

Untersuchungen zur Aktivierung des RET Tyrosinkinase-Rezeptors
mit seltenen MEN 2A/FMTC-assoziierten Mutationen in der
extrazellulären und intrazellulären Domäne
in der Mäusefibroblasten-Zelllinie NIH3T3
und der humanen neuroektodermalen Tumorzelllinie SK-N-MC

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Dorit Hella Arlt
aus Hamburg

Hamburg 2001

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. Höppner

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. L. Renwantz

Tag der Disputation: 25. Januar 2002

Hamburg, den 20. Dezember 2001



A handwritten signature in dark ink, appearing to read "U. Wienand". The signature is fluid and cursive.

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	V-VI
1	Einleitung.....	1-15
1.1	Tyrosinkinasen.....	1
1.2	Durch Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgelöste Signalwege.....	2
1.3	Tyrosinkinasen und ihre Bedeutung bei der Onkogenese.....	4
1.4	Das RET-Protoonkogen und sein Genprodukt.....	5
1.5	Die gewebespezifische Expression des RET-Rezeptors.....	6
1.6	Aktivierung des RET-Rezeptors.....	6
1.7	Signaltransduktion des RET-Rezeptors.....	8
1.8	Mutationen im RET-Protoonkogen und damit assoziierte Krankheiten.....	9
1.9	Pathomechanismus der klassischen Mutationen.....	12
1.10	Molekulare Diagnostik der MEN 2.....	13
1.11	Ziel der Arbeit.....	15
2	Material und Methoden.....	16-48
2.1	Materialien und Geräte.....	16-27
2.1.1	Verwendete Chemikalien und Substratlösungen.....	16
2.1.2	Verwendete Puffer und Lösungen.....	19
2.1.3	Verwendete Antikörper.....	22
2.1.4	Zelllinien.....	23
2.1.5	Sonstige Materialien und Geräte.....	24
2.1.6	Verwendete Kits.....	26
2.2	Methoden des Ergebnisteils A.....	28-42
2.2.1	Molekularbiologische Arbeiten.....	28
2.2.2	Zellkulturtechnik.....	34
2.2.3	Proteinchemische Analysen.....	36
2.2.4	Transformationsassays.....	42

2.3	Methoden des Ergebnisteil B.....	43-38
2.3.1	Verwendung von Datenbanken.....	43
2.3.2	Molekularbiologische Arbeiten.....	44
2.3.3	Proteinchemische Analysen.....	47
2.3.4	Zellkulturtechnik.....	47
3	Ergebnisse.....	49-81
3.1	Ergebnisteil A.....	49-68
3.1.1	Sequenzierung der mutierten Region in Exon 13 im Vergleich zur wt-Sequenz.....	49
3.1.2	Überprüfung der ligandenunabhängigen Dimerisierung des RET-Rezeptors mit den eingefügten Mutationen.....	50
3.1.3	Überprüfung der ligandenunabhängigen Phosphorylierung der Tyrosinreste in der Kinase-Domäne des RET-Rezeptors bei den Mutationen in der extrazellulären Domäne.....	52
3.1.4	Untersuchung der in der Zellmembran vorhandenen RET-Monomere.....	55
3.1.5	Überprüfung der ligandenunabhängigen Tyr-Phosphorylierung der RET-Tyrosinkinase bei den Mutationen in der intrazellulären Domäne.....	56
3.1.6	Untersuchung der kopräzipitierten Phosphotyrosin-Proteine.....	58
3.1.7	Bindung von GRB2 an den RET-Rezeptor.....	61
3.1.8	Bindung von PLC- γ an den RET-Rezeptor.....	63
3.1.9	Veränderung der Morphologie transfizierter NIH 3T3-Zellen.....	64
3.1.10	Überprüfung der transformierenden Eigenschaften der RET-Mutationen im Poly-HEMA-Assay.....	65
3.1.11	Soft-Agar-Experimente.....	68
3.2	Ergebnisteil B.....	69-81
3.2.1	Überprüfung der RET-Expression bei SK-N-MC-Zellen und Kelly-Zellen.....	69
3.2.2	Vergleich der Expression der RET-Liganden GDNF und NTN.....	70
3.2.3	Vergleich der Expression der RET-Korezeptoren GFR- α 1 und GFR- α 2.....	71
3.2.4	Überprüfung der ligandenunabhängigen Dimerisierung der Mutationen in Exon 13.....	71
	Veränderung der Morphologie transfizierter SK-N-MC-Zellen.....	73
3.2.5	Vergleich der Proliferation zwischen transfizierten- und nicht-transfizierten Zellen.....	74
3.2.6	Sequenzvergleich der RET-Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies.....	76
3.2.7	Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen der Kinase-Domänen verschiedener humaner Tyrosinkinase-Rezeptoren.....	76
3.2.8	Lokalisation der Mutationen im Exon 13 des RET-Rezeptors.....	80

4	Diskussion.....	82-100
•	Ein zusätzliches Cystein in der cysteinreichen Domäne der extrazellulären Region resultiert in einer ligandenunabhängige Dimerisierung.....	83
•	Die Dimerbildung ist auf intermolekulare Disulfidbrücken zurückzuführen.....	85
•	Die MEN 2A/FMTC-assoziierten Mutationen Leu790Phe und Tyr791Phe in Exon 13 resultieren nicht in einer ligandenunabhängigen Dimerisierung.....	86
•	Die Duplikationen in Exon 11 führen zu einer erhöhten Phosphorylierung der Tyrosinreste im Protein.....	87
•	Rezeptoren mit den Mutationen in Codon 790 und Codon 791 zeigen Unterschiede in der Phosphorylierung von Tyrosinresten.....	88
•	Die Aminosäuren Leucin 790 und Tyrosin 791 haben Einfluss auf die N-Terminale Struktur des RET-Rezeptors.....	89
•	Die Bindung von pTyr-Proteinen an den RET-Rezeptor unterscheidet sich bei den untersuchten Mutationen.....	90
•	Die Rezeptoren mit verschiedenen Mutationen unterscheiden sich in der Bindung von GRB2.....	91
•	Extrazelluläre und intrazelluläre Mutationen führen zu charakteristischen Veränderungen der Zell-Morphologie.....	92
•	Eine transformierende Wirkung lässt sich nur für die +9bp-transfizierten Zellen eindeutig nachweisen.....	93
•	Beurteilung des gewählten in vitro-Modells.....	95
•	Die RET-transfizierten SN-N-MC-Zellen bilden ein autokrines System.....	96
•	Die Morphologie der SK-N-MC-Zellen wird durch die Transfektion mit dem RET-Rezeptor verändert.....	97
•	Die transfizierten SK-N-MC-Zellen zeigen Mutations-spezifische Veränderungen der Wachstumsraten.....	99
•	Ausblick.....	99
5	Abkürzungsverzeichnis.....	101-103
6	Glossar.....	104

7	Literaturverzeichnis.....	105-110
8.	Anhang.....	110-111
•	Danksagung.....	110
•	Lebenslauf.....	111

1 Einleitung

1.1 Tyrosinkinasen

Die Protein-Tyrosinkinasen besitzen im Organismus eine Bedeutung bei der Regulation von Wachstum, Differenzierung, Adhäsion, Motilität und Zelltod. Es handelt sich bei diesen Proteinen um Phosphotransferasen, die als Akzeptor Hydroxylgruppen von Tyrosin-Resten in Substrat-Proteinen phosphorylieren. Zwei Klassen von Tyrosinkinasen lassen sich unterscheiden. Die Rezeptor-Tyrosinkinasen sind Transmembran-Proteine, die im extrazellulären Bereich eine Liganden-Bindungsdomäne besitzen und intrazellulär eine Tyrosinkinase-Region aufweisen. Ligandenbindung induziert bei vielen dieser Rezeptoren eine Dimerisierung oder Oligomerisierung, welche zur Konformationsänderung in der cytoplasmatischen Tyrosinkinase-Region führt. In der Folge kommt es zur Autophosphorylierung der Rezeptoren und zur Auslösung intrazellulärer Signalwege. Die bisher achtundfünfzig identifizierten humanen Rezeptor-Tyrosinkinasen sind aufgrund von Sequenzhomologien in der Kinase-Domäne in zwanzig Subfamilien eingeteilt (Robinson et al., 2000). Viele Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren und Hormone vermitteln ihre Effekte über Rezeptor-Tyrosinkinasen.

Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen sind cytoplasmatische Proteine, die zum Teil an Transmembran-Rezeptoren binden und auf diese Weise extrazelluläre Signale vermitteln (Abb. 1). Andere cytoplasmatische Tyrosinkinasen werden durch Adhäsion, Calcium-Influx oder durch Zell-Zyklus-assoziierte Signale aktiviert, ohne dass eine unmittelbare Verbindung zu Transmembran-Rezeptoren nachgewiesen ist. Im menschlichen Genom sind zweiunddreißig Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen identifiziert, die sich in zehn Subfamilien gliedern (Robinson et al., 2000).

Bei Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen induziert deren Aktivierung eine Kaskade von Phosphorylierungen (Abb. 1). Dazu gehören Autophosphorylierung und Phosphorylierung cytoplasmatischer Substrate. Die Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste ermöglicht die Bindung von Proteinen mit SH2- und PTB-Domänen. Dies resultiert wiederum in der Aktivierung weiterer Proteine, deren Signale in den Zellkern übermittelt werden und die Expression spezifischer Gene induzieren. Ausserdem wird die Produktion von Second Messenger-Molekülen ausgelöst, die der Signalverstärkung dienen. Wichtige Regulatoren der Signaltransduktion sind Phosphotyrosin-Phosphatasen mit SH2-Domänen. Sie interagieren mit den Tyrosinkinase-Rezeptoren, dephosphorylieren Tyrosinreste und sind somit an der Regulation mitogener Signale beteiligt.

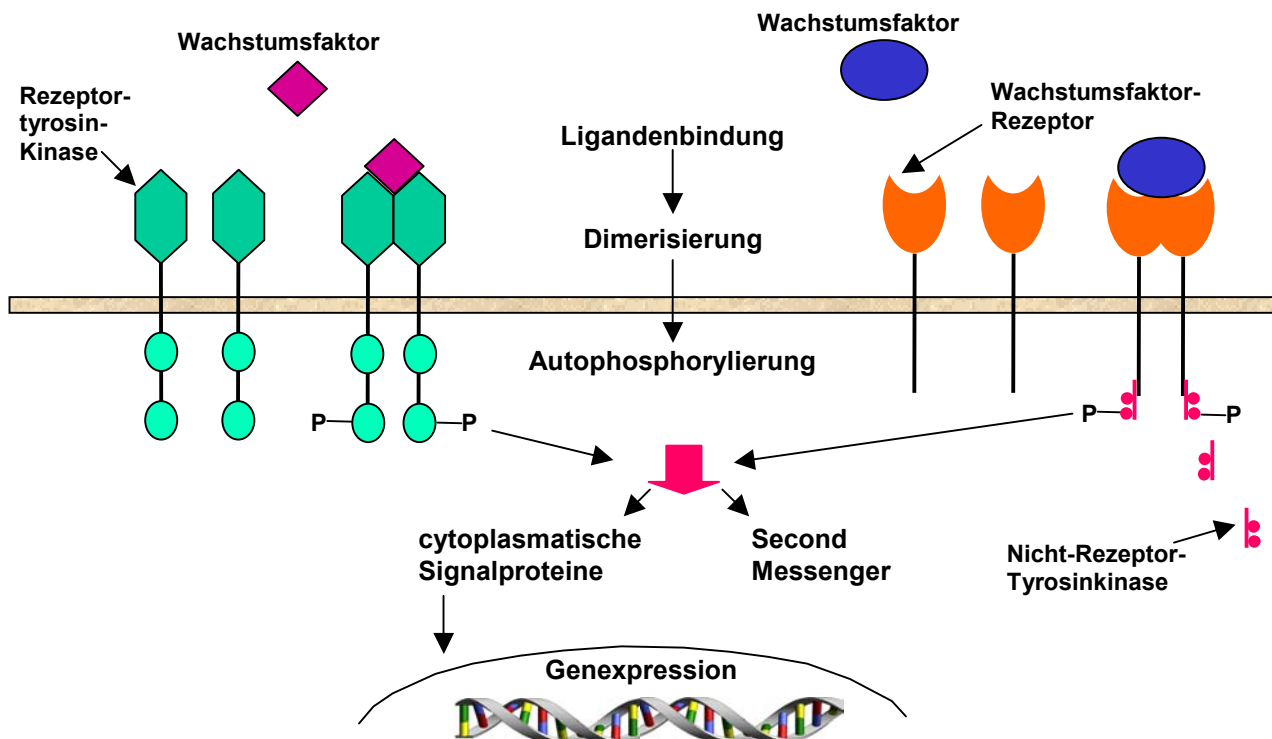


Abb. 1: Prinzip der Signaltransduktion, ausgelöst durch Tyrosinkinasen.

1.2 Durch Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgelöste Signalwege

Die meisten Tyrosinreste, die nach der Aktivierung autophosphoryliert werden, sind in der nicht-katalytischen Region des Rezeptors lokalisiert (Schlessinger, 2000). Daran binden unterschiedliche Signalproteine, von denen einige eine enzymatische Aktivität besitzen. Dazu gehört eine grosse Familie von Proteinen mit SH2-Domänen wie SRC-Kinasen (PTK-Aktivität), SHP2 (Phosphatase-Aktivität) oder PLC- γ (Phospholipase-C-Aktivität). Andere Proteine mit SH2- oder SH3-Domänen dienen lediglich als Adapter (z. B. GRB2, NCK, CRK, SHC). Sie vermitteln Bindungen zu Proteinen, die in die Signaltransduktion involviert sind. Einige Adaptor-Proteine besitzen PTB-Domänen, die für die komplexe Formation mit einer Reihe von Rezeptoren verantwortlich sind. Zu diesen Proteinen gehört z.B. SHC, welches außerdem mit seiner SH2-Domäne an aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK's) bindet und so wiederum das Protein GRB2 koppelt. Als Folge wird die MAP-Kinase-Kaskade aktiviert. In Abbildung 2 sind die wichtigsten Signalwege, die durch Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgelöst werden können, zusammengefasst. Alle bekannten RTK's stimulieren den Austausch von GTP zu GDP durch Ras. Dieses wird möglich, wenn das Adapter-Protein

GRB2 mit seiner SH2-Domäne an einen phospho-Tyrosinrest (pTyr-Rest) bindet, mit der SH3-Domäne den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sos bindet, und diesen somit in räumliche Nähe des Membran-assoziierten Ras bringt. Ras wiederum interagiert mit einigen Effektor-Proteinen wie Raf, Cdc42 und PI-3 Kinase (PI3K). Raf aktiviert den MAPK-Signalweg, welcher zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt.

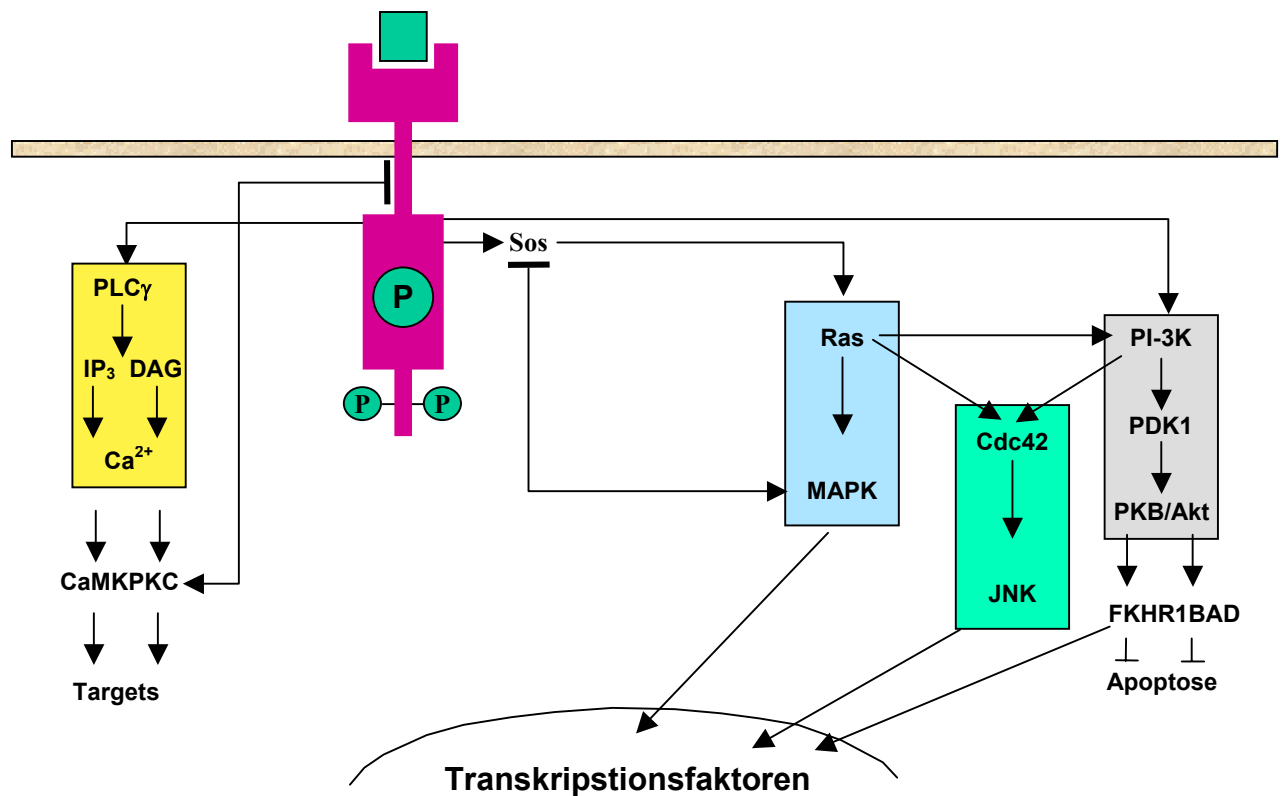


Abb. 2: Signalwege, die durch aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgelöst werden.

Die Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste im Rezeptor hat die Bindung und Aktivierung von PLC- γ zur Folge. Dies führt zur Hydrolyse von Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (Ptd-Ins(4,5)P₂) und es entstehen Diacylglycerol (DAG) und Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (Ins(1,4,5)P₃). DAG wirkt als Second Messenger und wirkt spezifisch auf die Proteinkinase C, die unterschiedliche Proteine an Threonin- und Serinseitenketten phosphoryliert. Ins(1,4,5)P₃ hat ebenfalls Second Messenger-Funktion und bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration.

PI3-Kinase (PI3K) bildet ebenfalls einen Komplex mit pTyr-Resten aktivierter RTK's. Dies führt zur Produktion der Second-Messenger Ptd-Ins(3,4)P₂ und Ptd-Ins(3,4,5)P₃. Ptd-Ins(3,4,5)P₃ vermittelt die Membranlokalisation von Signalproteinen wie PDK1 und

PKB/Akt, was für deren Aktivierung notwendig ist. Die Aktivierung von PKB führt zur Phosphorylierung von BAD, wodurch Apoptose inhibiert wird. Außerdem wird der Transkriptionsfaktor FKHR1 und die Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) aktiviert.

1.3 Tyrosinkinase und ihre Bedeutung bei der Onkogenese

Tyrosinkinase spielen eine zentrale Rolle bei der malignen Transformation. Viele von ihnen gehören zu Protoonkogenen, die durch aktivierende Mutationen zu Onkogenen werden und zur neoplastischen Transformation der Zelle beitragen. Entdeckt wurden die Onkogene zunächst in Retroviren. 1970 wurde erstmals postuliert, dass im Genom des Rous-Sarkom-Virus, welches in Hühnern die Bildung von Sarkomen auslöst, ein Gen enthalten ist, dass Zellen transformieren kann (Duesberg et al., 1970). Dieses Gen wurde *Src* (Abkürzung für Sarcoma) genannt. Das Genprodukt ist die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase SRC. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Gen auch in normalen Hühnerzellen vorkommt. Dies wies darauf hin, dass nicht die Existenz des Gens, sondern Mutationen oder Veränderungen in der Expression für das onkogene Potential verantwortlich sind. Das Gen selbst wird in diesem Fall als Protoonkogen, die transformierende Form als Onkogen bezeichnet. In menschlichen Tumoren konnten bisher keine Mutationen in Mitgliedern der SRC-Kinase-Familie nachgewiesen werden.

Genetische Veränderungen in Protoonkogenen, die für Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität codieren, sind häufig bei der Entartung von Zellen involviert (Tabelle 1). Amplifikationen, Überexpression, oder somatische Mutationen resultieren in einer höheren Rezeptoraktivität, was zum Kontrollverlust der unter normalen Umständen fein regulierten Proteinphosphorylierung in den Zellen führt.

Tabelle 1: Onkogene, die für Rezeptor-Tyrosinkinase kodieren

Gen	Genprodukt	Genetische Veränderungen in menschlichen Tumoren	Literatur
<i>ERBB</i>	EGF-Rezeptor	Amplifikation	Collins et al., 1993
<i>ERBB-2</i>	ERBB-2	Amplifikation	Gullick et al., 1990
<i>PDGFR β</i>	PDGF-Rezeptor β	Rekombination	Golub et al., 1994
<i>RET</i>	RET	Rekombination/ Punktmutation	Takahashi et al., 1985 Mulligan et al., 1993
<i>MET</i>	MET	Amplifikation	Fischer et al., 1995
<i>TRK</i>	NGF-Rezeptor	Rekombination	Greco et al., 1992

Es sind viele onkogene Mutationen für Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität beschrieben, bei denen als Konsequenz eine konstitutive Dimerisierung und Aktivierung zur Transformation der Zellen führt (Rodrigues et al., 1994).

1.4 Das RET-Protoonkogen und sein Genprodukt

Das *RET*-Gen ist auf Chromosom 10q11.2 lokalisiert und besteht aus 21 Exons (Takahashi et al., 1988). Es codiert für einen Tyrosinkinase-Rezeptor (Abb. 3) der in der extrazellulären Domäne neben der Ligandenbindungsregion eine Cadherin-ähnliche Sequenz und eine cysteinreiche Region besitzt. Die Cadherin-ähnliche Sequenz bindet Ca^{2+} -Ionen, was für den Transport des Proteins zur Zellmembran (van Weering et al., 1998) und zur Aktivierung durch den Liganden von Bedeutung ist (Nozaki et al., 1998). Die Cysteinreste der cysteinreichen Region erlauben die Bildung intramolekularer und intermolekularer Disulfidbrücken und sind so an der Ausbildung der Struktur des Rezeptors sowie an der Signalübertragung beteiligt. An die cysteinreiche Region schließt sich die Transmembran-Domäne an. Intrazellulär besitzt der RET-Rezeptor zwei Tyrosinkinase-Domänen, die von einer Kinase-Insert-Region voneinander getrennt sind (Pasini et al., 1997). Durch alternatives Spleißen am 3'-Ende entstehen drei Isoformen, die als *RET51* (long isoform), *RET43* (intermediate isoform) and *RET9* (short isoform) bezeichnet werden (Myers et al., 1995). Es sind zwei Proteinprodukte von 150 kDa und 170 kDa bekannt, die posttranskriptionell aus einem 120 kD-Protein durch unterschiedliche Glykosylierung entstehen (Chew et al., 1995). Das 150 kD-Protein ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und erscheint nach Prozessierung als 170 kD-Protein in der Zellmembran (Asai et al., 1995).

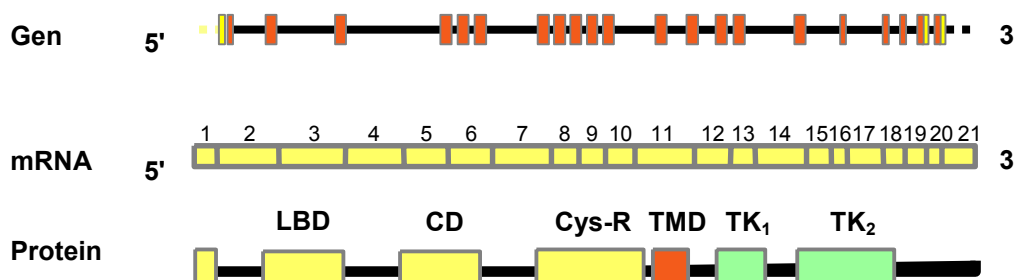


Abb. 3: Schematische Darstellung des *RET*-Gens, der daraus resultierenden mRNA und des Genproduktes. LBD: Ligandenbindungs-Domäne, CD: Cadherinähnliche-Sequenz, Cys-R: Cysteinreiche Region, TMD: Transmembrandomäne, TK₁: Tyrosinkinase-Domäne 1, TK₂: Tyrosinkinase-Domäne 2

Das *RET*-Gen wurde durch einen klassischen Transfektions-Assay als Onkogen identifiziert (Takahashi et al., 1985). Es sind einige Mutationen beschrieben, die mit der Entwicklung von drei autosomal dominant vererbbaeren Krebserkrankungen assoziiert sind. Diese stellen sich als Subtypen der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN 2) dar (Eng et al., 1996) (Tabelle 1). Die MEN 2-assoziierten Mutationen verwandeln *RET* in ein dominant transformierendes Gen. Es ist das erstbeschriebene dominant wirkende Onkogen mit transformierender Funktion bei einem erblichen Tumorleiden (Wagener, 1996).

1.5 Die gewebespezifische Expression des RET-Rezeptors

In Mäuseembryonen wird RET im sich entwickelndem zentralen und peripheren Nervensystem, sowie im sich entwickelndem Nierengewebe exprimiert (Pachnis et al., 1993; Avantsgiato et al., 1994). Experimente mit Knockout-Mäusen zeigten, dass der Verlust beider *RET*-Allele eine Dysplasie der Nieren und ein Fehlen der Darmganglien zur Folge hat (Schuchardt et al., 1994). Die Mäuse sterben in der neonatalen Phase. Interessanterweise sind die C-Zellen der Schilddrüse und des Nebennierenmarks normal entwickelt. Im Menschen wird das RET-Protein im gesunden Gewebe des Nebennierenmarks, der C-Zellen sowie im Nervengewebe exprimiert (Nakamura et al., 1994). Auch in Tumoren, die sich von den Zellen des Neuroektoderms ableiten, wird der RET-Rezeptor exprimiert. Dazu gehören neben den medullären Schilddrüsenkarzinomen und den Phäochromozytomen auch die Neuroblastome (Santoro et al., 1990; Ikeda et al., 1990).

1.6 Aktivierung des RET-Rezeptors

Die funktionellen Liganden des RET-Rezeptors gehören zu den neurotrophischen Faktoren der Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor (GDNF)-Familie. Dazu gehören GDNF, Neurturin, Artemin und Persiphein (Durbec et al., 1996; Creedon et al., 1997, Baloh et al., 1998, Lindahl et al., 2001). Diese Faktoren vermitteln als Dimere Signale in den Zellkern. Dies geschieht über die Bildung von Multirezeptorkomplexen (Abb. 4), die zwei RET-Rezeptoren und zwei GPI-verankerte Korezeptoren einschließen (Treanor et al., 1996). Als Korezeptoren sind GFR- α 1 (Jing et al., 1996), GFR- α 2 (Baloh et al., 1997), GFR- α 3 (Worby et al., 1998) und GFR- α 4 (Lindahl et al., 2001) bekannt. Die unterschiedlichen Korezeptoren vermitteln die Bindung der Liganden GDNF, Neurturin, Artemin und Persephin mit unterschiedlichen Affinitäten.

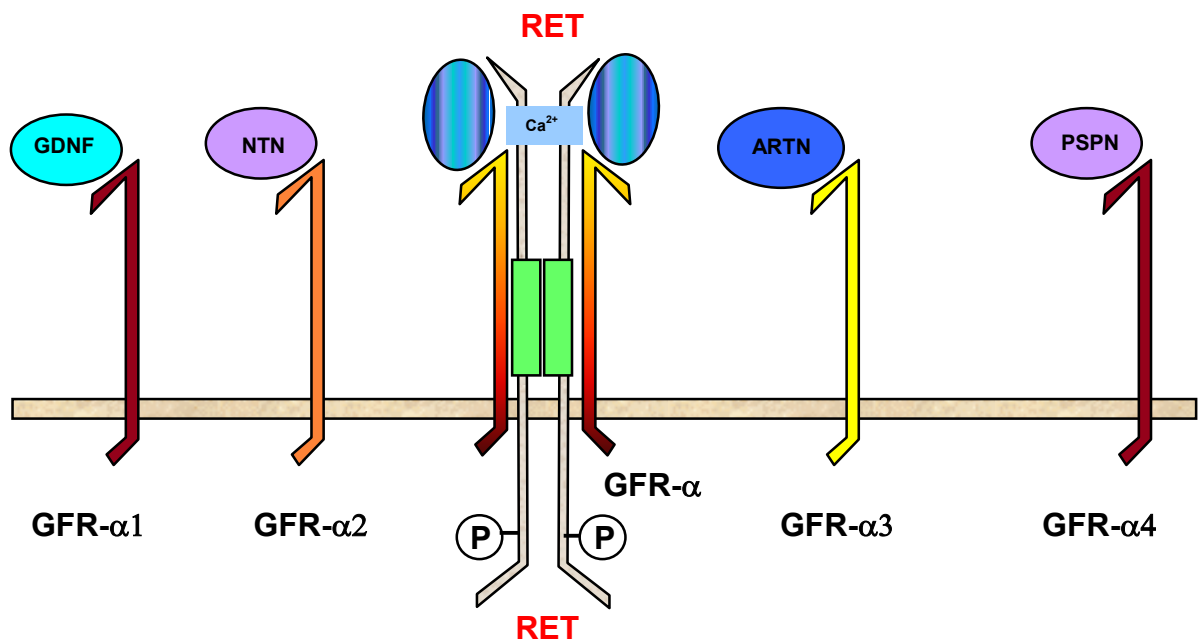


Abb. 4: Darstellung der an der Ausbildung des RET-aktivierenden Multirezeptorkomplexes beteiligten Komponenten

Während GDNF eine hohe Affinität zu GFR- $\alpha 1$ besitzt und mit geringer Affinität an GFR- $\alpha 2$ und GFR- $\alpha 4$ bindet, ist für Neurturin eine hohe Affinität zu GFR- $\alpha 2$ und eine geringere Affinität zu GFR- $\alpha 1$ und GFR- $\alpha 4$ gezeigt (Scott et al., 2001). Artemin bindet mit grosser Affinität an GFR- $\alpha 3$ und mit niedriger Affinität an die anderen Korezeptoren. Für Persiphein konnte bisher nur eine Bindung an GFR- $\alpha 4$ nachgewiesen werden (Milbrandt et al., 1998, Scott et al., 2001). Für GDNF und Neurturin ist gezeigt, dass die Auslösung von intrazellulären Signalwegen durch die Bildung des Multirezeptorkomplexes aus Liganden, Korezeptoren und RET-Rezeptoren Calcium-abhängig ist (Nozaki et al., 1998). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Ca^{2+} -Ionen für die Bindung des GDNF/Korezeptor-Komplexes an den RET-Rezeptor essentiell sind (Anders et al., 2001). Die Cadherin-ähnliche Sequenz in der extrazellulären Domäne des RET-Rezeptors ist für die Ca^{2+} -Bindung verantwortlich. Der aktivierte RET-Rezeptor löst nachweislich unterschiedliche Signalwege unabhängig voneinander aus.

1.7 Signaltransduktion des RET-Rezeptors

Die cytoplasmatische Domäne des RET-Rezeptors (Long Isoform) enthält achtzehn Tyrosinreste (Jhiang et al., 2000).

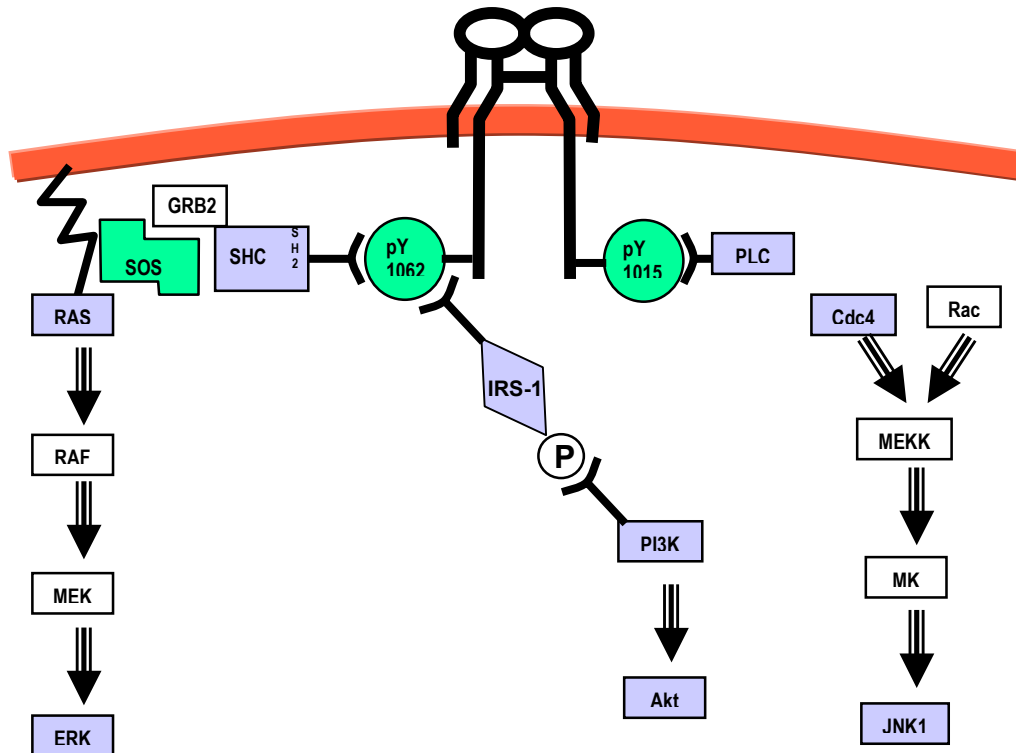


Abb. 5: Zusammenfassung der durch den Multirezeptorkomplex ausgelösten Signalwege. Die Aktivierung der hier blau dargestellten Komponenten wurde direkt in unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen.

Davon befinden sich zwei in der juxtamembranen Region (Tyr 660 und Tyr 687), vier in der TK1-Domäne (Tyr 752, Tyr 791, Tyr 806 und Tyr 809), einer in der Kinase-Insert-Region (Tyr 826), sechs in der TK2-Domäne (Tyr 864, Tyr 900, Tyr 905, Tyr 928, Tyr 952 und Tyr 981), sowie fünf in der C-terminalen Region (Tyr 1015, Tyr 1029, Tyr 1062, Tyr 1090 und Tyr 1096). Bei der Short Isoform des Rezeptors fehlen die Tyrosinreste Tyr 1090 und Tyr 1096. Die Tyrosinreste im C-Terminus sind im aktivierten Zustand Bindungsdomänen für PLC- γ (pTyr 1015), SHC (pTyr 1062) und GRB2 (pTyr 1090 und pTyr 1096). Das SHC-Protein interagiert nach Autophosphorylierung des Tyrosinrestes 1062 (Y1062) im RET-Protein (Asai et al., 1996) über seine Phosphotyrosin-Bindestelle (PTB) sowie über seine SH2-Domäne mit der intrazellulären Tyrosinkinase (Lorenzo et al., 1997). pTyr 905 bindet Grb10. Abbildung 5 zeigt die bisher beschriebenen Signalwege, die durch den aktivierten RET-Rezeptor nachgewiesen wurden. Dabei sind die Untersuchungen in verschiedenen

Zelllinien durchgeführt worden. Es wurde die Ras-vermittelte Aktivierung von ERK2 (Santoro et al., 1994; van Weering et al., 1995), die Cdc42 vermittelte Aktivierung von JNK's (Chiariello et al., 1998), sowie die Aktivierung der Phospholipase C- γ (Santoro et al., 1994; Borello et al 1996) und der PI3K und Akt (van Weering et al., 1997) nachgewiesen.

Die Isoformen RET51 (L-Isoform) und RET9 (S-Isoform) weisen Unterschiede bei der Bindung des SHC-Proteins auf (Lorenzo et al., 1997). Während bei RET9 SH2 und PTB an der Y1062 Domäne binden, besitzt die RET51-Isoform für die SH2-Sequenz eine zusätzliche Bindungsstelle. Dies hat zur Folge, dass SHC bei der Expression der L-Isoform durch höhere Phosphorylierung stärker aktiviert wird. In vitro-Versuche weisen darauf hin, dass auch bezüglich der Interaktion zwischen RET und GRB2 Unterschiede zwischen den beiden Isoformen bestehen (Alberti et al., 1998). RET51 tritt über die beiden Tyrosinreste 1090 und 1096 mit der cytoplasmatischen Kinasedomäne direkt mit der SH2-Region des GRB2 in Verbindung. RET9 besitzt diese beiden Reste nicht und es konnten auch keine anderen GRB2-Bindungsstellen identifiziert werden. Die Assoziation mit RET erfolgt indirekt über das Adaptorprotein SHC.

