

Charakterisierung der Regulation der gerichteten Migration und Invasion humaner Pankreaskarzinomzellen durch den neuronalen Wachstumsfaktor GDNF

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität
Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Christine Veit
aus Stuttgart

Hauptberichter: Herr Prof. Dr. Peter Scheurich (Stuttgart)

Mitberichter: Herr Prof. Dr. Peter Gierschik (Ulm)

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 07. 2002

Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart

2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm, Leiter Prof. Dr. med. Peter Gierschik, unter der Anleitung von Dr. rer. nat. Klaudia Giehl durchgeführt.

Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 518 „Entzündung, Regeneration und Transformation im Pankreas“, Projekt B7, gefördert.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der ausdrücklich bezeichneten Hilfsmittel und der Ratschläge von jeweils namentlich aufgeführten Personen angefertigt habe.

Ulm, den 15. April 2002

1	ABKÜRZUNGEN	8
2	ABSTRACT	12
3	ZUSAMMENFASSUNG	14
4	EINLEITUNG	16
4.1	DAS PANKREASKARZINOM	16
4.1.1	ALLGEMEINE EINLEITUNG	16
4.1.2	PERINEURALE INVASION INTRA- UND EXTRAPANKREATISCHER NERVEN	16
4.1.3	MOLEKULARE MECHANISMEN DER PERINEURALEN INVASION	17
4.2	GDNF UND DER GDNF-REZEPTOR-KOMPLEX	19
4.2.1	DER NEURONALE FAKTOR GDNF	19
4.2.2	GENOMISCHE ORGANISATION UND EXPRESSION DES <i>GDNF</i> -GENS	20
4.2.3	DER RET/GFR α -REZEPTOR-KOMPLEX	21
4.2.4	RET-ASSOZIIERTE TUMORERKRANKUNGEN UND MORBUS HIRSCHSPRUNG	22
4.2.5	GENOMISCHE ORGANISATION DES C- <i>RET</i> -GENS UND PROTEINSTRUKTUR VON RET	23
4.3	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	26
5	MATERIAL	27
5.1	CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKALIEN	27
5.2	RADIOAKTIV-MARKIERTE CHEMIKALIEN	29
5.3	ENZYME UND MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS	30
5.4	MOLEKULARGEWICHTSMARKER	30
5.4.1	MOLEKULARGEWICHTSMARKER FÜR AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE	30
5.4.2	MOLEKULARGEWICHTSMARKER FÜR SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	31
5.5	ZELLKULTUR-MATERIAL	31
5.6	STANDARD-LÖSUNGEN UND MEDIEN	32
5.6.1	STANDARD-LÖSUNGEN	32
5.6.2	BAKTERIEN-MEDIEN	32
5.6.3	ZELLKULTUR-MEDIEN	32
5.6.3.1	Zellkultur-Medien für Zelllinien	32

5.6.3.2	Zellkultur-Medien für Primärkulturen	33
5.7	FAKTOREN UND INHIBITOREN	33
5.7.1	FAKTOREN	33
5.7.2	INHIBITOREN	34
5.8	PROKARYONTISCHE UND EUKARYONTISCHE ZELLEN	34
5.8.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i> STÄMME	34
5.8.2	EUKARYONTISCHE ZELLINIEN	34
5.9	EXPRESSIONSPLASMIDE	35
5.9.1	PROKARYONTISCHEN EXPRESSIONSVEKTOREN	35
5.9.2	EUKARYONTISCHEN EXPRESSIONSVEKTOREN	35
5.9.3	KLONIERUNGSVEKTOREN	35
5.10	OLIGONUKLEOTIDE	36
5.11	ANTIKÖRPER	40
5.12	GERÄTE	41
5.13	SOFTWARE	42
5.14	ACCESSION NUMBERS	43
6	METHODEN	44
6.1	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	44
6.1.1	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN	44
6.1.2	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	44
6.1.3	SELEKTION TRANSFORMIERTER BAKTERIEN	45
6.1.4	EXPRESSION VON GST-FUSIONSPROTEINEN IN <i>E. COLI</i>	45
6.1.4.1	Expression von GST-RhoA und GST-RhoC in DH5 α	45
6.1.4.2	Expression von GST-PAK-CD in <i>E.coli</i> -Bakterien	46
6.1.4.3	Expression von GST und GST-RBD in <i>E. coli</i>	47
6.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	47
6.2.1	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA	47
6.2.2	BESTIMMUNG DER NUKLEINSÄURE-KONZENTRATION	48
6.2.3	FÄLLUNG VON NUKLEINSÄURE	48
6.2.4	PHENOL/CHLOROFORM-EXTRAKTION	48
6.2.5	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	49
6.2.6	EXTRAKTION VON DNA AUS AGAROSEGELEN	50
6.2.7	SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	50
6.2.8	DEPHOSPHORYLIERUNG VON PLASMID-DNA	50
6.2.9	KLENOW-REAKTION	51
6.2.9.1	Auffüllen von 5'-überhängenden Enden doppelsträngiger DNA	51

6.2.9.2	Auffüllen von DNA-Fragmenten aus einer PCR	52
6.2.10	LIGATION	52
6.2.11	ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS ZELLINIEN	53
6.2.12	cDNA-SYNTHESE	53
6.2.13	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	54
	PCR-Übersicht: RhoA und RhoC	55
	PCR-Übersicht: Ret	56
	PCR-Übersicht: GDNF	57
6.2.14	DNA-SEQUENZIERUNG	57
6.2.15	KLONIERUNGEN DER KODIERENDEN DNA-SEQUENZEN VON RHOA UND RHO C IN VERSCHIEDENE VEKTORSYSTEME	58
6.2.16	KLONIERUNG DER KODIERENDEN RET51-DNA-SEQUENZ AUS PANC-1-ZELLEN IN DEN PEGFP-N1-VEKTOR.	59
6.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	60
6.3.1	KULTIVIERUNG EUKARYONTISCHER ZELLINIEN	60
6.3.2	EINFRIEREN UND AUFTAUEN EUKARYONTISCHER ZELLEN	61
6.3.3	ETABLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON PRIMÄRKULTUREN	61
6.3.4	AUFBEREITUNG VON ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN	62
6.3.5	QUANTIFIZIERUNG DER ZELLPROLIFERATION	62
6.3.5.1	Bestimmung der Zellzahl	62
6.3.5.2	Bestimmung der DNA-Syntheserate	63
6.3.6	ANALYSE DER ZELLMIGRATION	63
6.3.7	KOKULTIVIERUNGSEXPERIMENTE	64
6.3.8	STABILE TRANSFEKTION	65
6.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	65
6.4.1	HERSTELLUNG VON RIPA-EXTRAKTEN	65
6.4.2	HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN ZUR BESTIMMUNG VON KINASE-AKTIVITÄTEN	66
6.4.3	PRÄPARATION VON PARTIKULÄREN UND ZYTOSOLISCHEN FRAKTIONEN	67
6.4.4	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	67
6.4.5	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	68
6.4.6	PROTEIN-NACHWEIS MITTELS COOMASSIE-BLAU-FÄRBUNG	69
6.4.7	NACHWEIS VON PROTEINEN IM IMMUNOBLLOT	69
6.4.8	BESTIMMUNG DER ERK2-AKTIVITÄT	71
6.4.9	BESTIMMUNG DER JNK-AKTIVITÄT	72
6.4.10	NACHWEIS DER AKT/PKB-PROTEINKINASE-AKTIVITÄT	73
6.4.11	NACHWEIS VON RAS-GTP UND RAC-GTP	74
6.4.11.1	Präzipitation von Ras-GTP	74

6.4.11.2	Präzipitation von Rac-GTP	75
----------	---------------------------	----

7 ERGEBNISSE **77**

7.1	EINFLUSS VERSCHIEDENER ZELLKULTURÜBERSTÄNDE AUF DIE PROLIFERATION UND MOTILITÄT VON PANC-1-ZELLEN	77
------------	--	-----------

7.2	EINFLUSS NEURONALER FAKTOREN AUF DIE PROLIFERATION UND MIGRATION VON PANC-1-ZELLEN	78
------------	---	-----------

7.2.1	EINFLUSS AUF DIE PROLIFERATION	78
-------	--------------------------------	----

7.2.2	EINFLUSS AUF DIE GERICHTETE MIGRATION	79
-------	---------------------------------------	----

7.2.3	EINFLUSS DER GDNF-KONZENTRATION AUF DIE GERICHTETE MIGRATION VON PANC-1-ZELLEN	80
-------	--	----

7.3	UNTERSUCHUNG DES GDNF-REZEPTOR-KOMPLEXES IN PANKREASKARZINOMZELLEN	81
------------	---	-----------

7.3.1	EXPRESSIONSANALYSE VON RET UND GFR α AUF MRNA-EBENE	81
-------	--	----

7.3.1.1	Nachweis der Ret-mRNA in verschiedenen Pankreaskarzinom-zelllinien	82
---------	--	----

7.3.1.2	Expression verschiedener Ret-Isoformen in PANC-1-Zellen	83
---------	---	----

7.3.1.3	Sequenzanalyse des <i>c-ret</i> -Gens aus PANC-1-Zellen	85
---------	---	----

7.3.1.4	Nachweis der mRNA von GFR α 1 und GFR α 2 in PANC-1-Zellen	87
---------	--	----

7.3.2	NACHWEIS DER GDNF-EXPRESSION IN PANC-1-ZELLEN	88
-------	---	----

7.3.3	NACHWEIS DES GDNF-REZEPTORS AUF PROTEINEBENE	89
-------	--	----

7.4	EINFLUSS VON GDNF AUF VERSCHIEDENE SIGNALWEGE UND RELEVANZ DIESER SIGNALWEGE FÜR DIE ZELLMIGRATION	91
------------	---	-----------

7.4.1	UNTERSUCHUNG DER RAS-RAF-MEK-ERK-KASKADE	91
-------	--	----

7.4.1.1	Aktivierung der MAP-Kinase ERK2 durch GDNF	91
---------	--	----

7.4.1.2	Einfluss von GDNF auf die Ras-Aktivität in PANC-1-Zellen	93
---------	--	----

7.4.1.3	Einfluss dominant-negativer H-Ras(S17N)-Proteine auf die GDNF-induzierte Migration	96
---------	--	----

7.4.1.4	Einfluss von MEK1 auf die GDNF-induzierte Migration von PANC-1-Zellen	98
---------	---	----

7.4.2	EINFLUSS VON GDNF AUF DIE AKTIVITÄT VON RAC UND JNK/SAPK IN PANC-1-ZELLEN	99
-------	---	----

7.4.2.1	Einfluss von GDNF auf die Rac-GTP-Menge in PANC-1-Zellen	99
---------	--	----

7.4.2.2	Einfluss von GDNF auf die JNK-Aktivität in PANC-1-Zellen	101
---------	--	-----

7.4.3	EINFLUSS VON GDNF AUF DIE PI3-KINASE-AKTIVITÄT UND RELEVANZ FÜR DIE CHEMOTAXIS VON PANC-1-ZELLEN	103
-------	--	-----

7.4.3.1	Untersuchung der PI3-Kinase-Aktivität	103
---------	---------------------------------------	-----

7.4.3.2	Relevanz der PI3-Kinase für die GDNF-induzierte Migration	104
---------	---	-----

7.5	KLONIERUNG UND EXPRESSION DES RET-REZEPTORS	105
------------	--	------------

7.5.1	KLONIERUNG DER RET51-CDNA-SEQUENZ AUS PANC-1-ZELLEN IN DEN PEGFP-N1-VEKTOR	
-------	--	--

7.5.2	CHARAKTERISIERUNG DER RET-EGFP-EXPRESSION	107
7.6	REGULATION DER MIGRATION DURCH DIE KLEINEN GTPASEN RHOA UND RHOC	110
7.6.1.1	Untersuchung der RhoC-Expression in Pankreaskarzinomzellen	110
7.6.1.2	Klonierung der kodierenden RhoC-DNA-Sequenz aus BxPC-3-Zellen in verschiedene Vektorsysteme	110
7.6.1.3	Herstellung von EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellklonen	111
7.6.1.4	Vergleich der Migrationseigenschaften von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden-PANC-1 Zellen	113
8	<u>DISKUSSION</u>	115
8.1	CHEMOTAXIS VON PANKREASKARZINOMZELLEN	115
8.2	DARSTELLUNG DES RET/GFRα-REZEPTOR-KOMPLEXES IN PANC-1-ZELLEN	118
8.3	SEQUENZANALYSE DER LANGEN RET51-ISOFORM AUS PANC-1-ZELLEN UND KLONIERUNG IN DEN PEGFP-N1-VEKTOR	121
8.4	CHARAKTERISIERUNG GDNF-INDUZIERTER SIGNALWEGE IN PANC-1-ZELLEN	123
8.5	EINFLUSS VON RHO-GTPASEN AUF DIE MOTILITÄT VON TUMORZELLEN	128
8.6	AUSBLICK	131
9	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	132
10	<u>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</u>	153
11	<u>ANHANG</u>	154
12	<u>DANKSAGUNG</u>	159
13	<u>LEBENS LAUF</u>	160

1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ART	Artemin
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-indolylphosphat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
CIF	<i>calf intestine phosphatase</i>
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium-freie Phosphat-gepufferte Saline
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CREB	cAMP response element-binding protein
DAG	Diacylglycerol
DCC	deleted in colorectal cancer
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DR	<i>dependence receptor</i>

DTT	1,4-Dithiothreitol
EC ₅₀	halbmaximale Konzentration
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FMTC	<i>familial medullary thyroid carcinoma</i>
g	Gramm und Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GDP	Guanosin-5-Diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFRα	<i>GDNF family receptor</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosin-5-Triphosphat
HA	Influenzavirus-Hämagglutinin-12CA5-Epitop
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HER	<i>human EGF-receptor</i>
HGF/SF	<i>hepatocyte growth factor/scatter factor</i>
HMW	<i>high molecular weight</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
<i>i. d. R.</i>	in der Regel
IGF I	<i>insulin like growth factor I</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
JNK/SAPK	<i>c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase</i>

kDa	Kilodalton
(n)kds	(nicht) kodierende Sequenz
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i>
LMW	<i>low molecular weight</i>
LPA	Lysophosphatidsäure
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MEK(4)	MAPK/ERK <i>kinase</i>
MEKK(1)	MAPK/ERK <i>kinase kinase</i>
MEN2A, B	<i>multiple endocrine neoplasia type 2 A, B</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minute
MLCK	<i>myosine light chain kinase</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
M/V	Masse pro Volumen
ng	Nanogramm
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
β-NGF	<i>β-nerve growth factor</i>
nm	Nanometer
β-NRG 1	β-Neuregulin 1
NT3, 4/5	Neutrophin 3, 4/5
OD	optische Dichte
p. a.	<i>pro analysis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PET	Polyethylenterephalat
PKA (2x)	cAMP- <i>dependent protein kinase</i> oder Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNI	Perineurale Invasion
PTB	<i>Phosphotyrosine-binding</i>
PtdIns(3,4)P2	Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphat
PtdIns(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Ret	<i>rearranged during transfection</i>
rh	rekombinant human
Rho	<i>ras homologous protein</i>
RIPA	<i>radioimmuno-precipitation-buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SEM	<i>standard error mean</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SGIF	<i>schwann cell growth factor</i>
SH2	<i>src homology domain 2</i>
SNT/FRS2	<i>Suc-1-associated neurotrophic factor target/FGF receptor substrate 2</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween-20	Polyoxymethylensorbitan-monolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
3'/5'-UTR	nicht-translatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V/V	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid

2 Abstract

Infiltration of intra- and extrapancreatic perineural spaces and tissues is characteristic for pancreatic adenocarcinoma and is related to the poor prognosis of this disease. The high affinity of the pancreatic cancer cells to neural tissues, even at very early tumour stages, indicates a particular attraction probably mediated by specific factors. The aim of this work was to identify and characterise neuronal factors which can induce directed cell migration and perineural invasion of human pancreatic cancer cells and to analyse the underlying signal transduction pathways. For this, the influence of conditioned media of various glial and neuronal cells as well as specific recombinant neurotrophic factors on proliferation and migration of human pancreatic carcinoma cell lines was analysed. As a result, the neurotrophic factor GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) was identified as an effective chemoattractant for PANC-1 cell line. In the neuronal system, GDNF exerts its specific effects by binding to the heterodimeric GDNF-receptor complex, consisting of the receptor tyrosine kinase Ret and the GPI-anchored protein GFR α . To determine the expression of the GDNF-receptor complex in PANC-1 cells, RT-PCR and Western blot analyses were performed. By this, the GDNF-receptor components, Ret and GFR α , were detected on both, mRNA and protein level. Furthermore, characterisation of the GDNF-receptor by RT-PCR could demonstrate the presence of the transcripts of two GFR α -proteins, GFR α 1 and GFR α 2, and of the three known Ret-isoforms Ret9, Ret43 and Ret51. Beyond this, sequence analysis of the Ret51-transcript expressed in PANC-1 cells revealed the expression of Ret-wildtype sequence. The complete coding Ret51-cDNA-sequence was cloned into the pEGFP-N1 vector and the expression of the Ret-EGFP-protein was characterised by fluorescence and Western blot analyses. To investigate Ret-dependent signal transduction pathways in PANC-1 cells, Ras- and Rac-GTP-binding assays as well as analyses of kinase activity of the MAP-kinases ERK2 and JNK by *in vitro* phosphorylation assays were performed. By this, it was shown, that GDNF significantly increases the intracellular amounts of N-Ras- and Rac-GTP and induces phosphorylation of ERK2 and JNK, respectively. Migration assays in the presence of MEK1-inhibitor PD98059 and PI3-kinase-inhibitor LY294002 underlined the relevance of the Ras-Raf-MEK-ERK-signal transduction pathway and PI3-kinase in GDNF-induced directed cell migration.

To investigate the influence of different Rho isoforms on the motility of pancreatic cancer cells, the coding *rhoC*-DNA-sequence was isolated from the pancreatic cancer cell line

BxPC-3 and cloned into various expression-vectors. Then, PANC-1 cells were generated, which stably express EGFP-RhoA and EGFP-RhoC fusion proteins. *Boyden* chamber assays revealed, that only EGFP-RhoC increases the serum-induced directed cell migration of these stably transfected cell clones.

So, in the present work, critical steps involved in GDNF-induced chemotaxis of pancreatic cancer cells were elucidated on the molecular level. Beyond this, the GDNF/Ret/GFR α signal transduction system as well as the small GTPase RhoC could be involved in perineural invasion of pancreatic cancer cells *in vivo*.

3 Zusammenfassung

Die starke Infiltration intra- und extrapankreatischer peripherer Nerven gilt als Hauptursache für das Auftreten lokaler Rezidive und die äußerst schlechte Prognose von exokrinen Pankreaskarzinomen. Die hohe Affinität der Tumorzellen zu peripherem Nervengewebe und die bereits in frühen Tumorstadien einsetzende perineurale Invasion machen eine spezifische Interaktion zwischen den Pankreaskarzinomzellen und den peripheren Nerven wahrscheinlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher nach Signalmolekülen gesucht, die an der Induktion der perineuralen Invasion humaner Pankreaskarzinomzelllinien beteiligt sein könnten. Der Einfluss konditionierter Medien neuronaler und glialer Zellen sowie spezifischer rekombinanter neuronaler Faktoren auf die Proliferation und Chemotaxis humaner Pankreaskarzinomzelllinien wurde analysiert. Hierbei wurde der neurotrophe Faktor GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) als Chemotaxis-induzierender Faktor für PANC-1-Zellen identifiziert. Da GDNF bei neuronalen Zellen seine spezifische Wirkung durch Bindung an den GDNF-Rezeptor-Komplex entfaltet, wurde die Expression dieses Rezeptor-Komplexes, bestehend aus der Rezeptortyrosinkinase Ret und dem GPI-Anker-Protein GFR α , in PANC-1-Zellen nachgewiesen. Mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)- und *Western blot*-Analysen konnte die Expression der beiden GDNF-Rezeptor-Komponenten Ret und GFR α 1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene demonstriert werden. Eine nähere Charakterisierung des GDNF-Rezeptor-Komplexes in PANC-1-Zellen durch RT-PCR-Analysen ergab, dass die Transkripte von zwei GFR α -Proteinen, GFR α 1 und GFR α 2, und den drei bekannten Ret-Isoformen, Ret9, Ret43, Ret51, in PANC-1-Zellen nachweisbar sind. Durch Sequenzanalyse des Ret51-Transkripts aus PANC-1-Zellen konnte die Expression der wildtypischen Sequenz in diesen Zellen bestätigt werden. Nachfolgend wurde die vollständige kodierende Ret51-DNA-Sequenz in den pEGFP-N1-Vektor kloniert und die Expression der Ret-EGFP-Fusionsproteine in PANC-1- und HEK293-Zellen in Fluoreszenz- und *Western blot*-Analysen überprüft. Zur Untersuchung Ret-abhängiger Signaltransduktionswege in PANC-1-Zellen wurden Ras- und Rac-GTP-Präzipitationsversuche und Kinaseaktivitätsanalysen der MAP-Kinasen ERK2 und JNK anhand von *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung der Zellen mit GDNF zu einer Steigerung der N-Ras- und Rac-GTP-Menge in PANC-1-Zellen führt und die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK2 und JNK induziert. Durch Migrationsexperimente in Anwesenheit des MEK1-Inhibitors PD98059 und des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 konnte die Relevanz der Ras-

Raf-MEK-ERK-Kaskade und der PI3-Kinase für die gerichtete Migration von PANC-1-Zellen herausgestellt werden.