1.8 Mutationen im RET-Protoonkogen und damit assoziierte Krankheiten

Keimbahnmutationen, bei denen heterozygote Missense-, Nonsense-, Frameshiftmutationen, Splice-Site-Deletionen und Rearrangements zur Geninaktivierung führen, sind für die Hirschsprung-Krankheit (HSCR) beschrieben (Mak et al., 1996). Sie ist durch eine neonatale Gastrointestinal-Obstruktion, das Auftreten eines Megacolon und durch eine Aganglionose im Dickdarm charakterisiert

Somatische Rearrangements, bei denen die cytoplasmatische Domäne des Rezeptors mit einem nicht verwandten Genabschnitt rekombiniert ist, treten in papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC, Papillary Thyroid Carcinoma) auf (Grieco et al., 1990). Die resultierenden Fusionsproteine sind im Cytoplasma lokalisiert und die RET-Tyrosinkinase ist konstitutiv aktiviert (Borello et al., 1994).

Keimbahnmutationen, bei denen heterozygote Missense-Mutationen im *RET*-Gen zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors bzw. zu einer Änderung der Tyrosinkinase-Aktivität führen, sind mit der autosomal dominant vererbaren Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 2 assoziiert (Mulligan et al., 1993). MEN 2A ist durch das Auftreten medullärer

Schilddrüsenkarzinome (in ca. 95 % der Fälle), Phäochromozytomen (in ca. 50 % der Fälle) und primären Hyperparathyroidismus (in ca. 20 % der Fälle) charakterisiert (Abb.6).

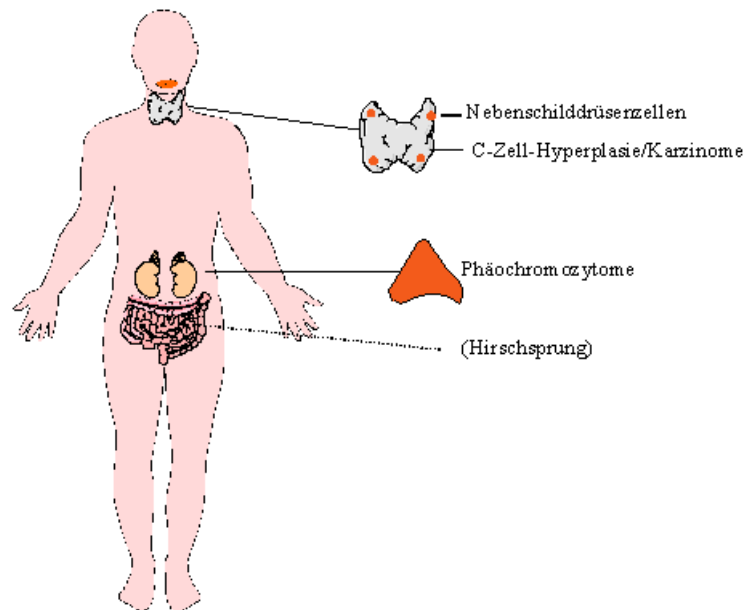


Abb. 6: Endokrine Organe, die bei der MEN 2A betroffen sind.

Bei MEN 2B (Abb. 7) treten neben medullären Schilddrüsenkarzinomen (in allen Fällen), und Phäochromozytomen (in ca. 50 % der Fälle) auch mukosale Neurome (in allen Fällen) und Ganglioneuromatosen (in ca. 40 % der Fälle) auf (Morrison and Nevin, 1996). Das C-Zellkarzinom dieses Subtyps stellt die aggressivste Form mit schlechter Prognose dar.

Beim Familiar Medullary Thyroid Carcinoma (FMTC) stellt das medulläre Schilddrüsenkarzinom das einzige Symptom dar. In Tabelle 2 sind die MEN2/FMTC-assoziierten Mutationen aufgeführt.

Bei MEN 2A wird in den meisten Fällen eins von fünf Cysteinocodons in Exon 10 oder Exon 11 durch eine Punktmutation in ein anderes Codon umgewandelt (siehe Tabelle 2). Dieser Bereich des Gens codiert für die cysteinreiche Domäne des Rezeptors. Die häufigste Mutation betrifft das Codon 634 im Exon 11 mit 66% der Fälle (Eng et al., 1996). Die TGC => CGC-Mutation (Cys634Arg) tritt am häufigsten auf (52,1%), gefolgt von der TAC- (Cys634Tyr, 26,9%) und GGC-Mutation (Cys634Gly, 9,5%). Die anderen Codons liegen an Position 609, 611, 618 und 620 in Exon 10. Einige Mutationen sind mit bestimmten Phänotypen der MEN 2A assoziiert (Eng et al., 1996/ Tabelle 2). Die Mutationen im Codon 634 sind neben dem Auftreten des MTC mit Phäochromozytomen assoziiert, der Aminosäureaustausch ist dabei

nicht von Bedeutung. Beim HPT ist ebenfalls eine Assoziation mit dem Codon 634 nachgewiesen, und zusätzlich eine Verbindung zwischen der Mutation C634R und HPT.

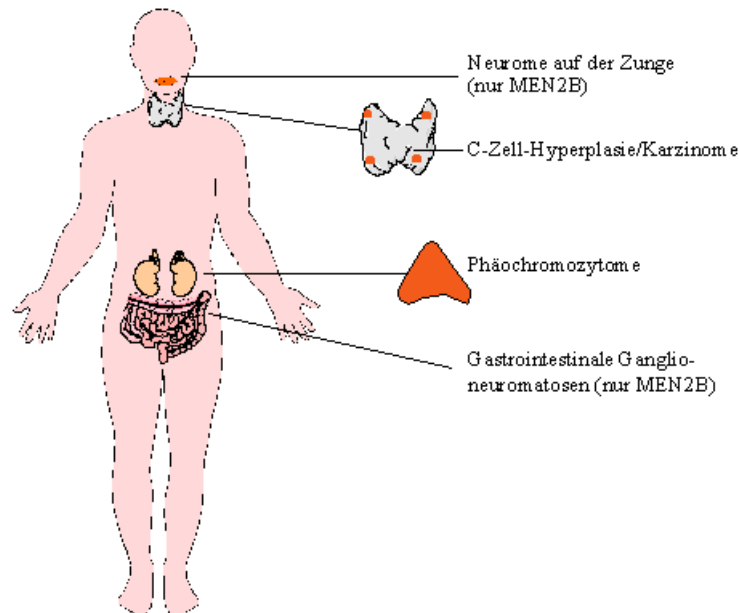


Abb. 7: Endokrine Organe, die bei der MEN 2B betroffen sind.

Tabelle 2: Die häufigsten Mutationen im RET Protoonkogen und der damit korrelierte Phänotyp bei deutschen MEN 2 Familien					
Exon	Codon	Lokalisation im Protein	Aminosäureaustausch	Phänotyp	Häufigkeit
10	609	cysteinreiche Domäne	Cys → x ¹	MEN 2A, FMTC	609 - 620 insgesamt 23%
	610		Cys → x	MEN 2A, FMTC	
	618		Cys → x	MEN 2A, FMTC	
	620		Cys → x	MEN 2A, FMTC	
11	634	cysteinreiche Domäne	Cys → x	MEN 2A	66%
13	768	TK1-Domäne	Gln → Asp	FMTC	< 1%
	790		Leu → Phe	MEN 2A, FMTC	790 und 791 insgesamt 8%
	791		Tyr → Phe	MEN 2A, FMTC	
14	804	TK1-Domäne	Val → Leu	FMTC	< 1%
			→ Met	FMTC	< 1%
	844		Arg → Leu	FMTC	< 1%
15	883	TK2-Domäne	Ala → Phe	MEN 2B	5%
	891		Ser → Ala	FMTC	< 1%
16	918	TK2-Domäne	Met → Thr	MEN 2B	95%
16	922	TK2-Domäne	Ser → Tyr	MEN 2B	5%

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

MEN 2B liegt eine Mutation im Codon 918 in Exon 16 zugrunde. Eine Basensubstitution (ATG => ACG) führt zum Austausch der Aminosäure Methionin in Threonin in der Tyrosinkinasedomäne (Carlson et al., 1994). Die selten vorkommenden Mutationen Ala883Phe und Ser922Tyr führen ebenfalls zum Phänotyp der MEN 2B.

Beim FMTC liegen die Mutationen häufig im selben Bereich wie bei der MEN 2A (Mak et al., 1996). Die am häufigsten mit dem FMTC assoziierte Mutation des Codons 634 ist der Austausch von TGC zu TAC (Cys634Tyr) (Eng et al., 1996). Im Gegensatz zur MEN 2A kommt es nur sehr selten zum Austausch von TGC zu CGC (Cys634Arg). Mutationen in Exon 13 und Exon 14 sind ebenfalls für das FMTC nachgewiesen (Tabelle 2). Basensubstitutionen in den Codons 790 und 791 des Exon 13 (Berndt et al., 1998) führen in seltenen Fällen auch zur MEN 2A. In beiden Fällen wird die Aminosäure des Wildtyps in Phenylalanin getauscht (Leu790Phe und Tyr791Phe). Auch bei einigen sporadischen MTC's ist das *RET*-Gen involviert. 40 - 60 % der sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinome weisen eine somatische Mutation in Exon 13, 14, 15 oder 16 des *RET*-Gens auf. Dabei sind die Mutationen im Exon 16 am häufigsten.

1.9 Pathomechanismus der klassischen Mutationen

Für die Mutationen in der cysteinreichen Domäne ist ligandenunabhängige Dimerisierung des Rezeptors durch die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken nachgewiesen (Santoro et al., 1995; Chappuis-Flament et al., 1998). Dies hat eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors zur Folge, die durch eine fortlaufende Autophosphorylierung zum Ausdruck kommt. Auch die Mutationen der Cysteine 609, 611, 618 und 620 führen zur ligandenunabhängigen Dimerisierung, doch ist aufgrund einer geringen Anzahl von Rezeptoren in der Zellmembran die Menge an Homodimeren niedriger als bei der Mutation in Codon 634 (Ito et al. 1997). Offenbar korreliert die Expression des mutierten RET-Rezeptors in der Plasma-Membran und die ligandenunabhängige Bildung und Aktivierung von RET-Homodimeren mit der Position der Mutation. Diese ist damit ausschlaggebend für die Stärke der Transformations-Aktivität, eine höhere Transformations-Aktivität wiederum ist assoziiert mit dem Auftreten des MEN 2A-Phänotypes mit Phäochromozytomen und pHPT. In einigen Familien führen Mutationen in Codon 618 und 620 zu MEN 2A und der Hirschsprung-Krankheit (HSCR) (Ponder and Smith, 1996). Nach Hypothese der Autoren wird die

biologische Aktivität des Rezeptors durch eine niedrige Expression des 170 kDa-Proteins in der Plasma-Membran derart geschwächt, dass während der Embryogenese keine Darmganglien gebildet werden und es zur Ausprägung der Hirschsprung-Krankheit kommt. In den C-Zellen reicht die Bildung von wenigen RET-Homodimeren jedoch aus, um transformierend zu wirken.

Im Vergleich zu den MEN 2A/FMTC-assoziierten Mutationen führen die MEN 2B assoziierten Mutationen nicht zur ligandenunabhängigen Dimerisierung (Santoro et al., 1995). Der Pathomechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde gezeigt, dass die Autophosphorylierung des Met918Thr-RET höher ist als beim wt-RET, aber deutlich niedriger als bei den Mutationen in Codon 634. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass durch die Mutation in Codon 918 die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 1062 im Vergleich zur MEN 2A-assoziierten Mutation in Codon 634 stärker ist (Salvatore et al., 2001) und es zu einer verstärkten Aktivierung der PI3K kommt (Murakami et al., 1999).

1.10 Molekulare Diagnostik der MEN 2

In der Vergangenheit wurde zur frühzeitigen Erkennung des Ausbruchs der Krankheit in betroffenen Familien ein biochemisches Screeningverfahren angewendet. Es basiert auf der erhöhten Pentagastrin-induzierten Stimulation von Calcitonin beim Vorliegen von C-Zell-Hyperplasien und/oder medullären Schilddrüsenkarzinomen (Scheuba et al., 1999). Diesem Test mußten sich alle Mitglieder von MEN 2A-Familien in etwa 6 bis 12 monatigen Abstand unterziehen.

In den letzten Jahren ist die molekulare Diagnostik für die Versorgung der MEN 2-Familien ein essentielles Kriterium zum therapeutischen Vorgehen geworden. In jeder betroffenen Familie wird heute zunächst bei einem Indexpatient die Mutation im RET-Protoonkogen ermittelt. Danach wird bei allen Verwandten das Vorliegen der Mutation überprüft. Die Genträger erkranken mit einer hohen Wahrscheinlichkeit an den Symptomen der MEN 2. Die präsymptomatische Ermittlung des Genträgerstatus ermöglicht als präventative Maßnahme eine prophylaktische Thyreoidektomie, die im Alter von 5 - 6 Jahren empfohlen wird, bei der MEN 2B hingegen schon im Säuglingsalter.

Die Molekulare Diagnostik der letzten Jahre hatte zur Folge, dass seltene MEN 2-assoziierte Mutationen detektiert wurden. In dem Labor von Prof. Höppner wurde eine neue Klasse von MEN 2A-assoziierten Mutationen gefunden. Es handelt sich dabei um Duplikationen einzelner Bereiche im Exon 11. Von besonderem Interesse ist, dass in diesen Fällen nicht ein

Cysteinrest verlorenggeht, sondern durch die Duplikation ein weiteres Cystein vorliegt. In einer MEN2A-Familie mit dem medullärem Schilddrüsenkarzinom, primären Hyperparathyreoidismus und Phäochromozytom wurde eine 9bp-Duplikation (Codon 634, 635 und 636) nachgewiesen (Höppner et al., 1997). Für eine Familie mit medulären Schilddrüsenkarzinom, einer ungewöhnlichen Häufung von pHPT und dem Fehlen von Phäochromozytomen ist eine 12 bp-Duplikation im Exon 11 nachgewiesen (Höppner et al., 1997). Die Insertion der duplizierten Sequenz erfolgt nicht im Leseraster, wodurch ein zusätzliches Histidincodon resultiert. Diese Art Mutationen sind offenbar selten, führen aber zu einem vergleichbaren Krankheitsbild wie die Punktmutationen in den Cysteinencodons. Auch die oben erwähnten Mutationen in Codon 790 und 791 (Tabelle 2) wurden in der Abteilung von Prof. Höppner als MEN 2A/FMTC-assoziierte Mutationen detektiert (Berndt et al., 1998). In Abbildung 8 sind zwei Stammbäume aus der der Publikation Berndt et al. gezeigt. Beim Stammbaum A handelt es sich um eine Familie mit der Mutation Leu790Phe. Es ist zu sehen, dass nicht alle Genträger auch klinische Symptome aufweisen.

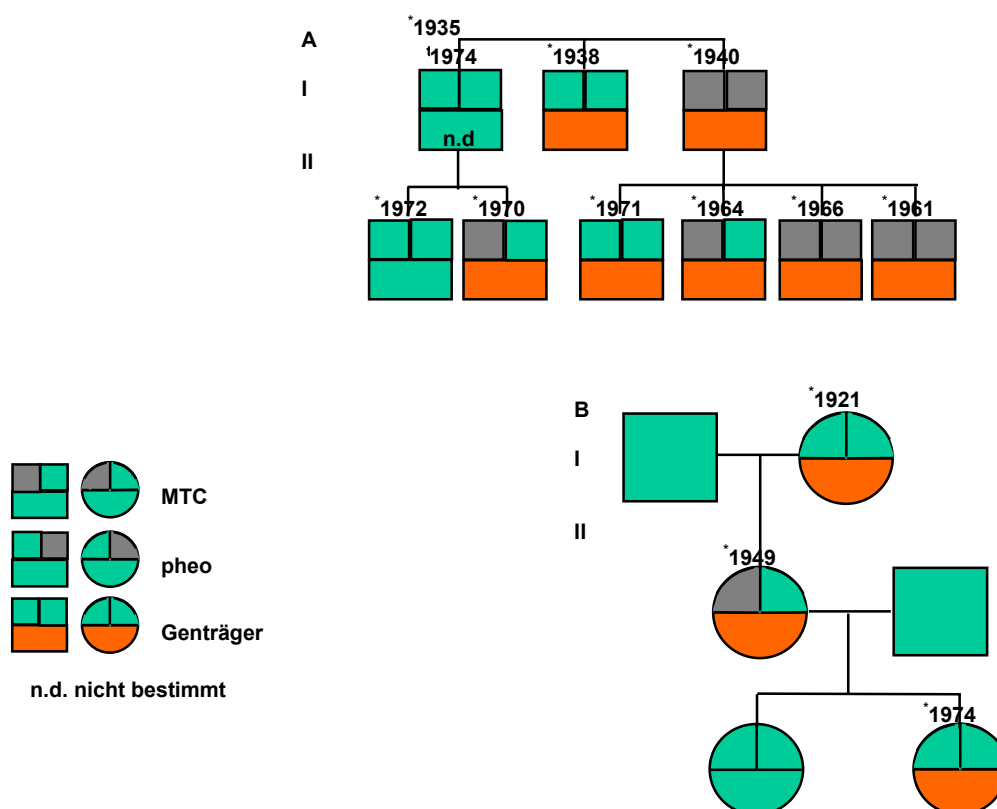


Abb. 8: Stammbäume von zwei Familien mit der Mutation Leu790Phe (Berndt et al., 1998).

In Generation I z.B. sind bei einer Person MTC und Phäochromozytome vorhanden, während beim zwei Jahre älteren Bruder weder ein MTC noch Phäochromozytome auftreten. In der zweiten Generation zeigen, bis auf eine Ausnahme, alle Genträger klinische Symptome der MEN 2A.

Beim Stammbaum B sind drei Generationen aufgeführt. Der Genträger aus der zweiten Generation zeigt den Phänotyp des FMTC, die Familienmitglieder aus Generation I und III weisen keine klinischen Symptome auf. Weitere Untersuchungen von betroffenen Familien mit Mutationen in Exon 13 bestätigen den variablen Phänotyp, doch gibt es mehr Familien mit FMTC. Des weiteren bestätigen sich die Aussagen der gezeigten Stammbäume insofern, dass nach Thyroidektomie bei Kindern teilweise C-Zell-Hyperplasien oder C-Zellkarzinome festgestellt werden, andererseits bei sehr viel älteren Genträgern keine Hinweise auf die Ausprägung der MEN 2A/FMTC-assoziierten klinischen Symptome vorhanden sind.

1.11 Ziel der Arbeit

Die Multiple endokrine Neoplasie Typ 2 (MEN2) und das Familiäre medulläre Schilddrüsenkarzinom (FMTC) sind hereditäre Krebserkrankungen, die autosomal dominant vererbt werden. Mutationen im *RET*-Protoonkogen, einem Tyrosinkinase-Rezeptor, führen zu einer konstitutiven Aktivierung des Genprodukts durch ligandenunabhängige Dimerisierung (MEN2A/FMTC) bzw. zu einer Änderung der Tyrosinkinase-Substratspezifität des als monomer aktiven Proteins (MEN2B).

1998 wurde von Berndt et al. ein neuer Hot Spot für Mutationen im *RET*-Protoonkogen beschrieben, der mit FMTC und MEN2A assoziiert ist. Er liegt in der Tyrosinkinase-Domäne TK1, die vom Exon 13 codiert wird. Betroffen sind die Codons 790 und 791, bei denen Basensubstitutionen zum Austausch der Aminosäuren Leucin bzw. Tyrosin in Phenylalanin führen. Diese Mutationen sind inzwischen in über 40 Familien oder Einzelpatienten von der Abteilung „Molekulare Diagnostik“ unter Leitung von Prof. W. Höppner nachgewiesen worden. Das Alter, in dem die Krankheit diagnostiziert wird, variiert bei den Mutationen in Exon 13 zwischen 21- und 64 Jahren. Offenbar führen diese Mutationen zu einer geringen Penetranz. Außerdem scheint der Phänotyp, der aus diesen Mutationen resultiert, im Hinblick auf Manifestationsalter und Malignität der Tumore variabel zu sein.

Um die Frage nach der onkogenen Potenz dieser Mutationen in Exon 13 zu beantworten, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob *in vitro* ein Pathomechanismus nachweisbar ist. Außerdem sollte für die während der molekularen Diagnostik detektieren Duplikationen in Exon 11 die transformierende Aktivierung untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Verwendete Chemikalien und Substratlösungen

Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung (Roth, Karlsruhe)

Agarose (Serva, Heidelberg)

Ammoniumpersulfat (Sigma, Steinheim)

Ampicillin (Life Technologies, Karlsruhe)

AMV Reverse Transkriptase (Roche, Mannheim)

Aprotenin (Sigma)

Borsäure (Merck, Darmstadt)

Bromphenolblau (Merck)

Calciumchlorid (Sigma)

Chloroform (Merck)

DMSO (Merck)

DNA-Längenstandard (Roche)

DTT (Sigma)

Dulbecco's Minimum Essential Medium, Glucose 4,5 g/l (Life Technologies, Karlsruhe)

EDTA (Sigma)

Essigsäure (Merck)

Ethanol (Merck)

Ethidiumbromid (Fluka, Neu-Ulm)

FBS (Life Technologies)

Ficoll (Merck)

Gelantine (Sigma)

Genitacin 418 (Roche)

Glucose (Sigma)

Glycerol (Merck)

Glycin (Sigma)

HCL (Merck)

HEPES (Sigma)

Isopropanol (Merck)

Kaliumchlorid (Merck)
Längenstandard 1kb (Roche)
LB-Agar (Life Technologies)
LB Broth Base (Life Technologies)
L- Glutamin (Life Technologies)
LOC-Medium (Life Technologies)
Magnesiumchlorid (Hybaid AGS, Heidelberg)
Magnesiumchlorid (Merck)
Marker VIII (Roche)
Minimum Essential Medium (Life Technologies)
MTT (Sigma)
NaAc (Perkin Elmer, Brüssel)
Natriumfluorid (Sigma)
Natriumchlorid (Sigma)
Natriumhydrogenphosphat (Sigma)
Natriumhydroxid (Merck)
Natriumvanadat (Sigma)
Nicht essentielle Aminosäuren (Life Technologies)
PBS-Puffer (Life Technologies)
Penicillin (Life Technologies)
PeqGOLD RNA Pur^M (Peqlab, Mannheim)
PMSF (Sigma)
Proteinstandard (BioRad, München)
Poly-HEMA (Sigma)
Ponceau (Sigma)
Probenpuffer nicht reduzierend (Roth, Karlsruhe)
Probenpuffer reduzierend (Roth)
Protein G-Agarose-Beads (Pierce, Rockford)
Proteinassay-Lösung (BioRad)
Rainbow recombinant protein molecular marker (Amersham Pharmacia, Freiburg)
Reaktionspuffer Reverse Transkriptase (Roche)
Reaktionspuffer Taq Polymerase (Roche)
RPMI 1640 (Life Technologies)
SDS (Serva, Heidelberg)

Stable Peroxidase Solution (Pierce)
Streptavidin-konjugierte Horseradish Peroxidase (Pierce)
Streptomycin (Life Technologies)
Sulfo-NHS-Biotin (Pierce)
SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution (Pierce)
Taq Polymerase (Roche)
TEMED (Sigma)
Tris (Sigma)
Triton X-100 (Merck)
Trypsin-EDTA-Lösung (Life Technologies)

2.1.2 Verwendete Puffer und Lösungen

TE-Puffer

10 mM Tris-HCL; pH 7,5

1 mM EDTA

10x TBE-Puffer

0,89 M Tris

0,89 M Borsäure

0,02 M EDTA

Minipräparation Lösung I

50 mM Glukose

10 mM EDTA

25 mM Tris/HCl pH 8,0

Minipräparation Lösung II

0,2 M NaOH

1% SDS

Probenpuffer

5 ml Glycerol

5 ml 1x TE-Puffer

0,25% Bromphenolblau

100µl 0,5 M EDTA; pH 8,0

Lysis-Puffer

100 ml ddH₂O

10 % Glycerol

1 % Triton-X-100

1,5 mM MgCl₂

50 mM HEPES pH 7,5

150 mM NaCl

1 mM EGTA

100 mM NaF
10 mM Na₂HPO₄

Elutionspuffer (10x)

1 M NaCl
0,025 M KCL
0,013 M CaCl₂
0,2 M HEPES

Waschpuffer

10 ml 10x Elutionspuffer
10 % TritonX-100
10 g Glycerol

Trenngel-Puffer (4x)

1,5 M Tris pH 8,8
0,4 % (w/v) SDS

Sammelgel-Puffer (4x)

0,5 M Tris pH 6,8
0,4 % (w/v) SDS

10 % APS

1 g Ammoniumpersulfat
10 ml ddH₂O

Probenpuffer (4x)

250 mM Tris-HCl
8 % SDS
40 % Glycerol
0,004 % Bromphenolblau

Tris-Glycerol-Elektrophorese-Puffer

0,125 M Tris pH 8,3

0,96 M Glycin

0,5 % SDS

Transferpuffer

25 mM Tris-HCl

192 mM Glycin

Ponceau S-Färbelösung

0,5 % Ponceau S

1 % Essigsäure

TBS-Puffer

20 mM Tris-HCl pH 7,5

500 mM NaCl

NET-Puffer (10x)

1,5 M NaCl

50 mM EDTA

0,5 % Triton-X-100

2,5 % (w/v) Gelantine

0,5 M Tris-HCl pH 7,4

NIH 3T3-Zell-Medium

Dulbecco's Minimum Essential Medium, Glucose 4,5 g/l

10% FBS

1% Penicillin

1% Streptavidin

SK-N-MC-Zell-Medium

Minimum Essential Medium
10% FBS
1% Penicillin
1% Streptavidin
1% Nicht essentielle Aminosäuren
1% L- Glutamin

TT-Zell-Medium

RPMI 1640
10% FBS
1% Penicillin
1% Streptavidin
1% L- Glutamin

Neuro 2A-Zell-Medium

Minimum Essential Medium
10% FBS
1% Penicillin
1% Streptavidin
1% Nicht essentielle Aminosäuren
1% L- Glutamin

Calcium-enthaltenden PBS

1x PBS
1,8 mM CaCl₂

2.1.3 Verwendete Antikörper

- Anti-RET (C-19), polyklonal, Kaninchen-IgG, 200 µg/ml (Santa Cruz, CA/USA)
- Anti-RET (C-19), polyklonal, Ziege-IgG, 200 µg/ml (Santa Cruz)
- Anti-Phosphotyrosin (PY-99) polyklonal, Maus IgG, 200 µg/ml (Santa Cruz)
- Anti-GRB2; monoklonaler Maus-IgG; 250 µg/ml (Dianova, Hamburg)
- Anti-PLC-γ; monoklonaler Maus-IgG; 250 µg/ml (Dianova)

- Anti-Kaninchen-IgG-HRP-konjugiert, 400 µg/ml (Dianova)
- Anti-Maus-IgG HRP-konjugiert, 900 µg/ml (Dianova)
- Anti-Ziege-IgG HRP-konjugiert, 400 µg/ml (Dianova)
- Anti-GDNF, polyclonal, Schaf-Antikörper (Chemicon, CA/USA)
- Anti-Neurturin, polyclonaler Schaf-Antikörper (Chemicon)

2.1.4 Zelllinien

In die Untersuchungen wurden folgende adhärente Zelllinien einbezogen:

Die Neuroblastom-Linie Neuro 2A (DSMZ, Braunschweig) wurde aus einem sporadischen Tumor einer Albinomaus etabliert (Olmstedt et al., 1970). Die Zellen zeigen eine Überexpression des wt-RET-Rezeptors (Ikeda et al., 1990). Die Mäusefibroblasten der Linie NIH 3T3 (DSMZ, Braunschweig) (Andersson et al., 1979) stammen aus einem murinen Embryo. Sie wachsen als Monolayer und sind kontaktinhibiert. Die Zellen dieser Linie exprimieren keinen RET-Rezeptor.

Die TT-Zellen wurden aus einem medullären Schilddrüsenkarzinom isoliert (Baier et al., 1990) und uns von Herrn Prof. Raue aus Heidelberg zur Verfügung gestellt. Sie sind heterozygot für die RET-Mutation C634W in Exon 11 (Santoro et al., 1995).

Die Zellen der humanen Linie SK-N-MC (DSMZ, Braunschweig) sind als supraorbitale Metastasen eines Neuroblastoms beschrieben worden (Biedler et al., 1973). Jedoch geht man heute aufgrund von genetischen und morphologischen Eigenschaften der Zellen davon aus, dass ein Askin's Tumor der ursprüngliche Tumor war (Dunn et al., 1994). In der aktuellen Literatur werden sie als Tumorzellen des Neuroepithels bezeichnet (van Weering et al., 1995). Die humane Zelllinie KELLY (DSMZ, Braunschweig) stammt aus einem Patienten mit Neuroblastom (Schwab et al., 1983). Die Zellen dieser Linie wachsen als Multilayer.

2.1.5 Sonstige Materialien und Geräte

1 ml, 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)

6-Well-Platten (Greiner)

15 ml und 50 ml Reaktionsgefäße (Greiner)

24-Well-Platte (Greiner)

50 ml Kulturflaschen (Greiner)

250 ml Kulturflaschen (Greiner)

Autoklav (Gössner, Hamburg)

Brutschrank (Heraeus)

CO₂-Wassermantel-Inkubator (Nuaire US Autoflow)

Drehrad (Reis)

Dreh-Schüttelapparat

Elektrophorese-Apparatur (Renner)

Elektroporator (BioRad, München)

Elisa-Reader (BioRad)

Röntgen-Film Entwicklungsgerät (Agfa)

Falcon Steril-Pipetten (Falcon)

Filtertubes 0,45 µm (Millipore, Bedford)

Flachbett-Agarosegelkammer (MWG)

Gewebekulturschalen (Nunc)

Hamillton-Pipette

Kühlzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)

Magnetrührer (Ikamag)

Microplate-Reader (BioRad, München)

Mikroskop (Wiloret, Wetzlar)

Mikrotiterplatte (Greiner)

Mikrowelle

Netzgerät für Elektrophorese (BioRad)

Nitrocellulosemembran 0,45 µm (BioRad, München)

Petrischalen (Nunc)

Photometer (Pharmacia, Biotech)

Plastikröhren (Sarstedt, Nürnberg)

Röntgenfilme (Fuiji)

Schüttler (Melsungen AG)

Sequencer (Abi Prism 377)
Sterilfilter (Millipore)
Thermocycler (Perkin Elmer)
Thermomixer (Eppendorf, Hamburg)
Tiefkühl-Gefäße (Nunc)
Trans-Blot Apparatur (BioRad, München)
UV-Leuchttisch (Biometra, Göttingen)
Wasserbad (GFL)
Videodokumentationsanlage
Whatman-Filterpapier (Schleicher und Schüll, Dassel)
Zellkulturbank (Heraeus Instruments)
Zellschaber (Greiner)
Zentrifuge (Heraeus Instruments)

2.1.6 Verwendete Kits

PCR-Mutagenese (Stratagene)

Komponenten:

PfuTurboTM DNA-Polymerase (2,5 U/μl)

10x Reaktionspuffer

Dpn I Restriktionsenzym (10 U/μl)

Oligonukleotid-Kontroll-Primer 1 (34mer, 100 ng/μl)

Oligonukleotid-Kontroll-Primer 2 (34mer, 100 ng/μl)

PWhitescriptTM 4,5 kb Kontrollplasmid (5 ng/μl)

dNTP Mix

Epicurian Coli XL1-Blue superkompetente Zellen

pUC18 Kontroll-Plasmid (0,1 ng/μl in TE-Puffer)

Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden)

Komponenten:

QIAGEN-tip 500

Puffer P1

Puffer P2

Puffer P3

Puffer QBT

Puffer QC

Puffer QF

RNase A

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, CA, USA)

Komponenten:

Terminator Ready Reaction Mix

- A-Dye Terminator, markiert mit Dichloro(R6G)
- C-Dye Terminator, markiert mit Dichloro(ROX)
- G-Dye Terminator, markiert mit Dichloro(R110)

- T-Dye Terminator, markiert mit Dichloro(TAMRA)
- Deoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dITP, dUTP)
- AmpliTaq DNA Polymerase, FS
- MgCl_2
- Tris-HCL-Puffer, pH 9,0

pGEM-3Zf(+) DNA Kontroll-Template

-21 M13 Kontrollprimer

QIAGEN Selector Kit

Komponenten:

SuperFect Transfektionsreagenz

Effectene Transfektionsreagenz

Enhancer

Puffer EC

2.2 Methoden des Ergebnisteils A

2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1.1 Generierung der mutierten cDNA

Zu Beginn der Arbeit stand die wt-cDNA der Short Isoform des *RET* kloniert in dem eukaryotischen Expressionsvektor pRC-CMV2 zur Verfügung. Aus vorherigen Arbeiten, die von Boris Baur in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Höppner durchgeführt wurden, ist für die im folgenden gezeigten Experimente die mutierte cDNA mit den Duplikationen von 9bp bzw. 12bp in Exon 11 des *RET*-Gens (Abb. 9) eingesetzt worden.

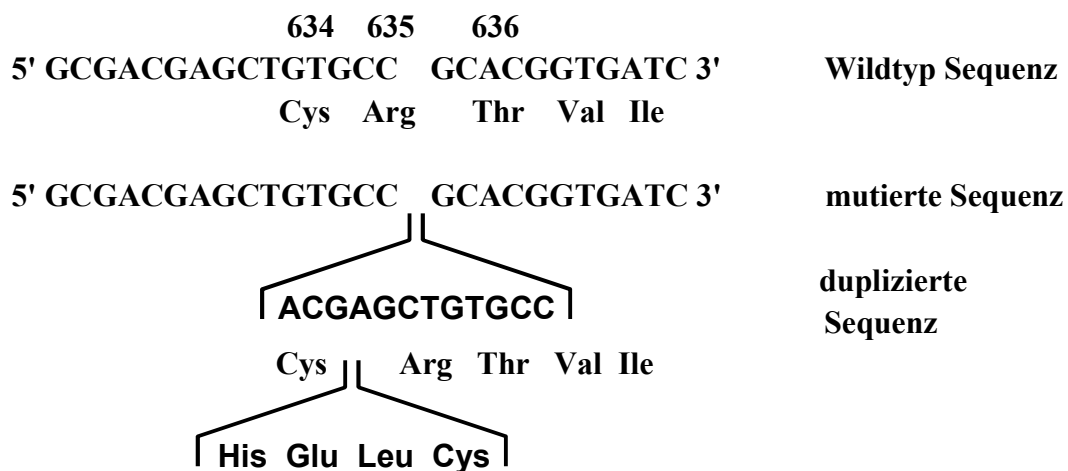
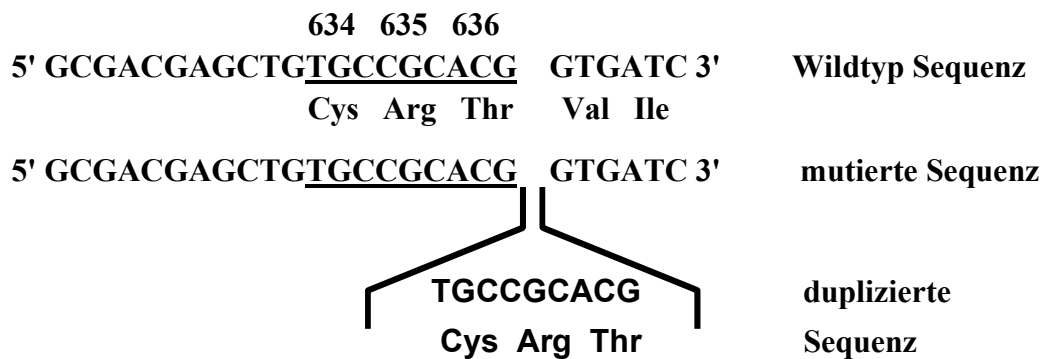


Abb. 9: Darstellung der Duplikationen in Exon 11 des *RET*-Protoonkogens.

2.2.1.2 PCR-Mutagenese

Die Einführung der Mutationen L790F und Y791F wurde mittels des QuikChange™-Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt (Komponenten des Kits siehe 2.1.6). In Abbildung 10 ist das Prinzip dieser Methode schematisch dargestellt.

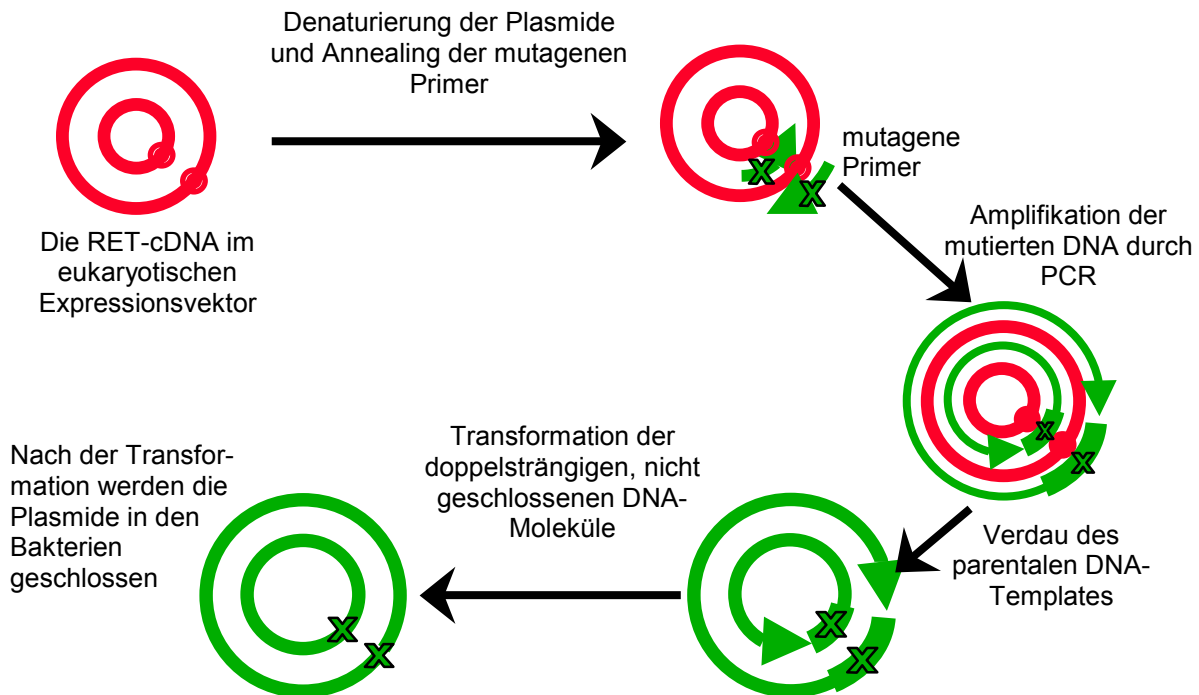


Abb. 10: Prinzip der PCR-Mutagenese mittels QuikChange™-Site-Directed Mutagenesis.

Folgende Primer wurden für die Amplifikation eingesetzt:

Forward-Primer für die Mutation im Codon 790 (die Base, die ausgetauscht wird, ist fett dargestellt)

Mut790F:

5'-CCACCCACATGTCATCAAATTTATGGGGCCTGCAGCCAGG-3'

Reverse-Primer für die Mutation im Codon 790 (die Base, die ausgetauscht wird, ist fett dargestellt)

Mut790R:

5'-CCTGGCTGCAGGCCCCATAAAATTTGATGACATGTGGGTGG-3'

Forward-Primer für die Mutation im Codon 791 (die Base, die ausgetauscht wird, ist fett dargestellt)

Mut791F:

5'-CCACCCACATGTCATCAAATTGTTTGGGGCCTGCAGCCAGG-3'

Reverse-Primer für die Mutation im Codon 791 (die Base, die ausgetauscht wird, ist fett dargestellt)

Mut791R:

5'-CCTGGCTGCAGGCCCA**AA**CAATTTGATGACATGTGGGTGG-3'

Der 50µl PCR-Ansatz enthielt 5µl Reaktions Puffer, 2µl dNTP's, 75ng DNA-Template und jeweils 250ng der entsprechenden Primer. Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf 49µl aufgefüllt und mit 1µl *PfuTurbo*TM-Polymerase versetzt. In einem Thermocycler wurde das gesamte Plasmid amplifiziert (Tabelle 3)

Tabelle 3: PCR-Programm für die Mutagenese:

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	30 Sekunden	1
95°C	30 Sekunden	12
55°C	1 Minute	
68°C	18 Minuten	

2.2.1.3 Überprüfung des Amplifikates mittels Flachbett – Elektrophorese

Zur Überprüfung des Amplifikates wurden jeweils 10µl des PCR-Ansatzes in 5µl Ladepuffer aufgenommen und auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Das Gel lief bei 80 V für eine Stunde in einer Flachbett-Agarosegelkammer mit 1x TBE-Puffer. Nach dem Lauf wurden die Fragmente auf einem UV-Leuchttisch überprüft. Die Größe der Amplifikate wurde mit einem 1kb Längenstandard verglichen.

Gießen des Agarosegels:

0,5g Agarose wurden mit 50ml 1x TBE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die gesamte Agarose gelöst hatte und keine Schlieren mehr sichtbar waren. In die auf 50°C abgekühlte Lösung wurde 1µl Ethidiumbromid gegeben und durch Schwenken mit der Lösung gemischt. Dann wurde das Gel in einem Gießstand mit zwei Kämmen gegossen.

2.2.1.4 Verdau des Amplifikates mit Dpn I

Die Plasmid-DNA aus dem Mutagenese-Ansatz wurde mit 1µl (10U/µl) des Restriktionsenzym Dpn I versetzt, das spezifisch die methylierte parenterale DNA verdaut. Die amplifizierte, mutationstragende DNA wird somit nicht geschnitten und auf diese Weise selektioniert. Das Gemisch aus PCR-Ansatz und Enzym wurde 60 min. bei 37°C im Thermomixer inkubiert.

2.2.1.5 Fällung der DNA aus den PCR-Ansätzen

Die DNA in den verbleibenden 40µl des PCR-Ansatzes wurde mittels einer Ethanol-Fällung gefällt.

Dazu wurde der Ansatz mit 4µl 3M NaAc und 100µl 96%igem Ethanol versetzt und anschließend gewhirlt. Nach der Lagerung bei -20°C für den Zeitraum von 30 Minuten, wurde der Ansatz 25 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das DNA-Pellet mit 250µl 70%igem Ethanol gewaschen, indem es kurz gewhirlt und erneut für 5 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Pellet luftgetrocknet. Abschließend wurde die DNA in 4µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.1.6 Gießen von LB-Agarplatten

32g LB-Agar wurden in 1l ddH₂O auf dem Magnetrührer gelöst und anschließend für 15 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Flüssigkeit auf 50°C wurden 50 mg steril filtrierte Ampicillin hinzugefügt. Dann wurden jeweils 20ml in eine Petrischale gegeben und bei 4°C gelagert.

2.2.1.7 Transformation

Die gefällte Plasmid-DNA aus der Mutagenese-PCR wurde für die Transformation von Epicurian Coli XL1-Blue superkompetenten Zellen verwendet.

Dazu wurden die bei -80°C gelagerten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und in 50µl aliquotiert, was einer Anzahl von ca. 5×10^6 entspricht. In jedes Aliquot wurden die gesamten 4 µl des gefällten Ansatzes pipettiert. Nachdem die Bakterien vorsichtig mit der DNA vermischt wurden, folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis. Zur Transformation wurden die E. coli in einem Thermomixer für 1 Minute bei 42°C inkubiert und anschließend sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt. Jeweils 500 µl auf 42°C erwärmtes LOC-Medium wurde zu den

Ansätzen gegeben, die anschließend 60 Minuten bei 37°C unter kräftigem Schütteln inkubiert wurden. 100 - 200µl des jeweiligen Ansatzes wurden auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Im Brutschrank wurden die Platten für 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.1.8 Ansetzen von LB-Medium

5 g LB Broth Base wurden in 250ml ddH₂O aufgenommen. Nach 15 minütigen autoklavieren kühlte das Medium auf 50°C ab, bevor es mit 12,5 mg Ampicillin versetzt wurde.

2.2.1.9 Minipräparation der Plasmide

Von den über Nacht inkubierten Agarplatten wurden einzelne Klone mit jeweils einer sterilen Pipettenspritze entnommen und jeder Klon in 2 ml LB-Medium bei 37°C über Nacht im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Jeweils 1,5 ml der über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wurden in ein gekühltes, steriles Reaktionsgefäß-Gefäß überführt und dann bei 4°C und 6.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 100µl Lösung I resuspendiert. Nach dem Whirlen wurden dann 200µl frisch angesetzte Lösung II und 200µl Chloroform zugefügt. Nach 1 Minute Inkubation des Gemisches auf Eis wurden 150µl 3M NaAc einpipettiert, und der Ansatz wurde gemixt. Es folgte eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C. Nach erfolgter Zentrifugation zeigte sich ein Dreiphasenprodukt. Die oberste, wässrige Phase mit der Plasmid-DNA wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daran schloß sich eine standardisierte DNA-Fällung an. 2 Volumina 96% Ethanol und 1/10 Volumen 3M NaAc wurden dafür zu der wässrigen Phase pipettiert, gewhirlt und bei 14.000 rpm und 4°C für 12 Minuten zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde 2-fach mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Das so aufgereinigte Produkt wurde in 60µl ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.1.10 Kontrollverdau der Minipräp-DNA

Von den jeweiligen Minipräparationen wurden 10µl DNA für den Verdau eingesetzt. Dazu wurden pro Minipräparation 2µl Puffer B, 0,5µl RNaseA und 0,5µl Restriktionsenzym BamHI gemischt und mit 7µl ddH₂O auf 10µl aufgefüllt. Nach dem Zusetzen der DNA wurde der gesamte Ansatz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das entstandene Produkt auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und mit einem Längenstandard verglichen.

2.2.1.11 Messen der DNA-Konzentration aus der Minipräparation

Von jeder Minipräparation wurden jeweils 2µl mit 98µl ddH₂O gemischt und anschließend bei 280 nm im Photometer gemessen.

2.2.1.12 Überprüfung der DNA-Sequenz der Plasmide

Zur Überprüfung der eingeführten Mutation und dem Ausschluß von nicht erwünschten Mutationen wurden die gesamte *RET*-cDNA im Vektor sequenziert. Dazu wurden in den Sequenz-Ansatz 1,5 - 2,0µg DNA-Template, 0,3µl DMSO und 2µl BigDye Sequenzierungs-Mix (siehe 2.1.6) einpipettiert und das Volumen mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Danach erfolgte die Amplifikation der DNA-Fragmente auf einem Thermocycler mit Hilfe folgender Zyklen:

Temperatur	Dauer	Zyklen
96°C	1 Minute	1
95°C	10 Sekunden	30
50°C	5 Sekunden	
60°C	4 Minuten	

Die Produkte wurden auf einem automatischen Sequenzer sequenziert.

2.2.1.13 Maxipräparation

Die Maxipräparation der DNA wurde mit dem Qiagen Plasmid Purification Kit (siehe 2.1.6) durchgeführt. Dazu wurden Klone von einer frisch ausgestrichenen LB-Agarplatte entnommen und in 3 ml LB-Medium für 8 Stunden im Wasserbad bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden von dieser Starterkultur 300-500µl in 100 ml LB-Medium gegeben und erneut für 12-16 Stunden unter Schütteln bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Aus dieser Bakterienkultur wurden die *E. coli* Bakterien geerntet, indem das Medium bei 6000rpm und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert wurde. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 10 ml Puffer 1 resuspendiert und mit 10 ml Puffer 2 versetzt. Das Bakterien-Puffer-Gemisch wurde vorsichtig, aber gründlich gemixt und dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml gekühlter Puffer 3 hinzugegeben, gründlich vermischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das Zelllysat wurde bei 13.000 rpm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit den Plasmiden in ein sauberes Gefäß überführt. Es

erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C. Pro Klon wurde ein Filter mit 10 ml Puffer QBT equilibriert und anschließend der Überstand auf den Filter gegeben. Die Flüssigkeit floß durch den Filter, wobei die Plasmide im Filter zurückgehalten wurden. Zweimal wurde der Filter mit jeweils 30 ml Puffer QC gewaschen, bevor die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert wurde. Es folgte die Präzipitation der DNA mit 10,5 ml Isopropanol, durch Mischen und sofortiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm und 4°C für 15 Minuten. Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, der Überstand über dem Pellet wurde vorsichtig dekantiert und die DNA luftgetrocknet, bevor sie in 60µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 aufgenommen und bei -20°C gelagert wurde.

2.2.2 Zellkulturtechnik

2.2.2.1 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in 50 ml und 250 ml Zellkulturflaschen bei 37°C und 7,5% CO₂ Beimischung im Brutschrank in Kultur gehalten. Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Gewebekulturbank durchgeführt. Die Medien wurden bei 4°C aufbewahrt und vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das Medium wurde alle 4 Tage gewechselt. Waren die Zellen in einer 250 ml Kulturflasche konfluent gewachsen, wurden sie mit 5 ml PBS gewaschen und mit 3 ml 1x Trypsin-EDTA versetzt. Während die Zellen für 2-3 Minuten im Brutschrank inkubierten, lösten sie sich vom Flaschenboden. Zur Inhibition der Trypsin-Wirkung wurde auf die abgelösten Zellen 10 ml Medium pipettiert. Die Zellsuspension wurde dann bis zu 9/10 verworfen, und auf den verbleibenden Rest wurden 12 ml frisches Medium gegeben. Wuchsen die Zellen in 50 ml Kulturflaschen, wurden folgende Volumina eingesetzt: 3 ml PBS, 1 ml Trypsin-EDTA, 3ml Medium zur Inhibition des Trypsins und 5 ml Medium auf die in der Flasche verbleibenden Zellen. Die Kulturflaschen wurden mit leicht geöffneten Verschuß in den Brutschrank gestellt.

2.2.2.2 Stabile Transfektion der NIH3T3-Zellen mittels Elektroporation

Zur stabilen Transfektion wurden konfluent gewachsene Zellen benutzt. Die Zellen wurden mit 3 ml Trypsin-EDTA behandelt. Nach 3 Minuten waren die Zellen vom Flaschenboden gelöst und wurden in 10 ml Medium aufgenommen. Sie wurden 4 Minuten bei 1200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 400µl Dulbecco's Medium resuspendiert und anschließend in eine Elektroporationsküvette

überführt. Nachdem 25µg DNA zupipettiert und die Suspension mit einer Pipette gemischt worden war, wurde die Küvette verschlossen und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 250 mV/ 960 C. Danach wurden die Zellen in ein mit 10 ml Medium gefülltes 15 ml Gefäß überführt, vorsichtig mit dem Medium gemischt, und jeweils 5 ml in eine 50 ml Flasche transferiert. Nach 48 Stunden wurde mit der Selektion begonnen.

2.2.2.3 Selektion von stabil transfizierten Zellen

Die transfizierten Zellen wurden mittels Genitacin 418 (G418) selektioniert, da der verwendete Expressionsvektor das Resistenzgen für diese Substanz trägt. Dazu wurde zwei Tage nach der Transfektion frisches Medium, das mit 1,2 mg/ml G418 versetzt war, auf die Zellen gegeben. Nach vier Tagen erfolgte der Wechsel des Mediums, wobei das frisch zugegebene Medium ebenfalls mit G418 versetzt war. Die nach 8 Tagen noch lebenden Zellen wurden dann für die Aufzucht von Klonen benutzt.

2.2.2.4 Aufzucht von Zell-Klonen

Dazu wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA aus der 50 ml-Zellkulturflasche bzw. einem Well der 6-Well-Platte gelöst und in 5 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Gefäß überführt. Jeweils 8-10 µl der Suspension wurden in Gewebekulturschalen, die mit 10 ml Selektionsmedium gefüllt waren, pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach 4 Tagen wurde das Medium gewechselt. Nachdem einzelne Zellklone, eindeutig von einander abgrenzbar, gewachsen waren, wurden diese mittels einer sterilen Pipettenspitze durch vorsichtiges mechanisches Ablösen und Ansaugen aufgenommen und in jeweils ein Well einer 24-Well-Platte überführt. Pro Well wurde 1 ml Medium zugegeben. Nachdem die Zellklone darin konfluent gewachsen waren, wurden sie mit PBS gewaschen und mit 3 Tropfen Trypsin-EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 1 ml Medium aufgenommen und in eine 50 ml Zellkulturflasche, die mit 5 ml Medium gefüllt wurde, transferiert. Nachdem sie in diesen Flaschen konfluent gewachsen waren, wurden sie in zwei 250 ml Flaschen überführt. Die Zellen der einen Flasche wurde für die weitere Aufzucht in Kultur gehalten, die Zellen der anderen Flasche wurden eingefroren.

2.2.2.5 Einfrieren der Zell-Klone

Die Zellen wurden nach der Trypsinierung in ein 15 ml Gefäß überführt und 5 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in 1 ml Medium mit 20 % FBS und 10% DMSO aufgenommen und in einem Tiefkühl-Tube bei -20°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurde das Tube in einen - 80°C Gefrierschrank überführt.

2.2.2.6 Kultivierung der Zellklone zur Überprüfung der Expression des RET-Proteins

Zum überprüfen der Expression von RET wurden Zellen eines Klons in ein Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit 3 ml des entsprechenden Mediums gefüttert und im Brutschrank bei 37°C gehalten. Am Tag vor der Lyse der Zellen wurden diese mit jeweils 1 ml frischem Medium pro Well gefüttert.

2.2.2.7 Kultivierung der Zellklone für die Immunpräzipitation

Pro Klon wurden drei 6-Well-Platten zur Aufzucht der Zellen verwandt. Die Zellen wurden am Tag vor der Ernte mit 1 ml FBS-freien Medium gefüttert.

2.2.2.8 Zelllyse

Waren die Zellen in den 6-Wells subkonfluent gewachsen, wurden sie lysiert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Zunächst wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen pro Well mit 1 ml kaltem 1x PBS +NaVO₃ gewaschen. Nach kurzem Schwenken wurde das PBS entfernt. Dann wurden die Zellen mit jeweils 200µl kaltem Lysepuffer für 10 Minuten inkubiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Schalen abgestrichen und mit einer sterilen Pipette in ein 2 ml Eppendorf Gefäß überführt.

2.2.3 Proteinchemische Analysen

2.2.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde als Doppelbestimmung für die jeweiligen Lysate und einem Proteinstandard mit 4, 8, 12 und 16 µg BSA/100 µl durchgeführt. Für die Lysate wurden dafür 700µl ddH₂O, für die Standards 600µl, in ein Probenröhrchen vorgelegt. In jedes Probenröhrchen wurden 100µl 0,5M NaOH gegeben. 5µl Zelllysate wurden in die Röhrchen

pipettiert und anschließend wurde zu alle Proben 200µl Farbreagenz gegeben. Der gesamte Ansatz wurde gründlich gewhirlt und jeweils 2x 340µl in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm im ELISA-Reader gemessen.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Für die Überprüfung der RET-Expression dienten 6,5%ige SDS-Polyacrylamidgele zur Auftrennung der Proteine. Das Gel hatte die Maße: 1,5 mm x 150 mm x 200 mm. Zunächst wurden Glasplatten und Spacer mit ddH₂O und Ethanol gereinigt. Die Spacer wurden zwischen den Glasplatten platziert und die Apparatur mittels Klammern und einem Gummiband so abgedichtet, dass die Polyacrylamid-Lösung nicht auslaufen konnte. Als erstes wurde ein Trenngel gegossen, das folgende Zusammensetzung hatte:

6,5 ml Polyacrylamid-Lösung

7,5 ml Trenngelpuffer

14,2 ml ddH₂O

Diese Substanzen wurden gründlich in einem Becherglas gemischt, bevor die restlichen Bestandteile hinzugefügt wurden.

1,5 ml Glycerol

265 µl 10%iges Ammoniumpersulfat

50 µl TEMED

Nach erneutem Mischen wurde die Flüssigkeit mit einer 10 ml Pipette zwischen die Glasplatten pipettiert und anschließend mit 1 ml ddH₂O überschichtet. Das Trenngel benötigte ca. 1 Stunde, um bei Raumtemperatur zu polymerisieren. Dann wurde das Wasser sorgfältig entfernt und das Sammelgel mit folgender Zusammensetzung vorbereitet:

1,7 ml Polyacrylamid-Lösung

2,5 ml Sammelgelpuffer

5,7 ml ddH₂O

Die Bestandteile wurden gemischt und dann mit Ammoniumpersulfat und TEMED versetzt.

150 µl 10% Ammoniumpersulfat

30 µl TEMED

Nachdem die Lösung über das Trenngel pipettiert worden war, wurde sofort ein Kamm mit 12, 18 oder 24 Taschen zwischen die Glasplatten luftblasenfrei in das Sammelgel geschoben. Nach ca. 90 Minuten konnte der Kamm gezogen werden. Die Taschen wurden mit dem Elektrophorese-Puffer von Gelresten befreit und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Beide Puffereservoirs wurden mit 1x Glycin-Elektrophorese-Puffer gefüllt.

2.2.3.3 Probenvorbereitung für Untersuchungen unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen

Pro zu überprüfendem Klon wurde ein 1,5 ml Gefäß beschriftet. Der reduzierende bzw. nicht-reduzierende Probenpuffer wurde 5 Minuten auf 95°C erhitzt und jeweils 10µl in jedes Gefäß vorgelegt. Die für jeden Klon äquivalente Proteinmenge von 70 µg wurde in die Gefäße pipettiert und mit dem Probenpuffer gemischt. Während die Proben für 2 Minuten im Thermomixer auf 95°C erhitzt wurden, sind 10µl RainbowTM-Marker zur Überprüfung der Molekulargewichte mit 30 µl ddH₂O und 10 µl Probenpuffer versetzt und ebenfalls auf 95°C erhitzt worden. Anschließend wurden die Proben mit einer Hamilton-Pipette in die Taschen des Gels pipettiert. Dies lief bei Raumtemperatur für ca. 18 Stunden bei 60 V.

2.2.3.4 Western Blot

Nach dem Lauf des Gels wurden die aufgetrennten Proteine mittels eines Transfer-Sandwiches auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Das Filterpapier, die Nitrocellulose-Membran und die Schwämme für das Transfer-Sandwich wurden 15 Minuten im Transferpuffer inkubiert. Das Gel wurde aus der Gelkammer genommen und ebenfalls 15 min im Transferpuffer äquilibriert. Für das Sandwich wurden ein Schwamm und zwei Filterpapiere aufeinander gelegt. Dann wurde die Membran ohne Luftblasen auf das Filterpapier gelegt und mit Transferpuffer feucht gehalten. Das Gel wurde vorsichtig auf ein Stück Filterpapier transferiert und langsam auf die Membran gerollt. Die Luftblasen zwischen Gel und Membran wurden entfernt und zwei Filterpapiere auf das Gel gelegt. Darauf kam der zweite Schwamm und das Sandwich wurde in die Tank-Blot Kammer gestellt. Diese wurde mit Transferpuffer gefüllt und der Blot für 4 Stunden bei 50 V durchgeführt.

2.2.3.5 Ponceau S-Färbung

Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran für 5 Minuten mit 1x TBS gewaschen und 3 Minuten in Ponceau-Lösung inkubiert. Daran anschließend wurde die Ponceau-Lösung entfernt, und die Membran wurde so lange mit ddH₂O gewaschen, bis die Protein-Banden sichtbar waren.

2.2.3.6 Detektion des RET-Proteins

Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen des Antikörpers an die Membran, wurde diese für 1 Stunde in 1x NET-Puffer geschwenkt. Danach wurde der NET-Puffer verworfen und die Membran mit dem RET-spezifischen Antikörper in der Verdünnung von 1:1000 in 1x NET-Puffer über Nacht unter Schwenken bei 4°C inkubiert. Nachdem die Antikörper-Lösung von der Membran entfernt wurde, folgten vier Waschschrte für 10 Minuten mit jeweils frischem 1x NET-Puffer. Dann wurde die Membran mit dem HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper in der Verdünnung von 1:15.000 in 1x NET-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur und unter Schwenken inkubiert. Die Sekundär-Antikörper-Lösung wurde verworfen und die Membran erneut 4x 10 Minuten mit 1x NET-Puffer gewaschen. Danach wurde der restliche NET-Puffer mit 1x TBS abgespült und die Membran für 1 Minute mit einem Detektionslösungs-Gemisch aus 3 ml Enhancer-Lösung und 3 ml Peroxid-Lösung bedeckt. Die überschüssige Detektionslösung wurde gründlich abgetropft und die Membran zügig in eine Klarsichtfolie gelegt, die dann in einer Röntgenkassette lichtgeschützt verwahrt worden ist. In der Röntgenkassette wurden Röntgenfilme für unterschiedliche Zeiten belichtet und dann in einem Entwicklungsgerät entwickelt.

2.2.3.7 Immunpräzipitation des RET-Rezeptors

Für die Immunpräzipitation wurden im Falle der Detektion von RET 800 µg, für die Detektion von Phosphotyrosin 2,5 mg, für die Detektion von PLC-γ 1,0 mg und für die Detektion von GRB2 5 mg Protein pro Klon eingesetzt. Alle Proteinlysate wurden dann mit 5 µl des RET-Antikörpers über Nacht inkubiert. Dafür wurden die Reaktionsgefäße in einen Dreh-Schüttelapparat eingespannt, der bei 4°C im Kühlraum lief.

2.2.3.8 Waschen der Protein-G-Agarose Beads und Inkubation mit Antikörper-Proteinkomplex

Bevor die RET-Protein-Antikörper-Komplexe mit ProteinG-Agarose-Beads inkubiert werden konnten, mußten die Beads gewaschen werden. Dazu wurden 100 ml Waschpuffer angesetzt und auf Eis gekühlt. 40µl der Beads wurden pro Ansatz abgemessen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Agarose-Beads wurden jeweils mit 1 ml Waschpuffer überlegt, kurz gewhirlt und dann bei 4000 rpm und 4°C für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und der Waschvorgang noch 2x wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads erneut mit Waschpuffer aufgefüllt und kräftig gewhirlt. Die Suspension wurde gleichmäßig auf vorbereitete neue Reaktionsgefäße aufgeteilt. Diese sind dann 1 Minute bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert worden. Der Überstand ist sorgfältig entfernt worden und die Zelllysate mit den RET-Protein-Antikörper-Komplexen wurden auf die Beads pipettiert. Dieses Gemisch wurde für 4 Stunden im Kühlraum in dem Dreh-Schüttelapparat inkubiert.

2.2.3.9 Waschen der Komplexe und Entfernung der Agarose-Beads

Nach vierstündiger Inkubation wurde der Waschvorgang dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der gesamte Waschpuffer so weit wie möglich entfernt und jeweils 25µl Laemmli-Puffer zugegeben. Zur Trennung der Proteine von den Beads wurden die Proben 30 Minuten unter kräftigem Schütteln bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Danach wurden die Ansätze 1 min bei 4° C und 4000 rpm zentrifugiert und auf ein Filter-Tube überführt. Diese wurden 5 min bei 4° C und 2000 rpm und danach 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Filter wurden verworfen und die Probe für 5 min bei 95° C im Heizblock inkubiert. Danach wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert.

2.2.3.10 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine aus der Immunpräzipitation wurden 8%ige und 12%ige SDS-Polyacrylamidgele benutzt. Die Elektrophorese sowie der Western Blot wurden wie unter 2.2.3.2 und 2.2.3.4 beschrieben durchgeführt.

8% Polyacrylamidgel	12% Polyacrylamidgel
8 ml Acrylamid	12 ml Acrylamid
7,5 ml Trenngelpuffer	7,5 ml Trenngelpuffer
12,7 ml ddH ₂ O	8,7 ml ddH ₂ O
1,5 ml Glycerol	1,5 ml Glycerol
265 µl 10% APS	265 µl 10% APS
50 µl TEMED	50 µl TEMED

2.2.3.11 Immunologische Detektion

Für die Detektion der p-Tyr-Proteine auf der Membran diente als 1. Antikörper ein Maus-Anti-Phosphotyrosin-Antikörper in der Verdünnung 1:1000. Der Antikörper gegen PLC- γ wurde in einer Verdünnung von 1:250 und der Antikörper gegen das Protein GRB2 in der Verdünnung 1:5000 eingesetzt. Alle übrigen Schritte wurden wie auf Seite 41 beschrieben durchgeführt.

2.2.3.12 Biotinylierung des membranständigen RET Proteins

Subkonfluente Kulturen der transfizierten Zellklone wurden mit 1 ml PBS gewaschen und mit nicht-membrangängigen Sulfo-NHS-Biotin (0,5 mg/ml) in Calcium-enthaltenden PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit 2 ml Medium überschichtet. Nach 2 Stunden wurden die Zellen wie oben beschrieben lysiert und eine Immunpräzipitation mit dem RET-Antikörper durchgeführt.

2.2.3.13 Detektion des biotinylierten RET-Proteins

Die Proteine wurden wie oben beschrieben in der Elektrophorese getrennt und ein Western Blot durchgeführt. Für die Detektion wurde jedoch kein Antikörper eingesetzt, sondern HRP-konjugiertes Streptavidin, welches eine hohe Affinität zu Biotin hat. Mit dem ECL-System konnten dann die in der Zellmembran verankerten RET-Rezeptoren sichtbar gemacht werden.

2.2.4 Transformationsassays

2.2.4.1 Präparation der Poly-HEMA-Zellkulturplatten

Poly-HEMA ist ein Agens, welches zur Oberflächenbeschichtung eingesetzt wird, um die Adhäsion von Zellen zu verhindern. In den Transformations-Assays wurde es in einer Konzentration von 5 mg/ml in 95%igem Ethanol aufgenommen und über Nacht im Wasserbad bei 37°C gelöst. 50 µl der Lösung wurden in jedes Well einer 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert und diese Platte 7 Tage im Inkubator bei 37°C getrocknet.

2.2.4.2 Messung des Zellwachstums auf Poly-HEMA-beschichteter Oberfläche

Die Zellen wurden in einem Volumen von 150 µl Medium ohne Phenol-Rot mit einer Dichte von 2500 Zellen pro Well mit einer MultiPette in die Zellkulturplatten gegeben. Nach vier Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, nach sechs Tagen wurden 15 µl MTT (5 µg/µl in PBS) in jedes Well gegeben und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. MTT ist ein wasserlösliches Tertrazoliumsalz, welches sich in Lösung gelb färbt. Gelöstes MTT verwandelt sich in blaue Kristalle, wenn der Tertrazoliumring durch Dehydrogenase-Enzyme gespalten wird. Je mehr Zellen im Well gewachsen sind, desto intensiver ist die Bildung der Kristalle. Die während der 4 Stunden entstandenen Kristalle wurden mit 100 µl SDS-Lösung (20% SDS in 10 mM HCL) gelöst und die OD nach 24 Stunden bei 595 nm gemessen.

2.2.4.3 Proliferations-Assay mit nicht-beschichteten 96-Well-Zellkulturplatten

Der Versuch wurde wie in 2.2.4.2 (Parallel-Ansatz zur Messung des Zellwachstums auf Poly-HEMA-beschichteter Oberfläche) durchgeführt, nur wurden nicht-beschichtete 96-Well-Platten verwendet.

2.2.4.4 Soft Agar

Die Soft-Agar-Experimente wurden in 6-Well-Platten durchgeführt. 5000 Zellen wurden in 1,0 ml Medium mit 0,3% Agar aufgenommen und auf eine 2,5 ml Medium-Schicht mit 0,5% Agar gegeben. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien mit 0,4 ml MTT (5 mg/ml PBS) gefärbt.

2.3 Methoden des Ergebnisteil B

2.3.1 Verwendung von Datenbanken

2.3.1.1 Sequenzvergleiche mit der Biology WorkBench

Zunächst wurden aus dem NCBI Sequence Viewer die mRNA-Sequenzen der codierenden Regionen sowie die Aminosäure-Sequenzen heruntergeladen. Dies wurde für folgende Gene durchgeführt:

Gen	Spezies	Accession-Nr.
RET	Mus musculus	NM 009050
	Homo sapiens	XM 005899
	Danio rerio	AF 007949
	Drosophila melanogaster	AF 322652
VEGFR	Homo sapiens	AF 063657
FGFR	Homo sapiens	NM 000604
INSR	Homo sapiens	XM 048346
TRKA	Homo sapiens	NM 002529

Daraufhin wurden die Aminosäure-Sequenzen in den eingerichteten Account der Biology WorkBench (<http://workbench.sdsc.edu/>) unter „Protein Tools, Add Sequences“ eingegeben und mit dem Programm CLUSTALW ein Alignement erstellt.

2.3.1.2 Erstellen eines dreidimensionalen Modells der RET-Tyrosinkinase

Das dreidimensionale Modell des intrazellulären Anteils des RET-Rezeptors wurde über den Internetanbieter Swiss-Modell (<http://expasy.hcuge.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) errechnet. Als Grundlage diente dafür die Wildtyp-Sequenz des Proteins. Diese Sequenz wurde automatisch mit Sequenzen anderer Tyrosinkinase-Rezeptoren verglichen, die eine hohe Homologie zur intrazellulären Domäne des RET-Rezeptors haben und deren Kristall-Struktur schon untersucht wurde. Dazu gehörten unter anderem die verschiedenen Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptoren (FGFR) und der Insulin-Rezeptor. Diese bekannten dreidimensionalen Strukturen wurden als Template für das RET-Modell verwendet und mit dem Swiss-PdbViewer dargestellt.

2.3.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.2.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit 1×10^6 Zellen, die in einer 250 ml Zellkulturflasche gewachsen waren, durchgeführt. Zunächst wurde das Nährmedium entnommen und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen mit 3 ml peqGOLD RNA Pure vom Flaschenboden gelöst und lysiert. Die lysierten Zellen wurden auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße verteilt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In jedes Gefäß wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und 15 Sekunden gewhirlt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 5 Minuten bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 700 µl Isopropanol zugegeben. Dieser Ansatz wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend 10 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol, welches mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt war, gewaschen. Nach kurzem Trocknen des Pellets wurde es in 50 µl DEPC-behandeltem ddH₂O aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

2.3.2.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit AMV-Reverser Transkriptase durchgeführt. Um Kontaminationen durch genomische DNA auszuschliessen, wurde für die isolierte RNA ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase durchgeführt. Pro Ansatz wurden 10 µl RNA, 5 µl RT-Puffer, 2 µl DTT (10 mM in DEPC-behandeltem ddH₂O), 4 µl dNTP's (1,25 mmol/l) sowie 4 µl Oligo dT's 25 pmol/µl) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach sorgfältigem Mischen und kurzer Zentrifugation wurden 2 µl der Reversen Transkriptase zugegeben. Dieser Ansatz wurde 1 Stunde bei 42°C in einem Thermoblock inkubiert und mit 75 µl ddH₂O verdünnt.

2.3.2.3 β-Aktin-Amplifikation

Die für die Amplifikation eingesetzten Primer flankieren ein Fragment von 294 bp im Exon 3 des β-Aktin-Gens (Nukleotide 2141-2435).

Primer:

Forward 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'

Reverse 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

Die PCR-Reagenzien pro Ansatz wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Komponenten	Ausgangskonzentration	Volumen
Taq-Puffer	10x	5,0 µl
dNTP's	1,25 mmol/l	2,0 µl
Primer Forward	25 pmol/µl	2,0 µl
Primer Reverse	25 pmol/µl	2,0 µl
MgCl ₂	25 mmol/l	2,5 µl
Taq-Polymerase	5U/µl	0,25 µl
cDNA	100 ng	X µl
ddH ₂ O		add 50 µl

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programm

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94°C	2 min	1
95°C	1 min	35
55°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1

Die Amplifikate wurden in einem 2%igen Agarose-Gel überprüft. Das Protokoll ist in 3.2.1.2 beschrieben. Als Längenstandard wurde der Marker VIII eingesetzt.

2.3.2.4 Überprüfung der GFR- α Expression

Für die Amplifikation der Korezeptoren GFR- α 1 und GFR- α 2 wurden spezifische Primerpaare, die durch ein Sequenz-Alignments mit dem Programm CLUSTALW erstellt wurden (Siehe 2.3.1.1), eingesetzt.

Primer:

GFR- α 1 Forward 5'-CTGGAGGCCAAGGATGAGTG-3'

GFR- α 1 Reverse 5'-CTGACAATCTGCTGTAACTGG-3'

GFR- α 2 Forward 5'-TGCCTCTTCTTCTTTCTAGACG-3'

GFR- α 2 Reverse 5'-TTGTTGGCCAGCATGGTGTG-3'

Für GFR- α 1 wird ein Amplifikat von 195 bp erwartet. Es besteht aus einem Teil des Exon 1 (Nukleotid 196-310) und aus den Nukleotiden 311-390 aus dem Exon 2. Das GFR- α 2-Amplifikat ist 218 bp groß.