Um den Einfluss verschiedener Rho-Proteine auf Migrations- und Invasionsprozesse humaner Pankreaskarzinomzelllinien analysieren zu können, wurde die RhoC-cDNA-Sequenz aus BxPC-3-Zellen amplifiziert und PANC-1-Zellklone generiert, welche EGFP-RhoC- oder EGFP-RhoA-Fusionsproteine stabil überexprimieren. Das Migrationsverhalten dieser Zellklone wurde im *Boyden*-Kammer-System analysiert. Hierbei wurde gezeigt, dass die Expression von EGFP-RhoC im Gegensatz zu EGFP-RhoA zu einer deutlichen Steigerung der Chemotaxis bei PANC-Zellen führt.

Somit wurden entscheidende molekulare Mechanismen aufgedeckt, die für die GDNF-induzierte Migration von PANC-1-Zellen relevant sind. Es wäre darüber hinaus möglich, dass das GDNF/Ret/GFR α -System sowie die kleine GTPase RhoC an der perineuralen Invasion von Pankreaskarzinomzellen *in vivo* beteiligt sind.

4 Einleitung

4.1 Das Pankreaskarzinom

4.1.1 Allgemeine Einleitung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist in den westlichen Industrieländern eine Tumorerkrankung mit steigender Inzidenz und liegt mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 1 % an 4.-5. Stelle der tumorbedingten Todesursachen (Gudjonsson, 1987; Parker et al., 1997). Männer sind häufiger betroffen als Frauen und 2/3 aller Patienten haben bei Diagnosestellung das 60. Lebensjahr bereits überschritten (Urrutia, 1997). Die Kombination aus früh einsetzender Metastasierung und oftmals nur unzureichenden Diagnose- und Therapiemöglichkeiten sind die Hauptursachen für die besonders ungünstige Prognose. Da zum Zeitpunkt der Diagnose in bis zu 50 % der Patienten Lymphknoten und periphere Nerven von den Tumorzellen befallen sind (Takahashi et al., 1997, Marczell et al., 1998), können nur noch 10-20 % aller Patienten durch radikale Resektion des Primärtumors behandelt werden (Zamboni, 2000).

Die frühe Metastasierung wird durch eine fehlende Organkapsel der Bauchspeicheldrüse sowie der Lage im Retroperitoneum begünstigt. Tumorabsiedlungen findet man in den Lymphknoten, der Lunge, der Leber, den Nieren und Nebennieren. Weitere Metastasen konnten im Duodenum und im Peritoneum nachgewiesen werden. Die häufigste extrapankreatische Ausdehnung stellt jedoch die perineurale Invasion (PNI) dar (Klöppel und Heitz 1984; Marczell et al., 1998).

4.1.2 Perineurale Invasion intra- und extrapankreatischer Nerven

Das Pankreaskarzinom und einige andere Tumorarten, wie das Prostatakarzinom (Villers et al., 1989; McNeal, 1992; Bostwick et al., 1999), zeigen ein charakteristisches Metastasierungsverhalten, indem sie nicht nur über Blut- und Lymphbahnen streuen, sondern darüber hinaus auch entlang von intra- und extrapankreatischen peripheren Nervenfasern wandern (Gutthoff et al., 1987; Klöppel und Heitz, 1988; Takahashi et al., 1997). Bereits bei kleinen Tumoren und in frühen Stadien der Tumorprogression kommt es zu einer starken perineuralen Invasion (Kimura et al., 1998; Tezel et al., 2001). Die Tumorzellen überwinden dabei die perineurale Barriere und dringen bis ins Endoneurium der Nervenfasern vor

(Bockman et al., 1994). Abbildung 1 zeigt den Aufbau eines peripheren Nerven im Querschnitt.

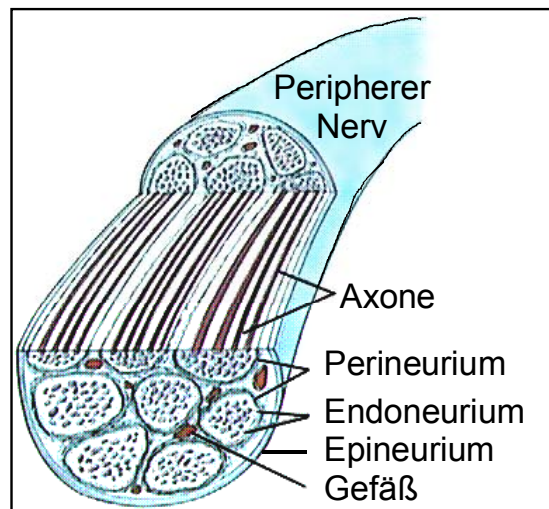


Abb. 1: Schematischer Querschnitt durch einen peripheren Nervenstrang. Die unmyelinisierten **Axone** der einzelnen Nervenzellen sind von Schwann'schen Zellen umhüllt und von einem lockeren kollagenem Bindegewebe mit Basalmembran, dem sog. **Endoneurium**, umgeben. Das **Perineurium**, welches aus einem dichten, kollagenhaltigen Bindegewebe besteht und die Nervenfaserbündel umgibt, bildet eine mechanische und physiologische Barriere. Das **Epineurium**, dessen Septen bis in die Nervenfaserbündel hineinreichen, formt den äußeren Mantel des peripheren Nerven (in Anlehnung an *Anatomy Manual*, 1998, Emory University, Atlanta: <http://gened.emc.maricopa.edu/bio/bio181/biobk/biobooknerv.html>).

Der Befund, dass periphere Nerven von Pankreaskarzinomzellen in viel höherem Maße befallen werden als Blut- und Lymphgefäße, führte zu der Hypothese, dass die PNI auf eine spezifische Interaktion zwischen Tumorzellen und peripheren Nerven zurückzuführen ist. Hierbei wurde angenommen, dass die Nervenzellen und/oder Schwann'schen Zellen peripherer Nerven Signalmoleküle abgeben, welche zu einer vermehrten Proliferation von Pankreaskarzinomzellen führen (Bockman et al., 1994; Miknyoczki et al., 1996; Zhu et al., 1999; Sakamoto et al., 2001). Um die molekularen Mechanismen der perineuralen Invasion aufzudecken, haben verschiedene Arbeitsgruppen nach Faktoren mit einer mitogenen Wirkung auf Pankreaskarzinomzellen gesucht.

4.1.3 Molekulare Mechanismen der perineuralen Invasion

Ein Merkmal von Tumorzellen ist die Überexpression von Signalmolekülen und den korrespondierenden Rezeptoren. Über autokrine und/oder parakrine Rückkoppelungsmechanismen steuern diese Liganden-Rezeptor-Systeme dann das Wachstums- und Wanderungsverhalten der Tumorzellen (Friess et al., 1994; Ebert et al.,

1994; Sakurai et al., 1997; Korc et al., 1998; Friess et al., 1999; Miknyoczki et al., 1999). Die ersten Signalmoleküle, die im Zusammenhang mit der Wachstumsregulation von Pankreaskarzinomzellen näher charakterisiert wurden, waren der transformierende Wachstumsfaktor α (TGF α) und der epidermale Wachstumsfaktor (EGF). In Pankreaskarzinomzellen konnte im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen des Pankreas eine Überexpression dieser beiden Wachstumsfaktoren sowie des EGF-Rezeptors (HER: *human EGF-receptor*) gezeigt werden. Infolge der Überexpression kam es bei den Tumorzellen zu einer vermehrten Proliferation sowie insgesamt zu einer beschleunigten Tumorprogression (Di Marco et al., 1990; Urrutia et al., 1997, Friess et al., 1999). Histologische Studien demonstrierten, dass TGF α darüber hinaus auch in pankreatischem Nervengewebe exprimiert wird (Bockman et al., 1994). Da eine Expression von TGF α und EGF jedoch auch in Tumorzellen ohne PNI nachgewiesen werden konnte, bleibt die Bedeutung dieses Liganden-Rezeptor-Systems für die PNI des Pankreas unklar.

Nachdem bei Prostatakarzinomzellen die Beobachtung gemacht wurde, dass der neuronale Wachstumsfaktor β -NGF (*β -nerve growth factor*) zu einer gesteigerten Invasion und Chemotaxis der Zellen *in vitro* führt (Djakiew et al., 1993; Geldof et al., 1997), rückten die Neurotrophine in den Mittelpunkt der PNI-Forschung. Zu den Neurotrophinen gehören neben β -NGF, die Polypeptide BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT3 und NT4/5 (Neurotrophine 3 und 4/5). Jeder dieser neuronalen Faktoren bindet an jeweils einen Trk-Rezeptor (TrkA, TrkB, TrkC: *tropomyosin related kinase A, B, C*) mit hoher Affinität und kann darüber hinaus mit dem *low affinity*-Rezeptor p75^{NTR} interagieren (Chao und Hempstead, 1995; Casaccia-Bonnel et al., 1998; Coulson et al., 1999). Anhand immunhistochemischer Färbungen und *in situ* Hybridisierungen konnte in Pankreaskarzinomzellen die Expression von β -NGF, BDNF, NT3 und NT4/5 sowie der korrespondierenden Rezeptoren nachgewiesen werden (Zhu et al., 1999; Miknyoczki et al., 1999; Schneider et al., 2001). Bei Behandlung mit BDNF und NT3 wurde eine erhöhte Invasion der Pankreaskarzinomzellen *in vitro* festgestellt (Miknyoczki et al., 1996; Miknyoczki et al., 1999). Außerdem wurde von Sakamoto et al. (2001) gezeigt, dass die Expression der Rezeptoren TrkA und TrkC in duktalem Pankreaskarzinomzellen *in vivo* zu einer verstärkten Proliferation der Zellen führt und mit der PNI korreliert. Da jedoch auch nicht-transformierte Pankreas- und Prostatazellen Neurotrophine und ihre Rezeptoren exprimieren, reichten die bisher gewonnenen Erkenntnisse zur Aufstellung eines Erklärungsmodelles für die PNI nicht aus (Graham et al., 1992; Miknyoczki et al., 1999).

Daneben wurden weitere Substanzen, wie NCAM (*neural cell adhesion molecule*), das Polypeptid Y und verschiedene Hormone als mögliche Vermittler der PNI untersucht (Ramo et al., 1990; Chen et al., 1994; Guo et al., 2000). Die meisten dieser Substanzen führen zwar zu einer Stimulation des Wachstums von Pankreaskarzinomzellen, doch konnte eine direkte Bedeutung für die PNI *in vivo* nicht eindeutig belegt werden.

Ein Faktor, der im zentralen und peripheren Nervensystem weit verbreitet ist, und insbesondere nach Axon-Läsionen und Entzündungsreaktionen peripherer Nerven in großen Mengen von Schwann'schen Zellen exprimiert wird, ist der neurotrophe Faktor GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*). Von diesem Faktor ist bekannt, dass er Migrationsprozesse von Zellen während der Embryonalentwicklung innerhalb und außerhalb des neuronalen Systems reguliert (Young et al., 2001). Eine Beteiligung an der PNI von Pankreaskarzinomzellen wäre daher denkbar.

4.2 GDNF und der GDNF-Rezeptor-Komplex

4.2.1 Der neuronale Faktor GDNF

Bei der Suche nach einem wirksamen Therapeutikum für neurodegenerative Erkrankungen wie dem Parkinson-Syndrom, wurde GDNF 1993 als neuronaler Faktor identifiziert und charakterisiert, der das Überleben dopaminergener Neurone des Mittelhirns fördert (Lin et al., 1993). Da GDNF 1994 aus dem konditionierten Medium der murinen glialen Zelllinie B49 isoliert und aufgereinigt wurde, bekam der Faktor die Bezeichnung *glial cell line-derived neurotrophic factor* (Lin et al., 1994). Zusammen mit den Neurotrophinen steuert GDNF das Überleben und Wachstum sowie die Differenzierung einer Vielzahl von Neuronen im zentralen und peripheren Nervensystem. Hierzu gehören neben den dopaminergen und noradrenergen Neuronen, die spinalen Motoneurone sowie verschiedene Subtypen von sympathischen und parasympathischen Neuronen des autonomen Nervensystems (Henderson et al., 1994; Zurn et al., 1994; Buj-Bello et al., 1995; Arenas et al., 1995; Trupp et al., 1995). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass GDNF bei der Regeneration von Axon-Läsionen und Verletzungen im zentralen und peripheren Nervensystem eine wichtige Bedeutung zukommt (Beck et al., 1995; Yan et al., 1995; Li et al., 1995; Milbrandt et al., 1998; Ramer et al. 2000). GDNF-*knockout*-Mäuse lieferten erste Hinweise auf eine grundlegende Funktion des neuronalen Faktors bei der Entwicklung des enterischen Nervensystems und der

Morphogenese der Niere (Schuchard et al., 1994; Pichel et al., 1996; Sanchez et al., 1996; Moore et al., 1996; Vega et al., 1996). Der neurotrophe Faktor GDNF ist namensgebend für die GFL (*GDNF family ligand*)-Familie neurotropher Faktoren, zu denen Neurturin (NTN), Persephin (PSP) und Artemin (ART) zählen. Die GFLs haben eine Aminosäuresequenz-Homologie von 40 % (Baloh et al., 1998; Milbrandt et al., 1998). Alle dieser Faktoren werden als inaktive Prepro-Proteine synthetisiert und nach Prozessierung als reife Proteine sekretiert (Rosenthal, 1999). Ihre biologische Funktion im Nervensystem entfalten sie als kovalent über Disulfidbrücken verknüpfte Homodimere. Aufgrund konservierter Cystein-Reste, welche über Disulfidbrücken einen sog. Cystein-Knoten bilden, gehören die GFLs zur TGF β (*transforming growth factor β*)-Superfamilie (Lin et al., 1993; Unsicker et al., 1996; Eigenbrot und Gerber, 1997; Baloh et al., 2000), die trotz einer Aminosäuresequenz-Homologie von durchschnittlich 20 % eine große Übereinstimmung in der Tertiärstruktur aufweisen (Milbrandt et al., 1998).

4.2.2 Genomische Organisation und Expression des *gdnf*-Gens

Das humane *gdnf*-Gen ist auf Chromosom 5p12-p13.1 lokalisiert (Schindelbauer et al., 1995), hat eine Gesamtlänge von 28 kb und beinhaltet in Anlehnung an die Nomenklatur des Maus-*gdnf*-Gens 3 Exone. Der translatierte Bereich beginnt innerhalb von Exon 2 und endet in Exon 3 (Grimm et al., 1998). Es konnten zwei unterschiedliche Transkripte des *gdnf*-Gens nachgewiesen werden, welche sich durch eine Deletion von 78 bp im 3'-Ende von Exon 2 unterscheiden. Beide mRNAs werden als bioaktive Proteine von je 15-18 kDa, entsprechend dem Glykosylierungsgrad, exprimiert (Springer et al., 1995).

Die Analyse der zeitlichen und räumlichen Verteilungsmuster von GDNF anhand von *in situ* Hybridisierungen wies auf eine große Bedeutung des neuronalen Faktors für dopaminerge Neurone des Mittelhirns und für Motorneurone des Rückenmarkes hin. Außerhalb des Nervensystems wurden große Mengen GDNF in der Niere und im Gastrointestinaltrakt embryonaler Mäuse und Ratten gefunden (Nosrat et al., 1997; Trupp et al., 1997). Die Letalität von GDNF-*knockout*-Mäusen wurde auf eine Nierenmissbildung oder Agenesie und eine mangelhafte Innervierung des enterischen Nervensystems zurückgeführt. Die Anzahl der Motorneurone war darüber hinaus um 22 %, die der peripheren SCG (*superior cervical ganglion*)-Neurone um 35 % vermindert. Die Entwicklung der dopaminergen Neurone wurde durch das Fehlen von GDNF hingegen nicht beeinträchtigt (Sanchez et al., 1996; Moore et al., 1996; Nosrat et al., 1996, 1997; Pachnis et al., 1998).

4.2.3 Der Ret/GFR α -Rezeptor-Komplex

Im Jahre 1996 gelang es zwei Arbeitsgruppen (Durbec et al., 1996; Trupp et al., 1996) über die Verteilungsmuster der GDNF- und Ret-mRNA und dem Vergleich der Phänotypen von Ret- und GFR α -knockout-Mäusen einen funktionellen Zusammenhang zwischen diesen Proteinen als Ligand und Rezeptor herzustellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass GDNF zur Autophosphorylierung des Ret-Rezeptors und zur Aktivierung Ret-vermittelter intrazellulärer Signalwege führt (Avantaggiato et al., 1994; Tsuzuki et al., 1995). Die Signaltransduktion von GDNF ist im Vergleich zu anderen Mitgliedern der TGF β -Superfamilie ungewöhnlich. Der neuronale Faktor bindet nicht an einen Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor sondern an die Rezeptortyrosinkinase (RTK) Ret. Die Assoziation von GDNF mit Ret erfolgt zudem indirekt und wird von einem als GFR α bezeichneten Korezeptor vermittelt (Jing et al., 1996; Treanor et al., 1996). Neben GDNF binden auch die anderen Mitglieder der GFL-Familie, NTN, ART und PSP, an den transmembranen Ret-Rezeptor. Vier unterschiedliche GFR α (GDNF *family receptor alpha*)-Korezeptoren (Jing et al., 1997; Thompson et al., 1998), welche mit hoher Affinität jeweils an eines der GFL-Proteine binden, gewährleisten die Spezifität der Bindung und der nachfolgenden Signaltransduktion, während die Rezeptortyrosinkinase Ret intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert. Für GDNF wurde gezeigt, dass eine hochaffine Bindung bevorzugt an GFR α 1 erfolgt, daneben aber auch eine Assoziation mit GFR α 2 möglich ist (Baloh et al., 1997; Sanicola et al., 1997; Trupp et al., 1998; Wang et al., 2000). Für Neurturin (NTN) wurde eine umgekehrte Bindungsspezifität nachgewiesen (Cik et al., 2000). Die Aminosäuresequenz-Homologie von GFR α -Molekülen liegt bei 30-40 %. GFR α -Proteine sind Glykoproteine, welche über einen C-terminalen Glykosylphosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker in speziellen Mikrodomänen der Zytoplasmamembran, sog. *lipid rafts*, verankert sind, und keinen intrazellulären Proteinanteil besitzen. Im geläufigsten Modell zur GDNF-Signaltransduktion bindet ein GDNF-Homodimer an zwei GFR α -Moleküle (s. Abbildung 2). Dieser vorgeformte Komplex assoziiert daraufhin mit dem transmembranen Ret-Rezeptor und rekrutiert diesen dabei in den *lipid rafts*. Nachfolgend interagiert der Ret-Rezeptor nach Homodimerisierung und Autophosphorylierung mit *lipid raft*-assoziierten Signalmolekülen (Tansey et al., 2000).

GDNF-Rezeptor-Komplex

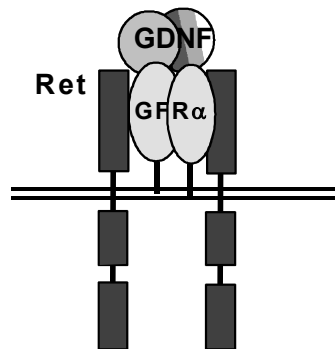


Abb. 2: GDNF-Rezeptor-Komplex. Ein GDNF-Homodimer bindet an zwei GFR α -Moleküle. Der Ligand-Korezeptor-Komplex assoziiert daraufhin an die Rezeptortyrosinkinase Ret, welche homodimerisiert und autophosphoryliert. GDNF: *glial cell line-derived neurotrophic factor*; GFR α : *GDNF family receptor alpha*

4.2.4 Ret-assoziierte Tumorerkrankungen und Morbus Hirschsprung

Die RTK Ret wurde 1985 nach der Transfektion von NIH/3T3 Fibroblasten der Maus mit der DNA von T-Zell-Lymphomen erstmals beschrieben (Takahashi et al., 1985). Während der Transfektion kam es zur Rekombination des *c-ret*-Gens mit einem fremden DNA-Abschnitt, so dass eine neue Transkriptionseinheit entstand, welche für ein konstitutiv-aktives Fusionsprotein kodierte. Da die DNA-Rekombination im Verlauf der Transfektion stattgefunden hatte, wurde das Proto-Onkogen als „Ret“ bezeichnet, für „*rearranged during transfection*“. Ein *rearrangement* des *c-ret*-Gens *in vivo* mit dem 5'-Ende verschiedener anderer Gene, kann auch durch γ -Strahlung, wie z. B. nach dem Reaktorunfall von Tschernobyl (1986) verursacht werden (Takahashi et al., 2001). Chimäre *c-ret*-Onkogene treten in 60-70 % papillärer Schilddrüsenkarzinome auf. Die Gene, welche mit dem *c-ret*-Gen fusionieren, werden als PTC (*papillary thyroid cancer*)-Gene 1-9, bezeichnet (Grieco et al., 1990; Bongarzone et al., 1993; Santoro et al., 1994a, 1999). Erblich bedingte, Ret-assoziierte Tumorerkrankungen sind neben dem familiären medullären Schilddrüsenkarzinom (FMTC: *familial medullary thyroid carcinoma*) zwei Arten der multiplen endokrinen Neoplasie (MEN 2A, B: *multiple endocrine neoplasia type 2A, B*) (Donis-Keller et al., 1993; Mulligan et al., 1994). Spezifische Punktmutationen, sog. *gain-of-function* Mutationen, in der Cystein-reichen extrazellulären Domäne oder den intrazellulären Tyrosinkinase-Domänen I und II, tragen zur Entstehung eines konstitutiv-aktiven Ret-Proteins bei. Alle Ret-assoziierten Tumore entstehen dabei in Zellen neuroektodermalen Ursprunges (Mak et al., 1996; Santoro et al., 1998). Eine

erblich bedingte neuroektodermale Erkrankung, Morbus Hirschsprung (*megacolon congenitum*) korreliert mit *loss-of-function* Mutationen im *c-ret*-Gen (Amiel et al., 2001). Verschiedene Mutationen, die über das gesamte *c-ret*-Gen verteilt sein können, führen zur Expression eines Ret-Rezeptors mit einer dominant-negativen Wirkung. Dadurch kommt es während der Embryogenese zu einer verminderten Zellwanderung oder Apoptose von Neuralleistenzellen, welche für die Innervierung des Gastrointestinaltraktes erforderlich ist. Die Folge ist eine Aganglionose (Pasini et al., 1996; Edery et al., 1997; Manie et al., 2001).

4.2.5 Genomische Organisation des *c-ret*-Gens und Proteinstruktur von Ret

Das *c-ret* Proto-Onkogen hat eine Größe von ca. 55 kb und ist auf Chromosom 10q11.2 lokalisiert (Pasini et al., 1995). Während Intron 1 bereits 24 kb lang ist, sind die Exone 2-21 auf die übrigen 31 kb verteilt. Anhaltspunkte für *c-ret*-verwandte Gene oder Pseudogene wurden innerhalb des Genoms nicht gefunden (Takahashi et al., 1988).

Aus dem *c-ret*-Gen können durch alternatives Spleißen oder Nutzung unterschiedlicher Polyadenylierungsstellen mehr als 10 verschiedene Transkripte entstehen (Pasini et al., 1995; Myers et al., 1995). Alternatives Spleißen am 3'-Ende führt zur Generierung von drei Ret-Isoformen, die als Ret9, Ret43 und Ret51 bezeichnet werden (Tahira et al., 1990; Lorenzo et al., 1995; Myers et al., 1995; Ivanchuk et al., 1997, 1998) und eine Länge von 3219 bp, 3321 bp und 3345 bp bzw. 1072 AS, 1106 AS und 1114 AS haben. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt zwei zusätzliche Tyrosin-Reste in der langen Ret51-Isoform, von welchen jedoch nur der Tyrosin-Rest Y1096 phosphoryliert wird und mit Adapterproteinen interagiert (Liu et al., 1996; Alberti et al., 1998).

Der extrazelluläre Ret-Anteil ist rund 600 AS lang und enthält im Vergleich zu anderen Rezeptortyrosinkinasen keine konservierten Proteinstrukturen wie Leucin- und Fibronectin Typ III-Wiederholungssequenzen oder Immunglobulin-homologe Domänen. Dafür folgt im Ret-Protein auf eine N-terminale Signalpeptid-Sequenz eine Cadherin-homologe Domäne mit Ca²⁺-Bindungsmotiven sowie eine Cystein-reiche Region. Ein kurzer hydrophober transmembraner Sequenzabschnitt verbindet die extra- mit der intrazellulären Ret-Region. Intrazellulär enthält das Ret-Protein zwei Tyrosinkinase-Domänen, welche die Autophosphorylierung spezifischer Tyrosin-Reste nach Ligandenbindung katalysieren.

Abbildung 3 zeigt schematisch das Ret-Protein mit den Struktur-Motiven sowie den an der Signaltransduktion beteiligten intrazellulären Tyrosin-Resten und einigen wichtigen Adapter- und Effektormolekülen.

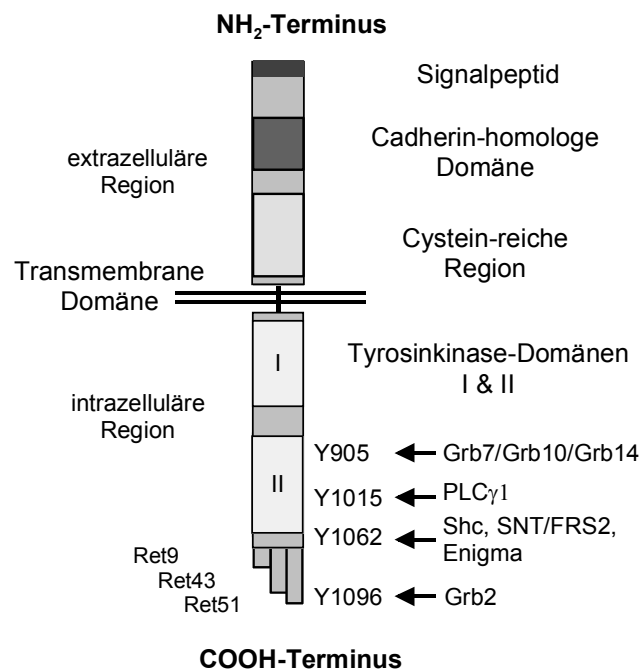


Abb. 3: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Ret. Auf eine N-terminale Signalsequenz folgen extrazellulär eine Cadherin-homologe Domäne sowie eine Cystein-reiche Region. Intrazellulär sind in Ret zwei Tyrosinkinase-Domänen vorhanden und 18 Tyrosin-Reste, von welchen 2 nur in der langen Ret51-Isoform auftreten. Vier Tyrosin-Reste, Y905, Y1015, Y1062 und Y1096, sind nach Autophosphorylierung des Ret-Rezeptors in die Bindung verschiedener Adapter- und Effektormoleküle mit einer SH2- oder PTB-Domäne involviert.

In der intrazellulären Region des Ret-Proteins befinden sich spezifische Konsensussequenzen, die, nach Autophosphorylierung darin enthaltener Tyrosin-Reste, als Bindungsstellen für verschiedene Adapter- und Effektorproteine mit SH2 (*src homology domain 2*)- (Koch et al., 1991) und PTB (*phosphotyrosine binding*)-Domäne (Blaikie et al., 1994) dienen. Die Assoziation dieser Proteine führt anschließend zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Rezeptortyrosinkinase-typischer Signaltransduktionswege. Von den insgesamt 16 bzw. 18 Tyrosin-Resten in den intrazellulären Regionen der Ret-Proteine konnte für 4 Tyrosin-Reste (Y905, Y1015, Y1062, Y1096) eine Involvierung in Signaltransduktionsprozesse gezeigt werden (van Weering und Bos, 1998a; Takahashi, 2001). Die Phosphotyrosin-Reste pY905 und pY1015 binden dabei an die Adapterproteine Grb7, Grb10 und Grb14 oder die Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) (Pandey et al., 1995, 1996; Borrello et al., 1996). Für den Phosphotyrosin-Rest pY1062 wurde eine Interaktion mit verschiedenen Adapterprotein-Komplexen nachgewiesen. Die beiden wichtigsten Adapterprotein-Komplexe sind hierbei der

Shc/Grb2/Sos- und der Shc/Gab1,2-Komplex. Die Anlagerung von ersterem führt hierbei zu einer Aktivierung der für die Proliferation und Differenzierung neuronaler Zellen bedeutenden Ras/ERK-Signalkaskade, während der Shc/Gab1,2-Protein-Komplex über eine PI3-Kinase-Aktivierung das Überleben neuronaler Zellen reguliert (Arighi et al., 1997; Creedon et al., 1997; Ishiguro et al., 1999; Soler et al., 1999; Besset et al., 2000; Hayashi et al., 2000; de Vita et al., 2000; Chen et al., 2001). Daneben konnte für den Phosphotyrosin-Rest pY1062 eine Interaktion mit Shc/Enigma (Durick et al., 1998) und SNT/FRS2 (Kurokawa et al., 2001; Mellilo et al., 2001) sowie der p62dok-Proteinfamilie (Grimm et al., 2001) gezeigt werden. Eine direkte Assoziation des Grb2-Adaptermoleküls mit dem nur in der langen Ret-Isoform vorkommenden Phosphotyrosin-Rest pY1096 wurde von Alberti et al. (1998) nachgewiesen. Die Formation eines Grb2/Gab2/p85(PI3K)-Protein-Komplexes vermittelt hierbei die Aktivierung PI3-Kinase-regulierter Signaltransduktionswege in neuronalen Zellen (Besset et al., 2000). Eine Beteiligung der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade sowie PI3-Kinase-regulierter Signalwege an der Migration epithelialer Zellen konnte kürzlich demonstriert werden (Tang et al., 1998; You et al., 2001).

4.3 Fragestellung der Arbeit

Die Prognose des duktales Adenokarzinoms des exokrinen Pankreas ist eine der ungünstigsten innerhalb des gesamten onkologischen Spektrums. Sie korreliert in hohem Maße mit dem Invasions- und Metastasierungsverhalten der Pankreaskarzinomzellen, welche in bis zu 90 % der Fälle intra- und extrapancreatische periphere Nerven infiltrieren. Die Ursachen für die hohe Affinität der Tumorzellen zu neuronalem Gewebe wurden bisher kaum erforscht. Durch Untersuchung der Migration und Proliferation von humanen Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro* sollte der Frage nachgegangen werden, ob periphere Nerven und/oder Schwann'sche Zellen Signalmoleküle freisetzen, die bei den Pankreaskarzinomzellen Wachstum und Chemotaxis induzieren. Nach Identifizierung und Charakterisierung eines neuronalen Faktors, sollten im weiteren Verlauf der Arbeit Signaltransduktionswege analysiert werden, die für eine Faktor-induzierte Chemotaxis der Tumorzellen relevant sind. Dabei sollten kleine GTPasen der Rho- und Ras-Familie, aufgrund ihrer Schlüsselstellung bei der Regulation des Aktin-Zytoskelettes und der Zellmotilität, besonders berücksichtigt werden.

5 Material

5.1 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamidlösung (30 % M/V)	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit/USA
Agarose, <i>molecular biology grade</i>	Life Technologies, Eggenheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Boehringer, Ingelheim
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Bayer, Leverkusen
ATP	Roche Diagnostics, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Difco, Detroit/USA
<i>Yeast extract Servabacter</i> [®]	Serva Bioproducts, Heidelberg
<i>BCA Protein Assay Reagent A</i>	Pierce, Sankt Augustin
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
Bisacrylamidlösung (2 % M/V)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Toluidinsalz (BCIP)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart
Chloroform	J. T. Baker, Deventer/Holland
<i>Coomassie Brilliant Blue R250</i>	Serva Bioproducts, Heidelberg
<i>donor calf serum</i> (DCS)	Life Technologies, Eggenstein
DMEM	Life Technologies, Eggenstein
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
DMRIE-C [®] <i>Transfection Reagent</i>	Life Technologies, Eggenstein
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
ECL [™] Reagenz - RPN 2106	Amersham Pharmacia, Freiburg
ECL [™] Reagenz - <i>Super Signal</i>	Pierce, Sankt Augustin
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Boehringer, Ingelheim
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Deisenhofen

Elvanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
<i>fetal calf serum</i> (FCS)	Life Technologies, Eggenstein
Genitacin [®] (G-418 Sulfat)	PAA Laboratories, Cölbe
Gel- <i>Blotting</i> -Papier GB002	Schleicher & Schuell, Dassel
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Glutathion Sepharose [™] 4B	Amersham Pharmacia, Freiburg
β-Glycerophosphat	Sigma, Deisenhofen
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roche Diagnostics, Mannheim
Kanamycin-Sulfat	Serva Bioproducts, Heidelberg
Kodak X-Omat AR Röntgenfilme	Sigma, Deisenhofen
Kupfer-(II)-sulfat	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Boehringer, Ingelheim
L-Glutamin	Life Technologies, Eggenstein
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver, Naturaflor [®] ,	Töpfer, Dietmannsried
MBP (95-98) S5 Peptid	Thermo Hybaid, Ulm
Natriumdeoxycholat	Serva Bioproducts, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Bioproducts, Heidelberg
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Sigma, Deisenhofen
4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	AppliChem, Darmstadt
Nitrozellulosemembranfilter [®] (0,45 μm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Papanicolaous Hämatoxylin-Lösung	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck-Schuscharadt, Hohenbrunn
PCR-Mineralöl	Serva Bioproducts, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA Laboratories, Linz (Österreich)
Pepstatin A	Serva Bioproducts, Heidelberg
Phenol	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen

Polymax RT Entwickler/Fixierer (Kodak)	Sigma, Deisenhofen
Ponceau-S-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Protein A-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein G-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Bioproducts, Heidelberg
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
<i>Scintillation Cocktail Quicksafe A</i>	Zinsser Analytic, Frankfurt
SuperFect™	Qiagen, Hilden
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Boehringer, Ingelheim
Thymidin	Sigma, Deisenhofen
TransFast™ <i>Transfection Reagent</i>	Promega, Mannheim
Trichloressigsäure	Serva Bioproducts, Heidelberg
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(TRIS)	USB, Cleveland/USA
Triton X-100	Boehringer, Ingelheim
Trypsin-EDTA-Lösung	Life Technologies, Eggenstein
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	Sigma, Deisenhofen
Tween® 20	Sigma, Deisenhofen
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid (X-Gal)	Boehringer, Mannheim

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel, wurden in *p. a.* - Qualität von den Firmen Merck, Darmstadt, Roth, Karlsruhe, und Sigma, Deisenhofen, bezogen.

5.2 Radioaktiv-markierte Chemikalien

[γ- ³² P]ATP (5000 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig
[³ H]-Methylthymidin (6,7 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig

5.3 Enzyme und Molekularbiologische Kits

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I (<i>amplification grade</i>)	Life Technologies, Eggenstein
Klenow-Polymerase Set	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
KlenTaq LA Polymerase Mix	Clontech, Palo Alto/USA
Pwo-Polymerase	AGS, Heidelberg
Ready-to-go™ T4 DNA-Ligase	Amersham Pharmacia, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	AGS, Heidelberg/MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Taq DNA-Polymerase	Sigma, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase	New Englands Biolabs, Beverly/USA
Nukleobond AX PC100 Kit	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy Midi Kit (50)	Qiagen, Hilden
SuperScript™ cDNA-Synthese Kit	Life Technologies, Eggenstein
TA Cloning® Kit	Invitrogen, Leek/Holland
TOP10 Kit	Invitrogen, Leek/Holland
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Desoxynukleosidtriphosphat-Set	Boehringer, Mannheim

5.4 Molekulargewichtsmarker

5.4.1 Molekulargewichtsmarker für Agarosegel-Elektrophorese

BioSizer™ III (λ -DNA *HindIII/EcoR* I gespalten) (AGS, Heidelberg)

Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp): 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125

5.4.2 Molekulargewichtsmarker für SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese

LMW - *Low molecular weight marker* (Sigma, Deisenhofen)

Protein	Molekulargewicht (kDa)
Rinderalbumin	66
Ovalbumin	45
Glyzerinaldehyd-3-P-dehydrogenase	36
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	29
Trypsinogen, Rinderpankreas	24
Trypsininhibitor, Sojabohnen	20
α -Lactalbumin, Rind	14,2

HMW - *High molecular weight marker* (Sigma, Deisenhofen)

Protein	Molekulargewicht (kDa)
Myosin, Kaninchenmuskel	205
β -Galaktosidase, <i>E. coli</i>	116
Phosphorylase B, Kaninchenmuskel	96
Rinderalbumin	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	36

5.5 Zellkultur-Material

Cell Culture Inserts (8 μ m)

Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg

12-Loch-Platten für o. g. Einsätze

Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg

Millex[®]-GS Sterilfilter (0,22 μ m)

Millipore Corporation, Bedford/USA

Das übrige Zellkultur-Material wurde von den Firmen Costar (Corning, NY/USA), Falcon/Beckton-Dickinson, Heidelberg, NUNC, Wiesbaden, und Renner, Darmstadt, bezogen.

5.6 Standard-Lösungen und Medien

5.6.1 Standard-Lösungen

1 x CMF-PBS:	140 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,2
1 x PBS:	136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 1,5 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O; 0,5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O; pH 7,4
1 x TBS:	50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5
5 x Glycin-Puffer:	2 M Glycin; 250 mM Tris/HCl; 0,5% (M/V) SDS; pH 8,5
Transferpuffer:	25 mM Tris/HCl; 0,1 % (M/V) SDS; 1,5 % (M/V) Glycin; 20 % (V/V) Methanol; pH 8,3
Alkalische Phosphatase-Puffer:	50 mM Tris/HCl; 50 mM MgCl ₂ ; pH 9,5

5.6.2 Bakterien-Medien

Luria Bertani (LB)-Flüssigmedium:	1% (M/V) Trypton; 0,5 % (M/V) Hefeextrakt; 1% (M/V) NaCl; pH 7,5
Luria Bertani (LB)-Agar:	1% (M/V) Trypton; 0,5 % (M/V) Hefeextrakt; 1% (M/V) NaCl, 2% (M/V) Agar; pH 7,5

5.6.3 Zellkultur-Medien

5.6.3.1 Zellkultur-Medien für Zelllinien

Die Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3, die Pankreaskarzinom Zelllinien AsPC-1, BxPC-3 und PANC-1 sowie alle glialen und neuronalen Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle*

Medium (DMEM; Life Technologies, Eggenstein) kultiviert, welchem 200 mM L-Glutamin (Life Technologies, Eggenstein), 1% Penicillin/Streptomycin (10 x, 10000 U, 10 mg/ml) und 10% (V/V) DCS (NIH/3T3) oder 10% (V/V) FCS (übrige Zelllinien) zugesetzt wurde. Dem Zellkultur-Medium für die stabil-transfizierte PANC-1-Zellen wurde außerdem noch 1,5 mg/ml G418-Sulphat (Life Technologies, Eggenstein) hinzugefügt. Alle Zusätze wurden vor dem Gebrauch sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße).

5.6.3.2 Zellkultur-Medien für Primärkulturen

Zur Selektion und Kultivierung von glialen Primärkulturen wurde MEM-EARLE Medium (*Minimal Essential Medium*) unter Zusatz von Glukose (5 g/l), L-Glutamin (292 mg/l), NaHCO₃ (2,2 g/l) und 10% (V/V) HS (*horse serum*; Life Technologies, Eggenstein) oder 20% (V/V) FCS verwendet.

Zur Selektion und Kultivierung von neuronalen Primärkulturen wurde modifiziertes N2-Medium (Bottenstein und Sato, 1979) verwendet, eine 1:1(V/V)-Mischung aus MEM und Ham's F12 Medium (Life Technologies, Eggenstein) mit folgenden Zusätzen: Glukose (5 g/l), L-Glutamin (220 mg/l), HEPES (10 mM; Sigma, Deisenhofen), Transferrin (50 µg/ml; Sigma, Deisenhofen), Putrescin (10⁻⁴ M; Sigma, Deisenhofen), Insulin (5 µg/ml; Sigma, Deisenhofen), Trijodthyronin (T3) (5 x 10⁻¹⁰ M; Sigma, Deisenhofen), Na-Selenit (3 x 10⁻⁸ M; Sigma, Deisenhofen), Progesteron (2 x 10⁻⁸ M; Sigma, Deisenhofen), Gentamicin (50 µg/ml; Life Technologies, Eggenstein).

Alle Medien für Primärkulturen wurden als Instant-Medien (Life Technologies, Eggenstein) bezogen und in 1l ddH₂O (B. Braun, Melsungen) gelöst.