Die PCR's wurden mit jeweils 100 ng der cDNA von TT-Zellen, SK-N-MC-Zellen und Kelly-Zellen durchgeführt. Dazu wurden folgende Reaktionsbedingungen eingestellt:

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen (GFR- α 1)	Volumen (GFR- α 2)
Taq-Puffer	10x	5,0 μ l	5,0 μ l
dNTP's	1,25 mmol/l	2,0 μ l	2,0 μ l
Primer Forward	25 pmol/ μ l	2,5 μ l	2,5 μ l
Primer Reverse	25 pmol/ μ l	2,5 μ l	2,5 μ l
DMSO		-	0,5 μ l
MgCl ₂	25 mmol/l	3,0 μ l	2,0 μ l
Taq-Polymerase	5U/ μ l	0,25 μ l	0,25 μ l
cDNA	100 ng	x	x
ddH ₂ O		X μ l (ad 50 μ l)	X μ l (ad 50 μ l)

Die Amplifikation wurde mit den PCR-Programmen

GFR- α 1 und GFR- α 2		
Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	2 min	1
95°C	1 min	35
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1

2.3.3 Proteinchemische Analysen

2.3.3.1 Überprüfung der Expression von GDNF und NTN

Die Überprüfung der RET-Liganden-Expression erfolgte mittels Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die beiden Proteine. Zunächst wurde eine Immunpräzipitation, wie sie unter 2.2.3.7 beschrieben ist, durchgeführt. Dafür wurden nach erfolgter Proteinbestimmung (siehe 2.2.3.1) 3 mg Gesamtprotein der Zelllinien TT-Zellen, SK-N-MC und Kelly eingesetzt und 1,5 µl des GDNF- bzw. des NTN-Antikörpers verwendet. Die SDS-PAGE wurde wie in 2.2.3.2 beschrieben durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden jeweils 100 ng des rekombinanten Proteins mit auf das 12%ige Polyacrylamid-Gel gegeben. Der Transfer der Proteine wurde wie in 2.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Der Primär-Antikörper (siehe 2.1.3) wurde in einer Verdünnung von 1:3.000 auf die Nitrozellulose-Membran gegeben, der Sekundär-Antikörper (siehe 2.1.3) wurde 1:25.000 verdünnt. Die Expositionszeit lag bei einer Minute.

2.3.4 Zellkultur-Techniken

2.3.4.1 Stabile Transfektion der SK-N-MC-Zellen mittels Lipofektion

Für die Transfektion der SK-N-MC-Zellen wurde das SuperFect-Reagenz aus dem Selector-Kit von QIAGEN (siehe 2.1.6) verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst in 6-Well-Platten mit 2×10^5 Zellen pro Well subkultiviert. Nach 24h waren die Zellen zu 40% konfluent gewachsen und somit für die Transfektion einsetzbar. Für den Transfektions-Mastermix wurden 133 µl Medium ohne FBS mit 1 µg Plasmid-DNA gemischt. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und kurz zentrifugiert. Im folgenden wurden 8 µl Superfect-Reagenz zugegeben und 5x mit der Pipette gemischt. Während der 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen in der 6-Well-Platte mit 1 ml PBS gewaschen. Nach den 10 Minuten wurden auf den Transfektions-Mastermix 600 µl Medium ohne FBS gegeben, 2x mit der Pipette gemischt und vorsichtig auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden für 3 Stunden in den CO₂-Inkubator gestellt und anschliessend 2x mit 1 ml PBS gewaschen. Es wurden 2 ml Medium mit FBS auf die Zellen gegeben und nach 48 Stunden mit der Selektion begonnen. Die Selektion, die Aufzucht von Zellklonen, das Screening sowie die Protein-Analysen wurden wie im Ergebnisteil A für die NIH3T3-Klone beschrieben, durchgeführt.

2.3.4.2 Erstellen einer Wachstumskurve

Um die Proliferation der transfizierten Zellklone zu untersuchen, wurden sechs 96-Well Platten mit 2000 Zellen in 100 µl Medium pro Well präpariert. Für jeden Klon waren sechs Wells vorgesehen. Alle 24 Stunden wurde auf eine 96-Well Platte 10 µl MTT (5 µg/µl in PBS) pro Well gegeben und vier Stunden bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden 100 µl SDS-Lösung (20% SDS in 10 mM HCL) in jedes Well gegeben und nach 24 Stunden die OD bei 595 nm im ELISA-Reader gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisteil A: Untersuchungen zur Aktivierung des RET Rezeptors in der Mäusefibroblasten-Zelllinie NIH 3T3

3.1.1 Sequenzierung der mutierten Region in Exon 13 im Vergleich zur wt-Sequenz.

Die für die folgenden Untersuchungen eingefügten intrazellulären Mutationen wurden auf ihre korrekte Sequenz überprüft (Abb. 11).

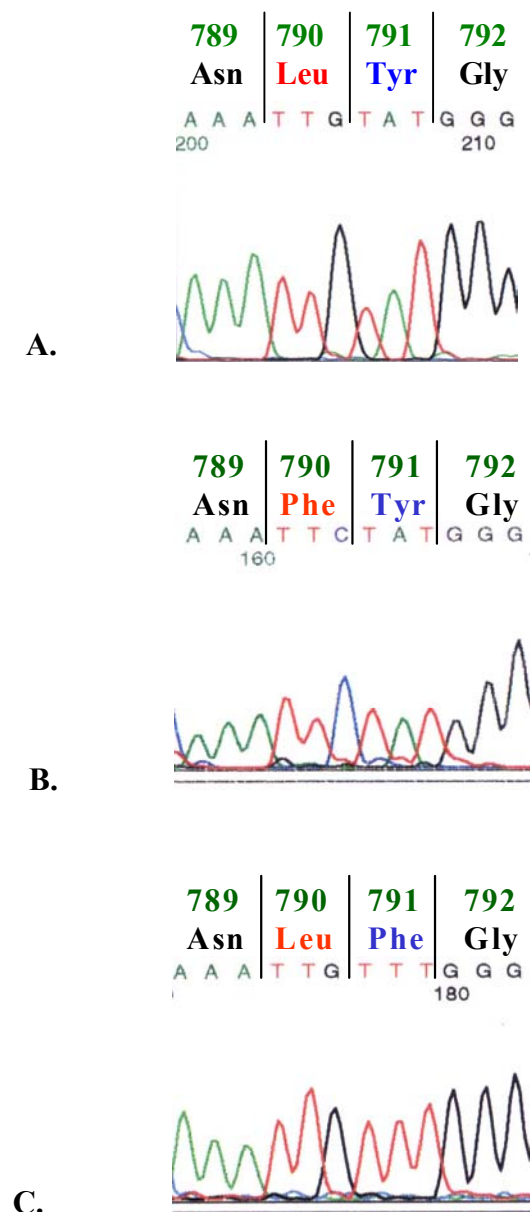


Abb. 11: Sequenzanalyse der klonierten *RET* cDNA nach der Plasmid Mini-Präparation mit dem ABI Prism 377 Sequencer. A: wt-Sequenz der Codons 789 – 792 in Exon 13 des *RET*-Protoonkogens. B: Sequenz der eingefügten Mutation im Codon 790. C: Sequenz der eingefügten Mutation im Codon 791 in Exon 13 des *RET*-Protoonkogens

Abbildung 11A zeigt die wt-Sequenz der Codons 789 bis 792, die für die Aminosäuren Asparagin, Leucin, Tyrosin und Glycin kodieren. Durch Basensubstitution wird bei der Mutation in Codon 790 (Abb. 11B) die dritte Base von einem Guanin zu einem Cytosin. Dies hat zur Folge, dass aus dem Codon für Leucin (TTG) ein Phenylalanin (TTC) wird. Durch die Mutation in Codon 791 (Abb. 11C) wird die zweite Base von einem Adenin zu einem Thymin, so dass aus dem Codon für Tyrosin ein Phenylalanin wird.

Für die in dem eukaryotischen Expressionsvektor pR CMV2 klonierte cDNA wurden weitere Mutationen ausgeschlossen und für die Transfektion der NIH 3T3-Zellen verwendet. Die Transfektionen mit den Duplikationen in Exon 11 wurden mit der schon vorhandenen und durch Sequenzanalysen kontrollierten klonierten cDNA durchgeführt (siehe Methoden des Ergebnisteils A, 2.2.1.1). Mit den daraus entstammenden positiven Zellklonen wurden die weiteren Untersuchungen durchgeführt.

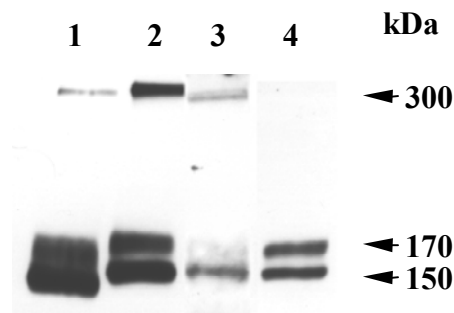
3.1.2 Überprüfung der ligandenunabhängigen Dimerisierung des RET-Rezeptors mit den eingefügten Mutationen.

Für den Austausch des Cystein 634 in eine andere Aminosäure wurde gezeigt, dass diese Mutation zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung des RET-Rezeptors führt, die auf die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken zurückzuführen ist. Die TT-Zellen tragen heterozygot die Mutation Cys634Trp. Im Western Blot mit Lysaten der TT-Zellen unter nicht-reduzierenden Bedingungen kann man mit einem spezifischen Antikörper gegen das RET-Protein das Dimer als 300 kDa-Bande sichtbar machen (Abb. 12A, Spur 1). Als Monomer kommt der RET-Rezeptor als 150 kDa - und als 170 kDa-Protein vor. Dabei ist das 150 kDa-Protein die nicht-prozessierte Form aus dem endoplasmatischen Retikulum und das 170 kDa-Protein der in der Membran verankerte Rezeptor. Die 9bp-Duplikation (Abb. 12A, Spur 2) und die 12bp duplizierte Sequenz (Abb. 12A, Spur 3) haben ebenfalls eine ligandenunabhängige Dimerisierung zur Folge, während der wt-Rezeptor ausschliesslich die RET-Monomere zeigt (Abb. 12A, Spur 4). Es ist zu beobachten, dass die RET-Proteine der transfizierten Mäusefibroblasten im Vergleich zu denen der TT-Zellen ein höheres Molekulargewicht aufweisen. Dies ist möglicherweise auf eine unterschiedliche Glykosylierung zurückzuführen.

Um zu überprüfen, ob die Dimerisierung der RET-Rezeptoren mit den Mutationen in der extrazellulären cysteinreichen Region auf die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken

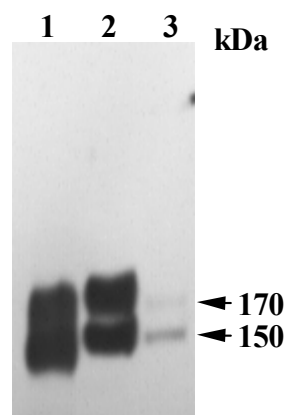
zurückzuführen ist, wurden Western Blots unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Abb. 12B). Wie in der Literatur beschrieben, zeigt das RET-Protein aus den TT-Zellen unter diesen Bedingungen kein Dimer bei 300 kDa mehr, lediglich die monomeren Formen sind detektierbar (Abb. 12B, Spur 1). Für das Protein mit den drei zusätzlichen Aminosäuren aus der 9bp-Duplikation (Abb. 12B, Spur 2) und für das Protein mit den zusätzlichen Aminosäuren aus der 12bp-Duplikation (Abb. 12B, Spur 3) ist unter reduzierenden Bedingungen ebenfalls kein Dimer nachweisbar.

A.



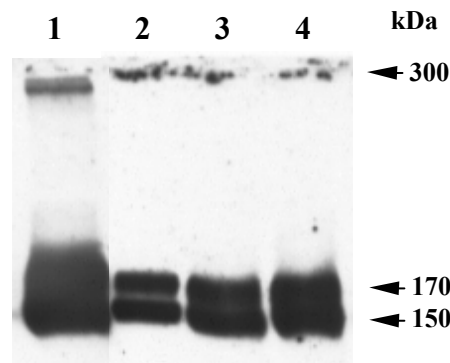
- 1: TT-Zellen (Cys634Trp)
- 2: +9bp-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 3: +12bp-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 4: wt-transfizierte NIH3T3-Zellen

B.



- 1: TT-Zellen (Cys634Trp)
- 2: +9bp-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 3: +12bp-transfizierte NIH3T3-Zellen

C



- 1: +9bp-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 2: wt-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 3: Tyr791Phe-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 4: Leu790Phe-transfizierte NIH3T3-Zellen

Abb. 12: Untersuchungen zur ligandenunabhängigen Dimerisierung des in den Mäusefibroblasten der Linie NIH3T3 exprimierten RET-Rezeptoren mittels Western Blot-Analyse. A: Vergleich der Mutationen in Exon 11 in der extrazellulären Domäne des Rezeptors mit dem wt-Rezeptor unter nicht reduzierenden Bedingungen. B: Western Blot unter reduzierenden Bedingungen. C: Vergleich der Mutationen in Exon 13 in der intrazellulären Domäne des Rezeptors mit dem wt-Rezeptor und der +9bp-Duplikation in Exon 11 mittels Western Blot unter nicht reduzierenden Bedingungen.

Die Mutationen in den Codons 790 und 791 liegen in der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. In der Abbildung 12C sind die RET-Proteine Leu790Phe (Abb. 12C, Spur 4) und Tyr791Phe (Abb. 12C, Spur 3) im Vergleich zum wt-Rezeptor (Abb. 12C, Spur 2) und dem Protein der 9bp-Duplikation gezeigt (Abb. 12C, Spur 1). Die Mutationen in Exon 13 führen demnach nicht zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung, was aus der fehlenden 300 kDa-Bande zu schliessen ist. Sie zeigen wie das wt-RET lediglich die monomeren Formen bei 150 kDa- und 170 kDa.

3.1.3 Überprüfung der ligandenunabhängigen Phosphorylierung der Tyrosinreste in der Kinase-Domäne des RET-Rezeptors bei den Mutationen in der extrazellulären Domäne

Die Tyrosinkinase-Aktivität des RET-Rezeptors wird durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten nach der Komplex-Bildung von Liganden, Korezeptoren und dem Rezeptor ausgelöst. Für die klassischen Mutationen in Codon 634 ist gezeigt, dass die aus der Mutation resultierende Dimerisierung auch ohne Stimulation durch Liganden zur konstitutiven

Aktivierung des Rezeptors führt. Um diesen Mechanismus für die in dieser Arbeit behandelten Mutationen zu untersuchen, wurden mit den präzipitierten RET-Proteinen Western Blots durchgeführt und die Proteine mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin detektiert (Abb. 13B). Gleichzeitig wurden die RET-Proteine aus dem gleichen Lysat wie für die pTyr-Detektion mit dem RET-spezifischen Antikörper detektiert (Abb. 13A), um die Expression der einzelnen Zellklone zu vergleichen und um die RET-Signale mit dem Signal für pTyr in direkten Zusammenhang zu bringen.

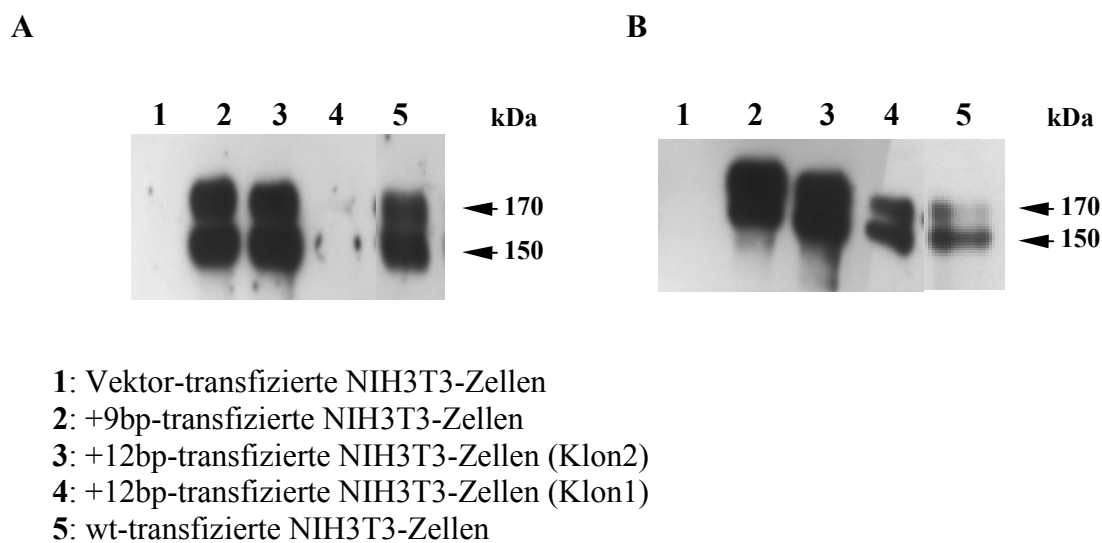
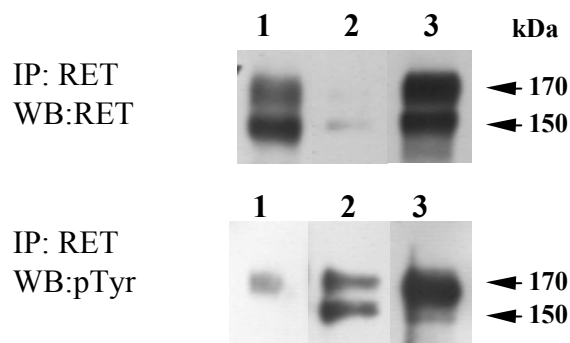


Abb. 13: Untersuchungen zur ligandenunabhängigen Aktivierung der Tyrosinkinase durch Phosphorylierung der Tyrosinreste in der intrazellulären Kinase-Domäne des RET-Rezeptors in den transfizierten Mäusefibroblasten. A: Immunpräzipitation und Detektion mit einem RET-spezifischen Antikörper. B: Immunpräzipitation mit Anti-RET und Detektion mit Anti-pTyr.

Wie in Abbildung 13A zu sehen, ist das Ausmaß der RET-Expression zwischen den einzelnen Klonen unterschiedlich. Schwankungen eines einzelnen Zellklons über mehrere Passagen konnten in den NIH3T3-Zellen nicht beobachtet werden. Für die Untersuchungen der Tyrosinkinase-Aktivierung durch die Duplikationen in Exon 11 wurde ein stark exprimierender wt-Klon (Abb. 13A, Spur 5) mit einem schwach exprimierenden +12bp-Klon (Abb. 13A, Spur 4) verglichen. Obwohl der +12bp-Rezeptor wesentlich schwächer exprimiert wird als der wt-Rezeptor, zeigt er ein deutlich stärkeres pTyr-Signal der 170 kDa-Bande (Abb. 13B, Spur 5 und Spur 4). Da für die Untersuchungen der 9bp-Duplikation nur stark exprimierende Klone zur Verfügung standen, wurde diese Mutation (Abb. 13A, Spur 2) mit einem stark exprimierenden +12bp-Klon (Abb. 13A, Spur 3) verglichen. Für das +9bp-RET sowie für das +12bp-RET ist eine deutliche ligandenunabhängige Phosphorylierung der

Tyrosinreste des 170 kDa-Proteins zu sehen (Abb. 13B, Spur2 und Spur 3). Im Vergleich ist das Signal des wt-Proteins deutlich schwächer. Als Negativkontrolle wurde ein Vektor-transfizierter Klon verwendet (Abb. 13, Spur 1).

Die Tatsache, dass auch der wt-Rezeptor ein pTyr-Signal zeigt, ist darin begründet, dass einige Tyrosinreste des nicht-aktivierten RET-Proteins phosphoryliert sind und dieser Effekt vermutlich durch die Überexpression noch verstärkt wird. Dies basiert wahrscheinlich auf spontaner Dimerisierung, die jedoch nicht stabil ist. Irritierend ist das starke pTyr-Signal des 150 kDa-Monomers beim wt-Rezeptor sowie bei dem mutierten RET, da diese Form des Proteins nicht in der Zellmembran verankert ist, sondern als nicht prozessiertes Protein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass als Folge der RET-Überexpression auch die 150 kDa-Form im ER phosphoryliert wird. Um dieses zu überprüfen, wurde neben den TT-Zellen und dem schwach exprimierenden +12bp-Klon die murinen Neuroblastom-Zelllinie Neuro 2A untersucht. Diese Linie zeigt eine Überexpression des wt-RET. In Abbildung 14 ist die Expression des RET-Proteins sowie die Tyr-Phosphorylierung der 150 kDa- und 170 kDa gezeigt. Bei dem RET-Rezeptor der TT-Zellen ist nur ein sehr schwaches pTyr-Signal der 150 kDa-Bande zu sehen (Abb. 14 [IP: RET/ WB: pTyr], Spur 1), obwohl von diesem Monomer eine grössere Menge vorhanden ist, als von der 170 kDa-Form (Abb. 14 [IP: RET/ WB: RET], Spur 1).



- 1: TT-Zellen
- 2: +12bp-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 3: Neuro 2A-Zellen(Neuroblastom-Zelllinie der Maus-RET Überexpression)

Abb. 14: Vergleich der pTyr-Signale von 150 kDa- und 170 kDa-RET

Das 170 kDa-Protein, welches in der Membran lokalisiert ist, zeigt dagegen ein starkes pTyr-Signal. Auch der durch die Überexpression (Abb. 14 [IP: RET/ WB: RET], Spur 3) spontan aktivierte wt-RET-Rezeptor der Neuro-2A-Zellen zeigt nur ein schwaches pTyr-Signal der 150 kDa-Form und eine sehr starke Phosphorylierung des 170 kDa-Protein (Abb. 14 [IP: RET/ WB: pTyr], Spur 3). Bei dem +12bp-Rezeptor der transfizierten NIH 3T3-Zellen ist das 150 kDa-Protein dagegen sogar etwas stärker phosphoryliert als das 170 kDa-Membranprotein (Abb. 14, Spur 2). Diese Ergebnisse machten es notwendig, den Transport des 150 kDa-Proteins zur Zellmembran zu überprüfen.

3.1.4 Untersuchung der in der Zellmembran vorhandenen RET-Monomere

Die vor der Zelllyse, im extrazellulären Bereich biotinylierten Membranproteine, sowie die nicht-biotinylierten cytoplasmatischen Proteine wurden für die Immunpräzipitation mit dem RET-spezifischen Antikörper eingesetzt. Untersucht wurden die stark exprimierenden Zellklone mit der +9bp-Mutation (Abb. 15, Spur 2) und der +12bp-Duplikation (Abb. 15, Spur 3), ein schwach exprimierender wt-Klon (Abb. 15, Spur 4), sowie die TT-Zellen (Abb. 15, Spur 1) und die Vektor-transfizierten Zellen als Kontrollen.

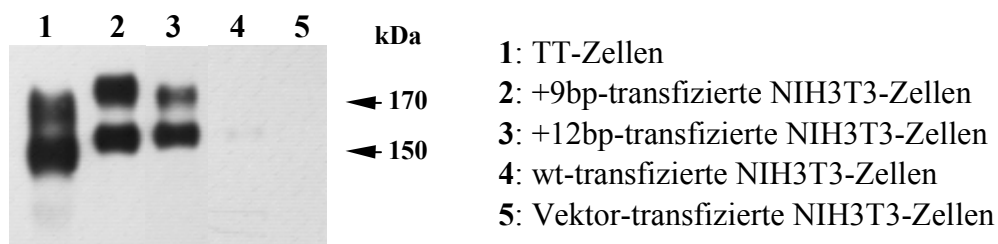


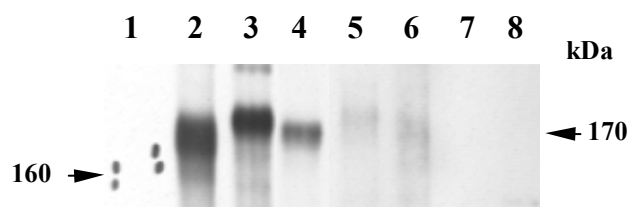
Abb. 15: Überprüfung der in der Zellmembran vorhandenen RET-Proteine durch Biotinylierung der extrazellulären Domäne. Immunpräzipitation des RET-Proteins und Detektion mit Anti-RET.

In Abbildung 16 sind im Gegensatz zur Abbildung 15 nur die biotinylierten RET-Proteine zu sehen, da die Detektion mit HRP-konjugierten Streptavidin durchgeführt wurde.

Bei den TT-Zellen ist lediglich die 170 kDa-Bande zu sehen (Abb. 16, Spur 2). Somit ist das 150 kDa-Protein nicht biotinyliert, was im Rückschluss bedeutet, dass es nicht in der Zellmembran vorkommt. Auch die transfizierten Zellklone mit der 9bp-Duplikation (Abb. 16, Spur 3), der +12bp-Mutation (Abb. 16, Spur 4) und dem wt-RET (Abb. 16, Spur 5) zeigen

kein Signal bei 150 kDa. Die 170 kDa-Bande entspricht im Verhältnis der in Abbildung 15 dargestellten Expression des Proteins. Die Vektor-transfizierten Mäusefibroblasten (Abb. 16, Spur 6) sowie die Negativkontrollen der stark RET exprimierenden Zellklone mit und ohne Biotinylierung vor der Zelllyse (Abb. 16, Spur 7 und Spur 8) zeigen weder ein Signal bei 170 kDa noch eines bei 150 kDa.

Durch diese Experimente konnte ausgeschlossen werden, dass bei den transfizierten überexprimierenden Zellklonen das 150 kDa RET-Monomer in die Zellmembran transportiert wird. Das 170 kDa-Protein ist in der Membran vorhanden und kann im folgenden zum Vergleich der pTyr-Signale verwendet werden.



- 1 Molekulargewichts-Marker
- 2: TT-Zellen
- 3: +9bp-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 4: +12bp-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 5: wt-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 6: Vektor-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 7: +9bp-transfizierte NIH3T3-Zellen ohne Biotin-Markierung
- 8: +12bp-transfizierte NIH3T3-Zellen ohne Biotin-Markierung

Abb. 16: Immunpräzipitation des RET-Proteins und Detektion mit HRP-konjugierten Streptavidin

3.1.5 Überprüfung der ligandenunabhängigen Tyr-Phosphorylierung der RET-Tyrosinkinase bei den Mutationen in der intrazellulären Domäne

Wie in Abbildung 12C gezeigt, kommt es durch die Mutationen in Exon 13 nicht zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung des RET-Rezeptors. Zur Untersuchung der intrazellulären Tyrosinkinase-Aktivität wurde für jede Mutation ein schwach und ein stark exprimierender Zellklon verwendet (Abb. 17A). Als Positivkontrollen wurden unterschiedlich stark exprimierende +12bp-Klone verwendet (Abb. 17A, Spur 6 und Spur 7), für die eine

ligandenunabhängige Tyrosinkinase-Aktivierung in Abbildung 13B gezeigt ist. Vergleicht man die pTyr-Signale der schwach exprimierenden Klone +12bp (Abb. 17B, Spur 7), Tyr791Phe (Abb. 17B, Spur 2) und Leu790Phe (Abb. 17B, Spur 4), ist die 170 kDa-Signalstärke der Mutation in Codon 791 deutlich schwächer als bei der +12bp-Mutation, während bei der Leu790Phe-Mutation ein ähnlich starkes pTyr-Signal zu erkennen ist. Der wt-Klon (Abb. 17A, Spur 5) exprimiert deutlich mehr RET als die schwach exprimierenden Klone mit den Mutationen +12bp (Abb. 17A, Spur 7) und Leu790Phe (Abb. 17A, Spur 4). Das pTyr-Signal der wt-170 kDa-Bande (Abb. 17B, Spur 5) ist im Verhältnis zur Expression des Proteins niedriger als beim +12bp-RET und Leu790Phe-RET.

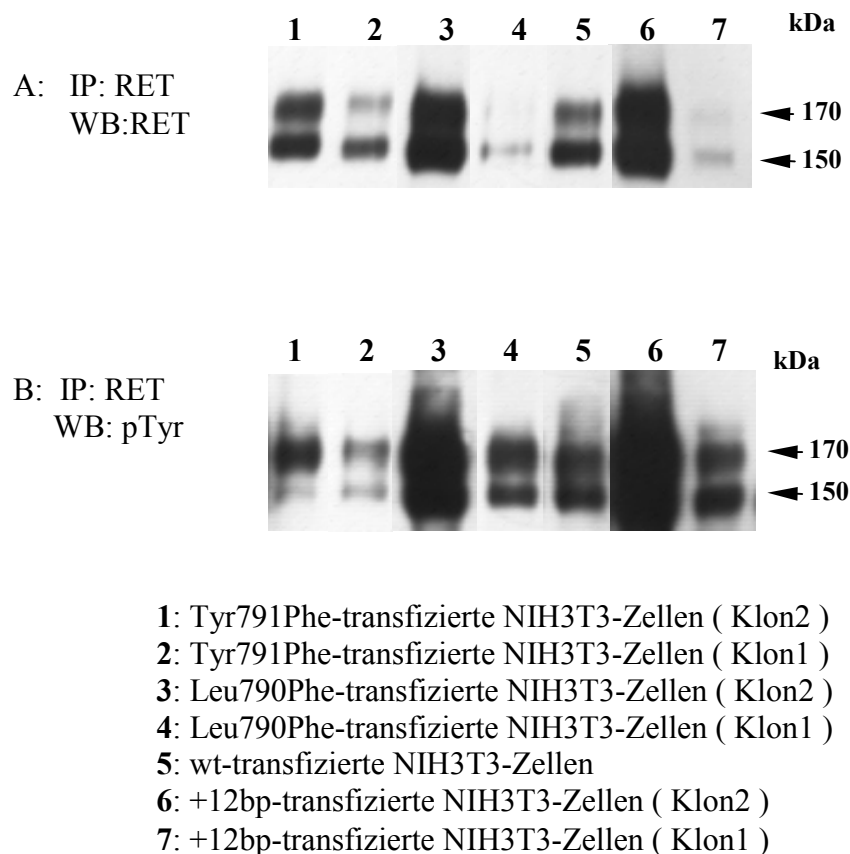


Abb. 17: Untersuchungen zur Phosphorylierung der RET-Kinase mit Mutationen in der intrazellulären TK1-Domäne. A: Immunpräzipitation des RET-Proteins und Detektion mit Anti-RET. B: Immunpräzipitation des RET-Proteins und Detektion mit Anti-pTyr.

Im Vergleich des stärker exprimierenden Tyr791Phe-Klons (Abb. 17A, Spur 1) mit dem wt-Rezeptor ist im Verhältnis keine Erhöhung des pTyr-Signals bei dem mutierten 170 kDa-RET (Abb. 17B, Spur 1 und Spur 5) zu detektieren. Zwar ist das 791er-Signal etwas stärker, aber das 170 kDa-Monomer wird in diesen Zellen auch etwas stärker exprimiert (Abb. 17A, Spur 1 und Spur 5). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Tyrosinkinase durch die Mutation in Codon 791 nicht ohne Stimulierung durch die Liganden aktiviert wird, die Mutation in Codon 790 dagegen zu einer Autophosphorylierung der Tyrosinkinase führt. Bestätigt wird dieses durch die stark exprimierenden Leu790Phe- (Abb. 17A, Spur 4) und +12bp-Klone (Abb. 17A, Spur 6). Die Mutation in Exon 13 führt wie die Mutation in der extrazellulären Domäne zu einer starken Aktivierung der Tyrosinkinase.

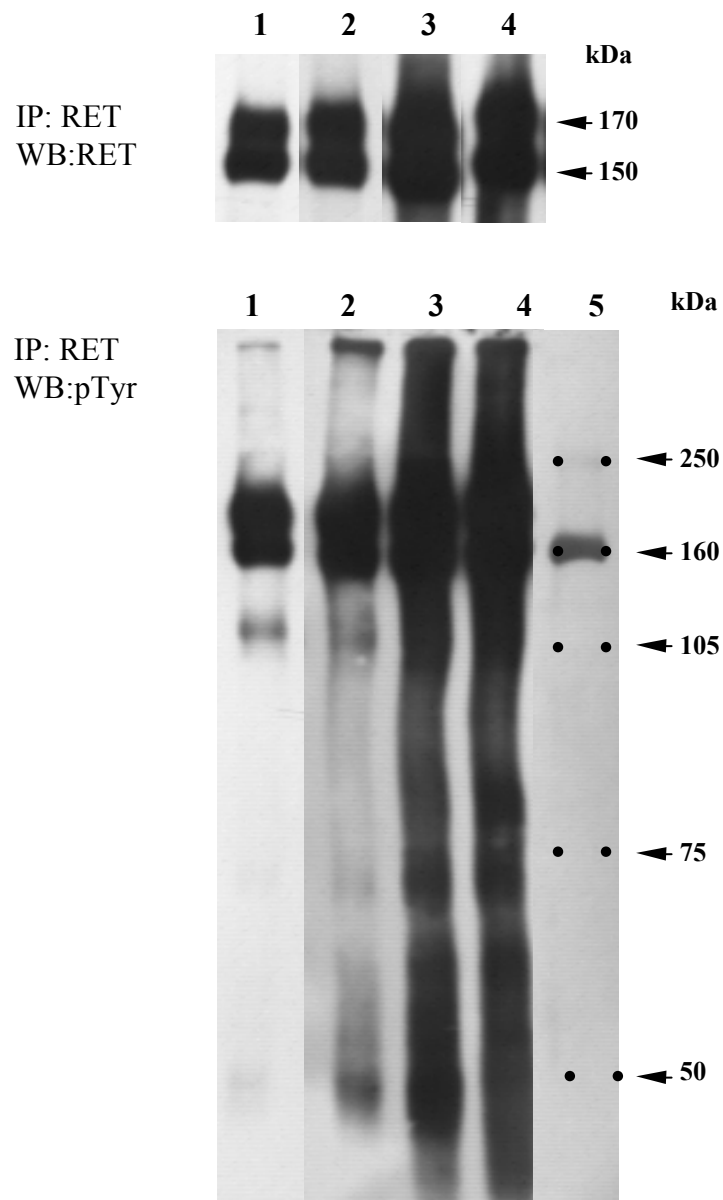
3.1.6 Untersuchung der kopräzipitierten Phosphotyrosin-Proteine

Bei der Immunpräzipitation des RET-Rezeptors werden alle assoziierten Proteine ebenfalls präzipitiert und während der SDS-PAGE der Größe nach getrennt. Bei den kopräzipitierten Proteinen handelt es sich um Adapterproteine, die nach der Aktivierung der Tyrosinkinase an den Rezeptor binden und die Auslösung der intrazellulären Signalwege bewirken. Einige dieser Proteine besitzen Tyrosinreste, die durch die Bindung ebenfalls phosphoryliert werden. Bei den stark exprimierenden Zellklonen ist die Menge dieser phosphorylierten Proteine hoch genug für die Detektion mit dem pTyr-Antikörper. Abbildung 6A zeigt die Expression der für den Vergleich verwendeten Klone. Der Leu790Phe-Klon 2 (Abb. 18, Spur 1) exprimiert ähnlich viel RET wie Klon 2 mit der +12bp-Mutation (Abb. 18, Spur 2). Das pTyr-Muster der beiden Mutationen zeigt Unterschiede. Insbesondere bei ca. 45 kDa ist bei dem +12bp-RET (Abb. 18, Spur 2) eine starke pTyr-Bande zu sehen, die bei dem Leu790Phe-Klon (Abb. 18, Spur 1) nur schwach zu sehen ist. Die pTyr-Bande bei ca. 115 kDa ist dagegen bei der Mutation in Codon 790 stärker als bei der +12bp-Mutation. Auch bei den extrazellulären Mutationen untereinander gibt es Unterschiede in dem pTyr-Muster. Die in der Expression vergleichbaren Klone +12bp Klon 4 (Abb. 18, Spur 3) und +9bp (Abb. 18, Spur 4) unterscheiden sich bei ca. 45 kDa und 80 kDa in der Stärke der pTyr-Signale.