5.7 Faktoren und Inhibitoren

5.7.1 Faktoren

rhBDNF (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>) (Stammlösung: 100 µg/ml in ddH ₂ O)	TEBU, Frankfurt a. M.
rhGDNF (<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>) (Stammlösung: 100 µg/ml in ddH ₂ O)	TEBU, Frankfurt a. M.
rhβ-NGF (<i>β-nerve growth factor</i>) (Stammlösung: 100 µg/ml in ddH ₂ O)	TEBU, Frankfurt a. M.
rhEGF (<i>epidermal growth factor</i>) (Stammlösung: 100 ng/ml in ddH ₂ O)	Roche Diagnostics, Mannheim

LPA (Lysophosphatidsäure)

Sigma, Deisenhofen

(Stammlösung: 10 mM in ddH₂O)

5.7.2 Inhibitoren

MEK1-Inhibitor (PD98059)

New England Biolabs, Beverly/USA

(Stammlösung: 50 mM in DMSO)

PI3-Kinase-Inhibitor (LY294002)

ALEXIS[®] Biochemicals, Grünberg

(Stammlösung: 10 mM in Methanol)

Mitomycin C

Sigma, Deisenhofen

(Stammlösung: 2 mg/ml in 1 x CMF-PBS, 25 % (V/V) Glycerin)

5.8 Prokaryontische und eukaryontische Zellen

5.8.1 *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Bezugsquelle
BL21(DE3)	Novagen/R&D Systems, Wiesbaden
DH5 α	Clontech/TCC Biotechnology, Heidelberg
TOP10F'	Invitrogen, Heidelberg

5.8.2 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	ATCC Nr./ Herkunft
NIH/3T3	Fibroblasten-Zelllinie aus der Maus (Copeland et al., 1979)	CRL-1658
HEK-293	humane embryonale Nierenzelllinie mit epithelialer Morphologie, transformiert mit Adenovirus 5 (Ad 5) (Graham et al., 1977)	CRL-1573
AsPC-1	humane duktales Pankreaskarzinomzelllinie humane duktales Pankreaskarzinomzelllinie mit K- <i>ras</i> -Mutation (Aoki et al., 1997)	CRL-1682
BxPC-3	humane Pankreaskarzinomzelllinie. Mutation im Codon 220 des <i>p53</i> -Gens (TAT→TGT) führt zum Austausch von Tyrosin gegen Glycin. Keine K- <i>ras</i> -Mutationen (Tan et al., 1986)	CRL-1687
PANC-1	humane Pankreaskarzinomzelllinie epithelialer Morphologie (Lieber et al., 1975). Eine Punktmutation im Codon 12 des K- <i>ras</i> -Gens (GGT→GAT) führt zum Austausch von Glycin gegen Asparagin und damit zu einem konstitutiv-aktiven K-Ras-Protein (Giehl et al., 2000)	CRL-1469

Mia PaCa-2	Humane Pankreaskarzinomzelllinie epithelialen Ursprunges, die sowohl eine Mutation im <i>p53</i> -Gen (Position 248, CGG→TGG), als auch eine Punktmutation in beiden Allelen des <i>K-ras</i> -Gens enthält. Letztere führt zu einem Austausch von Glycin gegen Cystein und hat zur Folge, daß die Zellen ein ständig aktives <i>K-ras</i> -Protein aufweisen (Berrozpe <i>et al.</i> , 1994).	CRL-1420
B49	gliale Zelllinie aus BDIX-Ratten (Schubert <i>et al.</i> , 1974)	von Dr. J. Engele
LS	humane Neuroblastoma-Zelllinie, wurde in Tübingen etabliert (Rudolph <i>et al.</i> , 1991)	von Dr. J. Engele
SK-N-LO	humane neuroektodermale Zelllinie	von Dr. J. Engele
SK-N-SH	humane Neuroblastoma-Zelllinie (Seeger <i>et al.</i> , 1977)	HTB-11/ von Dr. J. Engele

ATCC: *American Type Culture Collection*; Rockville/USA

5.9 Expressionsplasmide

5.9.1 Prokaryontischen Expressionsvektoren

pGEX-2TK	Amersham Pharmacia, Freiburg
pGEX-2T/RhoA(G14V/F25N)	erhalten von K. Aktories, Freiburg
pGEX-2T/RhoA(T19N/F25N)	erhalten von K. Aktories, Freiburg
pGEX2-TK/PAK-CD	erhalten von J. Collard, Amsterdam/Holland
PGEX-2TK/RBD	erhalten von J. Bos, Utrecht/Holland

5.9.2 Eukaryontischen Expressionsvektoren

pcDNA3. 1(+)	Invitrogen, Leek/Holland
pEGFP-C/N	Clontech, Palo Alto/USA
pMT2 SM /RhoA	von M. Gebbink, Utrecht/Holland

Das Expressionsplasmid pEGFP-C1/H-Ras(S17N) wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Klaudia Giehl kloniert und zur Herstellung stabil-transfizierter PANC-1-Zellen verwendet.

5.9.3 Klonierungsvektoren

pUC19	Stratagene, Heidelberg
pBluescript II KS(+) (pKS(+))	Stratagene, Heidelberg
pCR2.1 [®]	Invitrogen, Leek/Holland

5.10 Oligonukleotide

Hämagglutinin-Epitop: Die Hämagglutinin(HA)-Sequenz wurde verwendet, um RhoA, und die RhoA(G14V/F25N)- und RhoA(T19N/F25N)-Mutanten am 5'-Ende mit einem Epitop-*tag* zu versehen.

Hämagglutinin-Sequenz: AAA CTG CAG **ATG** TAT CCT TAT GAT GTT CCT GAT TAT GCC CAT **ATG**-Rho-Sequenz

Restriktionsschnittstellen: *Pst*I: CTG CAG; *Nde*I: CAT ATG; *Bam*HI: GGA TCC

M1 und M255: Methionin-Reste an den Positionen 1 und 255 der Aminosäuresequenz des RET-Proteins

RhoA- und RhoC-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz	Länge (bp)
RhoA 5'-Primer (<i>Nde</i> I)	5'-GGG CAT ATG GCT GCC ATC CGG AAG AAA-3'	27
RhoA 3'-Primer (<i>Bam</i> HI)	5'-GGG GAT CCT CAC AAG ACA AGG CAA CCA GA-3'	29
HA-RhoA 5'-Primer (<i>Nde</i> I)	5'-CCC AAA CTG CAG ATG TAT CCT TAT GAT GTT CCT GAT TAT GCC CAT ATG GCT GCC ATC CGG AAG AAA-3'	66
RhoC 5'-Primer	5'-CAC CAT GGC TGC AAT CCG A-3'	19
RhoC 3'-Primer	5'-GGG GGG ATC TCA GAG AAT GG-3'	20
RhoC 5'-Primer (<i>Nde</i> I)	5'-GGG CAT ATG GCT GCA ATC CGA-3'	21
RhoC 3'-Primer (<i>Bam</i> HI)	5'-GGG GGA TCC TCA GAG AAT GG-3'	20

Ret-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz, Lokalisation	Länge (bp)
5'-Ende _{M1}	5'-CGA TGG CGA AGG CGA CGT-3' bp -2 (5'UTR) - 16 (Exon 1)	18
5'-Ende _{M255}	5'-TGA TGG TGC CCT TCC CGG-3' bp 761 - 778 (Exon 4)	18

3'-intern I	5'-GCA CCG ACA CGT TGA AGT GGA-3' bp 1172 - 1192 (Exon 6)	21
5'-intern II5A	5'-GTC CTC TTG CTC CAC TTC AA-3' bp 1162 - 1181 (Exon 6)	20
3'-intern II5B	5'-ACA ACA TCG CAG TGG CC-3' bp 1702 - 1718 (Exon 9)	17
5'-intern II3A	5'-TAC ACC ACG GTG GCC GT-3' bp 2254 - 2270 (Exon 12)	17
3'-intern II3B	5'-GCT CAG GAG GAA TCC CAG G-3' bp 2857 - 2875 (Exon 17)	19
5'-intern I	5'-TTT TGA TCA TAT CTA CAC CA-3' bp 2769 - 2788 (Exon 16)	20
3'-Original	5'-TGT TAA CTA TCA AAC GTG TCC ATT AA-3' bp 3322 (Exon 20) - 3347 (3'-UTR/"Intron 20")	26
5'-Primer „5'-EndeMitte“	5'-GGC TTT CCC CTG CTC ACC GTC T-3' (Sequenzierung) bp 343 - 364 (Exon 3)	22
5'-Mitte	5'-GAA CTT CTC CAC CTG CTC TCC-3' (Sequenzierung) bp 1659 - 1679 (Exon 9)	21
3'-Mitte	5'-ACT CTG ACA GCA GGT CTC GAA-3' (Sequenzierung) bp 2305 - 2326 (Exon 13)	22
3' Ret9	5'-GAA TCT AGT AAA TGC ATG G-3' bp 3198 - 3216* (Intron 19, kds)	19
3' Ret9 Test	5'-TAT TCA ACC TGT TCT TGG-3' bp 3471 - 3488* (Intron 19, nkds)	18
3' Ret43	5'-GAA GTT ACA GTG CTG ACA A-3' bp 3254 - 3272* (Exon 21)	19

* Exon 19 ist das letzte Exon, das in allen drei Spleißvarianten des *c-ret*-Gens vorkommt. Das letzte Basenpaar von Exon 19 ist Basenpaar 3186. Die angegebenen Oligonukleotidsequenzen ergeben sich durch Weiterzählen in die entsprechenden Intron- oder Exon-Sequenzen.

GFR α 1- und GFR α 2-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz, Lokalisation	Länge (bp)
GFR α 1 5'-intern	5'-GGA TTG CGT GAA AGC CAG TGA-3' bp 80 - 100 (Exon 2)	21
GFR α 1 3'-intern	5'-AGC ACA CAG GCA CGA TGG TCT-3' bp 664 - 684 (Exon 4)	21
GFR α 2 5'-intern	5'-GTG CCC AGC GAG TAC ACC TAC-3' bp 630 - 650 (Exon 4)	21
GFR α 2 3'-intern	5'-CAG GTG GTG ATG ACA CTG GTC-3' bp 1184 - 1204 (Exon 7)	21

Die GFR α 1- und GFR α 2-Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Frau Dr. Gita Pezeshki, Abteilung Anatomie und Zellbiologie, zur Verfügung gestellt.

GDNF-Oligonukleotide (nach Okada et al., 1999)

Oligonukleotid	Sequenz, Lokalisation	Länge (bp)
GDNF 5'-intern	5'-TGCTTCCTAGAAGAGAGCGG-3' bp 254 - 273 (Exon 3)	20
GDNF 3'-intern	5'-TCGTACGTTGTCTCAGCTGC-3' bp 451 - 470 (Exon 3)	20

2 β -Aktin-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz	Länge (bp)
β -Aktin 5'-Primer	5'-GAC TAC CTC ATG AAG ATC CT-3' bp 634 - 653	20
β -Aktin 3'-Primer	5'-GCG GAT GTC CAC GTC ACA CT-3' bp 926 - 945	20

Die β -Aktin Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Andre Menke zur Verfügung gestellt.

Oligonukleotide für Plasmid-Sequenzierung

Oligonukleotid	Sequenz, Lokalisation	Länge (bp)
pKS(+) reverse-Primer	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG T-3' bp 601 - 625	22
pKS(+) universal-Primer	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3' bp 808 - 826	19
pEGFP-C 5'-Primer	5'-CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G-3' bp 1268 - 1287	22
pEGFP-C 3'-Primer	5'-TAA CAA CAA CAA TTG CAT TC-3' bp 1500 - 1519	20
pEGFP-N 5'-Primer	5'-GGT AGG CGT GTA CGG TGG GAG G-3' bp 530 - 551	22
pEGFP-N 3'-Primer	5'-CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G-3' bp 724 - 745	22
pGEX-2TK 5'-Primer	5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3' bp 869 - 891	23
pGEX-2TK 3'-Primer	5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3' bp 1019 - 1041	23
BGH-Primer	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3' bp 1021 - 1038	18
T7-Promotor Primer	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA-3' bp 863 - 885	23

Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden die hier aufgeführten Primer von der Firma Thermo Hybaid (Ulm) synthetisiert.

5.11 Antikörper

Primäre Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
anti-Rac1 IgG2b, Maus; R56220	Transduction Laboratories, Franklin Lakes/USA	1:500
anti-pan-Ras (Ab-3) IgG, Maus; OP 40	Oncogene Research, San Diego/USA	1:1000 - 1:2000
anti-N-Ras (Ab-1) IgG, Maus; OP 15	Oncogene Research, San Diego/USA	1:500
anti-RhoA (26C4) IgG, Maus; sc-418	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz/USA	1:1000
anti-RhoA (119) IgG, Kaninchen; sc-179	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz/USA	1:1000
anti-Ret (C-19) IgG, Ziege; sc-167-G	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz/USA	1:100 - 1:300
anti-Ret (C19) IgG, Kaninchen; sc-167	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz/USA	1:100 - 1:300
anti-GDNFR α IgG, Maus; sc-167G, G556201	Transduction Laboratories, Franklin Lakes /USA	1:5000
anti-ERK2 (C-14) IgG, Kaninchen; sc-154	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz /USA	1:1000
anti-JNK1 (FL) IgG, Kaninchen; sc-571	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz/USA	1:1000
anti-Akt/PKB IgG, Kaninchen; #9270	New England Biolabs, Beverly/USA	1:1000
anti-P-Akt (Ser473) IgG, Kaninchen; #9270	New England Biolabs, Beverly/USA	1:1000
anti-P-Akt (Thr308) IgG, Kaninchen; #9275S	New England Biolabs, Beverly/USA	1:1000
anti-GFP, Klone 7.1 & 13.1, Maus; #1814460	Roche Diagnostics, Mannheim	1:500 - 1:1000
anti-GST (Z-5) IgG, Kaninchen; sc-459	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz/USA	1:500

Die anti-Ret-Antikörper und anti-P(Phospho-)-Akt/PKB-Antikörper wurden in TBS verdünnt, während alle anderen Antikörper in CMF-PBS verdünnt wurden (siehe 5.6.1)

Sekundäre Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
anti-Ziege IgG, Kaninchen, G5518; HRP	Sigma, Deisenhofen	1:1000
anti-Kaninchen IgG, Ziege, A-6154; HRP	Sigma, Deisenhofen	1:1000
anti-Maus, IgG, Ziege, A-5278; HRP	Sigma, Deisenhofen	1:1000
anti-Maus IgG (H+L), Ziege, #97012804; HRP	Pierce, St. Augustin	1:5000
anti-Kaninchen IgG (H+L), Ziege, #31460; HRP	Pierce, St. Augustin	1:5000
anti-Maus IgG, Ziege, A-3562; AP	Sigma, Deisenhofen	1:2500
anti-Kaninchen, IgG (H+L), Maus, #36234; AP	Dianova, Hamburg	1:1000

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G; HRP: *horse-radish peroxidase*;

AP: Alkalische Phosphatase

5.12 Geräte

AnalySIS-Dokumentationssystem, Doku 3.0	Analysis, Stuttgart
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Jena
Bakterienschüttler Certomat R	B. Braun, Melsungen
Beckman DU 640 Photometer	Beckman Instruments, München
Beckman Zentrifuge J1-HS (Rotoren JA10, JA 20)	Beckman Instruments, München
Beckman Zentrifuge J2-HS	Beckman Instruments, München
CO ₂ -Inkubator, Typ CB 210	WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen
Concentrator 5301 (<i>speed vac</i>)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge 5417-C	Eppendorf, Hamburg

Fluoreszenzmikroskop Olympus	Olympus, Hamburg
Flüssigszintillationszähler LSC2200 CA	Packard, Dreieich
Elektrophoresegelkammer (8 x 10 cm)	Sigma, Deisenhofen
Elektrophoresegelkammer (16 x 18 cm)	Hoefer, San Fransisco/USA
Heraeus Sepatech Megafuge 1.0	Heraeus Christ, Osterode
Horizontalgelkammer	MBT-Brand, Heidelberg
Mischgerät REAX2	Heidolph, Kelheim
Netzgerät EPS200	Pharmacia Biotech, Freiburg
Peltier Thermal Cyclers PTC 200	Biozyme, Hess. Oldendorf
<i>Sammy-Dry</i> Blotkammer	Schleicher & Schuell, Dassel
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Heraeus Instruments, Stuttgart
Sonifier B-12	Branson Sonic Power Company Danbury/USA
Sorvall Ultrazentrifuge OTD 50 B	DuPont Instruments, Bad Nauheim
Tankblotkammer (B2157; 14 x 13 x 16 cm)	Sigma, Deisenhofen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Beckman Optima™ (Rotor TLA 45)	Beckman Instruments, München
UV-Stratalinker™ 1800	Stratagene, Heidelberg
Videodokumentationssystem CF8/1 DX	Kappa Meßtechnik, Gleichen

5.13 Software

GraphPad Prism® Version 2.01, 32 bit version for Windows95, GraphPad Software, San Diego/USA

Micrografx Designer 7.0, Micrografx Inc., München

Mircografx Picture Publisher 7, Micrografx Inc., München

5.14 Accession numbers

Gen	GenBank(Gi) Nomenklatur
<i>rhoA</i>	407696
<i>rhoC</i>	407698
<i>ret</i>	14745698
<i>gfα1</i>	1599926
<i>gfα2</i>	4503982
<i>gdnf</i>	14723800

6 Methoden

6.1 Mikrobiologische Methoden

6.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Eine Einzelkultur oder 50 μl einer Gefrierkultur des Bakterienstammes DH5 α wurden in 3 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 220 Upm (Standardbedingungen) inkubiert. Am Tag darauf wurden 100 ml LB-Medium mit 500 μl der über-Nacht-Kultur angeimpft und bei Standardbedingungen bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,4$ inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 2800 x g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 ml eiskalter 100 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für 1 Std. auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden ein weiteres Mal bei 2800 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskalter 100 mM CaCl_2 -Lösung mit 30 % (V/V) Glycerin resuspendiert, in 500 μl Aliquots portioniert und nach Vorfrieren in einem Ethanol/Trockeneis-Bad bei -80 °C gelagert. Die Qualität der kompetenten Bakterien wurde durch Transformation von 50 ng Plasmid-DNA überprüft.

6.1.2 Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Lage sind, unter definierten Bedingungen zirkuläre DNA aufzunehmen. Für eine Transformation wurden 200 μl kompetente DH5 α *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 50 ng Vektor-DNA oder 10 μl eines Ligationsansatzes und 100 μl TCM-Puffer (4 °C) versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock bei 42 °C für 3 min bewirkte die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien. Die Bakterien wurden für 1 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 700 μl LB-Medium (RT) bei 220 Upm für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Ein Aliquot dieser Bakterienkulturen wurde mit einem Drygalsky-Spatel, je nach Resistenz des verwendeten Plasmides, auf LP^{Amp^+} - oder $\text{LB}^{\text{Kana}^+}$ -Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

TCM-Puffer: 10 mM Tris/HCl; 10 mM CaCl_2 ; 10 mM MgCl_2 ; pH 7,5

Bei Transformationen von Ligationsansätzen mit dem pCR[®]2.1-Vektor wurden kommerziell bezogene kompetente TOP10F' *E. coli*-Zellen verwendet. Die Transformationen erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

6.1.3 Selektion transformierter Bakterien

Die Selektion der Bakterien mit internalisierter Plasmid-DNA erfolgte zum einen durch Verwendung von antibiotikahaltigen LB-Agarplatten. Zum anderen konnte bei der Transformation bestimmter Vektoren (pBluescript[®] KS(+), pUC19, pCR[®]2.1) durch Verwendung der Substanzen X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid) und IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) eine Blauweißselektion vorgenommen werden. Alle weißen Klone enthielten die rekombinante DNA innerhalb ihrer multiplen Klonierungsstelle und konnten damit keine funktionsfähige β -Galaktosidase mehr herstellen, welche das Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff umsetzt. Für eine 10 cm Agarplatte wurde ein Gemisch aus 100 μ l LB-Medium, 50 μ l einer 2 %igen X-Gal-Lösung in DMF (N,N-Dimethylformamid) und 10 μ l 100 mM IPTG eingesetzt.

6.1.4 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

6.1.4.1 Expression von GST-RhoA und GST-RhoC in DH5 α

Einzelkolonien der Bakterienstämme DH5 α /pGEX-2T/RhoA(G14V/F25N), DH5 α /pGEX-2T/RhoA(T19N/F25N) sowie DH5 α /pGEX-2TK/RhoC wurden mit einem sterilen Zahnstocher von LB^{Amp⁺}-Platten abgenommen und in Polypropylenröhrchen mit jeweils 3 ml LB^{Amp⁺}-Medium überführt. Diese Vorkulturen wurden über Nacht bei 220 Upm und 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die über-Nacht-Kulturen in 50 ml LB^{Amp⁺}-Medium überführt und bis zu einer OD_{600nm} = 0,7 inkubiert. Die Induktion der Expression der GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteine erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach Inkubation bei 220 Upm für 3 Std. bei 37 °C wurden die Bakterien bei 2800 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Lysispuffer resuspendiert. Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte mittels Ultraschallbehandlung bei 50 Watt dreimal für 30 sec. Zwischen den einzelnen Sonizierintervallen wurden die Zellen für 1 min auf Eis abgekühlt. Um die Bakterienzellwände auch biochemisch aufzuschließen, wurden die Bakterien zusätzlich mit 100 mg/ml Lysozym bei 4 °C für 30 min auf einem Mischgerät inkubiert. Die Auftrennung in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion erfolgte

durch Zentrifugation des Bakterienlysates bei 10000 x g für 30 min bei 4 °C. Das Pellet wurde in 0,5 ml Lysispuffer resuspendiert und von beiden Fraktionen die Proteinkonzentration mittels BCA-Methode bestimmt. Die Verteilung der GST-Fusionsproteine in der löslichen und partikulären Fraktion wurde mittels SDS-PAGE untersucht.

Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 0,1 mg/ml Lysozym

6.1.4.2 Expression von GST-PAK-CD in *E.coli*-Bakterien

(modifiziert nach Sander *et al.*, 1998; Ren und Schwartz, 2000)

GST-PAK-CD ist ein Fusionsprotein aus der Glutathion-S-Transferase (GST), und der Rac-GTP-Bindungsdomäne, der sog. CRIB-Domäne (CD; Aminosäuren 56-272) des Rac-Effektorproteins PAK1B (PAK-CD). Zur Expression des GST-PAK-CD-Fusionsproteins wurden 50 ml einer BL21(DE3)/pGEX-2TK/PAK-CD Kultur in 400 ml LB^{Amp⁺}-Medium überführt und bei 220 Upm und 37 °C bis zu einer OD_{600nm} = 0,5 inkubiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und die Kultur bei 220 Upm für 2 Std. bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 4000 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml Lysispuffer (4 °C) resuspendiert. Die Zellen wurden durch 6-maliges Sonizieren bei 50 Watt für 30 sec aufgeschlossen und zwischen den einzelnen Sonizierintervallen jeweils für 1 min auf Eis abgekühlt. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde die Bakteriensuspension bei 10000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt und mit 300 µl Glutathion-Sepharose™ versetzt. Zur Bindung des GST-PAK-CD-Fusionsproteins an die Glutathion-Sepharose wurde der Ansatz für 1 Std. bei 4 °C auf einem Mischgerät durch über-Kopf-Rotation inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 1700 x g für 1 min bei 4 °C zentrifugiert und das Präzipitat dreimal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurde das an die Glutathion-Sepharose™ gekoppelte GST-PAK-CD in 4 ml Waschpuffer resuspendiert, mit 400 µl Glycerin versetzt und als Aliquots (200-400 µl) bei -80 °C gelagert.

Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 % (V/V) Triton X-100; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin

Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,5 % (V/V) Triton X-100; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin

6.1.4.3 Expression von GST und GST-RBD in *E. coli*

(modifiziert nach de Rooij und Bos, 1997)

Je 50 ml BL21(DE3)/pGEX-2TK und BL21(DE3)/pGEX-2TK/RBD Kulturen wurden in 400 ml LB^{Amp⁺}-Medium überführt und bei 220 Upm und 37 °C bis zu einer OD_{600nm} = 0,6 inkubiert. Die Induktion der Expression von GST und GST-RBD erfolgte durch Zugabe von 0,1 mM IPTG und weiterer Inkubation der Bakterienkulturen bei 220 Upm für 2 Std. bei 37 °C. Nach Zentrifugation der Kulturen bei 4000 x g für 10 min bei 4 °C, wurden die Bakterienpellets in je 25 ml Lysispuffer resuspendiert. Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte durch 6-maliges Sonizieren bei 50 Watt für je 1 min. Zwischen den einzelnen Sonizierintervallen wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde zu den Bakterienlysaten Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1 % (V/V) zugegeben und die Suspension 10 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Die Lysate wurden zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile bei 12000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde mit 10 % (V/V) Glycerin versetzt, und die Aliquots (400 µl) bei -80 °C aufbewahrt.

Lysispuffer (1 x PBS): 136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄; 1,5 mM CaCl₂ x 2 H₂O; 0,5 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 1 µM Pepstatin A; 0,5 mM DTT; 0,1 µM Aprotinin; 1 µM Leupeptin; pH 7,4

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Gewinnung von bis zu 40 µg Plasmid-DNA wurden 1-8 ml *E. coli*-Bakteriensuspension nach Angaben des Herstellers mit dem NucleoSpin[®] System (Machery & Nagel, Düren) aufbereitet. Die Gewinnung von bis zu 100 µg Plasmid-DNA aus 10-100 ml Bakterienkulturen erfolgte mit dem Nucleobond[®] AX 100 System. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte über Nacht bei 220 Upm bei 37 °C in LP^{Amp⁺}- oder LB^{Kana⁺}-Medium. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

6.2.2 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Dabei entspricht eine Einheit bei einer optischen Dichte von 260 nm ($OD_{260nm} = 1$) einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA.

$$\text{DNA-Konzentration} = \frac{OD_{260nm} \times 50 \mu\text{g} \times \text{VF}}{1 \text{ ml}} \quad (\text{VF: Verdünnungsfaktor})$$

Eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure konnte anhand des Verhältnisses der Extinktionswerte von 260 nm zu 280 nm gemacht werden. Werte zwischen 1,8 und 2,0 entsprechen hierbei einem hohen Reinheitsgrad.

6.2.3 Fällung von Nukleinsäure

Zur Fällung der DNA wurde die DNA-Lösung auf mindestens 100 μl mit ddH₂O aufgefüllt. Nach Zugabe des 5fachen Volumens 99,8 %igen (V/V) Ethanol (-20 °C) und 10 μl 3 M Natrium-Acetat (pH 7,0 bzw. pH 4,6 bei DNA für Sequenzierung) wurde die DNA entweder über Nacht bei -20 °C oder für 1 Std. bei -80 °C gefällt. Anschließend wurde die DNA bei 15000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 70 %igem (V/V) Ethanol (-20 °C) gewaschen. Das DNA-Pellet wurde im Vakuumkonzentrator getrocknet, die DNA in 15-50 μl ddH₂O resuspendiert und die Konzentration spektralphotometrisch ermittelt.

6.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Verunreinigungen, insbesondere von Proteinen, wurde die DNA einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Dazu wurde die wäßrige DNA-Lösung mit ddH₂O auf mindestens 200 μl aufgefüllt und mit einem Volumen (200 μl) eines Gemisches aus 25 Teilen mit TE-Puffer gesättigten Phenols (100 μl), 24 Teilen Chloroform (96 μl) und einem Teil Isoamylalkohol (4 μl) versetzt. Nach kräftigem Durchmischen erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 15000 x g für 5 min bei RT. Der obere, DNA-haltige, wäßrige Überstand wurde abgenommen, mit einem Volumen eines Gemisches aus 24 Teilen Chloroform (stabilisiert mit 0,75 %igem Ethanol) und einem Teil Isoamylalkohol ausgeschüttelt und bei 15000 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Die Reinigung der DNA

erfolgte durch Fällung mit dem 5fachen Volumen 99,8 %igen (V/V) Ethanols (-20 °C) und 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetats (pH 7,0 bzw. pH 4,6 bei DNA für Sequenzierung) für 1 Std. bei -80 °C. Nach Trocknen des DNA-Pellets im Vakuumkonzentrator wurde die DNA in ddH₂O gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA

6.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der negativ geladenen DNA-Fragmente erfolgte entsprechend ihrem Molekulargewicht in einer horizontalen Agarosegelapparatur. Die Agarosekonzentration der Gele wurde in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente gewählt.

Agarose-Konzentration in % (M/V)	Trennbereich linearer DNA (kb)
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

(nach Sambrook *et al.*, 1989)

Die Agarose wurde in 1 x TAE-Elektrophoresepuffer aufgekocht und in einen Gelschlitten (8,5 cm x 7,5 cm) mit einem 8- oder 12-Taschen-Kamm gegossen. Die DNA wurde im Verhältnis 6:1 (V/V) mit DNA-Probenpuffer versetzt, in die Taschen des erstarrten Gels pipettiert und bei 100 V für 30-60 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarosegel für 5 min bei RT in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 mg/ml in 1 x TAE) inkubiert und die DNA-Banden mittels UV-Beleuchtung bei $\lambda = 312$ nm auf einem Transilluminator (Bachofer) visualisiert.

1 x TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 % (V/V) Essigsäure; 1 mM EDTA

6 x DNA-Probenpuffer: 30 % (V/V) Glycerin; 0,25 % (M/V) Bromphenolblau;
0,25 % (M/V) Xylene Cyanol FF

6.2.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Eine andere Methode bestand darin, die ausgeschnittenen Gelstücke durch silanisierte Glaswolle (Serva Bioproducts, Heidelberg) in 0,5 ml Eppendorf-Gefäße bei 4000 x g für 10 min bei RT zu zentrifugieren und die DNA im Durchfluss anschließend mit dem 5fachen Volumen 99,8 %igen Ethanol (-20 °C) und 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetats (pH 7,0) über Nacht bei -80 °C zu fällen.

6.2.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen erkennen und durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen spalten. Je nach Art der Erkennungssequenz und der Spaltreaktion unterscheidet man drei verschiedene Enzymtypen. Hier wurden Typ II-Restriktionsenzyme verwendet, bei denen Bindungsstelle und Schnittstelle identisch sind und deren oft palindromische Erkennungssequenzen mit 4-6 Basenpaaren relativ kurz sind. Durch die Spaltung der DNA entstehen je nach Restriktionsenzym 3'-überstehende, 5'-überstehende oder glatte DNA-Enden. Die Hydrolyse durch Typ II-Restriktionsenzyme ist temperaturabhängig und abhängig von Mg^{2+} -Ionen. Die konkreten Reaktionsbedingungen richteten sich nach den Angaben der Hersteller (MBI Fermentas, St. Leon-Rot; AGS, Heidelberg)

Standard-Ansatz: 0,5 µg DNA
 0,5 µl Restriktionsenzym (5-10 U/µl)
 1 µl 10 x Puffer
 auf 10 µl mit ddH₂O auffüllen

Der Spaltansatz wurde für mindestens 1 Std. bei der für das jeweilige Restriktionsenzym erforderlichen Temperatur inkubiert, die DNA anschließend elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und mittels UV-Licht auf dem Transilluminator visualisiert.

6.2.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Vor der Ligation linearisierter Vektor-DNA mit DNA-Fragmenten, wurde die Vektor-DNA dephosphoryliert, um eine Rezirkularisierung zu verhindern. Die Entfernung der

Phosphatreste am 5'-Ende erfolgte mit einer aus Kälberdarm isolierten Alkalischen Phosphatase (CIP: *calf intestine phosphatase*).

CIP-Ansatz: 3-5 µg linearisierte Vektor-DNA

1 µl Alkalische Phosphatase (1U/µl; Roche Diagnostics, Mannheim)

10 µl 10 x Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim)

auf 100 µl mit ddH₂O auffüllen

Nach Inkubation des CIP-Ansatzes für 1 Std. bei 37 °C wurde die Alkalische Phosphatase für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde die DNA mit dem 5fachen Volumen 99,8 %igen Ethanol (-20 °C) und 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetats (pH 7,0) versetzt und über Nacht bei -80 °C gefällt. Nach Trocknen des DNA-Pellets in einem Vakuumkonzentrator wurde es in 20 µl ddH₂O resuspendiert.

6.2.9 Klenow-Reaktion

Das Auffüllen von 5'-überhängenden Enden doppelsträngiger DNA zu glatten Enden erfolgte mit dem großen Fragment der *E. coli*-DNA-Polymerase I. Das Klenow-Fragment ist ein matrizenabhängiges Enzym, das in Gegenwart von dNTPs eine Polymeraseaktivität in 5'-3'-Richtung ausübt. Nach der Reaktion war die Ligation von DNA-Fragmenten möglich, die durch Spaltung mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen inkompatible Ende erhalten hatten.

6.2.9.1 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden doppelsträngiger DNA

Klenow-Reaktionsansatz: 19,5 µl DNA (3-5 µg) gelöst in ddH₂O

1 µl Klenow-Fragment (10 U/µl)*

2,5 µl 10 x Puffer*

2 µl 10 mM dNTP-Mix*

10 x Klenow-Puffer: 500 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM MgCl₂; 10 mM DTT

dNTP-Mix: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP

* von MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Der Ansatz wurde für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch

Zugabe von 2 μl 250 mM EDTA (pH 8,0) gestoppt und das Klenow-Fragment für 10 min bei 75 °C hitzeinaktiviert. Die DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel extrahiert.

6.2.9.2 Auffüllen von DNA-Fragmenten aus einer PCR

Klenow-Reaktionsansatz: 50 μl PCR-Ansatz

1 μl Klenow-Fragment (10 U/ μl)*

2 μl 100 mM MgCl_2 *

0,5 μl 10 mM dNTP-Mix*

* von MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Nach 1 Std. Inkubation bei RT wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel extrahiert.

6.2.10 Ligation

Die Ligationsreaktion von Vektor-DNA und DNA-Fragmenten (*Insert-DNA*) erfolgte mit einer T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim), welche beide DNA-Komponenten mittels Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft.

Ligationsansatz: 1 μl *Insert-DNA* (0,1-0,5 μg)

1 μl Vektor-DNA (20-50 ng)

1 μl T4-DNA-Ligase (1 U/ μl ; New England Biolabs, Beverly/USA)

1 μl 10 x Puffer (New England Biolabs, Beverly/USA)

auf 10 μl mit ddH₂O auffüllen

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte über Nacht bei 15 °C.

Alternativ wurde das Ready-to-go™ System (Amersham Pharmacia, Freiburg) verwendet. Die Standardreagenzien des Ligationsansatzes liegen hier in lyophilisierter Form vor und wurden durch 20 ng Vektor-DNA und 100 ng DNA-Fragment ergänzt. Der Ligationsansatz wurde mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20 μl aufgefüllt und für 45 min bei 15 °C inkubiert.

Für die Ligationenreaktion von PCR-Produkten mit dem pCR[®]2.1-Vektor (Invitrogen, Leek/Holland) wurde der TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Leek/Holland) verwendet. Hierfür eigneten sich jedoch nur PCR-Produkte mit 3'-überhängenden Adenosin-Resten, wie sie von *Taq*-Polymerasen gebildet werden. PCR-Produkte, welche mit Polymerasen mit Exonuklease-Aktivität in 3'-5'-Richtung (*Pwo*, *Pfu*) amplifiziert worden waren, konnten dagegen nicht eingesetzt werden.

Formel zur Berechnung der für die Ligation erforderlichen PCR-Produkt Menge:

$$X \text{ ng PCR-Produkt} = \frac{(Y \text{ bp PCR-Produkt}) \times (50 \text{ ng pCR}^{\text{®}}2.1\text{-Vektor})}{3900 \text{ bp (Größe des pCR}^{\text{®}}2.1\text{-Vektor)}}$$

Ligationsansatz: Z μ l PCR-Produkt (X ng PCR-Produkt)
 1-2 μ l pCR[®]2.1 Vektor (25 ng/ μ l)
 1 μ l 10 x Puffer
 1 μ l T4-DNA-Ligase (4 *Weiss units*; Invitrogen, Leek/Holland)
 auf 10 μ l mit ddH₂O auffüllen

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte über Nacht bei 15 °C.

6.2.11 Isolierung von gesamt-RNA aus Zelllinien

Die Isolierung der gesamt-RNA aus Zelllinien erfolgte unter Verwendung des RNeasy Midi Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Da bei der RNA-Synthese eine große Kontaminationsgefahr durch RNasen besteht, wurden alle Arbeiten mit RNase-freiem, DEPC-behandeltem Wasser und RNase-freien Plastikmaterialien durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bei 260 nm unter Verwendung einer 1:50 Verdünnung bestimmt (s. 6.2.2).

6.2.12 cDNA-Synthese

Für die Synthese komplementärer einzelsträngiger cDNA wurde der SuperScript[™] cDNA-Synthese Kit (Life Technologies, Eggenstein) verwendet. Das Prinzip dieser Methode stützt sich auf die Tatsache, dass die mRNA von Eukaryonten in der Mehrzahl am 3'-Ende polyadenyliert ist und somit eine Hybridisierung mit Oligo(dT)-Nukleotiden möglich ist. Um eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde die RNA vor der cDNA-Synthese einer DNase I-Behandlung unterzogen.

DNase I Reaktionsansatz: 2 μl RNA (2 μg)
1 μl DNase I (*amplification grade*, 1 U/ μl)
1 μl 10 x Puffer
auf 10 μl mit ddH₂O auffüllen

Nach 2 Std. Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 μl 25 mM EDTA (pH 8,0) gestoppt und das Enzym durch Erhitzen für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Zur Vorbereitung der Reaktion wurden 1 μl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Nukleotide (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zum Ansatz gegeben und mit ddH₂O auf 15 μl Endvolumen aufgefüllt. Die cDNA-Synthese erfolgte im unten aufgeführten Reaktionsansatz, der vor Zugabe der Reversen Transkriptase für 5 min bei 42 °C präinkubiert wurde.

Reaktionsansatz: 15 μl Ansatz
2,5 μl 10 x Puffer
1 μl 10 mM dNTP-Mix
3 μl 25 mM MgCl₂
2,5 μl 100 mM DTT
+ 1 μl Reverse Transkriptase (200 U/ μl ; SuperScript II RT)

Nach 1 Std. Inkubation bei 42 °C wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 15 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde zur Degradation noch vorhandener RNA 1 μl RNase H (2 U/ μl ; Life Technologies, Eggenstein) dazugegeben und der Reaktionsansatz für 10 min bei 55 °C inkubiert. Die Qualität der cDNA wurde in einer PCR mit β -Aktin-Oligonukleotiden überprüft.

6.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zum einen für den Expressionsnachweis von Genen auf mRNA-Ebene eingesetzt, andererseits aber auch zur Amplifikation von Genen oder Genabschnitten (Ret, β -Aktin, RhoA, RhoC) sowie zur Veränderung von cDNA-Sequenzen. Als Beispiel für eine Standard-PCR-Reaktion sind im Folgenden die Reaktionsbedingungen für eine β -Aktin-PCR mit cDNA als Matrize aufgeführt.

PCR-Ansatz: 2 μl cDNA
5 μl 10 x PCR-Puffer (Sigma, Deisenhofen)
1 μl 10 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)
1 μl 10 μM Oligonukleotid-Mix (1:1 (V/V))

1 μl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/ μl ; Sigma, Deisenhofen)
auf 50 μl mit ddH₂O auffüllen

Zur Initiation der PCR wurde der PCR-Ansatz für 5 min bei 94 °C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der DNA-Doppelstränge zu garantieren. Anschließend wurden 30 Zyklen der folgenden Inkubationsphasen wiederholt:

1. Denaturierung der DNA-Doppelstränge für 30 sec bei 94 °C
2. Anheftung der Oligonukleotide (*annealing*) für 1 min bei 61 °C
3. Synthesephase (*extension*) für 1 min bei 72 °C

Auf den letzten Reaktionszyklus folgte eine einmalige Synthesephase von 10 min bei 72 °C, um alle unvollständig synthetisierten DNA-Stränge aufzufüllen. Anschließend wurde 1/10 des PCR-Ansatzes in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden nach Färbung mit Ethidiumbromid auf einem Transilluminator mit UV-Licht dargestellt.

In den folgenden Übersichtstabellen sind die jeweiligen PCR-Bedingungen aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCRs zusammengefasst. Die Sequenz und Lokalisation der verwendeten Oligonukleotide sind im Material-Teil unter 5.10 aufgeführt.

PCR-Übersicht: RhoA und RhoC

cDNA	Oligo-Nukleotide/ Fragment-Größe	1. Denaturierung	Denaturierung	<i>annealing</i>	<i>extension</i>	letzte <i>extension</i> -Phase	Zyklen
RhoC	5'(<i>Nde</i> I), 3'(<i>Bam</i> HI)/ 597 bp	5 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 60 °C	2 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35
RhoA	5'(<i>Nde</i> I), 3'(<i>Bam</i> HI)/ 596 bp	5 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	2 min/ 56 °C	2 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	30
RhoA (G14V/ F25N)	5'(<i>Nde</i> I), 3'(<i>Bam</i> HI)/ 596 bp	5 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	2 min/ 56 °C	2 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	30
RhoA (T19N/ F25N)	5'(<i>Nde</i> I), 3'(<i>Bam</i> HI)/ 596 bp	5 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	2 min/ 56 °C	2 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	30
RhoA	5'(<i>Pst</i> I-HA- <i>Nde</i> I), 3'(<i>Bam</i> HI)/ 624 bp	5 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 56 °C	2 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	30
RhoA	5'(<i>Pst</i> I-HA-	5 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 56 °C	2 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	30

(G14V/ F25N)	<i>NdeI</i> , 3'(<i>BamHI</i>)/ 624 bp	94 °C	94 °C	56 °C	72 °C	72 °C	
RhoA (T19N/ F25N)	5'(<i>PstI</i> -HA- <i>NdeI</i>), 3'(<i>BamHI</i>)/ 624 bp	5 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 56 °C	3 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	30

In den RhoC- und RhoA-PCRs wurde die gesamte kodierende Sequenz von jeweils 582 Basenpaaren amplifiziert und zusätzlich an den 5'- und 3'-Enden Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI*, *BamHI* und *PstI* generiert. Außerdem wurden die RhoA-cDNAs am 5'-Ende mit einer Erkennungssequenz für einen anti-HA (Hämagglutinin)-Antikörper versehen. Alle RhoC- und RhoA-PCRs wurden mit der *Pwo*-Polymerase (AGS, Heidelberg) durchgeführt.

PCR-Übersicht: Ret

cDNA	Oligo- Nukleotide/ Fragment- Größe	1. Denatu- rierung	Denatu- rierung	<i>annealing</i>	<i>extension</i>	Letzte <i>extension</i> - Phase	Zyklen
„Ret _{M255} 5'-Ende“	„5'- Ende _{M255} “, 3'-intern I/ 432 bp	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 58 °C	2 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35
Ret 3'-Ende	5'-intern I, 3'-original/ 579 bp	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 52 °C	3 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35
Ret 5'-intern	5'-intern II5A 3'-intern II5B/557 bp	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 52 °C	3 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35
Ret 3'-intern	5'-intern II3A 3'-intern II3B/622 bp	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 52 °C	3 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35
Ret- Mitte	5'-intern II5A 3'-intern II3B/1714bp	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 53 °C	3 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35
Ret _{M255} gesamt	5'-Ende _{M255} , 3'-original/ 2583 bp	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	110 sec/ 53 °C	4 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35
Ret _{M1} 5'-Ende	5'-Ende _{M1} 3'-intern/ 1194 bp	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 58 °C	3 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35
Ret9-	5'-intern I,	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 58 °C	3 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35

Isoform	3'-Ret9/ 448 bp	94 °C	94 °C	40 °C	72 °C	72 °C	
Ret9-Test	5'-intern I, 3'-Ret9-Test/ 720 bp	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 40 °C	3 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35
Ret43 Isoform	5'-intern I, 3'-Ret43/ 504 bp	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 40 °C	3 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35

Die Ret-PCRs wurden mit der *Taq*-Polymerase (Sigma, Deisenhofen) durchgeführt. Nur für die PCRs „Ret_{M1} 5'-Ende“, „Ret_{M255} gesamt“ und „Ret Mitte“ (5'-internII5A/3'-internII3B) wurde die KlenTaq-Polymerase (Clontech, Palo Alto/USA) eingesetzt.

PCR-Übersicht: GFR α 1 und GFR α 2

cDNA	Oligo-Nukleotide/ Fragment-Größe	1. Denaturierung	Denaturierung	<i>annealing</i>	<i>extension</i>	Letzte Extension-Phase	Zyklen
GFR α 1 Mitte	5'-intern, 3'-intern/ 605 bp	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 61 °C	3 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35
GFR α 2 Mitte	5'-intern, 3'-intern/ 575 bp	4 min/ 94 °C	1 min/ 94 °C	1 min/ 61 °C	3 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35

PCR-Übersicht: GDNF

cDNA	Oligo-Nukleotide/ Fragment-Größe	1. Denaturierung	Denaturierung	<i>annealing</i>	<i>extension</i>	Letzte extension	Zyklen
GDNF-Mitte	5'-intern, 3'-intern/ 217 bp	4 min/ 94 °C	0,5 min/ 94 °C	0,75 min/ 55 °C	1 min/ 72 °C	10 min/ 72 °C	35

Alle GFR α 1-, GFR α 2- und GDNF-PCRs wurden mit der *Taq*-Polymerase (Sigma, Deisenhofen) durchgeführt.

6.2.14 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Frau Susanne Gierschik mit dem ABI PRISM™ System (310 *Genetic Analyzer*) durchgeführt.

6.2.15 Klonierungen der kodierenden DNA-Sequenzen von RhoA und RhoC in verschiedene Vektorsysteme

Übersicht zu RhoA-, RhoA(G14V/F25N)- und RhoA(T19N/F25N)-Klonierungen

DNA-Sequenz	Kloniert in Vektor System	Verwendete Restriktionsenzyme	Anmerkung zur <i>rho</i> -DNA-Sequenz
RhoA:	pMT2 SM	Ausgangsvektor	
	pUC19	<i>SalI/NotI</i>	
	pcDNA3.1(+)	<i>HindIII/EcoRI</i>	
	pEGFP-C2	<i>HindIII/EcoRI</i>	
RhoA(<i>NdeI/BamHI</i>):	pKS(+)	<i>blunt end</i>	PCR-Produkt
RhoA(HA-Epitop-tag+ <i>NdeI/PstI</i>):	pKS(+)	<i>blunt end</i>	PCR-Produkt
	pEGFP-C3	<i>NdeI/PstI</i>	
RhoA(G14V/F25N):	pGEX-2T	Ausgangsvektor	
	pcDNA3.1(+)	<i>BamHI/EcoRI</i>	
	pEGFP-C3	<i>HindIII/EcoRI</i>	
RhoA(G14V/F25N) (<i>NdeI/BamHI</i>)	pKS(+)	<i>blunt end</i>	PCR-Produkt
RhoA(G14V/F25N) (HA-Epitop-tag+ <i>NdeI/PstI</i>)	pKS(+)	<i>blunt end</i>	PCR-Produkt
	pEGFP-C3	<i>NdeI/PstI</i>	
RhoA(T19N/F25N):	pGEX-2T	Ausgangsvektor	
	pcDNA3.1(+)	<i>BamHI/EcoRI</i>	
	pEGFP-C3	<i>HindIII/EcoRI</i>	
RhoA(T19N/F25N) (<i>NdeI/BamHI</i>)	pKS(+)	<i>blunt end</i>	PCR-Produkt
RhoA(T19N/F25N) (HA-Epitop-tag+ <i>NdeI/PstI</i>)	pKS(+)	<i>blunt end</i>	PCR-Produkt
	pEGFP-C3	<i>NdeI/PstI</i>	

Die zusätzliche Mutation in Codon 25 (F25N) in beiden RhoA-Mutanten sollte dem Protein nach Expression in den Zellen eine größere Stabilität verleihen.

Übersicht zu RhoC-Klonierungen

DNA-Sequenz	Kloniert in Vektor System	Verwendete Restriktionsenzyme	Anmerkung zur <i>rho</i> -cDNA-Sequenz
RhoC	pKS(+)	<i>blunt end</i>	PCR-Produkt
	pcDNA3.1(+)	<i>EcoRI/NotI</i>	PCR-Produkt
	pEGFP-C1	<i>EcoRI/BamHI</i>	PCR-Produkt
	pGEX-2TK	<i>EcoRI/SmaI</i>	PCR-Produkt
RhoC(<i>NdeI/BamHI</i>)	pKS(HA)(+)	<i>NdeI/BamHI</i>	PCR-Produkt

6.2.16 Klonierung der kodierenden Ret51-DNA-Sequenz aus PANC-1-Zellen in den pEGFP-N1-Vektor.

Zur Klonierung der vollständigen kodierenden Ret51-DNA-Sequenz aus PANC-1-Zellen in den pEGFP-N1-Vektor wurden zunächst über RT-PCR zwei überlappende RT-PCR-Fragmente generiert. Die Klonierung des 5'-Fragmentes (1194 bp) erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *KpnI*, und des 3'-Fragmentes (2583 bp) über *KpnI* und *HpaI* bzw. eine *SmaI*-Schnittstelle im pEGFP-N1-Vektor. Da die *HpaI*-Erkennungssequenz als interne Schnittstelle im Ret 3'-Fragment enthalten ist und das Stop-Kodon beinhaltet, wurde durch Spaltung mit *HpaI* das Stop-Kodon deletiert. Somit konnte das Ret-Protein als Ret-EGFP-Fusionsprotein exprimiert werden. Um die beiden Ret-Sequenzen über die interne *single cut*-Schnittstelle *KpnI* im pEGFP-N1-Vektor zur Ret51-Sequenz zusammenzufügen, wurde das Ret 5'-Fragment über *HindIII* und *KpnI* vom pEGFP-N1-Vektor in das pEGFP-N1/Ret3'-Plasmid kloniert. Im folgenden Schema (Abbildung 4) sind die einzelnen Schritte zur Klonierung der vollständigen kodierenden Ret51-DNA-Sequenz aus PANC-1-Zellen in den pEGFP-N1-Vektor detailliert aufgeführt.

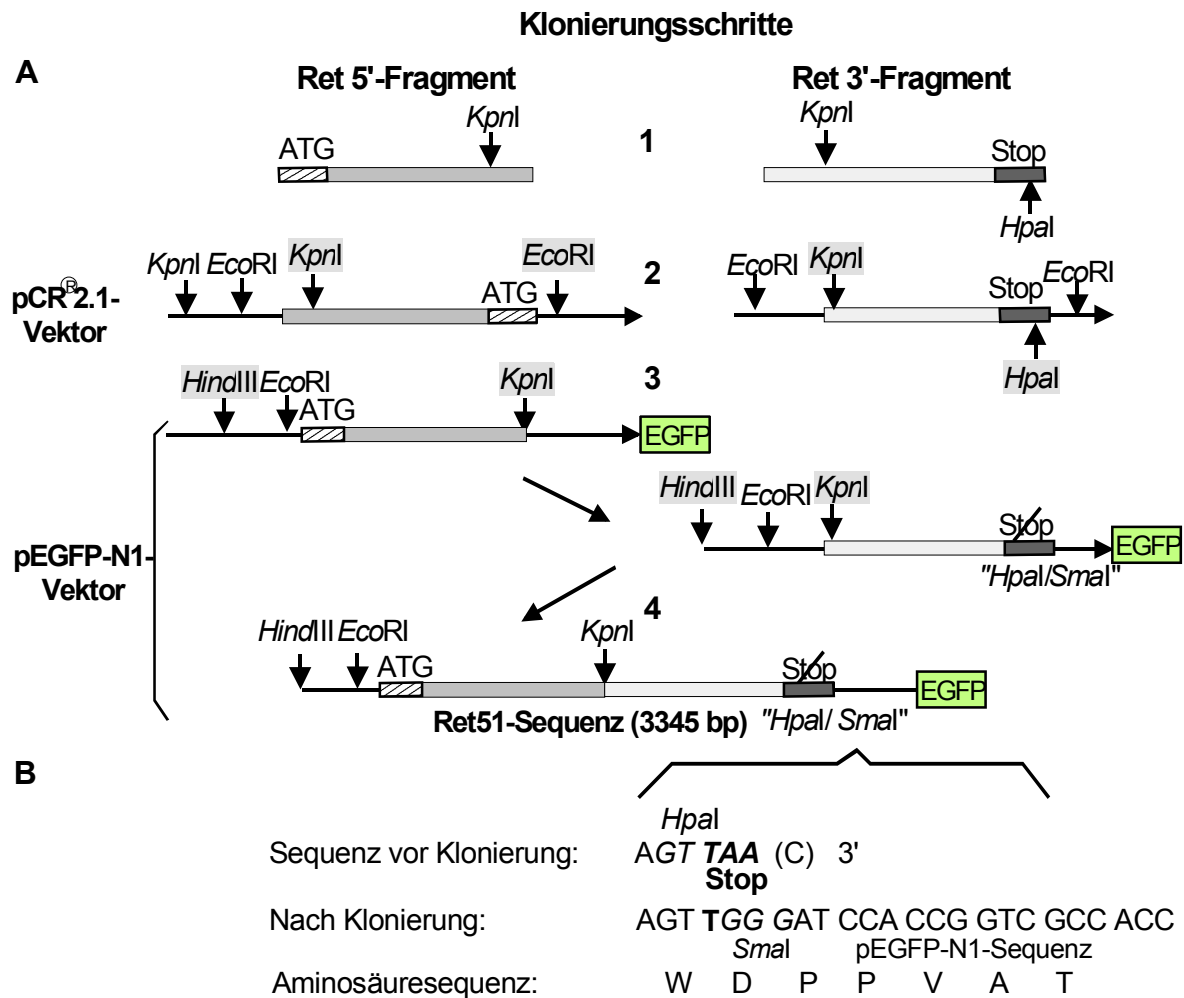


Abb. 4: Schematische Darstellung der Ret51-Klonierung. A, Die Ret RT-PCR-Fragmente wurden in verschiedenen Klonierungsschritten erst einzeln (2, 3), dann als vollständige Ret51-DNA-Sequenz (4) über die interne *single cut*-Schnittstelle *KpnI* in den pEGFP-N1-Vektor kloniert. B, Die Klonierung des Ret 3'-Fragmentes in den pEGFP-N1-Vektor erfolgte über eine interne *HpaI*-Sequenz (GTTAAC) im Ret 3'-Fragment und die *SmaI*-Schnittstelle (GGGCCC) im pEGFP-N1-Vektor. Hierdurch wurde gleichzeitig das Stop-Kodon (TAA→TGG) deletiert. Die Aminosäuresequenz demonstriert, dass der Leserahmen zwischen der Ret- und der EGFP-Sequenz eingehalten und kein neues Stop-Kodon generiert wurde.

6.3 Zellbiologische Methoden

6.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Die Kultivierung eukaryontischer Zelllinien erfolgte in DMEM-Medium (Life Technologies, Eggenstein) mit 1 % Glutamin (Stammlösung: 200 mM) (Life Technologies, Eggenstein), 1 % Penicillin/Streptomycin (10 x, 10000 U/10 mg/ml) und 10 % (V/V) DCS (NIH/3T3) oder 10 % (V/V) FCS (übrige Zelllinien) bei von 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator. Das Wachstumsmedium der Zellen wurden alle 2-3 Tage erneuert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90-100 % erreicht hatten, wurden sie in einer

geringeren Zelldichte in neuen Kulturgefäßen ausgesät. Die Kultivierung von PANC-1-Zellen, welche EGFP-Fusionsproteine stabil exprimieren, erfolgte unter den gleichen Bedingungen, jedoch wurde dem Wachstumsmedium 1,5 mg/ml G418-Sulfat zugesetzt.

6.3.2 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

Das Einfrieren eukaryontischer Zellen, zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff, erfolgte in Wachstumsmedium mit 20 % (V/V) FCS, und 5 % (V/V) DMSO. Beim Wiederauftauen der Zellen musste das DMSO, aufgrund seiner zytotoxischen Wirkung, schnell entfernt werden. Dazu wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in einem Polyethylenröhrchen mit 9 ml Wachstumsmedium verdünnt und bei 173 x g für 2 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 3 ml Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellen in Zellkulturschalen (Ø 60 oder 100 mm) ausgesät.

6.3.3 Etablierung und Kultivierung von Primärkulturen

Primäre Dissoziationszellkulturen wurden aus den Mesencephali von Mausembryonen des Embryonaltages 15 (E15) angelegt. Dazu wurden 6-10 Mausembryonen einer CO₂-Inhalation unterzogen, die Gehirne mit sterilem Besteck entnommen und auf Eis in eine Schale mit 1 x CMF-PBS gelegt. Die Hirnhäute, wurden vollständig entfernt, die Mesencephali herauspräpariert und auf Eis in modifiziertes N2-Medium (nach Bottenstein und Sato, 1979) gegeben. Die enzymatische Dissoziation der Mittelhirn-Gewebestücke erfolgte durch Inkubation in 1 x CMF-PBS mit 0,1 % (V/V) Trypsin (Life Technologies, Eggenstein) und 0,02 % EDTA für 25 min bei RT. Zur mechanischen Zerkleinerung wurden die Mittelhirn-Gewebestücke in 10 ml Ca²⁺- und Mg²⁺-freier *Hank's buffered saline solution* (HBSS; Life Technologies, Eggenstein) mit 10 % (V/V) FCS transferriert und durch 15-mal Auf- und Abpipettieren, erst mit einer 10 ml, dann mit einer 5 ml Pipette, dissoziiert. Nach Zugabe weiterer 10 ml HBSS mit 10 % (V/V) FCS wurden die stark zerkleinerten Gewebestücke mittels Filtration durch ein steriles Nylon-Netz in Einzelzellen dissoziiert. Schließlich wurden die Zellen bei 400 x g für 5 min bei RT sedimentiert und das Zellpellet in 4 ml *Minimal essential medium* (MEM; Life Technologies, Eggenstein) mit 20 % (V/V) FCS resuspendiert. Die Zellzahl der lebenden Zellen wurde in einer Neubauer Zählkammer, unter Zusatz von Trypan-Blau (1:10 Verdünnung) ermittelt, und es wurden 1,5 x 10⁵ Zellen in 250 µl MEM-Medium mit 20 % (V/V) FCS je Vertiefung einer 48-Loch-Platte (Costar, Corning/USA) ausgesät. Die Platte war zuvor mit poly-D-Ornithin (0,1 mg/ml in ddH₂O) beschichtet

worden, um die Anzahl positiver Ladungen zu erhöhen und die Adhäsion der Zellen zu fördern. Nach 12-16 Std. Inkubation der Zellen bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator, wurde das Medium abgesaugt und durch 250 µl modifiziertes N2-Medium je Vertiefung ersetzt. Zur Selektion und Kultivierung von glialen Primärkulturen wurde MEM-EARLE mit 10 % (V/V) HS oder 20% (V/V) FCS verwendet. Alle Medien für Primärkulturen wurden als Instant-Medien (Life Technologies, Eggenstein) bezogen und in 1 l ddH₂O (B. Braun, Melsungen) gelöst.

Trypsin-Lösung: 1 x CMF-PBS mit 0,1 % (M/V) Trypsin (0,1 g/l) und 0,02 % (M/V) EDTA (0,02 g/l) (Life Technologies, Eggenstein).

6.3.4 Aufbereitung von Zellkulturüberständen

Verschiedene Neuroblastoma- und gliale Zelllinien wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90 % in DMEM-Medium mit 10 % FCS bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit gezogen. Alle 48 Std. wurde der Zellkulturüberstand, mit den von den Zellen sezernierten Stoffwechselprodukten abgenommen und die Zelltrümmer bei 1000 x g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde das sog. konditionierte Medium sterilfiltriert (0,22 µm) und bei -20 °C gelagert.

Zur Herstellung von konditionierten Medien von neuronalen Primärkulturen wurden diese in modifiziertem N2-Medium bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit gezogen und der Zellkulturüberstand alle 48-72 Std. abgenommen. Die Aufbereitung des Zellkulturüberstandes erfolgte wie bei den Zelllinien.

6.3.5 Quantifizierung der Zellproliferation

6.3.5.1 Bestimmung der Zellzahl

Um den Einfluss einzelner Faktoren oder Zellkulturüberstände auf das Proliferationsverhalten von PANC-1-Zellen zu untersuchen, wurden 3 x 10⁵ Zellen je Vertiefung in 6-Loch-Platten ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht in DMEM-Medium mit 10 % (V/V) FCS bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit. Nach 12-16 Std. wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit 1 x CMF-PBS gewaschen und mit dem Zellkulturüberstand von B49-Zellen oder DMEM-Medium mit 10 ng/ml *β-nerve growth factor* (β-NGF), 10 ng/ml *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) oder 10 ng/ml *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) überschichtet. Als Kontrollen dienen DMEM-

Medium mit 0,1 % (V/V) oder 10 % (V/V) FCS. Alle 48-72 Std. wurde die Zellzahl einer Vertiefung mittels Neubauer Zählkammer ermittelt. Bei den übrigen PANC-1-Zellen wurde das Medium alle 48 Std. erneuert. Die Versuchsdauer betrug 10 Tage.

6.3.5.2 Bestimmung der DNA-Syntheserate

Die DNA-Syntheserate von PANC-1-Zellen wurde über die Aufnahme von [³H]-Methylthymidin ermittelt. Dazu wurden 5×10^4 PANC-1-Zellen je Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausgesät und in 0,5 ml DMEM-Medium mit 10 % (V/V) FCS bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 Std. wurde das Medium abgenommen, durch DMEM-Medium mit 0,1 % (V/V) FCS ersetzt und die Zellen für 36 Std. ausgehungert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 36 Std. mit den Zellkulturüberständen (s. 5.3.4) verschiedener neuronaler und glialer Zelllinien stimuliert. In den letzten 24 Std. wurde [³H]-Methylthymidin (0,5 µCi/ml) und 1 µM nicht-markiertes Thymidin zugegeben. Von den Zellen nicht aufgenommenes, säurelösliches [³H]-Methylthymidin wurde durch 30 min Waschen mit 5 % (M/V) Trichloracetat (4 °C) bei 4 °C entfernt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 99,8 % (V/V) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und mit 0,5 ml Elutionslösung je Vertiefung für 30 min bei RT geschüttelt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte nach Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (*Quicksafe A*; Zinsser Analytic, Berkshire/UK) in einem β -Counter (Packard, Dreieich).

Elutionslösung: 0,1 % (V/V) NaOH, 1% (M/V) SDS in ddH₂O

6.3.6 Analyse der Zellmigration

Um den Einfluß verschiedener neuronaler Faktoren sowie des Zellkulturüberstandes von neuronalen Primärkulturen auf das Migrationsverhalten von PANC-1-Zellen zu untersuchen wurden Zellmigrationsstudien durchgeführt. Als Faktoren wurden β -NGF, BDNF und GDNF verwendet. Die Versuche wurden in einem modifizierten *Boyden*-Kammer-System durchgeführt. Dazu wurden Zellkultureinsätzen mit einer porösen (8 µm Poren) PET (Polyethylen-Terephthalat)-Membran (Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg) in 12-Loch-Platten (Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg) eingesetzt. Für einen Migrationsversuch wurden 5×10^4 PANC-1-Zellen in 0,5 ml DMEM-Medium mit 10 % (V/V) FCS je Einsatz ausgesät. Die Kammer unter dem Einsatz enthielt 1,2 ml Wachstumsmedium. Nach Abheften der Zellen (2-3 Std.) wurden die Zellen zur Proliferations-Inhibition für 3 Std. mit

Mitomycin C (10 µg/ml) behandelt. Anschließend wurde das Medium in der unteren Kammer durch 1,2 ml DMEM-Medium mit 0,1 % (V/V) FCS, 10 ng/ml β-NGF, 10 ng/ml BDNF, 10 ng/ml GDNF oder Zellkulturüberstand ersetzt. Die PANC-1-Zellen in der oberen Kammer wurden mit 200 µl serumfreiem DMEM-Medium je Einsatz überschichtet. Bei Verwendung spezifischer Kinase-Inhibitoren (MEK1-Inhibitor PD98059 und PI3-Kinase-Inhibitor LY294002) wurden diese sowohl dem Medium der oberen, als auch der unteren Kammer hinzugefügt. Nach 40 Std. Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 1 x CMF-PBS gewaschen, für 15 min in Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (4 % (M/V) PFA in 1 x CMF-PBS) fixiert und für 15 min in Harris'Hämatoxylinlösung (Merck, Darmstadt) gefärbt. Die Zellen auf der Membran wurden entfernt und die Anzahl der gewanderten Zellen auf der Unterseite der Membran am Lichtmikroskop (200fache Vergrößerung) quantifiziert.