In Abbildung 19 sind die pTyr-Muster bei niedrigerer Expositionszeit und im Vergleich mit den TT-Zellen dargestellt. Die Unterschiede zwischen der +9bp- (Abb. 19, Spur 2) und

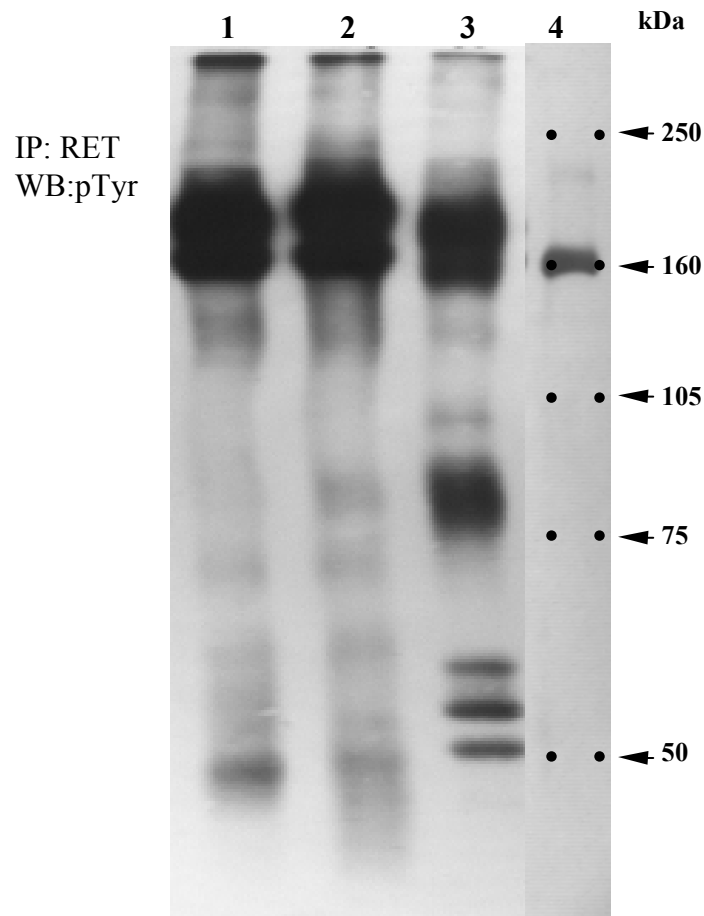
+12bp-Mutation (Abb. 19, Spur 1) im Bereich 45 kDa und 80 kDa sind deutlich zu erkennen. Wie im Vergleich mit den Leu790Phe-transfizierten Zellen ist bei dem +12bp-Klon das pTyr-Signal bei 45 kDa wesentlich stärker als bei dem +9bp-Klon.

A.



- 1: Leu 790Phe-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 2)
- 2: +12bp-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 2)
- 3: +12bp-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 4)
- 4: +9bp-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 5: Rainbow Marker

Abb. 18: Vergleich der pTyr-Signale von RET- koprizipitierten Proteinen



- 1: +12bp-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 2)
- 2: +9bp-transfizierte NIH3T3-Zellen
- 3: TT-Zellen
- 4: Rainbow Marker

Abb. 19: RET-kopräzipitierte pTyr-Proteine bei stark exprimierenden NIH3T3-Klonen im Vergleich zu den TT-Zellen. Expositionszeit: 30 Sekunden.

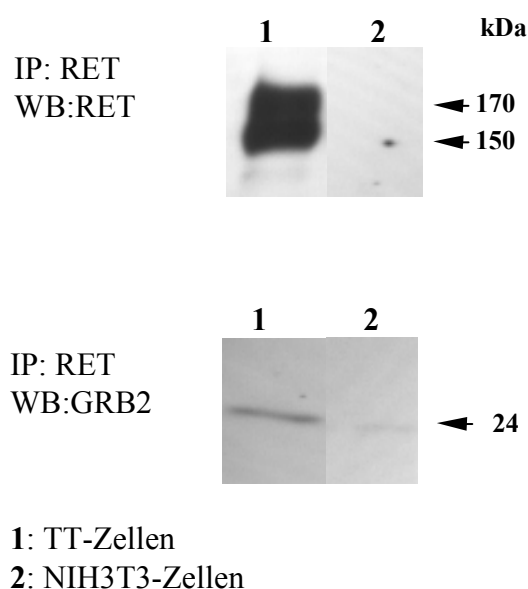
Dagegen ist das pTyr-Signal bei ca. 80 kDa bei dem +9bp-Klon stärker als bei der +12bp-Mutation. Interessant ist der Unterschied zwischen den transfizierten Mäusefibroblasten und den TT-Zellen. Insgesamt sind die pTyr-Signale der kopräzipitierten Proteine deutlich intensiver als bei den transfizierten Zellen. Zwischen 50 kDa und ca. 65 kDa können drei pTyr-Proteine detektiert werden. Bei ca. 80 kDa ist ein sehr starkes pTyr-Signal zu erkennen und bei ca 100 kDa eine schwache pTyr-Bande, die bei den transfizierten Zellen nicht erscheint.

3.1.7 Bindung von GRB2 an den RET-Rezeptor

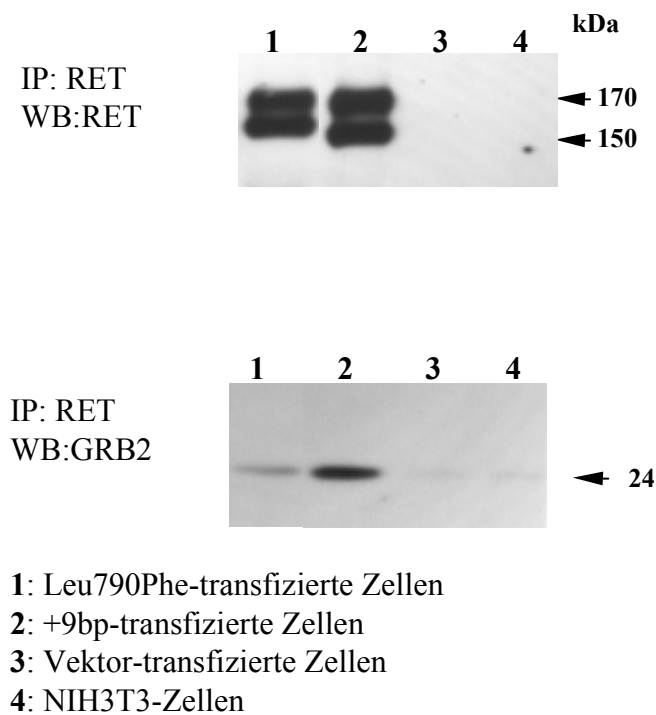
GRB2 ist ein Adapter-Protein des RET-Rezeptors. Die für diese Arbeit verwendete Short-Isoform des RET-Proteins bindet GRB2 nicht direkt, sondern über das Adapter-Protein SHC. Diese Bindung an den RET-Rezeptor ist nur mit stark exprimierenden Klonen möglich, da eine hohe Menge RET vorhanden sein muss, damit die kopräzipitierten GRB2-Moleküle detektiert werden können. In Abbildung 20A ist die Expression des RET-Proteins der TT-Zellen (Abb. 20A, Spur 1; IP:RET/WB:RET) dargestellt, sowie das kopräzipitierte GRB2 (Abb. 20A, Spur 1; IP:RET/WB:GRB2). Die nativen NIH3T3-Zellen (Abb. 20, Spur 2) exprimieren kein RET und zeigen ein sehr schwaches GRB2-Signal. Dies lässt darauf schließen, dass GRB2 eine geringe Affinität zu den Agarose-Beads hat, bei der Probenaufbereitung gelöst wird und mit auf das Gel aufgetragen wird.

Die Bindung von GRB2 an den RET-Rezeptor mit der Leu790Phe-Mutation (Abb. 20B, Spur 1) ist im Vergleich zur +9bp-Mutation (Abb. 20B, Spur 2) schwächer. Die Vektor-transfizierten Zellen zeigen ähnlich wie die nativen NIH 3T3-Zellen (Abb. 20B, Spur 3) ein sehr schwaches GRB2-Signal. Der Vergleich der GRB2-Koprazipitation zwischen Leu790Phe-RET und +12bp-RET zeigt hingegen ein stärkeres GRB2-Signal bei den der Leu790Phe-Mutation (Abb. 20C).

A.



B.



C.

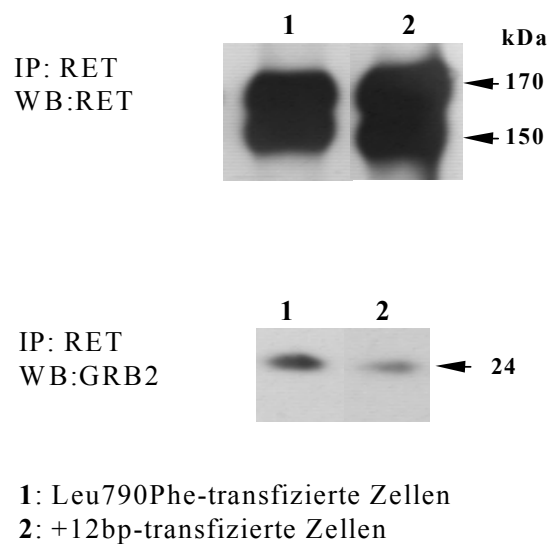


Abb. 20: Vergleich der RET-Kopräzipitation von GRB2 an die mutierten Rezeptoren stark exprimierender NIH3T3-Klone. A: Bindung von GRB2 an den RET-Rezeptor der TT-Zellen. B: Vergleich der GRB2-Bindung an den RET-Rezeptors zwischen Leu790Phe- und +9bp-transfizierten Zellen. C: Vergleich der GRB2-Bindung an den RET-Rezeptors zwischen Leu790Phe- und +12bp-transfizierten Zellen.

3.1.8 Bindung von PLC- γ an den RET-Rezeptor

PLC- γ wird an den aktivierten RET-Rezeptor gebunden. In Abbildung 21 ist die Kopräzipitation von PLC- γ für die stark exprimierenden Klone +9bp- (Abb. 21, Spur 1), +12bp Klon 2 (Abb. 21, Spur 2) und Leu790Phe Klon 2 (Abb. 21, Spur 3) gezeigt.

Es sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den Bindungen an den RET-Rezeptor in diesen stark exprimierenden Zellklonen zu erkennen. Zwar ist das PLC- γ Signal bei der +9bp-Mutation (Abb. 21, Spur 2; IP:RET/WB: PLC- γ) stärker als bei der 12bp-Duplikation (Abb. 21, Spur 2; IP:RET/WB:PLC- γ), doch ist auch die RET-Expression der +9bp-Zellen höher (Abb. 21, Spur 2; IP:RET/WB:RET) als bei den +12bp-Zellen (Abb. 21, Spur 3; IP:RET/WB:RET). Beim Vergleich von +9bp-RET (Abb. 21, Spur 2; IP:RET/WB:RET) und Leu790Phe-RET (Abb. 21, Spur 4; IP:RET/WB:RET) ist zu erkennen, dass die Expression von +9bp etwas niedriger ist als bei Leu790Phe. Das Signal der kopräzipitierten PLC- γ ist dagegen bei +9bp stärker (Abb. 21, Spur 2; IP:RET/WB: PLC- γ) als bei Leu790Phe (Abb. 21, Spur 4; IP:RET/WB:PLC- γ). Die Negativkontrolle der Vektor-transfizierten Zellen (Abb. 21, Spur 1; IP:RET/WB:RET) zeigt ein schwaches PLC- γ Signal.

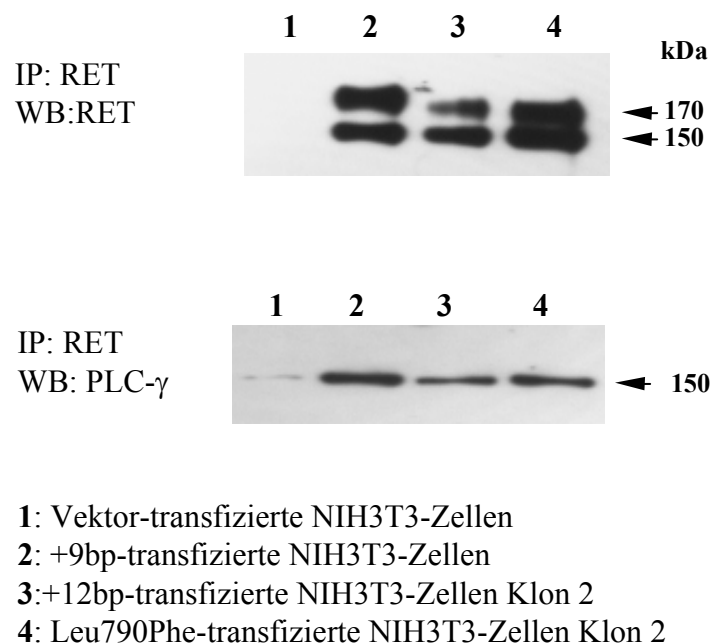


Abb. 21: Kopräzipitation von PLC- γ bei der Immunpräzipitation des RET-Proteins.

3.1.9 Veränderung der Morphologie transfizierter NIH 3T3-Zellen

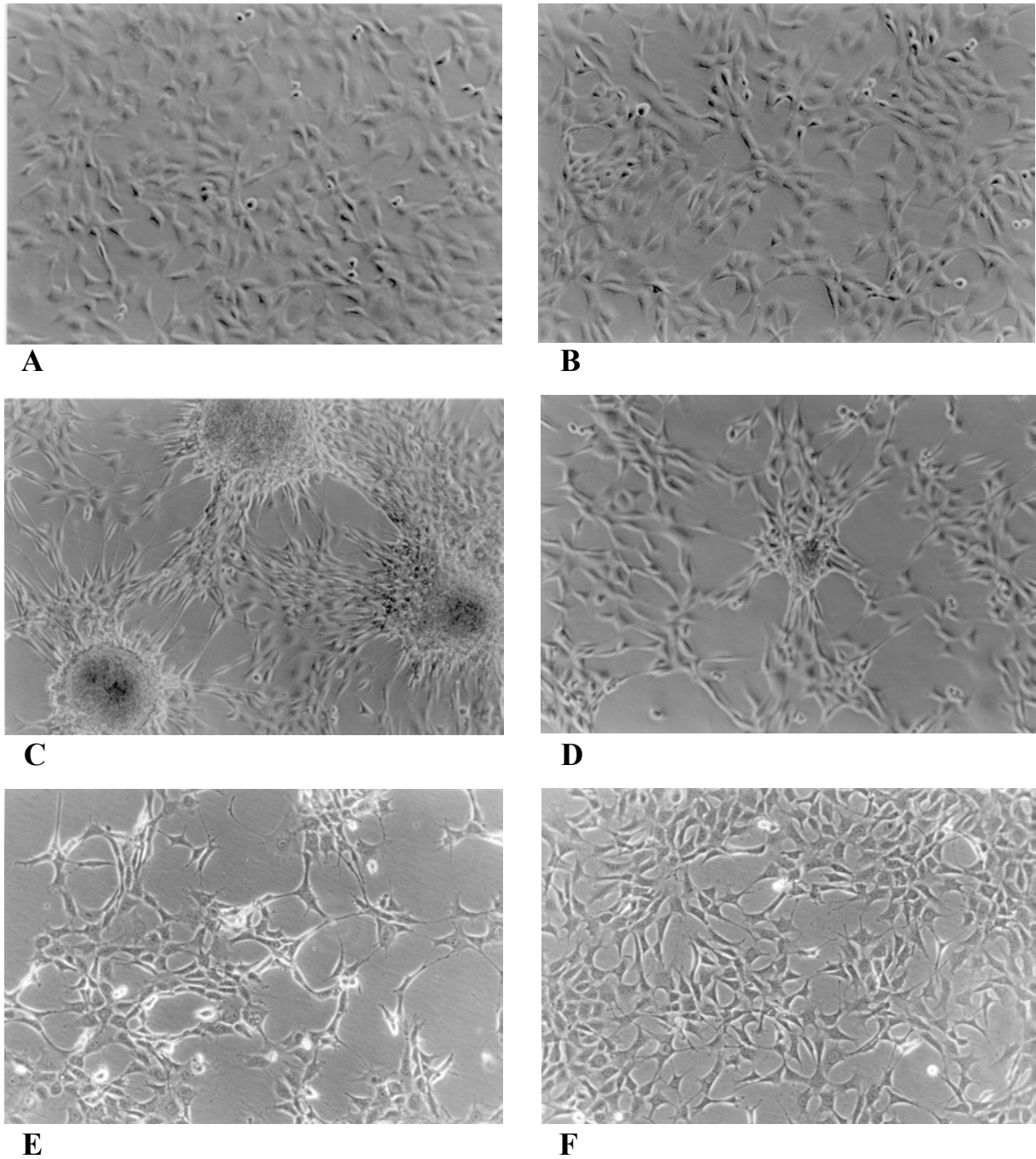
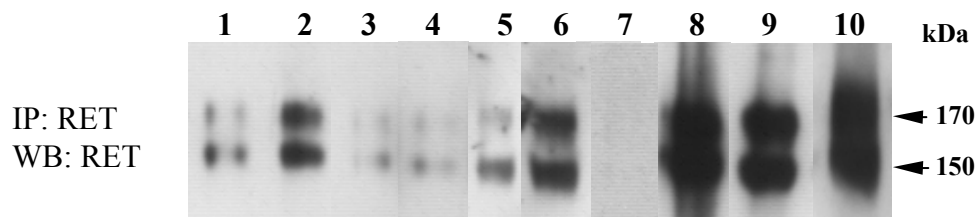


Abb. 22: Native NIH3T3-Zellen, B. wt-transfizierte NIH3T3-Zellen, C. +9bp-transfizierte NIH3T3-Zellen, D. +12bp-transfizierte NIH 3T3-Zellen (Klon 2), E. Leu790Phe-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 2), F: Tyr791Phe-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 2)

Die nativen NIH3T3-Zellen besitzen eine für Fibroblasten typische Morphologie (Abb. 22A), die sich nach der Transfektion mit der wt-RET cDNA (Abb. 22B) nicht wesentlich ändert. Wie schon in meiner Diplomarbeit gezeigt, führt die Transfektion mit der +9bp cDNA zur Ausprägung der transformierten Morphologie von Mäusefibroblasten (Abb. 22C). Diese ist durch die Bildung von Zell-Clustern und durch spindelförmige Zellen charakterisiert. Die +12bp-RET exprimierenden Zellen (Abb. 22D) bilden ebenfalls Zell-Cluster, doch sind diese kleiner und nicht in so grosser Anzahl wie bei den +9bp-RET exprimierenden Zellen. Auch die Spindelform der Zellen ist bei der +12bp-Mutation nicht so deutlich ausgeprägt. Die Leu790Phe- (Abb. 22E) und Tyr791Phe-transfizierten NIH3T3-Zellen (Abb. 22F) bilden keine Cluster. Statt dessen wachsen sie nicht so abgerundet wie die nativen Zellen und entwickeln Zellausläufer. Diese verleiht Ihnen ein Nervenzell-ähnliches Aussehen. Bei den Leu790Phe-transfizierten Zellen ist dieser Phänotyp stärker ausgeprägt.

3.1.10 Überprüfung der transformierenden Eigenschaften der RET-Mutationen im Poly-HEMA-Assay

Transformierte Zellen verlieren die Eigenschaft des substratabhängigen Wachstums. Diese Fähigkeit der Proliferation ohne feste Anheftung dient als in vitro-Indikator für Tumorgenizität. Für NIH 3T3-Zellen ist gezeigt, dass sie nach der Transfektion mit Protoonkogenen die Eigenschaft erlangen, auf Poly-HEMA beschichteten Oberflächen zu wachsen (Fukazawa et al., 1995). Werden 96-Well-Zellkulturplatten mit Poly-HEMA beschichtet, kann man mit diesen Platten ein Mikroplate-Assay zur Quantifizierung substratabhängigen Wachstums durchführen. In Abbildung 23 ist die RET-Expression der für den Transformationsassay eingesetzten Zellklone gezeigt. Für wt-RET (Abb. 23, Spur 1 und Spur 2), +12bp-RET (Abb. 23, Spur 3 und Spur 4), Tyr791Phe-RET (Abb. 23, Spur 5 und Spur 6) sowie für Leu790Phe-RET (Abb. 23, Spur 7) wurden die schwach exprimierenden Klone eingesetzt, die für die Überprüfung der ligandenunabhängigen Aktivierung der Tyrosinkinase dienten. Außerdem wurden die stark exprimierenden Klone mit den Mutationen Leu790Phe (Abb. 23, Spur 8), +9bp (Abb. 23, Spur 9) und +12bp (Abb. 23, Spur 10) in dem Transformationsassay untersucht, die in Abschnitt 6 für die Untersuchungen kopräzipitierter Phosphotyrosin-Proteine, in Abschnitt 7 auf die Bindung von GRB2 und in Abschnitt 8 auf die Kopräzipitation von PLC- γ überprüft wurden.



- 1: wt-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 1)
- 2: wt-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 2)
- 3: +12bp-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 1)
- 4: +12bp-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 3)
- 5: Tyr791Phe-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 1)
- 6: Tyr791Phe-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 2)
- 7: Leu790Phe-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 1)
- 8: Leu790Phe-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 2)
- 9: +9bp-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 1)
- 10: +12bp-transfizierte NIH3T3-Zellen (Klon 2)

Abb. 23: Expression des RET-Rezeptors bei den für den Poly-HEMA-Assay eingesetzten Zellklone.

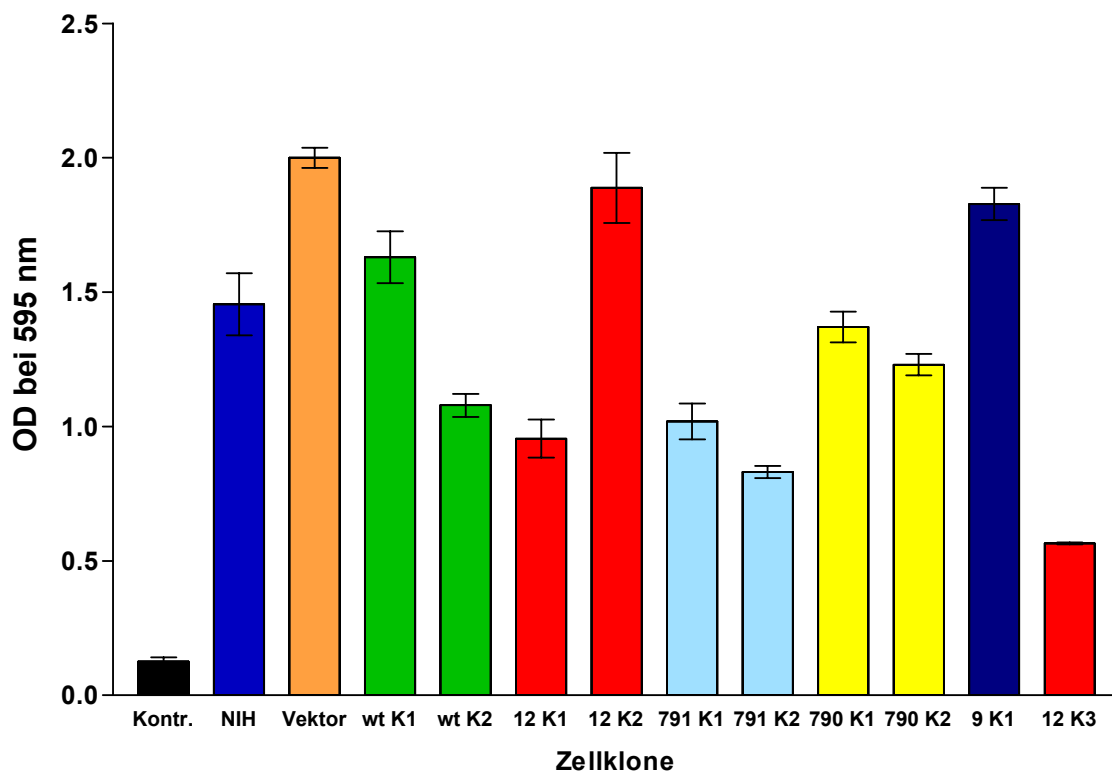


Abb. 24: Proliferation der transfizierten Zellklone in unbeschichteten 96-Well-Platten

Wie im Methodenteil beschrieben (s. 2.2.4.3), wurde ein Proliferations-Assay mit nicht-beschichteten 96-Well-Zellkulturplatten durchgeführt (Abb. 24). Aus den Werten der OD bei 595 nm nach Lösung der MTT-Kristalle ist zu erkennen, dass das Wachstum der einzelnen Klone sehr unterschiedlich ist. Die Vektor-transfizierten Zellen zeigen im Vergleich zu den nativen NIH 3T3-Zellen eine höhere Proliferation (Abb. 24, Säule 2 und Säule 3). Dies ist jedoch keine regelmäßige Konsequenz, die durch die Prozedur der Transfektion erfolgt. Dies wird durch den Vergleich mit den *RET*-transfizierten Mäusefibroblasten deutlich. Die wt-transfizierten Zellen des Klons wtK1 Proliferation (Abb. 24, Säule 4) zeigen eine niedrigere Proliferation als die Vektor-transfizierten Zellen. Der wt-Klon wtK2 (Abb. 24, Säule 5), der eine höhere RET-Expression als wtK1 aufweist (Abb. 24, Spur 1 und Spur 2), zeigt eine niedrigere Proliferation als der Klon wtK1.

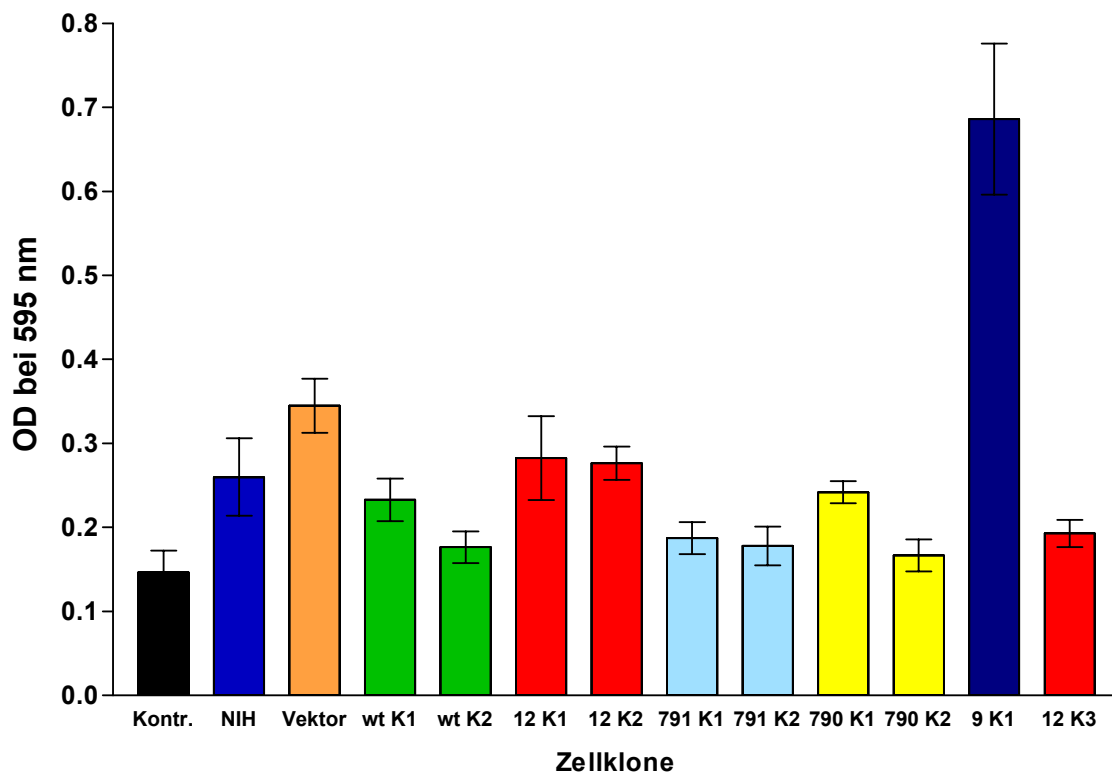


Abb. 25: Wachstum der Zellklone in Poly-HEMA beschichteten 96-Well-Platten.

Dass die Menge des RET-Proteins nicht direkt mit der Proliferationsrate der transfizierten Zellen korreliert, ist an dem Wachstum der +12bp-Klone zu erkennen. Die annähernd gleich exprimierenden Klone 12K1 (Abb. 24, Säule 6) und 12K3 (Abb. 24, Säule 7) unterscheiden sich in der Proliferation. Die sehr stark exprimierenden Zellen des Klons 12K3 (Abb. 24,

Säule 13) zeigen ein niedrigeres Wachstum als die Vektor-transfizierten Zellen. Die Proliferation der beiden Tyr791Phe-Klone (Abb. 24, Säule 8 und Säule 9) unterscheidet sich nicht sehr voneinander und das Wachstum der Leu790Phe-transfizierten Zellen ist ebenfalls ähnlich (Abb. 24, Säule 10 und Säule 11). Das Wachstum der ähnlich stark exprimierenden Klone 790K2 (Abb. 24, Säule 11), 9K1 (Abb. 24, Säule 12) und 12K2 (Abb. 24, Säule 13) ist sehr unterschiedlich.

Die Untersuchungen mit Poly-HEMA beschichteten Zellkulturplatten zeigten, dass die nativen NIH 3T3-Zellen ein geringe Fähigkeit zum substratunabhängigen Wachstum aufweisen (Abb. 25, Säule 2). Bei den Vektor-transfizierten Zellen erhöht sich diese Fähigkeit (Abb. 25, Säule 3), bei den wt-transfizierten Zellen verringert sich dagegen das Wachstum beim Klon wtK1 (Abb. 25, Säule 4) und bei dem höher exprimierenden Klon wtK2 (Abb. 25, Säule 5). Die in der Expression mit wtK1 zu vergleichenden 12K1-Zellen (Abb. 25, Säule 6) zeigen ein höheres Wachstum, der ebenfalls in dieser Menge exprimierende Klon 12K3 (Abb. 25, Säule 7) zeigt im Vergleich zu 12K1 nur ein wenig geringeres Wachstum auf der Poly-HEMA beschichteten Oberfläche. Bei den Zellen mit Tyr791Phe-RET (Abb. 25, Säule 8 und Säule 9) und Leu790Phe-RET (Abb. 25, Säule 10 und Säule 11) verringert sich die Fähigkeit zum substratunabhängigen Wachstum im Vergleich zu den +12bp-Klonen (Abb. 25, Säule 6 und Säule 7) und nähert sich den Werten der wt-transfizierten Klone an (Abb. 25, Säule 4 und Säule 5). Der Vergleich zwischen den stark exprimierenden Klonen 790 K2 (Abb. 25, Säule 11), 9K1 (Abb. 25, Säule 12) und 12K2 (Abb. 25, Säule 13) zeigt für die +9bp-RET Zellen ein sehr hohes Wachstum, welches den Wert der Vektor-transfizierten um ca. das zweifache übersteigt. Die 12K2-Zellen und die 790K2-Zellen besitzen dagegen kaum die Eigenschaft auf den Poly-HEMA beschichteten Platten zu wachsen.

3.1.11 Soft-Agar-Experimente

Bei den Soft-Agar-Experimenten konnte keine Bildung von Zell-Clustern bei den transfizierten Mäusefibroblasten detektiert werden.

3.2 Ergebnisteil B: Charakterisierung der humanen neuroektodermalen Tumorzelllinie SK-N-MC und der humanen Neuroblastom-Zelllinie Kelly zum Aufbau eines für die Untersuchung der seltenen RET-Mutationen geeigneten in-vitro-Systems.

Ziel war, eine humane Zelllinie mit neuroektodermalen Ursprung in Kultur zu nehmen, die keinen RET-Rezeptor, jedoch die Korezeptoren GFR- α 1 und GFR- α 2 exprimiert, so dass nach der Transfektion mit der *RET*-cDNA die Stimulierung mit den RET-Liganden GDNF und NTN durchgeführt werden kann. Außerdem ist es notwendig, eine Kontroll-Zelllinie zu untersuchen, die ebenfalls neuroektodermalen Ursprungs ist und den wt-RET-Rezeptor sowie die Korezeptoren GFR- α 1 und GFR- α 2 exprimiert, um auszuschliessen, dass die Effekte der Stimulierung mit GDNF und NTN bei den transfizierten Zellen Artefakte durch Transfektion und/oder Überexpression des RET-Proteins darstellen.

3.2.1 Überprüfung der RET-Expression bei SK-N-MC-Zellen und Kelly-Zellen

Für die Untersuchung der RET-Expression wurde eine Immunpräzipitation mit dem RET-spezifischen Antikörper und anschliessende Detektion mit Anti-RET durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden die TT-Zellen verwendet (Abb.26, Spur 1).

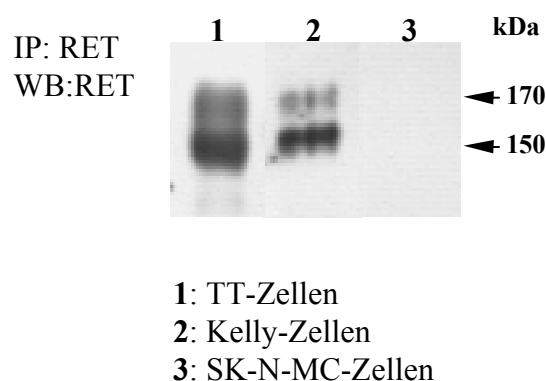


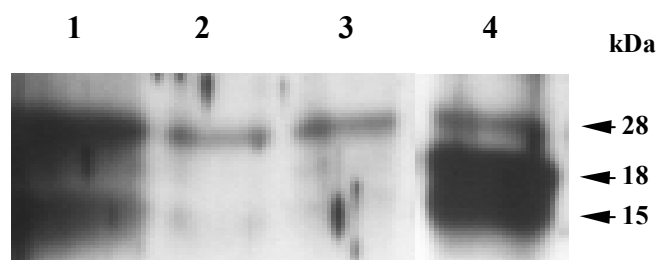
Abb. 26: Expression des RET-Rezeptors in humanen Zelllinien neuroektodermalen Ursprungs.

Die Kelly-Zellen exprimieren das RET-Protein (Abb. 26 Spur 2), während für die SK-N-MC-Zellen keine RET-Expression nachweisbar ist (Abb. 26, Spur 3).

3.2.2 Vergleich der Expression der RET-Liganden GDNF und NTN

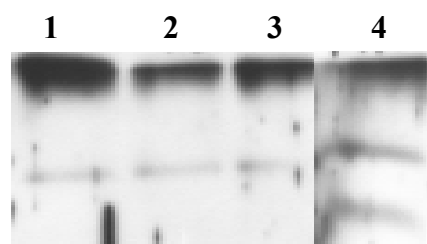
In autokrinen Systemen werden die von Rezeptor- Liganden von den zu stimulierenden Zellen selbst exprimiert und sezerniert. Für den Aufbau des in vitro-Systems zur Untersuchung der *RET*-Mutationen ist es notwendig, die zu transfizierenden Zellen sowie die Kontroll-Zelllinie auf die Expression der RET-Liganden zu untersuchen, um die Daten bei der Auswertung der Ergebnisse vor und nach der Stimulierung zu berücksichtigen.

A.



1: TT-Zellen
2: Kelly-Zellen
3: SK-N-MC-Zellen
4: Rekombinantes GDNF (100ng)

B.



1: TT-Zellen
2: Kelly-Zellen
3: SK-N-MC-Zellen
4: Rekombinantes NTN (100ng)

Abb. 27: A: Expression von GDNF in humanen Zelllinien neuroektodermalen Ursprungs. B: Expression von NTN in humanen Zellen neuroektodermalen Ursprungs.

In Abbildung 27A ist die Expression von GDNF dargestellt. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes GDNF verwendet (Abb. 27A, Spur 4). Die C-Zellkarzinomzellen der TT-Zelllinie wurden ebenfalls untersucht, um den Vergleich mit Zellen herzustellen, bei denen die beschriebenen aktivierenden *RET*-Mutationen zur Transformation führen. Die TT-Zellen exprimieren ein hohes Maß an GDNF (Abb. 27A, Spur 1), die Kelly-Zellen (Abb. 27A, Spur 2) sowie die SK-N-MC-Zellen (Abb. 27A, Spur 3) exprimieren deutlich weniger Protein des RET-Liganden.

Auch bei der Expression von NTN (Abb. 27B) zeigt sich eine höhere Expression bei den TT-Zellen (Abb. 27B, Spur 1) als bei Kelly-Zellen (Abb. 27B, Spur 2) und den SK-N-MC-Zellen (Abb. 27B, Spur 3). Als Positivkontrolle diente rekombinantes NTN (Abb. 27B, Spur 4).

Während die Expression von GDNF in den Kelly-Zellen und SK-N-MC-Zellen ähnlich stark ist (Abb. 27A, Spur 2 und Spur 3), zeigen die SK-N-MC-Zellen eine höhere Expression von NTN als die Kelly-Zellen (Abb. 27B, Spur 2 und Spur 3).