6.3.7 Kokultivierungsexperimente

In Kokultivierungsexperimenten wurde der unmittelbare Einfluß neuronaler oder glialer Zelllinien auf das Migrationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen untersucht. Alle Versuche wurden in einem modifizierten *Boyden*-Kammer-System durchgeführt. Von den Zelllinien SK-N-SH, B49 und NIH/3T3 (Maus-Fibroblasten) wurden 3×10^5 Zellen/ml je Vertiefung einer 12-Loch-Platte in DMEM-Medium mit 10 % (V/V) FCS ausgesät, und bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit für 72 Std. inkubiert. 4 Std. vor Ablauf der Inkubationszeit wurden 5×10^4 Pankreaskarzinomzellen (PANC-1) auf porösen (8 µm Poren) Zellkultureinsätzen in DMEM-Medium mit 10 % FCS ausgesät und bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Abheften der Zellen wurde das Medium auf den Pankreaskarzinomzellen durch DMEM-Medium mit 0,1 % FCS ersetzt und die Zellen für 48 Std. mit den Neuroblastoma-, Glioma- oder Fibroblasten-Zellen in den 12-Loch-Platten kokultiviert. Als Kontrolle diente ein Ansatz DMEM-Medium mit 10 % (V/V) FCS ohne Zellen. Abschließlich wurden die Pankreaskarzinomzellen zweimal mit 1 x CMF-PBS gewaschen, 15 min in 4 % (M/V) PFA in 1 x CMF-PBS fixiert und weitere 15 min in Harris'Hämatoxylinlösung gefärbt. Die Zellen auf der Membran wurden entfernt und die Anzahl der gewanderten Zellen auf der Unterseite der Membran am Lichtmikroskop (200fache Vergrößerung) quantifiziert.

6.3.8 Stabile Transfektion

PANC-1-Zellen wurden mit der DNA der Plasmide pEGFP-C3, pEGFP-C1/RhoC und pEGFP-C2/RhoA stabil transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde DMRIE-C[®] (Gibco BRL, Eggenstein) verwendet. Dieses Transfektionsreagenz enthält das Lipid 1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy-ethyl-ammoniumbromid sowie Cholesterin in wässriger Lösung. Das Lipid bildet mit der DNA einen Komplex, welcher sich in die Zellmembran einlagert, vermutlich durch Endozytose ins Zellinnere gelangt und von dort in den Zellkern transportiert wird (Felgner et. al. 1987; Felgner, 1996).

Für die Transfektion wurden 5×10^5 PANC-1-Zellen in einer 10 cm Kulturschale ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 10 % CO₂ im CO₂-Inkubator inkubiert. Je Transfektionsansatz wurden 40 µl DMRIE-C[®] Reagenz mit 500 µl DMEM-Medium (Ansatz 1) und 10 µg DNA in DMEM-Medium (Ansatz 2) gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Ansätze 1 und 2 wurden anschließend vorsichtig gemischt und weitere 15 min inkubiert. Die PANC-1-Zellen wurden zweimal mit CMF-PBS gewaschen und mit 4 ml DMEM-Medium überschichtet, der Transfektionsansatz (DMRIE-C[®] plus DNA) zugegeben und die Zellen für 6 Std. im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch DMEM-Medium mit 10 % FCS ersetzt. Nach 24 Std. wurden die PANC-1-Zellen in einem Verhältnis von 1:10 auf 10 cm-Schalen gesplittet und in DMEM-Medium mit 10 % FCS, welches zusätzlich 1,5 mg/ml G418 enthielt, kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Nach etwa 2-3 Wochen wurden mit Hilfe einer sterilen Gilson-Pipette Einzelklone gepickt, welche die grün fluoreszierenden Proteine EGFP, EGFP-RhoC und EGFP-RhoA exprimierten. Diese PANC-1-Zellklone wurden in 24-Loch-Kulturschalen weiter in G418-haltigem DMEM-Medium kultiviert. Die Herstellung von RIPA-Extrakten und anschließende Untersuchung der EGFP-/EGFP-RhoC/EGFP-RhoA-Expression im Immunoblot erlaubte die Selektion stabiler Zellklone.

6.4 Proteinbiochemische Methoden

6.4.1 Herstellung von RIPA-Extrakten

Um die Proteinexpression von Zellen im Immunoblot analysieren zu können, wurden sog. RIPA-Extrakte hergestellt. Dazu wurden die zu analysierenden Zellen in DMEM-Medium mit 10 % (V/V) FCS in Zellkulturschalen (10 cm) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90 %

bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im CO₂-Inkubator kultiviert. Für die Herstellung von RIPA-Extrakten wurden die Zellen zweimal mit 1 x CMF-PBS (4 °C) gewaschen, in 500 µl 1 x RIPA-Puffer (4 °C) aufgenommen und mit einem Zellschaber von den Schalen abgekratzt. Mit einer Tuberkulin-Spritze (1ml, Kanüle 18-gauge, 0,5 x 25 mm) wurden die Zellen zehnmal auf- und abgezogen und homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden bei 14000 x g für 10 min bei 4 °C sedimentiert. Der Proteingehalt im Überstand wurde mittels BCA-Methode (s. 6.4.4) bestimmt. Die RIPA-Extrakte wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

1 x RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,5 % (M/V) Natriumdeoxycholat; 0,1 % (M/V) SDS; 1 % (V/V) Triton X-100; 1 mM PMSF; 0,1 µM Aprotinin; 1 µM Leupeptin

6.4.2 Herstellung von Zelllysaten zur Bestimmung von Kinase-Aktivitäten

Zur Bestimmung von Kinase-Aktivitäten nach Behandlung von Zellen mit Faktoren wurden die zu analysierenden Zellen in DMEM-Medium mit 10 % (V/V) FCS bis zu einer Konfluenz von 90 % bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im CO₂-Inkubator inkubiert und für 24 Std. in serumfreiem DMEM-Medium ausgehungert. Nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Faktoren, wurden diese einmal mit 1 x CMF-PBS (4 °C) gewaschen und in 500 µl RIPA-Puffer mit Phosphatase-Inhibitoren aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und durch zehnmal auf-und abziehen mit einer Tuberkulin-Spritze (1ml, Kanüle 18-gauge, 0,5 x 25 mm) homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden bei 14000 x g für 10 min bei 4 °C sedimentiert und der Proteingehalt im Überstand mittels BCA-Methode (s. 6.4.4) bestimmt. Die RIPA-Extrakte wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

1 x RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,5 % (M/V) Natriumdeoxycholat; 0,1 % (M/V) SDS; 1 % (V/V) Triton X-100; 10 mM Na-Pyrophosphat; 25 mM β-Glyzerophosphat; 2 mM Na-Orthovanadat; 2,1 µg/ml Aprotinin; 1 µM Leupeptin

Für die Proteinbestimmung wurden 5-10 µl Zellysate mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die BCA-Lösungen A (*Protein Assay Reagent A*) und B (*Protein Assay Reagent B*; CuSO₄-Lösung) wurden im Verhältnis 50:1 (V/V) gemischt. Je 1 ml des BCA-Reagenz wurde auf die Proben der Konzentrationsreihe sowie der Zellysate gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Proben für 5 min bei RT abgekühlt und die Extinktion am Spektralphotometer bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels linearer Regression der Extinktionswerte berechnet.

6.4.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Entsprechend der Gelgröße wurden unterschiedliche vertikale Gelapparatusysteme verwendet: für große Gele (Glasplatten: 16 x 18 cm, Abstandshalter: 1,5 mm) ein System von Hoefer (San Fransisco/USA) und für kleine Gele (Glasplatten: 8 x 10 cm, Abstandshalter: 1 mm) ein System von Sigma (Deisenhofen). Die Auswahl der Acrylamidkonzentration der Gele erfolgte anhand der Größe der aufzutrennenden Proteine. Der folgenden Tabelle kann das Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel(e) entnommen werden. Alle Prozent-Angaben in der Tabelle sind (M/V)-Angaben.

Für je 2 Gele	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5 %	Sammelgel
30 % Acrylamid	2 ml	2,6 ml	3,25 ml	0,38 ml
2 % Bisacrylamid	0,8 ml	1 ml	1,2 ml	0,15 ml
3 M Tris/HCl, pH 8,8	1 ml	1 ml	1 ml	—
1 M Tris/HCl, pH 6,8	—	—	—	0,38 ml
10 % SDS	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml	0,03 ml
60 % Saccharose	—	—	—	0,75 ml
ddH ₂ O	4,1 ml	3,3 ml	2,45 ml	1,3 ml
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl	4 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	40 µl
Trennbereich	200-40 kDa	130-30 kDa	100-20 kDa	

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit ddH₂O-gesättigtem Isobutanol überschichtet, um einen Sauerstoff-Kontakt auszuschließen. Nach vollständiger Polymerisierung des Trenngels wurde das Isobutanol durch Waschen mit ddH₂O entfernt, das Trenngel mit dem Sammelgel

überschichtet, und in dieses ein Kamm mit 10 oder 14 Taschen eingesetzt. Die Proben wurden mit mindestens 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95 °C zur Denaturierung der Proteine gekocht und in die Geltaschen pipettiert. Durch das SDS im Probenpuffer wurden die Proteine mit einer negativen Ladung versehen und konnten bei 100 V entsprechend ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt werden. Eine Größenordnung der Proteine erfolgte mit Hilfe definierter Molekulargewichtsmarker (5.4). Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde ein 1 x Tris/Glycin-Puffer verwendet.

5 x SDS-Probenpuffer: 200 mM Tris/HCl, pH 8,8; 2 % (M/V) SDS; 5 mM EDTA;
 0,1 % (M/V) Bromphenolblau; 1 M Saccharose; 1 mM DTT

5 x Tris/Glycin-Puffer: 250 mM Tris/HCl, pH 8,5; 2 M Glycin; 0,5 % (M/V) SDS

6.4.6 Protein-Nachweis mittels *Coomassie-Blau-Färbung*

Die Proteinbanden im SDS-Polyacrylamidgel wurden mit *Coomassie Brilliant Blue R 250* reversibel gefärbt. Die Inkubation der Gele in der *Coomassie*-Färbelösung erfolgte entweder für 30 min bei 60 °C oder über Nacht bei RT. Zum Entfernen des nicht an Proteine gebundenen überschüssigen Farbstoffes wurden die Gele entweder für 30 min bei 60 °C oder über Nacht bei RT in Entfärbelösung inkubiert.

Färbelösung: 0,03 % (M/V) *Coomassie Brilliant Blue R 250*;
 25 % (V/V) Isopropanol; 10 % (V/V) Eisessig

Entfärbelösung: 12,5 % (V/V) Isopropanol; 10 % (V/V) Eisessig

6.4.7 Nachweis von Proteinen im Immunoblot

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden für einen Immunoblot auf eine Nitrozellulosemembran (Protran[®]; Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Dazu wurden Gel und Membran in Transferpuffer getränkt, luftblasenfrei aufeinander gelegt und zwischen je zwei Lagen Gel-Blotting-Papier (GB002; Schleicher & Schuell, Dassel) und zwei Schaumstoff-Schwämmen in der Mitte von zwei Plastikhalterungen in der Tankblot-Kammer vertikal befestigt. Der Proteintransfer in der Tankblot-Kammer (Sigma, Deisenhofen) erfolgte bei 80 V für 45 min. Dabei war das Gel der Kathode und die Membran der Anode zugewandt,

so dass die Proteine, aufgrund ihrer negativen Ladung, aus dem Gel auf die Membran transferiert wurden. Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Transfer mit Wasser gewaschen, die Proteinbanden mit Ponceau-S-Lösung (Sigma, Deisenhofen) unspezifisch und reversibel gefärbt und die Banden der Marker-Proteine eingezeichnet. Nach Entfärben der Nitrozellulosemembran in Wasser mit 1 M Tris/HCl (pH 9,5) wurden unspezifische Bindungsstellen für Antikörper durch Inkubation der Membranen in 1 x CMF-PBS mit 5 % (M/V) Magermilchpulver für 1 Std. bei RT blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe. Die verwendeten Antikörper-Verdünnungen sind den Übersichten (s. 5.11) zu entnehmen. Nicht gebundener primärer Antikörper wurde durch dreimal Waschen der Nitrozellulosemembran mit 1 x CMF-PBS mit 0,5 % (M/V) Magermilchpulver und 0,02 % Tween[®]20 (Sigma, Deisenhofen) entfernt und der Immunoblot anschließend für 1 Std. bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser war gegen den konstanten Anteil des primären Antikörpers gerichtet und entweder an Meerrettich-Peroxidase (HRP: *horse-radish peroxidase*) oder Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Membranen bei Verwendung eines Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörpers in einer ECL[™]-Lösung (Amersham Pharmacia, Freiburg) für 3 min bei RT inkubiert und die Proteine über die Schwärzung eines Röntgenfilms visualisiert. Bei Verwendung eines Alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörpers wurde die Nitrozellulosemembran erst in AP-Puffer gewaschen und anschließend in einer 100:1:1 (V/V/V)-Verdünnung von AP-Puffer mit BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat-Toluidinsalz) und NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) lichtgeschützt inkubiert. Hierdurch wurden die Proteinbanden direkt auf den Membranen dargestellt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit Wasser gewaschen und getrocknet.

1 x Transferpuffer:	25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 20 % (V/V) Methanol; 1,5 % (M/V) Glycin; 0,1 % (M/V) SDS
Alkalische Phosphatase-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 9,5; 50 mM MgCl ₂
ECL [™] -Lösung:	Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1 (V/V)

6.4.8 Bestimmung der ERK2-Aktivität

(Giehl et al., 2000)

Zur Bestimmung der Aktivität der MAP-Kinase (*mitogen-activated protein kinase*) ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase 2*) nach Behandlung von PANC-1-Zellen mit den Signalmolekülen GDNF oder EGF (*epidermal growth factor*), wurde eine *in vitro* Phosphorylierungsreaktion durchgeführt.

Immunpräzipitation der MAP-Kinase ERK2

PANC-1-Zellen wurden für 24 Std. in serumfreiem DMEM-Medium ausgehungert und anschließend für 10 min oder 15 min mit GDNF oder EGF inkubiert. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen vor der Behandlung für 15 min mit dem MEK1-Inhibitor PD98059 präinkubiert. Von den Zellen wurden RIPA-Lysate hergestellt (s. 6.4.1) und die Proteinkonzentrationen der Lysate mittels BCA-Methode (s. 6.4.4) ermittelt. Für die Immunpräzipitation von ERK2 wurden 7 µl anti-ERK2-Antikörper mit 30 µl Protein A-Agarose in 0,5 ml RIPA-Puffer mit Phosphatase-Inhibitoren inkubiert. Die Kopplung von Antikörper und Protein A-Agarose erfolgte durch Inkubation auf einem Mischgerät für 30 min bei RT. Der Ansatz wurde für 1 min bei 2700 x g bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die MAP-Kinase ERK2 wurde aus 1 mg Zelllysat in einem Endvolumen von 0,5 ml RIPA-Puffer immunpräzipitiert. Dazu wurde das Zelllysat mit dem an Protein A-Agarose gekoppelten anti-ERK2-Antikörper für 2 Std. bei 4 °C auf einem Mischgerät inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 2700 x g für 1 min bei 4 °C zentrifugiert, das Präzipitat zweimal mit RIPA-Puffer und zweimal mit Kinase-Puffer gewaschen und in 30 µl Kinase-Puffer aufgenommen. Je Ansatz wurden 10 µl zur Kontrolle der ERK2-Immunpräzipitation in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Immunoblot die eingesetzten ERK2-Mengen überprüft.

Kinase-Reaktion

Die Kinase-Reaktion wurde durch Zugabe von 5,2 µl Reaktionsmix (2 µM ATP; 2 µCi [γ - 32 P]ATP (5000 Ci/mmol); 30 µg MBP-Peptid) für 10 min bei 37 °C durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Auftropfen des Reaktionsgemisches auf p81-Phosphozellulose-Filter. Diese wurden getrocknet und mit 180 mM Ortho-Phosphorsäure dreimal unter Schütteln für 5 min, 30 min und 5 min gewaschen. Anschließend wurden die Filter kurz in Aceton gelegt, anschließend getrocknet und in Szintillationsröhrchen überführt.

Die Radioaktivität wurde als Maß für die ERK2-Aktivität im β -Counter (Packard, Dreieich) gemessen.

1 x RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,5 % (M/V) Natriumdeoxycholat; 0,1 % (M/V) SDS; 1 % (V/V) Triton X-100; 10 mM Na-Pyrophosphat; 25 mM β -Glyzerophosphat; 2 mM Na-Orthovanadat; 2,1 μ g/ml Aprotinin; 1 μ M Leupeptin

Kinase-Puffer: 15 mM Tris/HCl, pH 7,2; 15 mM MgCl₂; 1 mM DTT

MBP-Peptid: Aminosäuresequenz: APRTPGGRR
(10 mg/ml in 100 mM Tris/HCl, pH 7,4)

6.4.9 Bestimmung der JNK-Aktivität

(modifiziert nach Coso et al., 1995a, b; Chiariello et al., 1998)

Die Aktivität der JNK/SAPK (*c-Jun NH₂-terminal protein kinase/stress-activated protein kinase*)-Kinase wurde nach Behandlung ausgehungerner PANC-1-Zellen mit den Signalmolekülen GDNF oder EGF in einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion ermittelt. Dazu wurde die JNK-Kinase mit einem anti-JNK-Antikörper immunpräzipitiert, und in einer Kinase-Reaktion mit radioaktivem [γ -³²P]ATP und rekombinantem GST-c-Jun als Substrat die Aktivität der JNK-Kinase bestimmt.

Immunpräzipitation der Proteinkinase JNK/SAPK

Die Herstellung von Zelllysaten aus PANC-1-Zellen nach Behandlung mit Signalmolekülen (GDNF, EGF) erfolgte entsprechend der Lysat-Herstellung für die ERK2-Phosphorylierungsreaktion (6.4.8). Zur Immunpräzipitation der JNK-Kinase wurden 10 μ l anti-JNK-Antikörper mit 30 μ l Protein A-Agarose und 1 mg Zelllysate in 0,5 ml RIPA-Puffer mit Phosphatase-Inhibitoren auf einem Mischgerät für 2 Std. bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 2700 x g für 1 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat zweimal mit RIPA-Puffer und zweimal mit JNK-Kinase-Puffer gewaschen. Das Präzipitat wurde in 30 μ l JNK-Kinase-Puffer resuspendiert. Davon wurden 10 μ l je Ansatz zur Kontrolle der JNK-Immunpräzipitation in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die präzipitierte JNK-Menge im Immunoblot überprüft.

Kinase-Reaktion

Die Kinase-Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µg GST-c-Jun und 1 µCi [γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol) in 20 µM ATP gestartet. Nach Inkubation des Ansatzes für 20 min bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl SDS-Probenpuffer je Ansatz gestoppt, und die Proteine durch Kochen für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Anschließend wurde das Gel mit *Coomassie Brilliant Blue R250* gefärbt, in Folie eingeschweißt und der Phosphorylierungsgrad des GST-c-Jun über Autoradiographie ermittelt.

1 x RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,5 % (M/V) Natriumdeoxycholat; 0,1 % (M/V) SDS; 1 % (V/V) Triton X-100; 10 mM Na-Pyrophosphat; 25 mM β -Glyzerophosphat; 2 mM Na-Orthovanadat; 2,1 µg/ml Aprotinin; 1 µM Leupeptin

Kinase-Puffer: 25 mM Tris/HCl, pH 7,5; 20 mM MgCl₂; 20 mM β -Glyzerophosphat; 0,1 mM Na-Orthovanadat; 2 mM DTT

5 x SDS-Probenpuffer: 200 mM Tris/HCl, pH 8,8; 5 mM EDTA; 0,1 % (M/V) Bromphenolblau; 1 M Saccharose; 1 mM DTT; 2 % (M/V) SDS

Die *in vitro* Phosphorylierungsversuche wurden freundlicherweise von Frau Angela Mansard, Ulm, durchgeführt.

6.4.10 Nachweis der Akt/PKB-Proteinkinase-Aktivität

Der Einfluß der Faktoren GDNF und LPA (Lysophosphatidsäure) auf die Aktivität des PI3-Kinase-Effektorproteins Akt/PKB (PI 3-Proteinkinase B) in PANC-1-Zellen wurde mit Hilfe eines anti-Phospho(Ser473)-Akt/PKB-Antikörpers (New England Biolabs, Beverly/USA) im Immunoblot untersucht. Dazu wurden PANC-1-Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und in DMEM-Medium mit 10 % (V/V) FCS bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Die Zellen für 24 Std. in DMEM-Medium ausgehungert und anschließend für 10 min in DMEM-Medium mit 50 ng/ml GDNF oder 10 µM LPA stimuliert. Alternativ dazu wurden die Zellen vor der Inkubation mit GDNF oder LPA für 20 min mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 präinkubiert. Durch Waschen der Zellen mit

1 x CMF-PBS (4 °C) wurde die Reaktion gestoppt, die Zellen in 0,5 ml RIPA-Puffer lysiert und durch 10-mal Auf- und Abziehen mit einer Tuberkulin-Spritze (1 ml, Kanüle 18-gauge, 0,5 x 25 mm) homogenisiert. Die Proteinkonzentrationen der Zelllysate wurde mittels BCA-Methode ermittelt. Je 80 µg Zelllysate wurden mit 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und die Proteine zur Denaturierung bei 95 °C für 10 min gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel bei 100 V. Nach der SDS-PAGE und dem Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine mit einem anti-Akt/PKB-, oder anti-Phospho-Akt(Ser473)-Antikörper über Nacht auf einer Wippe bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal in TBS-Puffer gewaschen und mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper für 1 Std. bei RT inkubiert. Die Detektion der Akt/PKB- bzw. P-Akt/PKB(Ser473)-Proteinbanden erfolgte nach ECL-Entwicklung der Nitrozellulosemembranen durch Schwärzung eines Röntgenfilms an den Stellen der Chemilumineszenz-Signale (Antikörper-Verdünnungen siehe 5.11).