3.2.3 Vergleich der Expression der RET-Korezeptoren GFR- α 1 und GFR- α 2

Die Expression der RET-Korezeptoren GFR- α 1 und GFR- α 2 wurde mittels RT-PCR überprüft. Die C-Zell-Karzinomlinie TT exprimiert den RET-Korezeptor GFR- α 1 sehr stark (Abb. 28, Spur 1), die Expression von GFR- α 2 konnte in dieser Zelllinie nicht nachgewiesen werden (Abb. 28, Spur 1). Die Kelly-Zellen zeigen ebenfalls eine starke GFR- α 1-Expression, GFR- α 2 wird vergleichsweise schwach exprimiert (Abb. 28, Spur 2). Die SK-N-MC-Zellen zeigen im Vergleich zu den Kelly-Zellen und den TT-Zellen ein umgekehrtes Expressionsmuster der untersuchten RET-Korezeptoren (Abb. 28, Spur 3). GFR- α 2 wird in diesen Zellen stark exprimiert, während für GFR- α 1 nur eine sehr schwache Expression nachweisbar ist.

3.2.4 Überprüfung der ligandenunabhängigen Dimerisierung der Mutationen in Exon 13

Um sicher zu gehen, dass die Ergebnisse bezüglich der ligandenunabhängigen Dimerisierung auf das humane Zellsystem übertragbar sind, wurden mit den Zelllysaten der wt-transfizierten SK-N-MC-Zellen, und der

Mutationen +12bp, Leu790Phe und Tyr791Phe Western Blot-Analysen unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden schwach exprimierende Klone verwendet. Die Proteine des wt-RET zeigen die monomeren Formen bei 150 kDa und 170 kDa (Abb. 29, Spur 1), wobei das 150 kDa Monomer nur schwach zu sehen ist. Das RET der +12bp-Mutation zeigt ein Signal bei ca. 300 kDa (Abb. 29, Spur 2), während für das RET mit den Mutationen Leu790Phe und Tyr791Phe lediglich die Monomere detektierbar sind (Abb. 29, Spur 3 und Spur 4).

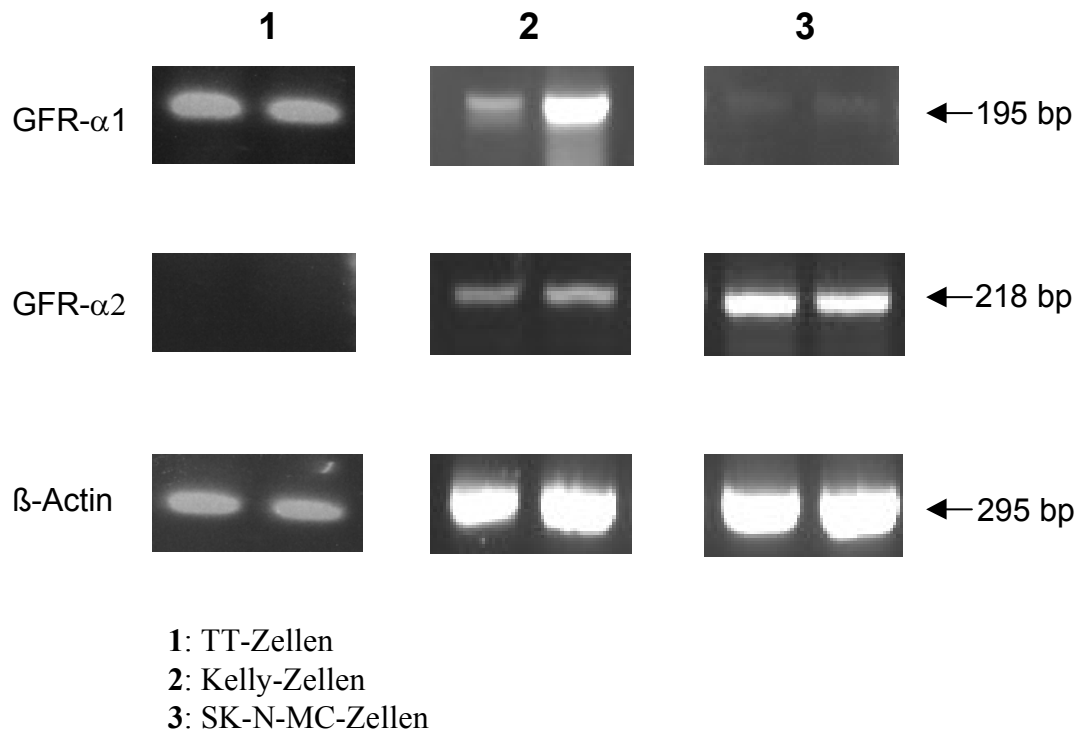


Abb. 28: Expression der RET-Korezeptoren RNA in humanen Zelllinien neuroektodermalen Ursprungs.

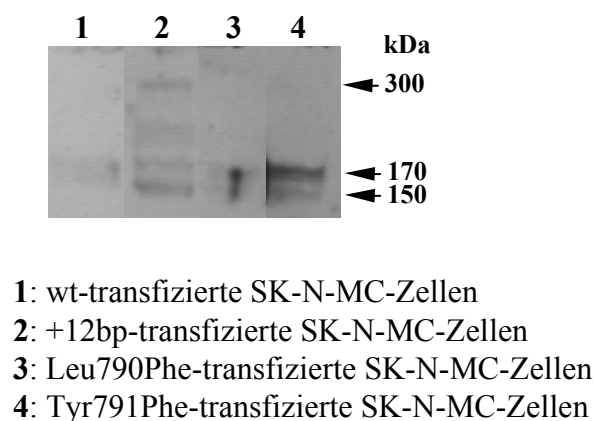


Abb. 29: Untersuchungen zur ligandenunabhängigen Dimerisierung des RET-Rezeptors in transfizierten SK-N-MC-Zellen.

3.2.5 Veränderung der Morphologie transfizierter SK-N-MC-Zellen

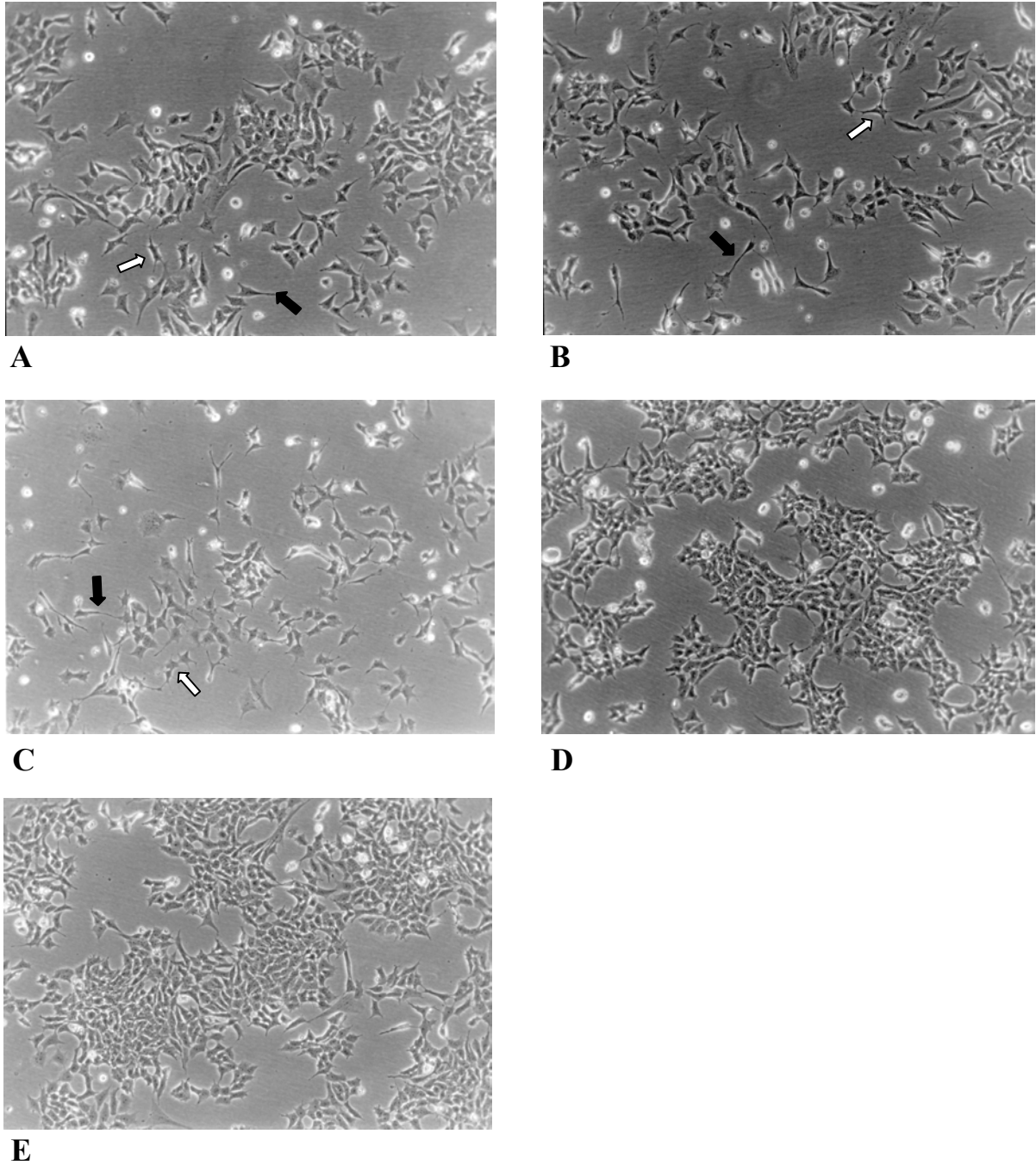


Abb. 30: A. Native SK-N-MC-Zellen, B. wt-transfizierte SK-N-MC-Zellen, C. +12bp-transfizierte SK-N-MC-Zellen, D. Leu790Phe-transfizierte SK-N-MC-Zellen, E. Tyr791Phe-transfizierte SK-N-MC-Zellen

Die nativen SK-N-MC-Zellen zeigen polygone Formen (Abb. 30A). Teilweise sind Zellausläufer zu erkennen, welche den Zellen ein längliches Aussehen verleihen (ausgefüllte Pfeile). Andere Zellausläufer sind eher sternenförmig (nicht ausgefüllte Pfeile). Die Zellen wachsen in Gruppen. wt-transfizierte Zellen wachsen in Gruppen weniger ausgeprägt (Abb. 30B). Es kommt statt dessen verstärkt zur Ausbildung von Zellausläufen. Ähnlich sehen die +12bp-transfizierten SK-N-MC-Zellen aus (Abb. 30C), nur ist bei diesen Zellen die Ausbildung von Ausläufen noch intensiver. Die Leu790Phe- (Abb. 30D) und Tyr791Phe-transfizierten Zellen (Abb. 30E) bilden im Gegensatz dazu kaum Zellausläufer. Sternenförmige Zellen sind nicht zu erkennen. Nur wenig längliche Zellen wachsen. Im Vergleich zu den nativen Zellen ist das Gruppenwachstum stärker ausgeprägt.

3.2.6 Vergleich der Proliferation zwischen transfizierten- und nicht-transfizierten Zellen

Um zu überprüfen, ob die Expression der mutierten RET-Rezeptoren Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen hat, wurden Wachstumskurven erstellt. In Abbildung 31A sind die nativen SK-N-MC-Zellen im Vergleich zu zwei wt-transfizierten Klonen und zwei Leu790Phe-transfizierten Klonen dargestellt. Das Wachstum dieser Zelllinie ist durch eine lange lag-Phase (Anlaufphase) charakterisiert. Erst nach 120 Stunden geht das Wachstum in die exponentielle Wachstumsphase über. Die wt-transfizierten Zellen zeigen das gleiche Wachstumsprofil wie die nativen SK-N-MC-Zellen. Die OD 595 der beiden wt-transfizierten Zellen und der nativen Zellen liegt nach 144 Stunden bei ca. 0,6. Die Zellen, welche mit der Leu790Phe-cDNA transfiziert worden sind, zeigen bis 120 Stunden ein ähnliches Wachstum wie die wt-transfizierten Klone. Danach steigt die Wachstumsrate der Leu790Phe-transfizierten Zellen jedoch deutlich steiler als bei wt-transfizierten Zellen und nativen SK-N-MC-Zellen. Die OD liegt nach 144 Stunden bei 0,77 und ist somit um das ca. 1,28-fache höher als bei den wt-transfizierten Zellen. Beim Vergleich zwischen den wt-transfizierten Zellen und Tyr791Phe-exprimierenden SK-N-MC-Zellen (Abb. 31B) stimmen die Ergebnisse mit denen des vorherigen Vergleichs überein. Auch bei den beiden untersuchten Tyr791Phe-transfizierten Klonen steigt die Wachstumsrate nach 120 Stunden steiler an als bei den beiden wt-transfizierten Klonen und den nativen SK-N-MC-Zellen. Der OD 595-Wert liegt mit 0,78 nicht signifikant höher als bei den Leu790Phe-transfizierten Zellen mit 0,77. Die +12bp-exprimierenden Zellen zeigen im Vergleich zu den transfizierten Klonen mit Mutationen im Exon 13 und mit den wt-transfizierten Zellen ein anderes Wachstumsprofil (Abb. 31C). Schon

nach 72 Stunden ist zu sehen, dass die Proliferation langsamer verläuft. Nach 120 Stunden wird das differente Wachstum deutlich. Während, wie oben beschrieben, die wt-transfizierten Zellen in die exponentielle Wachstumsphase übergehen, bleibt dies bei den +12bp-exprimierenden Zellen aus. Für den 12b-Klon liegt die OD 595 nach 144 Stunden bei 0,45 und für den Klon 12d bei 0,35.

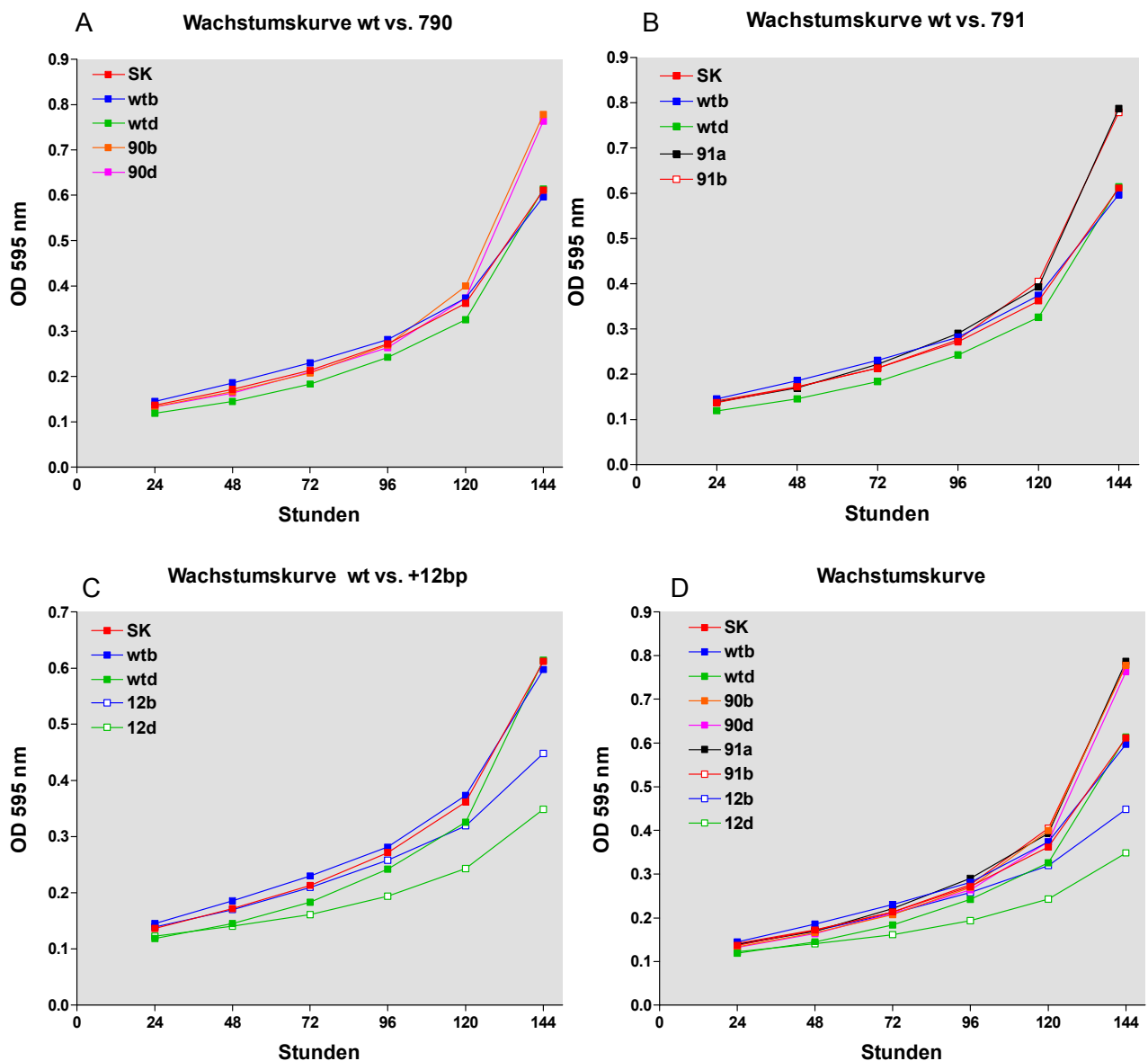


Abb. 31: Proliferation der transfizierten SK-N-MC-Zellen im Vergleich zu den nativen Zellen.

Die Wachstumsrate liegt bei 12b damit um das 0,75-fache niedriger als bei den wt-transfizierten Klonen, bei 12d um das 0,58-fache niedriger. Abbildung 31D verdeutlicht die Unterschiede im Wachstum zwischen den verschiedenen Mutationen. Es sind alle neun Wachstumskurven übereinander dargestellt. Für die Klone mit den Mutationen in Exon 13 und den Klonen mit der 12bp-Duplikation sind charakteristische Veränderungen in der Proliferation im Vergleich zu den wt-transfizierten Klonen und den nativen SK-N-MC-Zellen zu erkennen.

3.2.7 Sequenzvergleich der RET-Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies

Gezeigt ist das Alignement der RET-Rezeptoren von *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* (Abb. 32). Die meisten Sequenzunterschiede sind in der extrazellulären Domäne zu dem Rezeptor von *Drosophila melanogaster* vorhanden. Interessant ist der Vergleich der Cystein-Reste in der cysteinreichen Domäne. Zwölf Cystein-Reste sind in den Rezeptoren aller vier Spezies vorhanden. Cystein 630 und Cystein 634 werden bei *Drosophila melanogaster* durch Glutamin und Leucin ersetzt. In der Tyrosinkinase-Domäne gibt es eine sehr hohe Sequenzhomologie zwischen den Spezies. Die in dieser Arbeit untersuchten Reste Leucin 790 und Tyrosin 791 sind jeweils innerhalb von drei Spezies konserviert. Leucin 790 ist im Rezeptor von *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* vorhanden, Tyrosin 791 kommt in *Danio rerio*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* vor. Die beiden Reste sind flankiert von jeweils drei Aminosäuren, die in allen vier Spezies konserviert sind.

3.2.8 Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen der Kinase-Domänen verschiedener humaner Tyrosinkinase-Rezeptoren

Gezeigt ist das Alignement des RET-Rezeptors, des FGF-Rezeptors 1, des VEGF-Rezeptors, des TRK-Rezeptors A und des Insulin-Rezeptors (Abb. 33). Hochkonserviert sind die Sequenzen der ATP-Bindungsdomäne und der katalytischen Domäne. Auch in der Aktivierungsdomäne und C-terminal derselben gibt es viele Sequenzhomologien zwischen den hier aufgeführten Rezeptoren. Das Leucin 790 des RET-Rezeptors ist in drei der vier weiteren Rezeptoren vorhanden. Der Tyrosin-Rest 791 des RET-Rezeptors ist an dieser Stelle

einzigartig in den verglichenen Rezeptoren, liegt jedoch direkt neben einem hochkonservierten Glycin-Rest.

	Signalpeptid
hret	MAKATSGAAGLRLLLLLLLPLLGKVALGLYFSRDAYWEKLYVDQAAGTPLLYVHALRDAP
mret	MAKATSGAAGLGKLILLPLLGKVALGLYFSRDAYWERLYVDQAGTPLLYVHALRDAP
drret	-MGSTRG-----IVMGVLLLLLSEGSFGLYFPQRLYTENIYVGQQQGSPLLQVISMREFP
dret	---MESTTIVFVTLTIIITQQRKHCAAVDVYFPTTSVKFNLPINEESESIFSKIPLAQFQV
hret	EEVPSFRLGQHLYGTYRTRLHENNWICIQEDTGLLYLNRSLDHSSWEKLSVRNRGFPLLT
mr	GEVPSFRLGQHLYGVYRTRLHENDWIRINETTGLLYLNQSLDHSSWEQLSTRNGGFPLLT
drret	TERPYFFLCSHRDAFT-----SWFHIDEASGVLYLNKLTLEWSDFSSLSRSGSVRSRK-D
dret	LRMEDNRLASDYLYSLE----QNPLLRINSSPGEIYMR-----TDYRSEPNSSATFLV
hret	VYLKVFSLPSTSLREGECQWPGCARVYFSFFNTSFPACSSSLKPRELCFPETRPSFRIRENR
mret	IFLQVFLGSTAQREGECWPGCTRVYFSFINDTFPNCSSFAQDLCEPETAVSSRVRENX
drret	LTLKVGVSSTPMPKVMCTILEPTVEVKLSFINDTAPSCGQVELSTLCFPEKISNPHITENR
dret	TAFPRDQPDHELLNVSHLSLEVTPQPLEEYCSELEHICFWSSAQYTIAESHGFPYRRKDF
	↓ Cadherin-Domäne
hret	EPGTFHQFRLLEVOFLCPNISVAYRLLLEGGLFFRCAPDSEVSTRWALDRE-----QRE
mret	EPGTFYHFMLEVOFLCPNISVKYSLGGDSLFFRCDDCEVSTRWALDRE-----LRE
drret	EPGALRHVRRFTHMSICPNYTISYGVVAGSSVPFAVDDSTSELVVTAQVDRE-----EKE
dret	EPVLIGALNSRAAKYLCPHVSLEYSLNAG-SSHFLVKQNRLYTROTLDHDELNGLNAKAG
hret	KYELVAVCTVH-AGAREEVVMVFFVTVYDEDDSAPTFPAGVDTASAVVEFKRKEDTVVA
mret	KYVLEALCIVAGPGANKETVTLSPFVTVYDEDDSAPTFSGGVGTASAVVEFKRKEGTVVA
drret	VYHLDIVCMVR-TERNLEEVRSLHVNLYDEDDNSP-YVNGTDTEDVLVEFDRSEGTVFG
dret	QLQARITCTVKLSSRDQRFKSRILDIKLLDRNDNGPKLQESSSKFDLYEQPYFQADEEA
hret	TLRVFDADVVPAS--GELVRRYTST-----LLPGDTWAQQTFRVEHWPNETSVQANGSFV
mret	TLQVFDADVVPAS--GELVRRYTNT-----LLSGDSWAQQTFRVEHSPIETLVQVNNNSV
drret	TLFVYDRDTTPVYPTNQVQNKLVGT-----LMTNDSWIKNNFAIEHKFREEKAIFGN--V
dret	GKNVIYVDRDTEANAHLVYAVHNDSHGLFRPDCHAYEADHTGRPHITIVSCQLRFSRNGV
hret	RATVHDYRLVLNRLNLSISE-----NRTMQLAVLVNDSDFQGPAG--VLLLHFNVSVLP
mret	RATMHNKYLILNRLNLSISE-----SRVLQAVLVNDSDFQGPAGG--ILVLHFNVSVLP
drret	RGTVHEYKLLKLSQNLSVTE-----QRSFLGLYLVNDTTFPGPEG--TVLLHFNVTVLP
dret	FRTEPYCVSLEARDLTIVSRVDAMSATANVCYHINLSKLHESEQELPQALPLRARQHRIF
hret	VSLHLP-STYSLSVSRARRFAQIGKVCVENCOAFSGINVQYKLHSSGANCS-----
mret	VTINLP-RAYSFPVNKRARRYAQIGKVCVENCOEFGSVSIQYKLQPSINCT-----
drret	VPIRFSNVTSFTVSQKATYSQIGKVCVENCOQFKGIDVTYQLEIVDRNITABEQSCYW
dret	ESEEFNGDSAGRSLSPPTVDYDKDVSVYRASAASFVQVQPSFLDLMLRLRSIR--FDIVE
hret	TLGVVTSABEDTSGILFVNDTKALRRPKCAELHYMVVATDQQTSRQAQQLLVTVEGSYVA
mret	ALGVVTSBEDTSGTLFVNDTEALRRPECTKLQYTVVATDRQTRQQTASLVVTVVEGTSIT
drret	AVSLAQNPNDNTGVLYVNDTKVLRPECEQLEYVVIQEQNKLOAKTQLTVSFQGEADS
dret	DKLGAFGITSTSGIVFVKNPQVLEEAPETIYFLNVTWIDQQLSHVRVINVHLVHGRPEN
hret	EEAGCP-----LSCAVSKRRLBCEECGGGLSPTGRCEWRQDGKGITRNFSTCSPSTKTC
mret	EEVGCP-----KSCAVNKRREBCEECGGGLSPTGRCEWRQDGKGITRNFSTCSPSTRTC
drret	LRTDEPR---FPACAEKRQRGDCEATRGLGAPTGRQCWRQGRDKGISKRYSTCSPNLGTC
dret	TSCELKVKRSQTCAQIKYQSCQVRYCGLATGGGSCQWRGNSAMFGTRYGSCVPESRYC
hret	PDGHCDVVEQTQDINICPDCLRGSIIVGG--HEPGEPRGIKAGYGTNCFFEEKCFCEPE
mret	PDGHCDAVESRDANICPDCLRADIVGG--HERGERQGIKAGYGTNCFFDEKKCFCEPE
drret	PDGYCDAIESKNISICPDCSSEAIIG--YER-DLYGIKAGHGTCTCYCFEG--KCFECERD
dret	PDHVCDPLEELNPMACPDCTPAGRIVGPHSSNENKRGYISASGTCICE-DNGKCSCAPL

	A TP-Bindungs Domäne	TK-Domäne 1	
hRET	WEFPPK ^L N ^L V ^L LGKTL ^L GE ^L GE ^L FGK ^L V ^L VKATAFHLKGRAG--YTTVAV ^L KMLKENASPSELRDLLS		
hFGFR1	WELP ^L RDRLV ^L LGKPL ^L GE ^L CGFQ ^L VLAELAIGLDKDKPNRVTKVAV ^L KMLKSDATEKDLSDLIS		
hVEGFR	WEFARERLKL ^L GKSL ^L GRGAF ^L GKVVQASAFGIKKSP---CRTVAV ^L KMLKEGATASEYKALMT		
hTRKA	HHIKRRDIVL ^L KWEL ^L GE ^L GAFGK ^L VFLAECHNLLPEQD--KMLVAV ^L KALKEAS-ESARQDFQR		
hINSR	WEVSRKITLLREL ^L GQGS ^L FGMVYEGNARDIIKGEA--ETR ^L VAV ^L KTVNESASLRERIEFLN		
	L790Y791	Kinase-Insert	
hRET	EFNVLKQVN-HPHVIKLYGACSQDG-P ^L LLLI ^L VEYAKY ^L GS ^L LRGFL ^L RESR-----		
hFGFR1	EMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQDG-P ^L LYVIV ^L EYASK ^L GN ^L REYL ^L QARR-----		
hVEGFR	ELKILTHIGHHLNVVNLLGACTKQGGPLMVIV ^L EYCKY ^L GN ^L SNY ^L LKSKRDLFFLNKDAALH		
hTRKA	EAELLTMLQ-HQHIVRFFGVCTE-GR ^L LLMV ^L FEYMRH ^L GD ^L LN ^L RFL ^L RSHG-----		
hINSR	EASVMKGFT-CHHVVRLLGVVSK-GQ ^L PLVVMELMAH ^L GD ^L LK ^L S ^L Y ^L LSLR-----		
	Domäne		
hRET	-----KVGPGYLGS ^L GGSRNSS-----SLDHPDERAL ^L TMG		
hFGFR1	-----PPGLEICYNP ^L SHN-----PEEQ ^L LS ^L SK		
hVEGFR	MEPKKEKMEPGLEQGGKPRLDSTSS ^L ESFASSG ^L FQEDK ^L SLSDVEEEDSDG ^L FYKEPITME		
hTRKA	-----PDAKLLAGGEDVAP-----G ^L PLGL ^L G		
hINSR	-----PEAENNPGR ^L P-----P ^L PTL ^L Q		
	TK-Domäne 2	Katalytische Domäne	Aktivierungs Domäne
hRET	DLISFAWQISQGMQYLAEMKLV ^L HRDLA ^L ARN ^L ILVAEGRKMK ^L ISDFGLSRD ^L VYEEDS ^L YVKRS		
hFGFR1	DLVSCAYQVAR ^L GMEYL ^L ASKKCI ^L HRDLA ^L ARN ^L VLVTEDNVMKIAD ^L FG ^L LARD ^L IHHIDY ^L YK ^L TT		
hVEGFR	DLISYSFQVAR ^L GMEFL ^L SSRKCI ^L HRDLA ^L ARN ^L ILLSENN ^L VVKICD ^L FG ^L LARD ^L IYKNPD ^L YVRK ^L G		
hTRKA	QLLAVASQVAA ^L GMVYL ^L AGLHFV ^L HRDLA ^L TRNCLV ^L GQGLV ^L VVKIGD ^L FG ^L MSRD ^L IYSTDY ^L YRVG ^L G		
hINSR	EMIQMAAELAD ^L GMAYL ^L NAKKFV ^L HRDLA ^L ARN ^L CMVAHDF ^L TVKIGD ^L FG ^L MTRD ^L IYETDY ^L YRK ^L GG		
	P+1		
hRET	QGRIPV ^L KWMA ^L IESLFDHIYTTQSDVWSFGVLLWE ^L IVTLGGN ^L PYPGIPPERL ^L FN-LLKTGH		
hFGFR1	NGRLP ^L VKWMAP ^L EALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWE ^L IFTLGGSPYPGVPVEELFK-LLKEGH		
hVEGFR	DTRLPL ^L KWMA ^L ESIFDKIYSTKSDVWSYGVLLWE ^L IFSLGGSPYPGVQMD ^L EDFC ^L SRLREG ^L M		
hTRKA	RTMLP ^L IRWMP ^L ESILYRKFTTESDVWSFGVLLWE ^L IFTYKQ ^L PWYQLSNTEAID-CITQGR		
hINSR	KGLLP ^L VRWMA ^L ESLKDGVFTTSSDMWSFGVLLWE ^L ITSLAEQ ^L PYQGLSNEQVLK-FVMDGG		
hRET	RMERPDNCSEEMYRLMLQCW ^L KQE ^L PK ^L RPVFADISKDLEKMMVKRRD-----		
hFGFR1	RMDKPSNCTNELYMMRD ^L CWHA ^L VP ^L SQRPTFKQLVEDLDRIVALTSNQE-----		
hVEGFR	RMRAPEYSTPEIYQIMLD ^L CWHRD ^L PKERPRFAELVEKLGDLLQANVQQDGKDYIPINAILT		
hTRKA	ELERPACPEVYA ^L IMRG ^L CWQRE ^L PQQRHSIKDVHARLQALAQAPP-----		
hINSR	YLDQPDNCBERVTDLMRM ^L CWQFN ^L PKMRPTFLEIVNMLLKDDLHPS-----		
hRET	-----YLDLAASTPSDSL ^L IYDDGLSEETP-----		
hFGFR1	-----YLDLSMPLDQYSPSPDTRSS ^L TCSS-----		
hVEGFR	GNSGFTYSTPAFSEDFKESISAPKFNSGSSDDVRYVNAFKFMSLERIKTFEELPNATS		
hTRKA	-----VYLDVLG-----		
hINSR	-----FPEVSFFHSEENKAPES ^L ELEMEFED-----		

Abb. 33: Sequenzvergleich verschiedener humanen Rezeptor-Tyrosinkinasen. Farblegende: blau: in allen verglichenen Rezeptoren vorhanden

3.2.9 Lokalisation der Mutationen im Exon 13 des RET-Rezeptors

Bis heute sind mehrere intrazelluläre Mutationen im *RET*-Gen beschrieben, die mit dem Auftreten der MEN 2 assoziiert sind. In Abbildung 34 ist ein Modell der Kinase-Domäne des RET-Rezeptors gezeigt.

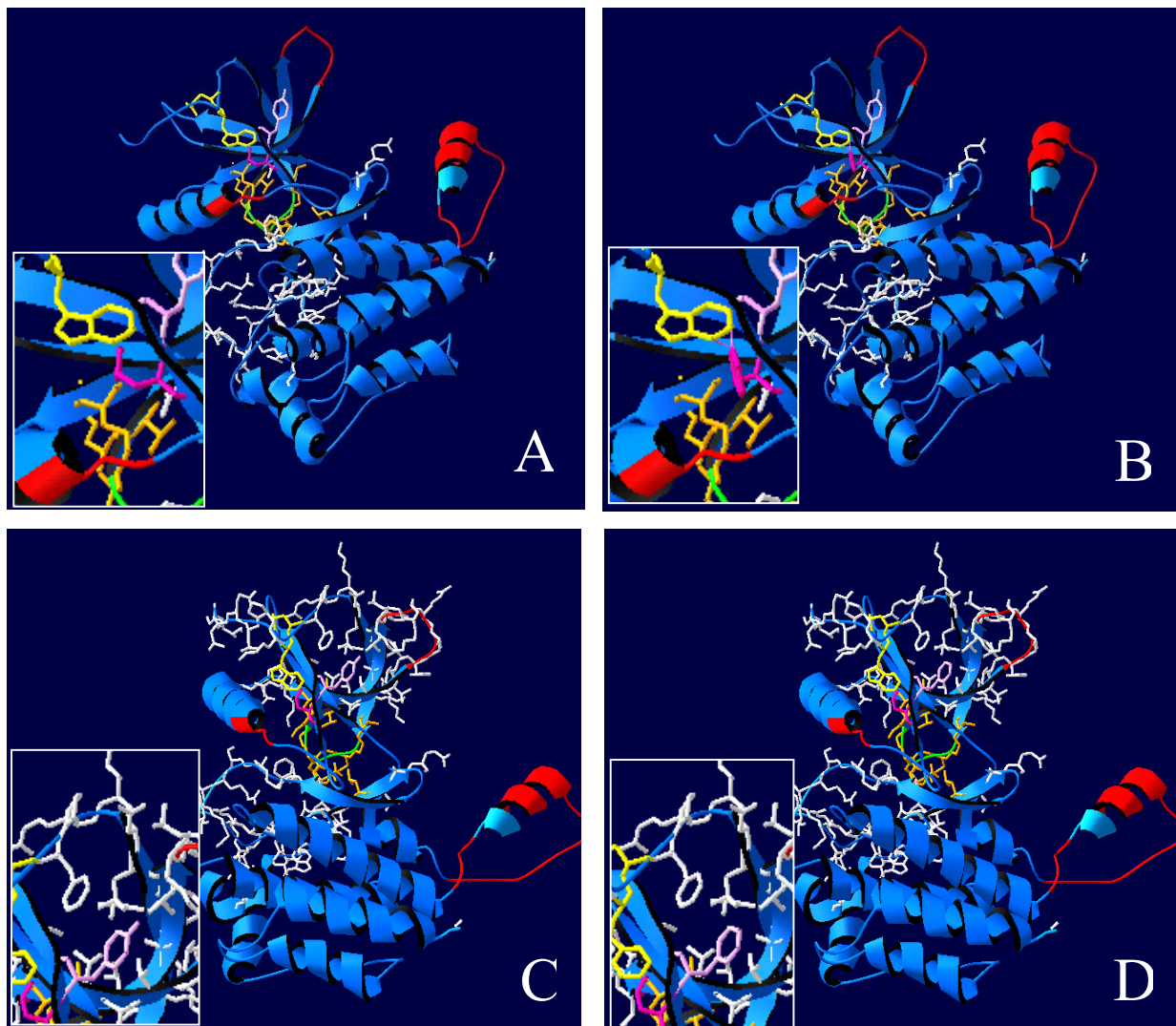


Abb. 34: Modell der Tyrosinkinase-Domäne des RET-Rezeptors

Farblgende: **rot** => 100 % Sequenzabweichung zu den für die Berechnung des Modells verwendeten Template-Sequenzen, **grün** => Glycin-reiche Region Gly731-Gly736, **gelb** => Tryptophan 717 und Glutaminsäure 718, **orange** => an der ATP-Bindung beteiligte Aminosäuren, **pink** => Leu790, **lila** => Tyr791, **weiss** (A und B) => katalytische Domäne und Aktivierungsdomäne; (C und D) => katalytische Domäne, Aktivierungsdomäne Tyr791 umgebende Aminosäuren (Leu724, Val725, Leu 726, Val755, Ala756, Leu757).

Im Gegensatz zu der Mutation in Codon 918 (im Modell nicht farbig markiert) liegen die Mutationen im Exon 13 nicht in der Aktivierungsdomäne (weiss) des Rezeptors (Abb. 34A). Vielmehr sind die beiden Mutationen Leu790Phe (pink) und Tyr791Phe (lila) nahe der ATP-Bindungsregion (orange). Der Tyrosinrest 791 ragt dabei von der ATP-Bindungsdomäne weg. Er ist von aliphatischen Aminosäuren wie Valin, Leucin und Alanin umgeben (Abb. 343C, Vergrößerung). Durch die Mutation Tyr791Phe verliert die aromatische Gruppe der Tyrosin-Seitenkette die Hydroxylgruppe (Abb. 34D). Die Seitenkette des Leucin 790 ist in räumlicher Nähe zu Leucin 730 (orange) und zu Tryptophan 717 (gelb; Abb. 34A, Vergrößerung). Die Mutation Leu790Phe verändert die Lage der drei Reste zueinander (Abb. 34B).

4 Diskussion

Rezeptor-Tyrosinkinasen spielen eine Schlüsselrolle in den zellulären Signalprozessen. Normalerweise ist ihre katalytische Aktivität in Zellen unter strenger Kontrolle. Diese Kontrolle besteht zum einen in der Expression von Liganden, Korezeptoren, dem Rezeptor selbst, sowie der an der Signalkaskade beteiligten Proteine und der durch sie aktivierten Transkriptionsfaktoren. Auch die Expression und Aktivität von deaktivierenden Phosphatasen ist essentiell für die Regulation der intrazellulären Tyrosinkinasen. Zum anderen ist die Struktur des Rezeptors wesentlich an der Autoregulation der Kinasen beteiligt. Kristallstrukturanalysen der Kinase-Domänen vom Insulinrezeptor (IRK) (Hubbard et al., 1994) und vom Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1K) (Mohammadi et al., 1996) gaben Aufschluß über die molekularen Mechanismen, die eine Autoinhibition der Kinase-Aktivität durch Tyrosinreste in der Aktivierungsdomäne bewirken. Die zwischen den RTK's konservierte Sequenz Asp-Phe-Gly (DFG) (s. Abb. 33, Seite 81) verhindert im nicht-aktivierten Insulinrezeptor die Bindung von ATP. In der FGFR1K interferiert die Sequenz mit dem konservierten Prolin 663 (P+1) (s. Abb. 33, Seite 81) und inhibiert auf diese Weise die Substratbindung. Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in der Aktivierungsdomäne nach der Ligandenbindung hebt diese Mechanismen der Autoregulation auf. Es folgen Autophosphorylierung und Induktion der Signalkaskaden.

Die MEN 2B-assoziierte Mutation Met918Thr liegt in der Aktivierungsdomäne der TK2-Domäne, fünf Aminosäuren von dem konservierten Prolin entfernt, welches bei dem FGF-Rezeptor die Substratbindung beeinflusst. Das ursprüngliche Methionin in Position 918 ist bei den Rezeptor-Tyrosinkinasen konserviert (s. Abb. 33, Seite 81). Obwohl es durch den Aminosäure-Austausch nicht zur ligandenunabhängigen Dimerisierung kommt, handelt es sich um eine aktivierende Mutation (s. 1.9, Seite 14). In diesem Fall wird offensichtlich ein autoregulatorischer Mechanismus ausser Kraft gesetzt und damit eine konstitutive Aktivierung RET-spezifischer Signalwege ausgelöst.

Es gibt auch Beispiele für regulatorische Funktionen extrazellulärer Domänen von RTK's. Für die Stabilisierung des FGF:FGFR-Rezeptorkomplexes ist die Bindung von Heparin oder Heparan-Sulfat-Proteoglykan (HSPG) notwendig (Spivak-Kroizman et al., 1994). Im monomeren FGF-Rezeptor ist die Heparin-Bindungsstelle durch intramolekulare Interaktionen zwischen einer Ig-ähnlichen Domäne und einer Sequenz saurer Aminosäuren verschlossen. Dadurch wird verhindert, dass der Rezeptor durch HSPG allein, welches in der extrazellulären Matrix vorhanden ist, durch Dimerisierung aktiviert wird (Plotnikov et al., 1999). Der FGF-

Rezeptor besitzt somit in der extrazellulären Domäne, zusätzlich zu der Ligandenbindung, eine autoregulatorische Funktion.

Mutationen im *RET*-Protoonkogen, die mit der MEN 2 assoziiert sind, betreffen bei der MEN 2A/FMTC zu über 66-75 % die extrazelluläre cysteinreiche Domäne (s. Tabelle 2, Seite 13). Cysteinsubstitutionen haben eine ligandenunabhängige Dimerisierung und konstitutive Aktivierung der Tyrosinkinase zur Folge (Santoro et al., 1995). Die Dimerisierung ist auf die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken zurückzuführen. Es wird postuliert, dass der fehlende Cysteinrest im nicht-mutierten Rezeptor an einer intramolekularen Disulfidbrücke beteiligt ist, und durch die Substitution ein Cysteinrest „frei“ wird. Dieser geht eine Disulfidbrückenbindung mit dem „freien“ Cysteinrest eines anderen mutierten Rezeptors ein. Somit hätte die Anzahl der Cysteinreste in der extrazellulären Domäne des RET-Rezeptors und die Bildung intrazellulärer Disulfidbrücken eine autoregulatorische Funktion.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es sich bei den sehr seltenen MEN 2A-assoziierten Duplikationen in Exon 11 und bei den häufiger vorkommenden Mutationen in Exon 13 des RET-Rezeptors um aktivierende Mutationen handelt. Dafür wurden eukaryotische Zelllinien transfiziert und die Auswirkungen unter zellbiologischen Aspekten, wie Veränderungen in der Morphologie, Wachstumsrate und Transformationseffizienz untersucht. Ausserdem wurden Protein-Analysen zur Dimerisierung der Rezeptoren, der Aktivierung der Tyrosinkinase, und den an den Rezeptor gebundenen Proteinen durchgeführt. Für Vergleiche zu anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen und zur Strukturanalyse wurden geeignete Datenbanken verwendet.

Ein zusätzliches Cystein in der cysteinreichen Domäne der extrazellulären Region resultiert in einer ligandenunabhängige Dimerisierung

Die Untersuchungen der *RET*-Mutationen wurden in dieser Arbeit zunächst in den Mäusefibroblasten der Linie NIH3T3 durchgeführt. Die Wahl des Zellsystems orientierte sich an der Publikation von Santoro et al., 1995. In dieser Veröffentlichung wurden Untersuchungen der Mutationen Cys634Arg und Met918Thr beschrieben.

Man geht davon aus, dass in normalen Zellen die Monomere von Rezeptor-Tyrosinkinasen im Gleichgewicht mit spontan gebildeten Dimeren stehen (Schlessinger et al., 2000). Es ist nicht auszuschliessen, dass durch die transfektionsbedingte Überexpression eines Rezeptors dieses

Die Autoren vermuten, dass sich die Cystein-Reste 634 und 630 zu nahe kommen, um intramolekulare Disulfidbrücken zu bilden, und dadurch eine Bildung intermolekularer Disulfidbrücken begünstigt wird. Offensichtlich sind also die Anzahl und die Anordnung der Cysteine entscheidend an der autoregulatorischen Funktion der cysteinreichen Domäne beteiligt.

Interessant ist der Vergleich der konservierten Cysteinreste zwischen den Spezies *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* (Abb. 32, Seite 79/80). Es zeigt sich, dass die Cysteine 630 und 634 in dem RET-Rezeptor von *Drosophila melanogaster* nicht vorkommen. Stattdessen besitzt das Protein in diesem Bereich eine Aminosäure-Sequenz, die die Cysteinreiche Region von der Transmembran-Region entfernt. Die restlichen Cysteine der cysteinreichen Region sind zwischen den hier aufgeführten Spezies hochkonserviert. In jedem Fall handelt es sich immer um eine gerade Anzahl von Cysteinen. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Cysteinreste dieser Region intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Eine Veränderung der Anzahl derart, dass eine ungerade Zahl von Cysteinresten vorhanden ist, kann die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken begünstigen.

Die Dimerbildung ist auf intermolekulare Disulfidbrücken zurückzuführen

Mit Ausnahme des Insulinrezeptors sind alle beschriebenen RTK's als Monomere in der Zellmembran verankert. Die Dimerisierung dieser Rezeptoren wird durch Ligandenbindung ausgelöst. Beim RET-Rezeptor sind zusätzlich GPI-verankerte Korezeptoren notwendig, welche die Ligandenbindung vermitteln (s. Abb. 4, Seite 9). Dieser komplexe Aktivierungsmechanismus weist auf eine sehr fein abgestimmte Kontrolle der RET-Aktivierung hin. Ob die Bildung des Multirezeptor-Komplexes zu intermolekularen Disulfidbrücken zwischen zwei RET-Proteinen führt, die das Dimer stabilisieren und die Konformationsänderung der intrazellulären Kinase-Domäne bewirkt, ist nicht bekannt.

Die Cysteinsubstitutionen haben eine Bildung intermolekularer Disulfidbrücken zur Folge (Santoro et al., 1995, Chappuis-Flament et al., 1998), offensichtlich ohne dass dafür ein Multirezeptorkomplex notwendig ist. Auch die Dimerisierung der mutierten RET-Rezeptoren mit den zusätzlichen Cysteinresten basiert auf der Bildung intermolekularer Disulfidbrücken (s. Abb. 12B, Seite 53). Durch diesen Mechanismus ist eine Kontrolle der Aktivierung durch Liganden und Korezeptoren vermutlich nicht mehr möglich. Es ist jedoch nicht

ausgeschlossen, dass die Expression der Komponenten des Multirezeptor-Komplexes das Ausmaß der Dimerbildung modulieren.

In vivo liegen diese Mutationen heterozygot in den Zellen vor, die RET-Korezeptoren exprimieren. Möglicherweise hat die Koexpression des wt-Rezeptors und die Expression von Liganden und Korezeptoren in den von der MEN 2 betroffenen Organen einen Einfluss auf das Ausmaß der Aktivierung der mutierten Rezeptoren. In transgenen Mäusen mit der Mutation Cys634Arg konnte gezeigt werden, dass nicht alle Gewebe, deren Zellen den RET-Rezeptor exprimieren, Tumore bilden (Kawai et al., 2000). Der Unterschied zu den tumorbildenden Geweben ist bei den untersuchten Mäusen eine hohe Expression der Korezeptoren und keine nachweisbare Dimerisierung der mutierten RET-Rezeptoren. Diese Ergebnisse suggerieren, dass die RET-Korezeptoren die mutationsbedingte Dimerisierung regulieren können. Auch in COS-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von GFR α -Rezeptoren die Tyrosin-Phosphorylierung überexprimierter RET-Proteine negativ moduliert (Trupp et al., 1998).

Auch die in dieser Arbeit gezeigte ligandenunabhängige Dimerisierung durch Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken wird möglicherweise in vivo von der Expression der RET-Korezeptoren beeinflusst. Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass nicht alle drei Organe mit der gleichen Häufigkeit betroffen sind.

Die MEN 2A/FMTC-assoziierten Mutationen Leu790Phe und Tyr791Phe in Exon 13 resultieren nicht in einer ligandenunabhängigen Dimerisierung

Beim MEN 2-Subtyp FMTC gibt es ausser der Schilddrüse keine anderen Organe, die von Neoplasien betroffen sind (s. 1.8, Seite 12). Die beschriebenen Mutationen in Exon 13 und Exon 14 sind eher mit dem Phänotyp des FMTC assoziiert (s. Tabelle 2, Seite 13). Die Penetranz der Mutationen Leu790Phe und Tyr791Phe ist (laut der klinischen Daten) sehr variabel (Berndt et al., 1998). Dies ist ebenfalls für die Mutationen im Codon 804 beschrieben (Frohnauer et al., 2001). Für die Mutation Val804Leu wurde gezeigt, dass es nicht zur ligandenunabhängigen Dimerisierung kommt, jedoch eine Autophosphorylierung ausgelöst wird (Pasini et al., 1997). Die Phosphorylierung der Tyrosinreste ist bei dieser Mutation für die Long-Isoform des RET-Rezeptors stärker als für die Short Isoform.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Mutationen Leu790Phe und Tyr791Phe keine ligandenunabhängige Dimerisierung verursachen (Abb. 12C, Seite 54).

Dies war zu erwarten, da die bisher untersuchten Mutationen in Codon 918 und 804 in der intrazellulären TK1- und TK2-Domäne ebenfalls keine Dimerisierung zur Folge haben. Für diese Mutationen konnte jedoch eine aktivierende Wirkung nachgewiesen werden. Deshalb wurde die Autophosphorylierung der mutierten Rezeptoren untersucht.

Die Duplikationen in Exon 11 führen zu einer erhöhten Phosphorylierung der Tyrosinreste im Protein

Die Phosphorylierung von Tyrosinresten erfolgt bei den RTK's nach der Bindung von Liganden und der dadurch induzierten Dimerisierung (s. Abb. 1, Seite 4). Dadurch wird die intrinsische katalytische Aktivität stimuliert (Hanks et al., 1991) und Bindungsstellen für Signalproteine werden generiert (Pawson, 1995). Das Ausmaß der Tyrosin-Phosphorylierung wird deshalb als Indikator für die Kinase-Aktivität verwendet.

Für die 12bp-Duplikation konnte in dieser Arbeit der eindeutige Nachweis erbracht werden, dass der Rezeptor stärker phosphoryliert wird als der wt-Rezeptor (s. Abb. 13, Seite 55). Dafür wurden die Proteine eines sehr schwach exprimierenden +12bp-Klons mit denen eines stärker exprimierenden wt-Klons verglichen. Bei dem +12bp-Klon ist, trotz der niedrigeren Expression, ein wesentlich stärkeres pTyr-Signal zu erkennen als beim wt-RET.

Die Untersuchungen der +9bp-Mutation gestalteten sich etwas schwieriger, da lediglich stark exprimierende Klone nach der Selektion gewonnen werden konnten. wt-RET-exprimierende Klone mit ähnlich starker Expression gab es keine. Aus diesem Grund wurde ein +12 bp-Klon mit hoher Expression für den Vergleich mit der +9bp-Mutation eingesetzt (s. Abb. 13A, Seite 55). Es zeigte sich bei beiden Mutationen eine sehr starke Phosphorylierung der Tyrosinreste (s. Abb. 13B, Seite 55). Da für den +12bp-Rezeptor eine eindeutige Aktivierung durch die Mutation gezeigt wurde, und das RET mit der +9bp-Mutation in Abbildung 13B eine ähnlich hohe Phosphorylierung wie das +12bp-RET zeigt, kann man davon ausgehen, dass es sich um eine aktivierende Mutation handelt.

Rezeptoren mit den Mutationen in Codon 790 und Codon 791 zeigen Unterschiede in der Phosphorylierung von Tyrosinresten

Da die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen in Exon 13 keine ligandenunabhängige Dimerisierung verursachen und die Mutationen *in vivo* eine geringere Penetranz als die extrazellulären MEN2A/FMTC-assoziierten Mutationen haben, stellte sich die Frage, ob eine erhöhte Rezeptoraktivität nachweisbar ist. Es wurden gering exprimierende Klone mit den Mutationen Leu790Phe und Tyr791Phe mit einem ebenfalls niedrig exprimierenden +12bp-Klon und einem höher exprimierenden wt-Klon verglichen (s. Abb. 17A, Seite 59). Es stellte sich heraus, dass die Mutation in Codon 790, im Vergleich zum wt-RET ein stärkeres pTyr-Signal zeigt (s. Abb. 17B, Seite 59). Die Aktivierung durch Autophosphorylierung ist ähnlich stark wie bei den +12bp-Rezeptoren. Im Gegensatz dazu zeigt das RET mit der Mutation in Codon 791 im Vergleich zum wt-RET keine Aktivierung durch Autophosphorylierung. Dieses Ergebnis ist überraschend, da die beiden Codons nebeneinanderliegen und ein ähnlicher Pathomechanismus wahrscheinlich ist.

Das Tyrosin in Position 791 ist eine potentielle Autophosphorylierungsstelle, wurde als solche jedoch nicht beschrieben. Durch das im Vergleich zur Mutation Leu790Phe schwache pTyr-Signal der Mutation Tyr791Phe wird suggeriert, dass unter normalen Bedingungen das Tyr 791 selbst phosphoryliert wird oder zumindest eine regulatorische Funktion bei der Autophosphorylierung hat. Aminosäuren, die an der Regulation der Kinase-Aktivität beteiligt sind, sind in der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen meist konserviert. Der Sequenzvergleich unter den vier Mitgliedern dieser Proteinfamilie zeigt jedoch, dass der RET-Rezeptor als einziger ein Tyrosin an Position 791 hat (s. Abb. 33, Seite 81). Bei drei der vier aufgeführten Rezeptoren ist ein Leucin an dieser Position, bei einem die Aminosäure Phenylalanin. Das weist darauf hin, dass das Tyr791 im RET-Rezeptor nicht zu den Tyrosinresten innerhalb der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört, die durch Autophosphorylierung eine Funktion bei der Regulierung der Kinase-Aktivität erwerben. Das Leucin 790 ist in vier der fünf gezeigten Tyrosinkinase-Domänen vorhanden. Demnach ist es stärker konserviert als das Tyrosin 791. Hochkonserviert ist das Glycin 792.

Der Sequenzvergleich des RET-Rezeptors zwischen verschiedenen Spezies (Abb. 32, Seite 80) zeigt, dass dem RET-Protein von *Drosophila melanogaster* das Tyrosin 791 fehlt. Stattdessen ist ein Leucin an dieser Stelle. Das Leucin 790 ist bei *Mus musculus* durch ein Methionin ersetzt. Beide Aminosäuren sind von konservierten Resten flankiert. Die Tatsache, dass beide Reste (Leu790 und Tyr791) nicht bei allen in dieser Arbeit aufgeführten Spezies

vorhanden sind, bestätigt die Vermutung, dass sie keine essentiellen reaktiven Funktionen in der TK1-Domäne übernehmen. Das schliesst nicht gleichzeitig aus, dass die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen Auswirkungen auf die Aktivität des Rezeptors haben. Wie oben erwähnt, können auch strukturelle Elemente im Rezeptor regulatorische Funktionen übernehmen.

Die Aminosäuren Leucin 790 und Tyrosin 791 haben Einfluss auf die N-Terminale Struktur des RET-Rezeptors

Die Tyrosinkinase des RET-Rezeptors besitzt zwei Kinase-Domänen (TK1 und TK2), die durch eine Kinase-Insert-Region voneinander getrennt sind (s. Abb. 32, Seite 80). Während in der TK1-Domäne die ATP-Bindungsdomäne lokalisiert ist, befinden sich in der TK2-Domäne die katalytische Domäne und die Aktivierungsdomäne (Pasini et al., 1997). Die Codons 790 und 791 liegen in der TK1-Domäne. Für den FGF-Rezeptor ist gezeigt, dass die Aminosäure Leucin 547 (L), welche dem Leucin 790 des RET-Rezeptors entspricht s. Abb. 33, Seite 81), zusammen mit dem Lysin 536 (K) (im RET Lysin 780) gegen das konservierte Tryptophan 471 (W) (Tryptophan 717 im RET) gerichtet ist (Mohammadi et al., 1996). Die konservierten Aminosäuren Tryptophan 471 und Glutaminsäure 472 (E) sind beim FGF-Rezeptor für die strukturelle Stabilisierung im N-terminalen Teil des intrazellulären Bereichs von Bedeutung und scheinen die Grenze zwischen juxtamembraner Region und Tyrosinkinase-Domäne zu markieren. Das Modell der Tyrosinkinase-Domäne des RET-Rezeptors (Abb. 34, Seite 82) zeigt, dass die Seitenkette des Leucin790 an das Tryptophan 717 heranragt. In Anlehnung zu den Untersuchungen des FGF-Rezeptors ist anzunehmen, dass diese Assoziation für die Struktur im N-terminalen Teil des RET-Rezeptors von Bedeutung ist. Das Modell zeigt ausserdem, dass durch die Faltung des Proteins eine räumliche Nähe des Leucin 790 zum Leucin 730 entsteht. Im FGF-Rezeptor entspricht Leucin 730 dem Leucin 484, welches mit dem Adeninring des ATP's Wechselwirkungen eingeht (Mohammadi et al., 1996). Ist diese Wechselwirkung auf den RET-Rezeptor übertragbar, hat die Mutation Leu790Phe möglicherweise Auswirkungen auf die ATP-Bindung.

Die Seitenkette des Tyrosin 791 ragt von dem Tryptophan 717 und Leucin 730 weg (Abb. 34C, Seite 82) und ist gegen die aliphatischen Reste der Codons 724-726 und 755-557 gerichtet. Die durch die Mutation fehlende Hydroxylgruppe des aromatischen Rings am Tyrosin hat möglicherweise Auswirkungen auf die Wechselwirkungen der flankierenden

Aminosäuren. Es ist ebenfalls möglich, dass die Hydroxylgruppe des Tyr791 im wt-Rezeptor an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist. In diesem Fall wären strukturelle Veränderungen in dieser Region wahrscheinlich. Somit ist anzunehmen, dass die Mutationen in Codon 790 und 791 Auswirkungen auf diese Struktur des N-terminalen Bereichs der intrazellulären Region haben, die wiederum die Aktivierung der Tyrosinkinase des RET-Rezeptors beeinflussen.

Die Bindung von pTyr-Proteinen an den RET-Rezeptor unterscheidet sich bei den untersuchten Mutationen

In die Untersuchungen der während der Immunpräzipitation kopräzipitierten Proteine wurden die Mutationen +9bp-, +12bp und Leu790Phe mit einbezogen. Für die Mutation Tyr791Phe war kein Klon vorhanden, der soviel RET exprimiert, dass die kopräzipitierten Proteine detektiert werden konnten. Bei den Analysen der Tyrosinphosphorylierung des RET-Rezeptors fiel auf, dass auch pTyr-Signale unterhalb von 150 kDa detektiert wurden (s. Ergebnisteil A, Seiten 55-59). Bei der pTyr-Bande von 150 kDa ist nicht auszuschließen, dass es sich um PLC- γ handelt. Diese bindet an den aktivierten RET-Rezeptor und wird an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert. Möglicherweise überlagern sich die Signale der 150 kDa-Bande des RET's und die der PLC- γ Bande.

Unterhalb der 150 kDa-Bande sind Unterschiede im pTyr-Muster zwischen den untersuchten Mutationen zu erkennen (s. Abb. 18, Seite 61 und Abb. 19, Seite 62). Demnach binden an den Rezeptor mit der Mutation Leu790Phe im Vergleich zu den extrazellulären Mutationen wenig Proteine mit phosphorylierten Tyrosinresten. Die pTyr-Signale, die detektiert wurden, sind bis auf eine Ausnahme schwächer, als bei dem in der RET-Expression ähnlich starken +12bp-Klon. Letzterer zeigt im Bereich 45 kDa bis 75 kDa deutlich stärkere pTyr-Signale als der Klon mit der Leu790Phe-Mutation. pTyr-Banden, die zusätzlich erscheinen oder verschwinden, sind bei diesen beiden Mutationen nicht zu erkennen.

Die Unterschiede zwischen den beiden Duplikationen im Exon 11 sind ebenfalls deutlich (Abb. 19, Seite 62). Insbesondere bei ca. 45 kDa ist das pTyr-Signal bei der +12bp-Mutation wesentlich stärker als bei der +9bp-Mutation. Die Signale im Bereich 45 kDa bis ca. 65 kDa sind bei der +12bp-Mutation insgesamt stärker. Hingegen ist bei der +9bp-Mutation das Signal bei ca 80 kDa stärker.

Die phosphorylierten Proteine wurden nicht identifiziert. Es wäre spekulativ, die Signale anhand ihres Molekulargewichts RET-bindenden Proteinen zuzuordnen und zu diskutieren. Dennoch ist deutlich, dass die hier untersuchten Mutationen im RET-Protoonkogen, trotz ähnlicher Intensität der Autophosphorylierung, Unterschiede bei den kopräzipitierten pTyr-Proteinen zeigen. Die Ergebnisse der divergenten Kopräzipitation von pTyr-Proteinen geben einen Hinweis darauf, dass die beiden Mutationen unterschiedliche Auswirkungen auf intrazelluläre Vorgänge haben. Von besonderem Interesse ist dies bezüglich der Unterschiede der mit den Mutationen assoziierten klinischen Phänotypen. Wie in 1.10 (Seite 16) beschrieben, ist der Phänotyp der +12bp-Familie durch eine ungewöhnliche Häufung von pHPT und dem Fehlen von Phäochromozytomen charakterisiert (Höppner et al., 1997). Die 9bp-Duplikation hingegen führt zum Vollbild der MEN 2A (Höppner et al., 1998).

Es ist nicht auszuschließen, dass der Rezeptor mit der +12bp-Mutation durch charakteristische Aktivierung in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse Substrate zur Verfügung hat, die umgesetzt oder aktiviert werden. Auf diese Weise könnte der häufig auftretende pHPT ausgelöst werden.

Auch bei der Leu790Phe-Mutation ist die geringe Kopräzipitation im Zusammenhang mit der durch klinische Daten suggerierten variablen Penetranz eine interessante Beobachtung. Für detaillierte Aussagen müssten diese Ergebnisse jedoch näher untersucht werden. Die Identität der kopräzipitierten pTyr-Proteine sollte geklärt werden, und die Ergebnisse sollten in anderen Zelllinien reproduzierbar sein. Zunächst kann die Untersuchung von kopräzipitierten Adapterproteinen Aufschluss auf eine divergente Aktivierung bringen.

Die Rezeptoren mit verschiedenen Mutationen unterscheiden sich in der Bindung von GRB2

GRB2 ist ein wichtiges Bindeglied zwischen Tyrosinkinasen und RAS (s Abb. 5, Seite 10). Als GRB2-Bindestellen im RET-Rezeptor sind pTyr 1090 und pTyr 1096 identifiziert worden (Alberti et al., 1998). Beide sind in der Short Isoform, mit der die Untersuchungen dieser Arbeit durchgeführt wurden, nicht vorhanden. Die Bindung von GRB2 wird bei der Short Isoform über eine Komplexbildung von RET, SHC und GRB2 vermittelt (Ohiwa et al., 1997). Für diese Komplexbildung ist die Bindung von SHC über die SH2-Domäne an den phosphorylierten Tyrosinrest 1062 notwendig. SHC wird bei diesem Vorgang ebenfalls an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert, so dass es als Bindungsprotein für die SH2-

Domäne von GRB2 dient. Für die Short-Isoform des RET-Rezeptors gilt deshalb, dass eine Kopräzipitation des GRB2 ebenfalls ein Maß für die Bindung von SHC mittels der SH2-Domäne ist. Eine Alternative wäre die Bindung von SHC über die PTB-Domäne (Arighi et al., 1997).

In dieser Arbeit wurde die Kopräzipitation von GRB2 zwischen stark exprimierenden Klonen der Mutationen +9bp-, +12bp- und Leu790Phe untersucht. Der Vergleich zwischen +9bp-RET und Leu790Phe-RET zeigt, dass die 9bp-Duplikation eine stärkere Bindung von GRB2 zur Folge hat als die Basensubstitution in Codon 790 (s. Abb. 20B, Seite 64). Im Gegensatz dazu zeigt die 12bp-Duplikation eine niedrigere Kopräzipitation von GRB2 im Vergleich zur Mutation in Codon 790 (s. Abb. 20C, Seite 64).

Kürzlich wurde gezeigt, dass das Insulinrezeptor Substrat-1 (IRS-1) mit SHC um die Bindung an pTyr 1062 im RET-Rezeptor konkurriert (Melillo et al., 2001). IRS-1 wiederum dient als Bindungsprotein für die regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase. Die alternative Bindung von SHC und IRS-1 könnte die Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege modulieren und somit die biologische Antwort auf die RET-Aktivierung beeinflussen.

Die in dieser Arbeit gezeigte unterschiedliche Kopräzipitation von GRB2 suggeriert eine unterschiedliche Bindung von SHC mittels der SH2-Domäne. Neben der oben erwähnten alternativen Bindung von SHC über die PTB-Domäne könnte auch eine bevorzugte Bindung von IRS-1 an pTyr 1062 die geringe Kopräzipitation von GRB2 beim +12bp-RET verursachen. Möglicherweise korreliert bei den hier untersuchten Zellklonen die unterschiedliche GRB2-Bindung mit einer Verschiebung der aktivierten Signalwege.

Extrazelluläre und intrazelluläre Mutationen führen zu charakteristischen Veränderungen der Zell-Morphologie

Für die Transfektion der Linie NIH3T3 mit der *RET* cDNA der Mutationen Cys634Arg und Met918Thr ist ein transformierender Phänotyp der exprimierenden Zellen beschrieben (Xing et al., 1996). Für die 9bp-Duplikation wurde schon in meiner Diplomarbeit gezeigt, dass die Zellen diesen transformierenden Phänotyp mit Zell-Clustern und spindelförmigen Zellen zeigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Intensität der Ausprägung dieses Phänotypes bei der +12bp-Mutation geringer ist (s. Abb. 22, Seite 66), jedoch auch die Bildung von Zell-Clustern beobachtet werden kann.

Die Zellen, die *RET* mit den intrazellulären Mutationen Leu790Phe und Tyr791Phe exprimieren, bilden keine Zell-Cluster, verändern ihre Morphologie jedoch in charakteristischer Art und Weise (s. Abb. 22 E und F, Seite 66). Sie sind abgeflacht und zeigen teilweise eine Nervenzell-ähnliche Morphologie. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass durch den Rezeptor mit den hier untersuchten Mutationen in der TK1-Domäne spezifische Signale übermittelt werden.

Eine transformierende Wirkung lässt sich nur für die +9bp-transfizierten Zellen eindeutig nachweisen

Unterschiedliche Wachstumsparameter verändern sich, wenn eine normale Zellkulturlinie transformiert. Regulatorische Mechanismen, welche die Zellteilung einschränken, gehen verloren. Die transformierten Zellen verlieren die Eigenschaft des substratabhängigen Wachstums. Obwohl die molekularen Mechanismen, die diesen Kontrollverlust verursachen, nicht im einzelnen bekannt sind, ist die Proliferation ohne feste Adhäsion ein wichtiger in vitro-Indikator für Tumorgenizität (Shin et al., 1975). Die am häufigsten angewendete Methode, substratunabhängiges Wachstum nachzuweisen, ist die Koloniebildung in Soft Agar. Die Auswertung solcher Untersuchungen gestaltet sich schwierig, da die Grösse der Kolonien nicht berücksichtigt werden kann und lediglich die Anzahl der Kolonien als Maß der Transformationseffizienz eines Protoonkogens dient. Die in dieser Arbeit durchgeführten Soft Agar-Experimente zeigten für keine der untersuchten Mutationen Koloniebildungen.

Für die Untersuchungen wurden die Zellklone, die bisher bei den Proteinanalysen eingesetzt worden sind, verwendet. Für die +9bp-Mutation wurde von einer mit uns kooperierenden Arbeitsgruppe eine Koloniebildung nachgewiesen (Hennige et al., 2000). Dies weist darauf hin, dass es sich um eine transformierende Mutation handelt. Da in dieser Arbeit dasselbe Protokoll für die Soft Agar-Experimente angewendet wurde, wie bei der Arbeitsgruppe in Tübingen, ist es unwahrscheinlich, dass die nicht erfolgte Koloniebildung auf methodische Komplikationen zurückzuführen ist. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass unterschiedliche Passagen von nativen NIH3T3-Zellen für die Transfektionen eingesetzt wurden. Dies könnte Auswirkungen auf die molekulare Basis der untersuchten Zellen haben, die in dem einen Fall eine Koloniebildung durch transformierende Gene möglich machen, in dem anderen Fall nicht.

In dem quantitativen Transformationsassay mit Poly-HEMA beschichteten 96-Well-Platten konnte die transformierende Eigenschaft der +9bp-Mutation im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Poly-HEMA ist ein anti-adhäsives Polymer, welches zunächst für Untersuchungen zu Zusammenhängen zwischen Zell-Form und Wachstumskontrolle eingesetzt wurde (Folkman et al., 1978). Transformierte Zellen besitzen die Eigenschaft, auf Poly-HEMA beschichteten Oberflächen zu wachsen. Dies wurde zur Entwicklung eines quantitativen Transformationsassays genutzt (Fukazawa et al., 1995). In dieser Arbeit wurde dieser Assay eingesetzt, um die transformierende Wirkung der hier untersuchten Mutationen zu überprüfen (s. 3.1.10, Seite 67). Wieder wurden die selben Klone, mit denen die Proteinanalysen durchgeführt wurden, verwendet. Parallel zu den Wachstumsversuchen wurde die Expression des RET-Rezeptors detektiert (Abb. 23, Seite 68). Im Vergleich zu den vorherigen Versuchen ist kaum eine Veränderung bezüglich der RET-Mengen zu erkennen. Lediglich der schwach exprimierende Klon 1 mit der Leu790Phe-Mutation zeigt in diesem Blot ein kaum zu erkennendes Signal.

Das Wachstum auf unbeschichteter Oberfläche zeigt hohe Schwankungen zwischen den einzelnen Klonen (Abb. 24, Seite 68). Eine Korrelation zwischen Mutation und Wachstum ist dabei nicht zu erkennen. Auch einen Zusammenhang zwischen der Menge des exprimierten RET und dem Zellwachstum gibt es nicht.

Die Fähigkeit auf Poly-HEMA-beschichteter Oberfläche zu wachsen, ist nur bei den +9bp-transfizierten Zellen deutlich ausgeprägt (Abb. 25, Seite 69). Demnach handelt es sich um eine transformierende Mutation. Dies bestätigt die Ergebnisse der Soft-Agar-Experimente der Tübinger Arbeitsgruppe. Erstaunlich ist, dass die +12bp-Klone nicht eine ähnliche Proliferation auf der behandelten Oberfläche zeigen, da für diese Mutation, wie für die 9bp-Duplikation, in dieser Arbeit eine ligandenunabhängige Dimerisierung gezeigt werden konnte. Auch eine im Vergleich zu dem wt-Rezeptor erhöhte Phosphorylierung der Tyrosinreste ist eindeutig nachgewiesen worden. Beides sind charakteristische Eigenschaften ligandenunabhängiger aktivierter RET-Rezeptoren und sind für die Cysteinsubstitutionen nachgewiesen. Andererseits wurde schon diskutiert, dass das pTyr-Muster der kopräzipitierten Proteine sich bei den beiden Mutationen unterscheidet, die SHC-vermittelte GRB2-Bindung bei der +12bp-Mutation schwächer ist und der Phänotyp der transfizierten Zellen weniger Zell-Cluster und spindelförmige Zellen zeigt. Daraus kann man den Rückschluss ziehen, dass es Unterschiede in der durch die Mutationen +9bp und +12bp ausgelösten zellulären Antwort gibt, was möglicherweise Auswirkungen auf die Transformationseffizienz hat. Möglicherweise sind die Bedingungen des Poly-HEMA-Assays zu stringent, um die

transformierende Wirkung der 12bp-Duplikation zu zeigen. Auch für die Mutationen Leu790Phe und Tyr791Phe konnte keine transformierende Wirkung in den NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden.

Beurteilung des gewählten in vitro-Modells

Die erste aktivierte Form des *RET*-Gens wurde aus transformierten NIH3T3-Zellen isoliert, die mit cDNA's aus einem humanen T-Zell-Lymphom transfiziert wurden (Takahashi et al., 1985). Es handelte sich um ein durch Rearrangement entstandenes Fusionsprodukt, wie es häufig in papillären Schilddrüsenkarzinomen gefunden wird. Die Untersuchungen zum Pathomechanismus der später entdeckten MEN 2-assoziierten Mutationen wurden zunächst ebenfalls in NIH3T3-Zellen durchgeführt (Santoro et al., 1995). Mechanismen, wie die ligandenunabhängige Dimerisierung, können in diesem Zellsystem gut untersucht werden, da keine spezifischen Proteine aus der Zelle einen Einfluss nehmen. In Bezug auf die Auslösung intrazellulärer Signalwege hat sich gezeigt, dass die Ergebnisse zum Teil einander widersprechen. Santoro et al. zeigten, dass in Mäusefibroblasten eine RET-abhängige RAS-Aktivierung nachweisbar ist, jedoch keine ERK2-Aktivierung detektiert werden kann. Auch eine Aktivierung der PI3-Kinase konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen wurden allerdings mit einem Chimär-Protein aus der extrazellulären Region des EGF-Rezeptors und der intrazellulären Domäne des RET durchgeführt. Das hatte den Vorteil, dass ohne Kenntnisse über den RET-Liganden Stimulierungen mit EGF durchgeführt werden konnten. Melillo et al. konnten dagegen zeigen, dass aktiviertes RET in NIH3T3-Zellen den PI3-Kinase-Signalweg induzieren kann. Hennige et al. zeigten, dass der ERK2-Signalweg durch die 9bp-Duplikation aktiviert wird.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigen, dass ligandenunabhängige Dimerisierung in dem gewählten Zellsystem verlässlich nachgewiesen werden kann (Arlt et al., 2000). Auch die Ergebnisse zur Autophosphorylierung und zu den kopräzipitierten Proteinen sind auswertbar. Es erwies sich allerdings als schwierig, den Pathomechanismus der offensichtlich schwach aktivierenden Mutation in den Codons 790 und 791 genauer zu untersuchen. Da keine eindeutige onkogene Potenz der Mutation selbst nachweisbar ist, sind vermutlich modulierende Faktoren von Bedeutung. Dafür kommen z.B. die RET-Korezeptoren GFR- α 1-4 und die Stimulierung durch die Liganden in Frage. Von grosser Bedeutung sind die in der Zelle vorhandenen Proteine für die durch RET ausgelösten Signalwege. Da der RET-Rezeptor gewebespezifisch exprimiert wird (s. 1.5, Seite 8) ist nicht

davon auszugehen, dass Mäusefibroblasten die Komponenten, die bei der Signaltransduktion durch Mutationen moduliert werden können, exprimieren. Für die Untersuchungen der Mutationen in Codon 790 und Codon 791 ist es deshalb wichtig, ein humanes Zellsystem zu finden, in dem der RET-Rezeptor normalerweise exprimiert wird. Um Veränderungen der Signaltransduktion nach der Stimulierung durch die Liganden zu detektieren, müssen in dem Zellsystem ebenfalls die RET-Korezeptoren exprimiert werden.

In der Literatur ist beschrieben, dass RET während der Vertebraten-Embryogenese in nicht differenzierten neuroektodermalen Vorläuferzellen des ventralen Neuralrohres sowie in wandernden Zellen der Neuralleiste und deren postmitotischen Derivaten exprimiert wird (Pachnis et al., 1993; Avantaggiato et al., 1994; Schuchardt et al., 1995; Tsuzuki et al., 1995). Die C-Zellen entstehen aus solchen Zellen. Somit liegt es nahe, die Pathomechanismen der *RET*-Mutationen in Zelllinien zu untersuchen, die aus der Neuralleiste stammen. Die Schwierigkeit liegt darin, geeignete Zellen zu finden, die endogen kein RET exprimieren. Das ist für die Zelllinie SK-N-MC beschrieben (van Weering et al., 1995). Auch die durch RET aktivierten Signalwege sind in diesen Zellen zum Teil untersucht worden. Der ERK2- und der PI3K-Signalweg werden durch den aktivierten RET-Rezeptor initiiert. Was die Zellen für die Untersuchungen der Pathomechanismen seltener MEN 2-Mutationen interessant macht, ist die Tatsache, dass die Aktivierung der Signalwege ERK2 und PI3K durch RET charakteristische Veränderungen der Zell-Morphologie und des Wachstumsverhaltens zur Folge hat (Puijenbroek et al., 1997; van Weering et al., 1997). Die Aktivierung der ERK2 führt zu einem divergenten Verbreiten der normalerweise in Verbänden wachsenden SK-N-MC-Zellen. Durch den aktivierten PI3K-Signalweg wird die Lamellipodia-Formation induziert. In neuronalen Zellen ist dies ein essentielles Ereignis in der Neuritogenese. Somit besitzen diese Zellen Indikatoren für aktiviertes RET.

Die RET-transfizierten SK-N-MC-Zellen bilden ein autokrines System

Um die Ergebnisse bezüglich der RET-Aktivierung durch die seltenen Mutationen auswerten zu können, war es notwendig, die Expression der RET-Liganden GDNF und Neurturin sowie der Korezeptoren GFR- α 1 und GFR- α 2 in den SK-N-MC-Zellen zu überprüfen (s. Ergebnisteil B, Seiten 71-74). Parallel dazu wurden auch die C-Zell-Karzinomlinie der TT-Zellen und die Neuroblastomzelllinie Kelly auf die Expression der für den Multirezeptorkomplex notwendigen Komponenten untersucht. Es zeigte sich, dass die drei

Zelllinien eine divergente Ausstattung der Liganden und Korezeptoren aufweisen. Der RET-Rezeptor wird, wie schon gezeigt, von den TT-Zellen exprimiert. Die Kelly-Zellen exprimieren ebenfalls den RET-Rezeptor (s. Abb. 26, Seite 71). Wie in der Literatur beschrieben, ist bei den SK-N-MC-Zellen keine RET-Expression nachweisbar. Die Ergebnisse der TT-Zellen zeigen, dass RET, GFR- α 1 und GDNF ein autokrines System bilden (s. Abb. 26-28, Seiten 71-74), vorausgesetzt GDNF wird sekretiert. Da die Expression von GFR- α 2 nicht nachweisbar ist, wird möglicherweise auch eine Aktivierung durch Neurturin über GFR- α 1 vermittelt. Die Expression von GFR- α 3 und GFR- α 4 ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden. Es ist nicht auszuschliessen, dass eine Aktivierung durch Neurturin über GFR- α 4 vermittelt wird. Auch die Kelly-Zellen bilden mit der Expression aller fünf untersuchten Komponenten ein autokrines System. Im Gegensatz dazu fehlt den SK-N-MC-Zellen der RET-Rezeptor. Es ist gezeigt, dass GDNF auch in Abwesenheit von RET in der Lage ist, Signale in die Zelle zu vermitteln (Trupp et al., 1999). In immortalisierten neuronalen Vorläuferzellen, die kein RET, jedoch GFR- α 's hoch exprimieren, stimuliert GDNF die Kinase-Aktivität der GFR- α 1-assoziierten SRC-like-Kinase. Ausserdem wird die Phosphorylierung des cAMP-Response-Element-Binding-Proteins (CREB), die Aufregulierung der c-fos mRNA und das Überleben der Zellen beeinflusst. Der RAS/ERK-Signalweg wird nicht aktiviert. Somit ist nicht auszuschliessen, dass es bei den SK-N-MC-Zellen eine autokrine Schleife ohne den RET-Rezeptor gibt. Werden die SK-N-MC-Zellen mit der *RET* cDNA transfiziert, ist eine Aktivierung der RET-assoziierten Signalwege, wahrscheinlich auch über einen autokrinen Mechanismus möglich. GFR- α 1 und GFR- α 2 (s. Abb. 28, Seite 74) würden die Stimulierung der RET-exprimierenden Zellen mit den exprimierten Liganden GDNF und Neurturin vermitteln.

Die Morphologie der SK-N-MC-Zellen wird durch die Transfektion mit dem RET-Rezeptor verändert

Der Vergleich zwischen den nativen SK-N-MC-Zellen und den wt-transfizierten Zellen (s. Abb. 30, Seite 75) zeigt, dass es zu einer morphologischen Veränderung kommt, wie sie für die Expression von aktivierten RET beschrieben ist (Puijenbroek et al., 1997; van Weering et al., 1997). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der RET-Rezeptor tatsächlich, wie oben vermutet, durch die von den SK-N-MC-Zellen exprimierten Liganden stimuliert wird. Möglicherweise sind auch neurotrophische Faktoren im FBS des Nähr-Mediums enthalten,

die eine Stimulierung der RET-Rezeptoren auslösen können. In jedem Fall ist davon auszugehen, dass in dem gewählten Zellsystem die Expression des RET-Rezeptors und dessen Stimulierung zur Induktion der intrazellulären Signalwege führt, die die gezeigte Veränderung der Zellmorphologie zur Folge hat. Dieser Effekt verstärkt sich, wenn das RET-Protein mit der 12bp-Duplikation exprimiert wird. Offensichtlich bewirkt die ligandenunabhängige Dimerisierung des mutierten Rezeptors (s. Abb. 29, Seite 74) eine Verstärkung der RET-vermittelten Signale. Möglicherweise ist die Dimerbildung durch intermolekulare Disulfidbrücken bei der +12bp-Mutation stabiler als der Multirezeptor-Komplex aus Liganden, Korezeptoren und RET-Rezeptoren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen in den Mäusefibroblasten der Linie NIH3T3 (s. Ergebnisteil A, Seite 52-70) zeigten, dass die 12bp-Duplikation im Vergleich zu der 9bp-Duplikation und der Mutation Leu790Phe zu einem divergenten Muster an kopräzipitierten pTyr-Proteinen, sowie einer geringeren Bindung von GRB2 führt. Der Phänotyp der transfizierten Zellen ist eventuell auf eine für die 12bp-Mutation charakteristische Induktion von Signalwegen zurückzuführen. Dieser Phänotyp äussert sich in einer Morphologie, die differenzierender Nervenzellen ähnlich ist (s. Abb. 30C, Seite 75).

SK-N-MC-Zellen, die RET-Rezeptoren mit den Mutationen Leu790Phe und Tyr791Phe exprimieren, zeigen eine charakteristische Veränderung der Morphologie (s. Abb. 30D und 30E). Diese ist der +12bp-RET-exprimierender Zellen entgegengesetzt. Die Zellen verbreiten sich nicht so wie die wt-transfizierten und die +12bp-transfizierten Zellen, sondern wachsen in Verbänden. Diese sind sogar stärker ausgeprägt als bei den nativen SK-N-MC-Zellen. Interessant ist, dass sich auch bei den transfizierten NIH3T3-Zellen die Morphologie der Zellen mit Leu790Phe- und Tyr791Phe-RET im Vergleich zu den Zellen mit +9bp- und +12bp-RET auf charakteristische Weise veränderte (Abb. 22, Seite 66). In den Mäusefibroblasten führen die extrazellulären Mutationen zum Wachstum in Verbänden, so dass Zell-Cluster entstehen, während die intrazellulären Mutationen ein Verbreiten der Zellen zur Folge haben. Diese Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass die Basensubstitutionen in Codon 790 und Codon 791 in den verwendeten Zelllinien spezifische Signalwege induzieren.

Die transfizierten SK-N-MC-Zellen zeigen Mutations-spezifische Veränderungen der Wachstumsraten

Werden SK-N-MC-Zellen mit einem chimären RET-Protein transfiziert, welches die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors und die intrazelluläre Kinase-Domäne des RET-Rezeptors besitzt, wird die Proliferation durch Stimulierung dieser Zellen mit EGF inhibiert (Puijenbroek et al., 1997). Da für die stimulierten Rezeptoren eine erhöhte Autophosphorylierung nachgewiesen wurde, und die nicht-transfizierten Zellen keine Inhibierung der Proliferation zeigen, kann man davon ausgehen, dass dieser Effekt durch die aktivierte RET-Kinase ausgelöst wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass +12bp-RET im Vergleich zum wt-RET ebenfalls zu einer geringeren Wachstumsrate der SK-N-MC-Zellen führt (s. Abb. 31C, Seite 77). Gemeinsam mit den Ergebnissen bezüglich der Zell-Morphologie zeigt dieses Ergebnis, dass die 12bp-Duplikation eine aktivierende Mutation ist.

Die Mutationen in Codon 790 und 791 führen zu einer erhöhten Proliferation (s. Abb. 31A und 31B, Seite 77). Diese wird erst deutlich, nachdem die Zellen 120 Stunden in Kultur sind. Da für beide Mutationen jeweils zwei Klone untersucht wurden, ist es unwahrscheinlich, dass es sich um einen durch die Transfektion hervorgerufenen Effekt handelt. Vielmehr bestätigt dieses Ergebnis, dass ein spezifisch induzierter Mechanismus eine Veränderung der biologischen Eigenschaften der Zellen zur Folge hat.

Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Duplikationen in Exon 11 des *RET*-Protoonkogen, die in einem zusätzlichen Cysteinrest nahe der Transmembran-Region resultieren, eine ligandenunabhängige Dimerisierung zur Folge haben. Diese führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors und im Fall der 9bp-Duplikation konnte eine transformierende Wirkung in NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden. Für die 12bp-Duplikation konnte in SK-N-MC-Zellen gezeigt werden, dass sie die typischen phänotypischen Indikatoren für aktiviertes RET ausprägen.

Diese Mutationen sind bisher für jeweils eine Familie beschrieben. Wieviele Mutationen dieser Art weltweit im Rahmen der molekularen Diagnostik für die MEN 2 detektiert wurden,

ist nicht bekannt. Für betroffene Familien ist das Ergebnis insofern von Bedeutung, dass Genträgern eine prophylaktische Thyreoidektomie empfohlen werden kann.

Die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen in Exon 13 gehören zu den selteneren nicht-Cystein *RET*-Mutationen, die in der intrazellulären Domäne des RET-Rezeptors liegen. In dem Labor von Prof. W. Höppner wurden bis heute 26 Familien mit der Mutation Leu790Phe, 22 Familien mit der Mutation Tyr791Phe und 14 Familien mit der hier nicht untersuchten Mutation in Codon 804 gefunden. Zur Zeit ist eine Studie in Vorbereitung, die Genotyp/Phänotyp-Korrelationen bei diesen Familien untersuchen soll. Eine Studie aus Frankreich zeigt, dass in 47 untersuchten Familien mit FMTC 59,5% nicht-Cystein-Mutationen aufweisen (Niccoli-Sire et al., 2001). Vier dieser Familien haben eine Mutation in Codon 790. Mutationen in Codon 791 sind nicht aufgeführt. 43,4% der FMTC-Familien zeigen Cysteinsubstitutionen in Exon 10. Im Vergleich zu den Genträgern der Mutationen in Exon 10, liegt bei den Genträgern mit nicht-Cystein-Mutationen das Alter in dem ein MTC diagnostiziert wird, höher. Die Autoren zeigen, dass das spätere Auftreten von C-Zell-Hyperplasien oder Karzinomen nicht immer mit einer mildereren Form einhergeht. Dagegen ist *in vitro* für die Mutationen in den Codons 768, 804 und 891 gezeigt, dass diese Mutationen eine schwächere Transformationseffizienz und onkogene Aktivierung haben als Mutationen in den Codons 634, 918 und 883 (Pasini et al., 1997; Iwashita et al., 1999).

Die bisher gesammelten, nicht eindeutigen Daten zur Genotyp/Phänotyp-Korrelation führen zu einer Unsicherheit bei der humangenetischen Beratung der betroffenen Familien, da die prophylaktische Thyreoidektomie oder das Alter, indem sie durchgeführt werden soll, nicht eindeutig empfohlen werden kann. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zu den Mutationen Leu790Phe und Tyr791Phe zeigen, dass *in vitro* keine ligandenunabhängige Aktivierung nachweisbar ist, wie sie für die extrazellulären Mutationen gezeigt ist. Dennoch wird deutlich, dass RET-Rezeptoren, welche diese Mutationen tragen, zellbiologische Veränderungen hervorrufen. Diese unterscheiden sich eindeutig von den durch den wt-Rezeptor ausgelösten Veränderungen. Da dies in zwei unterschiedlichen Zellsystemen gezeigt wurde, ist davon auszugehen, dass es sich um signifikante Mutations-spezifische Zellantworten handelt. Diese Tatsache sollte in Zukunft bei der Diskussion über eine prophylaktische Thyreoidektomie betroffener Genträger berücksichtigt werden. Darüberhinaus ist mit den in dieser Arbeit generierten Zellsystemen eine detaillierte Untersuchung der Pathomechanismen möglich.

5 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AMV	Avian Myeloblastoma Virus
APS	Ammoniumpersulfat
Arg (R)	Arginin
ARTN	Artemin
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
CRK	Cell division cycle 2-Related protein Kinase
Cys (C)	Cystein
dd	doppelt destilliert
DAC	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescent
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FMTc	Familial Medullary Thyroid Carcinoma
G	Guanin
GDNF	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFR	Growth Factor Receptor
Glu	Glutaminsäure
GPI	Glykolysiertes Phosphatidyl-Inositol
GRB 2	Growth factor Receptor Bound protein 2
GTP	Guanosin-Triphosphat
HCL	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfat
His	Histidin

HRP	Horseradish Peroxidase
HSCR	Hirschsprung-Krankheit
Ile	Isoleucin
INSR	Insulinrezeptor
IP	Immunpräzipitation
IRK	Insulinrezeptor-Kinase
JNK	c-jun aminoterminal kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Leu (L)	Leucin
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEN	Multiple Endocrine Neoplasia
Met	Methionin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger (Boten)-RNA
MTC	Medullary Thyroid Carcinoma
MTT	3-(4,5-Dimethyltetrazolium Bromid)
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NaVO ₃	Natrium-Metavanadat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIH3T3	murine Fibroblasten
NTN	Neurturin
OD	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK 1	Pyruvat Dehydrogenase Kinase Isoenzym 1
Phe	Phenylalanin
pHPT	primärer Hyperparathyreoidismus
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PLC-γ	Phospholipase C-γ
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Poly-HEMA	Poly (2-Hydroxyethyl Metacrylate)
PSPN	Persephin
PTB	Phosphotyrosine Binding Site
PTK	Phosphotyrosin-Kinase
pTyr (pY)	Phosphotyrosin

RET	Rearranged Transforming
rpm	Rates Per Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH2	Src Homology region 2
SHP 2	SH2-Phosphatase 2
Sos	Son Of Sevenless protein homolog
Src	Sarcoma
SRE	Serum Response Element
T	Thymin
Thr	Threonin
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline solution
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin
TK	Tyrosinkinase
TRKA	TRK1 transforming tyrosine kinase protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr (Y)	Tyrosin
U	Einheiten (Units)
UV	Ultraviolett
V7	NIH 3T3 mit Vektor ohne RET-cDNA transfiziert
Val	Valin
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
wt	Wildtyp

6 Glossar

Assay	Test/Untersuchung.
Elektroporation	Methode zur Transfektion, bei der Zellen in Gegenwart von Plasmid-DNA kurzzeitig einer hohen Spannung ausgesetzt werden. Dadurch wird die Zellmembran vorübergehend für DNA durchlässig.
Kit	Kompletter Satz von Reagenzien zur Durchführung einer bestimmten Methode.
Lipofektion	Liposomen-vermittelter Gentransfer, bei der die DNA in Lipidschichten eingekapselt wird. Die Liposomen verschmelzen mit der Zellmembran und die DNA gelangt in die Zelle.
Mutagenese	Gezielter Austausch von Nukleotiden in der DNA.
Polymerase Chain Reaction (PCR)	Methode, mit der DNA-Moleküle in vitro amplifiziert werden können.
Primer	Kurze, einzelsträngige Oligonukleotide, deren 3'-OH-Gruppen als Startpunkte für DNA-Polymerasen dienen.
Screening	„Durchsieben“. In dem hier verwendeten Zusammenhang ist die Suche nach RET-exprimierenden Zell-Klonen gemeint.
Template	Matrize, Vorlage. A: Der Nukleinsäurestrang, von dem während der Replikation bzw. Transkription eine Kopie hergestellt wird. B. Aminosäure-Sequenzen, die zur Berechnung des RET-3D-Modells dienen.
Transfektion	Verfahren, bei dem Fremd-DNA in den Zellkern von eukaryotischen Zellen transferiert wird.
Well	Vertiefung in einer Zellkulturplatte.
Western Blot	Verfahren, bei dem Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen und anschließend mit Antikörpern detektiert werden können.

7 Literaturverzeichnis

- Alberti L**, Borrello MG, Ghizzoni S, Torriti F, Rizzetti MG, Pierotti MA. Grb2 binding to the different isoforms of RET tyrosine kinase. *Oncogene* 1998 Sep 3;17(9):1079-1087
- Anders J**, Kjar S, Ibanez CF. Molecular modeling of the extracellular domain of the RET receptor tyrosine kinase reveals multiple cadherin-like domains and a calcium-binding site. *J Biol Chem* 2001 Sep 21;276(38):35808-35817
- Andersson P**, Goldfarb MP, Weinberg RA. A defined subgenomic fragment of in vitro synthesized Moloney sarcoma virus DNA can induce cell transformation upon transfection. *Cell* 1979 Jan;16(1):63-75
- Arighi E**, Alberti L, Torriti F, Ghizzoni S, Rizzetti MG, Pelicci G, Pasini B, Bongarzone I, Piutti C, Pierotti MA, Borrello MG. Identification of Shc docking site on RET tyrosine kinase. *Oncogene* 1997 Feb 20;14(7):773-782
- Arlt DH**. Diplomarbeit des Fachbereichs Biologie in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Höppner am Institut für Hormon und Fortpflanzungsforschung (Hamburg); Charakterisierung der zellbiologischen Eigenschaften mutierter RET-Proteine. Abschluß 19.01.98)
- Arlt DH**, Baur B, Wagner B, Höppner W. A novel type of mutation in the cystein rich domain of the RET receptor causes ligand independent activation. *Oncogene* 2000; 19: 3445-3448
- 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):1613-1619
- 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):17644-17649
- Avantaggiato V**, Dathan NA, Grieco M, Fabien N, Lazzaro D, Fusco A, Simeone A, Santoro M. Developmental expression of the *RET* proto-oncogene. *Cell Growth and Differentiation* 1994; 5: 305-311
- Baier R**, Grauer A, Lazaretti-Castro M, Ziegler R, Raue F. Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cell proliferation and calcitonin gene expression. *Endocrinology* 1994 Nov;135(5):2006-11
- Baloh RH**, Gorodinsky A, Golden JP, Tansey MG, Keck CL, Popescu NC, Johnson EM Jr, Milbrandt J. GFRalpha3 is an orphan member of the GDNF/neurturin/persephin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 May 12;95(10):5801-5806
- Baloh RH**, Tansey MG, Golden JP, Creedon DJ, Heuckeroth RO, Keck CL, Zimonjic DB, Popescu NC, Johnson EM, Milbrandt J. Trnr2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through RET. *Neuron* 1997; 18: 793-802
- Berndt I**, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grußendorf M, Raue F, Ritter MM, Höppner W. A new hot spot for mutation in the *RET* proto-oncogene causes familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83(3): 770-774
- Biedler JL**, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 1973 Nov;33(11):2643-2652
- Bongarzone I**, Vigano E, Alberti L, Mondellini P, Uggeri M, Pasini B, Borrello MG, Pierotti MA. The Glu632-Leu633 deletion in cysteine rich domain of *RET* induces constitutive dimerization and alters the processing of the receptor protein. *Oncogene* 1999 Aug 26;18(34):4833-4838
- Borrello MG**, Alberti L, Arighi E, Bongarzone I, Battistini C, Bardelli A, Pasini B, Piutti C, Rizzetti MG, Mondellini P, Radice MT, Pierotti MA. The full oncogenic activity of RET/PTC2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase C-gamma. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2151-2163

Borello MG, Pelicci G, Arighi E, De Fillippis 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

Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE, Wells SA Jr, Goodfellow PJ, Donis-Keller H. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the *RET* protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Feb 15;91(4):1579-1583

Chappuis-Flament S, Pasini A, De Vita G, Segouffin-Cariou C, Fusco A, Attie T, Lenoir GM, Santoro M, Billaud M. Dual effect on the RET receptor of MEN 2 mutations affecting specific extracytoplasmic cysteines. *Oncogene* 1998 Dec 3;17(22):2851-2861

Chew SL, Lavender P, Jain A, Weber A, Ross RJ, Wass JA, Besser GM, Clark AJ. Absence of mutations in the MEN2A region of the *RET* proto-oncogene in non-MEN 2A pheochromocytomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995 Jan;42(1):17-21

Collins VP. Amplified genes in human gliomas. *Semin Cancer Biol* 1993 Feb;4(1):27-32

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

Duesberg PH, Vogt PK. Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970 Dec;67(4):1673-1680

Dunn T, Praissman L, Hagag N, Viola MV. ERG gene is translocated in an Ewing's sarcoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 1994 Aug;76(1):19-22

Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Suvanto P, Wartiovaara K, Smith D, Ponder B, Constantini F, Saarma M, Sariola H, Pachnis V. Glial cell line derived neurotrophic factor signalling through the RET receptor tyrosine kinase. *Nature* 1996; 381: 789-792

Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, van Amstel HK, Lips CJ, Nishisho I, Takai SI, Marsh DJ, Robinson BG, Frank-Raue K, Raue F, Xue F, Noll WW, Romei C, Pacini F, Fink M, Niederle B, Zedenius J, Nordenskjold M, Komminoth P, Hendy GN, Mulligan LM, et al. The relationship between specific *RET* proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA* 1996 Nov 20;276(19):1575-1579

Fischer U, Muller HW, Sattler HP, Feiden K, Zang KD, Meese E. Amplification of the MET gene in glioma. *Genes Chromosomes Cancer* 1995 Jan;12(1):63-65

Folkman J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature* 1978 Jun 1;273(5661):345-349

Frohnauer MK, Decker RA. Update on the MEN 2A c804 *RET* mutation: is prophylactic thyroidectomy indicated? *Surgery* 2000 Dec;128(6):1052-1057

Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, Frilling A, Dahia PL, Mulligan LM, Zajac JD, Robinson BG, Eng C. Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Nov;82(11):3902-3904

Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994 Apr 22;77(2):307-316

Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Della Porta G. TRK-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1992 Feb;7(2):237-242

Grieco M., Santoro M., Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, Pierotti MA, Della Porta G, Fusco A, Veggio G. PTC is a novel rearranged form of the *RET* proto-oncogene and frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990; 60: 557-563

Gullick WJ. The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer. *Int J Cancer Suppl* 1990;5:55-61

Hanks SK, Quinn AM. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* 1991;200:38-62

Hennige AM, Lammers R, Arlt D, Hoppner W, Strack V, Niederfellner G, Seif FJ, Haring HU, Kellerer M. RET oncogene signal transduction via a IRS-2/PI 3-kinase/PKB and a SHC/Grb-2 dependent pathway: possible implication for transforming activity in NIH3T3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2000 Sep 25;167(1-2):69-76

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. *Human Mutation* 1998; Supplement 1: 128-130

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. *Human Molecular Genetics* 1997; 6: 587-590

Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 1994 Dec 22;372(6508):746-754

Ikeda I, Ishizaka Y, Tahira T, Suzuki T, Onda M, Sugimura T, Nagao M. Specific expression of the *RET* proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 1990; 5: 1291-1296

Ito S, Iwashita T, Asai N, Murakami H, Iwata Y, Sobue G, Takahashi M. Biological properties of RET with cysteine mutations correlate with multiple endocrine neoplasia type 2A, familial medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease phenotype. *Cancer Res.* 1997; 57: 2870-2872

Iwashita T, Kato M, Murakami H, Asai N, Ishiguro Y, Ito S, Iwata Y, Kawai K, Asai M, Kurokawa K, Kajita H, Takahashi M. Biological and biochemical properties of RET with kinase domain mutations identified in multiple endocrine neoplasia type 2B and familial medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 1999 Jul 1;18(26):3919-3922

Jhiang SM. The *RET* proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* 2000 Nov 20;19(49):5590-5597

Jing SQ, Wen DZ, Yu YB, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonoi 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- α , a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996; 85: 1113-1124

Kawai K, Iwashita T, Murakami H, Hiraiwa N, Yoshiki A, Kusakabe M, Ono K, Iida K, Nakayama A, Takahashi M. Tissue-specific carcinogenesis in transgenic mice expressing the *RET* proto-oncogene with a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Cancer Res* 2000 Sep 15;60(18):5254-5260

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 α 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):9344-9351

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):763-771

Mak YF, Ponder BA. *RET* oncogene. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6(1): 82-6

Melillo RM, Carlomagno F, De Vita G, Formisano P, Vecchio G, Fusco A, Billaud M, Santoro M. The insulin receptor substrate (IRS)-1 recruits phosphatidylinositol 3-kinase to RET: evidence for a competition between Shc and IRS-1 for the binding to RET. *Oncogene* 2001 Jan 11;20(2):209-218

Milbrandt et al. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and Neurturin. *Neuron* 1998; 20: 245-253

Mohammadi M, Schlessinger J, Hubbard SR. Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell* 1996 Aug 23;86(4):577-587

Morrison PJ, Nevin NC. Multiple endocrine neoplasia type 2B (mucosal neuroma syndrome, Wagenmann-Frobose syndrome). *J Med Genet.* 1996; 33(9): 779-82

Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al. Germline mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993 ; 363: 458-460.

Murakami H, Iwashita T, Asai N, Shimono Y, Iwata Y, Kawai K, Takahashi M. Enhanced phosphatidylinositol 3-kinase activity and high phosphorylation state of its downstream signalling molecules mediated by RET with the MEN 2B mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Aug 19;262(1):68-75

Myers SM, Eng C, Ponder BAJ, Mulligan LM. Characterisation of *RET* proto-oncogene 3'-splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for *RET*. *Oncogene* 1995; 11: 2039-2045

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. *Journal of Pathology* 1994; 172: 255-260

Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Franc S, Chabrier G, Baldet L, Maes B, Savagner F, Giraud S, Bezieau S, Kottler ML, Morange S, Conte-Devolx B; The French Calcitonin Tumors Group (GETC). Familial medullary thyroid carcinoma with noncysteine *RET* mutations: phenotype-genotype relationship in a large series of patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Aug;86(8):3746-3753

Nozaki C, Asai N, Murakami H, Iwashita T, Iwata Y, Horibe K, Klein RD, Rosenthal A, Takahashi M. Calcium-dependent RET activation by GDNF and neurturin. *Oncogene* 1998 Jan 22;16(3):293-299

Ohiwa M, Murakami H, Iwashita T, Asai N, Iwata Y, Imai T, Funahashi H, Takagi H, Takahashi M. Characterization of RET-Shc-Grb2 complex induced by GDNF, MEN 2A, and MEN 2B mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Aug 28;237(3):747-751

Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970 Jan;65(1):129-136

Pachnis V, Mankoo B, Constantini F, 1993 Expression of the c-*RET* Proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 119: 1005-1017

Pasini A, Geneste O, Legrand P, Schlumberger M, Rossel M, Fournier L, Rudkin BB, Schuffenecker I, Lenoir GM, Billaud M. Oncogenic activation of RET by two distinct FMTC mutations affecting the tyrosine kinase domain. *Oncogene* 1997 Jul 24;15(4):393-402

Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995 Feb 16;373(6515):573-580

Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 1999 Sep 3;98(5):641-650

Ponder BAJ, Smith D. The MEN 2 syndromes and the role of the *RET* proto-oncogene. *Adv. Cancer Res.* 1996; 70: 179-222

Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000 Nov 20;19(49):5548-5557

Rodrigues GA, Park M. Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr Opin Genet Dev* 1994 Feb;4(1):15-24

Salvatore D, Melillo RM, Monaco C, Visconti R, Fenzi G, Vecchio G, Fusco A, Santoro M. Increased in vivo phosphorylation of RET tyrosine 1062 is a potential pathogenetic mechanism of multiple endocrine neoplasia type 2B. *Cancer Res* 2001 Feb 15;61(4):1426-1431

Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, 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; 267: 381-383

Santoro M, Rosati R, Grieco M, Berlingieri MT, Dámato GL, de Franciscis V, Fusco A. The *RET* proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene* 1990; 5:1595-8

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. *Molecular and Cellular Biology* 1994; 14:663-675

Scheuba C, Kaserer K, Weinhausl A, Pandev R, Kaider A, Passler C, Prager G, Vierhapper H, Haas OA, Niederle B. Is medullary thyroid cancer predictable? A prospective study of 86 patients with abnormal pentagastrin tests. *Surgery* 1999; 126: 1089-95

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000 Oct 13;103(2):211-225

Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. *RET*-deficient mice: an animal model for Hirschsprung's disease and renal agenesis. *J Intern Med* 1995 Oct;238(4):327-332

Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Constantini F, Pachnis V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor RET. *Nature* 367: 380-383.

Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983 Sep 15;305(5931):245-248

Scott RP, Ibanez CF. Determinants of ligand binding specificity in the glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha S. *J Biol Chem* 2001 Jan 12;276(2):1450-1458

Shin SI, Freedman VH, Risser R, Pollack R. Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975 Nov;72(11):4435-4439

Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation *Cell* 1994 Dec 16;79(6):1015-1024

Takahashi M, Buma J, Iwamoto T, Inaguma Y Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of the *RET* proto-oncogene encoding a receptor tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 1988; 3: 571-578

Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, *RET*, by DNA rearrangement. *Cell* 1985; 42:581-588

Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulson KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davics AM, Asai N, Takahashi M, Vanden R, Henderson CE, Rosenthal A,. Characterisation of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 1996; 382: 80-83

Trupp M, Raynoschek C, Belluardo N, Ibanez CF. Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-RET receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Neurosci* 1998 May;11(1-2):47-63

Trupp M, Scott R, Whittemore SR, Ibanez CF. RET-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem* 1999 Jul 23;274(30):20885-20894

Tsuzuki T, Takahashi M, Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Asai J. Spatial and temporal expression of the *RET* proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues. *Oncogene* 1995 Jan 5;10(1):191-198

van Puijenbroek AA, van Weering DH, van den Brink CE, Bos JL, van der Saag PT, de Laat SW, den Hertog J. Cell scattering of SK-N-MC neuroepithelioma cells in response to RET and FGF receptor tyrosine kinase activation is correlated with sustained ERK2 activation. *Oncogene* 1997 Mar 13;14(10):1147-1157

van Weering D, Medema JP, van Puijenbroek A, Burgering B, Bass PD, Bos JL. RET receptor tyrosine kinase activates extracellular signal-regulated kinase in SK-N-MC cells. *Oncogene* 1995; 11: 2207-2214

van Weering D, Moen TC, Braakman I, Baas PD, Bos JL. Expression of the receptor tyrosine kinase RET on the plasma membrane is dependent on calcium. *J Biol Chem* 1998 May 15;273(20):12077-12081

van Weering D and Bos JL. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces RET-mediated lamellipodia formation. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 249-254

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

Xing S, Smanik PA, Oglesbee MJ, Trosko JE, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Characterization of *RET* oncogenic activation in MEN2 inherited cancer syndromes. *Endocrinology* 1996 May;137(5):1512-1519

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung durchgeführt. Mein Dank gilt daher der Institutsleitung, Herrn Prof. F. Leidenberger und den Direktoren Herrn Prof. R. Ivell und Herrn Dr. A. Mukhopadhyay.

Bei Herrn Prof. H.J. Seitz und Herrn Prof. W. Höppner bedanke ich mich für die Aufnahme und die Förderung durch das Graduiertenkolleg 336 „Molekulare Endokrinologie und molekularer Stoffwechsel“.

Herrn Prof. W. Höppner danke ich für die Vergabe des Themas und für die vielseitige Ausbildung. Bei Herrn Prof. K. Wiese bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Hormon und Fortpflanzungsforschung bedanke ich mich für die Unterstützung bei dieser Arbeit. Namentlich genannt seien Dr. James Olcese, Dr. C. Kirchhoff und insbesondere Frau Monika Kistler und Frau Birthe Willipinski-Stapelfeldt, die mir technische Unterstützung und seelischen Beistand gaben. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Bettina Wagner meinen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Frau Marlene Reuter, Herrn Eugen Lusga und Herrn Oliver Krebs. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Kathrin Siebke und Frau Ulrike Klein für die intensive Zusammenarbeit und den Spass, den wir dabei hatten. Für die technische Unterstützung danke ich Frau Anja Schröder, Frau Nadege Lardiere und Frau Marie-Luise Klein-Gunewik.

Meiner Familie und Herrn Andreas Rammonat danke ich für den Beistand und die Geduld, die mir diese Arbeit ermöglichten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dorit Hella Arlt
Geburtsdatum: 06.09.1965
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: Ledig

Beruflicher Werdegang

1972 - 1976: Besuch der Grundschule Alter Teichweg
1976 - 1983: Besuch der Gesamtschule Alter Teichweg
Februar 1983 –Januar 1986: Besuch der Fachschule für Sozialpädagogik
Februar 1986 - August 1987: Beschäftigung als Erzieherin in einem Privathaushalt
August 1987 - Juli 1989 Tätigkeit als Erzieherin bei der Vereinigung städtischer Kinder und Jugendheime
September 1988 - Juni 1991: Besuch des Abendgymnasiums St. Georg
April 1991 - März 1992: Tätigkeit als Erzieherin bei der Vereinigung städtischer Kinder und Jugendheime
Oktober 1991 – Januar 1998: Studium der Biologie an der Universität Hamburg;
Diplomarbeit: Charakterisierung der zellbiologischen Eigenschaften mutierter RET-Proteine
Seit Februar 1998 Promotion im Fachbereich Biologie. Thema der Doktorarbeit: Untersuchungen zum Pathomechanismus seltener MEN 2A/FMTC-assoziiierter Mutationen im *RET*-Protoonkogen
November 2000 – August 2001: Mutterschaftsvertretung als wissenschaftlicher Mitarbeiterin bei der GLE-Medicon in der Abteilung für Molekulare Diagnostik

Hamburg, 27.09.2001

Dorit Hella Arlt