1 x RIPA-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,5 % (M/V) Natriumdeoxycholat; 0,1 % (M/V) SDS; 1 % (V/V) Triton X-100; 10 mM Na-Pyrophosphat; 25 mM β-Glyzerophosphat; 2 mM Na-Orthovanadat; 2,1 µg/ml Aprotinin; 1 µM Leupeptin
5 x SDS-Probenpuffer:	200 mM Tris/HCl, pH 8,8; 5 mM EDTA; 0,1 % (M/V) Bromphenolblau; 1 M Saccharose; 1 mM DTT; 2 % (M/V) SDS

6.4.11 Nachweis von Ras-GTP und Rac-GTP

6.4.11.1 Präzipitation von Ras-GTP

(modifiziert nach de Rooij und Bos, 1997)

Der Einfluß der Faktoren GDNF und EGF auf die Ras-Aktivität in PANC-1-Zellen wurde durch Präzipitation von Ras-GTP mit einem GST-Fusionsprotein der minimalen Ras-Bindungsdomäne (RBD) aus dem Ras-Effektorprotein Raf1 (AS51-131) untersucht. PANC-1-Zellen wurden in 60- oder 100 mm-Schalen in DMEM-Medium mit 10 % FCS ausgesät und bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im CO₂-Inkubator kultiviert. Konfluente Zellen wurden für 24 Std. mit serumfreiem DMEM-Medium inkubiert und, entsprechend dem Versuchsansatz, mit unterschiedlichen Mengen Faktor (GDNF, EGF) für 1-30 min stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem 1 x CMF-PBS gewaschen und in 0,5 ml 1 x

Ras-RIPA-Puffer je Ansatz lysiert. Homogenisiert wurden die RIPA-Lysate durch Auf- und Abziehen mit einer Tuberkulin-Spritze (1ml, Kanüle 18-gauge, 0,5 x 25 mm). Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden die RIPA-Lysate bei 14000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und von den Überständen die Proteinkonzentration mittels BCA-Methode ermittelt. Je Ansatz wurden 100 µl GST-RBD-*E. coli*-Lysat mit 40 µl Glutathion-Sepharose™ 4B in 0,5 ml Ras-RIPA-Puffer für 30 min bei RT auf einem Mischgerät präinkubiert. Die Sepharose wurden zweimal mit 1 x CMF-PBS gewaschen und anschließend jeweils bei 420 x g für 1 min bei RT zentrifugiert. Das Ras-GTP wurde aus 0,5-1 mg RIPA-Lysat in einem Endvolumen von 0,5 ml RIPA-Puffer mit Hilfe der an Sepharose gekoppelten GST-RBD-Fusionsproteine präzipitiert. Hierzu wurden die Proben für 1,5-2 Std. bei 4 °C auf einem Mischgerät inkubiert. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen wurden je 50 µg (1/10 oder 1/20) der RIPA-Lysate vor Zugabe der Sepharose entnommen, und der Ras-Gehalt im Immunoblot mit einem anti-pan-Ras-Antikörper (OP40) analysiert. Die Sepharosepräzipitate wurden dreimal mit 300 µl Ras-RIPA-Puffer gewaschen und dabei jeweils bei 420 x g für 1 min bei RT zentrifugiert. Die Sepharose-Präzipitate wurden durch Absaugen des Überstandes mit einer Hamilton-Spritze getrocknet, mit 25 µl SDS-Probenpuffer versetzt und die präzipitierten Proteine für 10 min bei 95 °C gekocht. Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, mittels Immunoblot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die Ras-Proteinbanden mit einem anti-pan-Ras-Antikörper detektiert. Die Darstellung der Ras-Proteine erfolgte nach Inkubation der Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper durch ECL-Entwicklung und Schwärzung eines Röntgenfilms an den Stellen der Chemilumineszenz-Signale.

1 x RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,5 % (M/V)
 Natriumdeoxycholat; 0,1 % (M/V) SDS; 1 % (V/V) Triton X
 100; 1 mM PMSF; 0,1 µM Aprotinin; 1 µM Leupeptin

6.4.11.2 Präzipitation von Rac-GTP

(nach Sander et al., 1998; Ren und Schwarz, 2000)

Der Einfluß der Faktoren GDNF und EGF auf die Aktivität der kleinen GTPase Rac in PANC-1-Zellen, wurde durch Präzipitation von Rac-GTP mit der CRIB-Domäne (CD) des Rac/Cdc42-Effektorproteins PAK1B (Aminosäuren 56-272 aus PAK1B) als rekombinantes GST-Fusionsprotein untersucht. Dazu wurden PANC-1-Zellen in DMEM-Medium mit 10 % FCS in 10 cm-Schalen ausgesät, und bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im CO₂-

Inkubator kultiviert. Die konfluenten Zellen wurden für 20 Std. in DMEM-Medium ausgehungert und anschließend mit DMEM-Medium mit dem neuronalen Faktor GDNF für unterschiedliche Zeiten stimuliert. Die Stimulation wurde durch zweimal Waschen mit eiskaltem 1 x CMF-PBS gestoppt, die PANC-1-Zellen in Rac-RIPA-Puffer (4 °C) lysiert und das Lysat durch Auf- und Abziehen mit einer Tuberkulin-Spritze (1ml, Kanüle 18-gauge, 0,5 x 25 mm) homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden bei 14000 x g für 10 min bei 4 °C sedimentiert und der Proteingehalt im Überstand mittels BCA-Methode ermittelt. Zur Präzipitation des endogenen Rac-GTPs wurden 1 mg Zelllysate mit 20 µg GST-PAK-CD in 0,5 ml Rac-RIPA-Puffer für 1 Std. bei 4 °C auf einem Mischgerät inkubiert. Zur Kontrolle der im Rac-Präzipitationsversuch eingesetzten Proteinmengen wurden je 50 µg der eingesetzten Proteinmenge in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und die Rac-RIPA-Lysate im Immunoblot mit einem anti-Rac-Antikörper detektiert. Die Sepharose-Präzipitate wurden viermal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen, und zwischen den einzelnen Waschschritten bei 420 x g für 1 min bei RT zentrifugiert. Abschließend wurde das Präzipitat mit einer Hamilton-Spritze getrocknet, in 25 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und die Proteine bei 95 °C für 10 min denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel bei 100 V. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die Rac-Proteine im Immunoblot mit einem anti-Rac-Antikörper nachgewiesen. Die Visualisierung der Rac-Proteine erfolgte nach Inkubation der Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper durch ECL-Entwicklung über Autoradiographie.

Rac-RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 % (V/V) Triton X-100; 0,5 % (M/V) Natriumdeoxycholat; 0,5 % (M/V) SDS; 1 mM PMSF; 10 µg/ml Leupeptin; 10 µg/µl Aprotinin

Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 % (V/V) Triton X-100; 0,1 mM PMSF; 10 µg/ml Leupeptin; 10 µg/µl Aprotinin

7 Ergebnisse

7.1 Einfluss verschiedener Zellkulturüberstände auf die Proliferation und Motilität von PANC-1-Zellen

Um die Frage zu klären, ob neuronale Zelllinien Faktoren sezernieren, welche das Proliferations- und Migrationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen beeinflussen, wurden die Zellkulturüberstände der neuronalen Zelllinien LS/LS107, SK-N-SH und SK-N-LO gesammelt und PANC-1-Zellen für 36 Std. darin inkubiert. Als Kontrollen dienten Ansätze mit 0,1 % FCS oder 10 % FCS in DMEM-Medium. Die Proliferation der Zellen in den verschiedenen Versuchsansätzen wurde durch Ermittlung der DNA-Synthese über den Einbau von [³H]-Methylthymidin für 24 Std. bestimmt und als Stimulation gegenüber Zellen in 0,1 % FCS angegeben. Dabei wurde die gebundene Radioaktivität durch Messung in einem β -counter quantifiziert. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Proliferationsversuchen zeigt die folgende Tabelle.

Zellkulturüberstand der Zelllinie	Stimulation \pm SEM	Anzahl der Versuche
10 % FCS (Positiv-Kontrolle)	1,59 \pm 0,13	5
LS/LS107	0,63 \pm 0,18	7
SK-N-SH	0,49 \pm 0,08	5
LO	0,50 \pm 0,18	2

Tab. 1: Einfluss von Zellkulturüberständen neuronaler Zelllinien auf die Proliferation von PANC-1-Zellen. PANC-1-Zellen wurden für 36 Std. mit den Zellkulturüberständen verschiedener neuronaler Zelllinien inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Synthese der Zellen durch Bestimmung des [³H]-Methylthymidin-Einbaus ermittelt. Der Quotient aus der Proliferation von Zellen in Zellkulturüberständen verschiedener neuronaler Zelllinien oder 10 % FCS und der Proliferation von Zellen in DMEM-Medium mit 0,1 % FCS wurde als Stimulation \pm SEM (*standard error mean*) angegeben.

Die Inkubation von PANC-1-Zellen mit den Zellkulturüberständen von verschiedenen neuronalen Zelllinien oder 10 % FCS führte nur im Kontrollansatz zu einer Steigerung der DNA-Synthese. In allen anderen Fällen war sogar eine Abnahme der Proliferation zu verzeichnen. Da sich PANC-1-Zellen in 0,1 % FCS noch ein- bis zweimal teilen, bedeutet

eine Inhibition der DNA-Syntheserate entweder ein Absterben der Zellen oder die Einstellung der DNA-Synthese.

Um den Einfluss der Zellkulturüberstände der neuronalen SK-N-SH und der glialen B49-Zelllinie auf das Wanderungsverhalten der Pankreaskarzinomzellen PANC-1 und Mia PaCa-2 zu untersuchen, wurden Kokultivierungsexperimente in einem modifizierten *Boyden*-Kammer-System durchgeführt. Nach 48 Std. wurden die Versuche durch Fixieren der Zellen gestoppt und ausgewertet. Eine Steigerung der Migration konnte weder bei Verwendung der humanen SK-N-SH-Zellen, noch bei den murinen B49-Zellen festgestellt werden.

Da es sich bei den neuronalen und glialen Zelllinien um Tumorzellen mit einem veränderten Expressionsmuster gegenüber nicht-transformierten Zellen handelte, wurden als nächstes Migrationsstudien mit primären neuronalen Zellen durchgeführt. Nach dem Anlegen neuronaler Primärkulturen aus den Mesencephali embryonaler Mäuse (E15), wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und der Einfluss auf das Migrationsverhalten von PANC-1-Zellen in modifizierten *Boyden*-Kammern untersucht. Eine Zunahme der Motilität von PANC-1-Zellen konnte jedoch nicht festgestellt werden.

7.2 Einfluss neuronaler Faktoren auf die Proliferation und Migration von PANC-1-Zellen

Da der Zellkulturüberstand verschiedener neuronaler und glialer Zelllinien keinen Einfluss auf das Proliferations- und Migrationsverhalten der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 hatte, wurde in den folgenden Experimenten die Wirkung spezifischer neuronaler Faktoren analysiert. Dabei wurde neben den Neurotrophinen β -NGF (*β -nerve growth factor*) und BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) der neuronale Faktor GDNF als ein Mitglied der TGF β -Superfamilie eingesetzt.

7.2.1 Einfluss auf die Proliferation

Für Proliferationsversuche wurden 3×10^5 PANC-1-Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und in DMEM-Medium mit 10 ng/ml GDNF, 10 ng/ml BDNF oder in Zellkulturüberstand von glialen, murinen B49-Zellen kultiviert. Versuchsansätze mit DMEM-Medium mit 0,1 % FCS oder 10 % FCS dienten als Kontrollen. Die Medien in den verschiedenen Versuchsansätzen wurden alle 48 Std. erneuert. Alle 2-3 Tagen wurde die Zellzahl in einer Neubauer

Zählkammer bestimmt. In Abbildung 5 ist die Auswertung eines repräsentativen Versuches (n = 2) graphisch dargestellt.

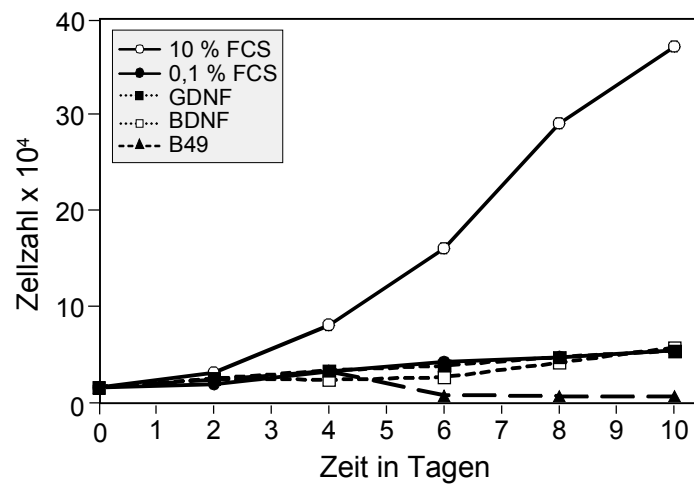


Abb. 5: Einfluss neuronaler Faktoren und des Zellkulturüberstandes von B49-Zellen auf das Wachstum von PANC-1-Zellen. PANC-1-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 ng/ml BDNF, 10 ng/ml GDNF oder dem Zellkulturüberstand von B49-Zellen inkubiert und alle 2-3 Tage wurde die Zellzahl je eines Versuchsansatzes in der Neubauer Zählkammer ermittelt. Als Kontrollen dienten Ansätze mit 0,1 % FCS und 10 % FCS. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches (n = 2).

Die Ergebnisse der Proliferationsversuche zeigen, dass das Zellwachstum von PANC-1-Zellen weder von den neuronalen Faktoren BDNF und GDNF, noch vom Zellkulturüberstand der B49-Zellen beeinflusst wird. Die Proliferation lag jeweils im Bereich des Zellwachstums in den Kontrollansätzen mit 0,1 % FCS. Nur die Inkubation von PANC-1-Zellen mit 10 % FCS führte zu einer exponentiellen Zunahme der Zellzahl.

7.2.2 Einfluss auf die gerichtete Migration

Anhand von Migrationsstudien in einem modifizierten *Boyden*-Kammer-System wurde ein möglicher Einfluss der neuronalen Faktoren GDNF, BDNF und β -NGF auf das Wanderungsverhalten von Pankreaskarzinomzellen analysiert. Dazu wurden PANC-1-Zellen für 40 Std. in DMEM-Medium mit 10 ng/ml GDNF, 10 ng/ml BDNF oder 10 ng/ml β -NGF kultiviert. Als Kontrollen dienten Ansätze mit 0,1 % BSA oder 10 μ M LPA. Die Auswertung eines repräsentativen Versuches (n = 2) ist in Abbildung 6 in Form eines Balkendiagrammes dargestellt.

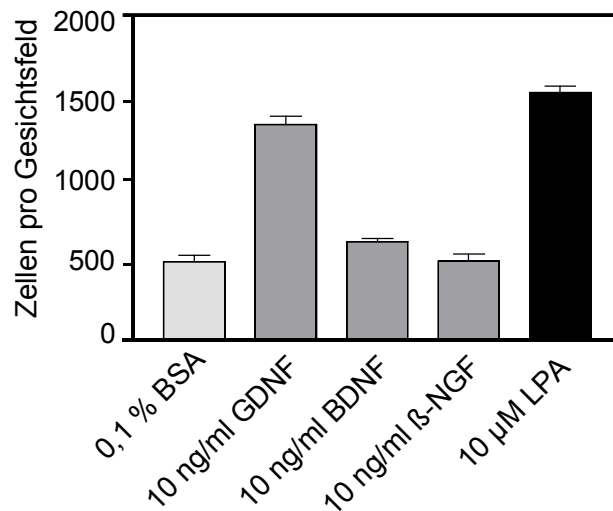


Abb. 6: Einfluss neuronaler Faktoren auf die gerichtete Migration von PANC-1-Zellen. PANC-1-Zellen wurden für 40 Std. in DMEM-Medium mit 10 ng/ml GDNF, 10 ng/ml BDNF oder 10 ng/ml β -NGF kultiviert und die Anzahl gewanderter Zellen durch Auszählen von drei willkürlich gewählten Gesichtsfeldern am Lichtmikroskop bestimmt (Vergrößerung 200fach). Als Kontrollen dienten Ansätze mit 0,1 % BSA und 10 μ M LPA. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte gewanderter Zellen \pm SEM (*standard error mean*) von drei ermittelten Werten eines Gesichtsfeldes für einen repräsentativen Migrationsversuch ($n = 2$).

Die Inkubation von PANC-1-Zellen in DMEM-Medium mit den neuronalen Faktoren BDNF und β -NGF hatte keinen Einfluss auf die Zellwanderung. Interessanterweise führte jedoch die Zugabe von 10 ng/ml GDNF zu einer signifikanten Steigerung der gewanderten Zellen gegenüber dem Kontrollansatz. Die Migration lag hierbei im Bereich der durch 10 μ M LPA induzierten Zellwanderung. Damit konnte der neuronale Faktor GDNF erstmals als chemotaktisch wirkender Faktor bei PANC-1-Zellen identifiziert werden.

7.2.3 Einfluss der GDNF-Konzentration auf die gerichtete Migration von PANC-1-Zellen

Nach der Identifizierung von GDNF als chemotaktisch wirkender Faktor bei PANC-1-Zellen wurde untersucht, ob es sich dabei um einen konzentrationsabhängigen Effekt handelt. Dazu wurden in modifizierten *Boyden*-Kammern Migrationsversuche mit verschiedenen GDNF-Konzentrationen zwischen 100 pg/ml und 50 ng/ml GDNF durchgeführt. Ein Ansatz mit 0,1 % BSA diente als Kontrolle. In Abbildung 7 ist das Ergebnis eines Versuches dargestellt.

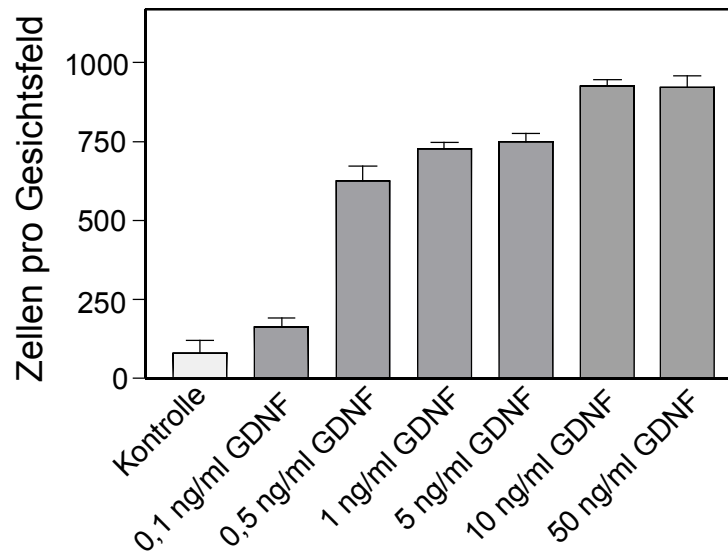


Abb. 7: Einfluss der GDNF-Konzentration auf die Migration von PANC-1-Zellen. In einem modifizierten *Boyden*-Kammer-System wurde der Einfluss verschiedener GDNF-Konzentrationen auf die gerichtete Migration von PANC-1-Zellen untersucht. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit 0,1 % BSA in DMEM-Medium. Die Zellen wurden für 40 Std. inkubiert und die Anzahl gewanderter Zellen durch Auszählen von drei repräsentativen Gesichtsfeldern (200fache Vergrößerung) je Ansatz am Lichtmikroskop quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (*standard error mean*) gewanderter Zellen je Gesichtsfeld.

Die Inkubation von PANC-1-Zellen in DMEM-Medium mit unterschiedlichen GDNF-Konzentrationen führte ab einer Konzentration von 0,5 ng/ml GDNF zu einer signifikanten Steigerung der Zellmigration. Die maximale Zellwanderung wurde bei 10 ng/ml GDNF erreicht und konnte auch durch höhere Mengen nicht weiter gesteigert werden.

7.3 Untersuchung des GDNF-Rezeptor-Komplexes in Pankreaskarzinomzellen

7.3.1 Expressionsanalyse von Ret und GFR α auf mRNA-Ebene

Um die Frage zu klären, ob es sich bei der GDNF-induzierten Migration von PANC-1-Zellen um einen spezifischen, Rezeptor-vermittelten Effekt handelt, wurde die Expression des Ret/GFR α -Rezeptor-Komplexes auf mRNA-Ebene in RT-PCR-Analysen untersucht.

7.3.1.1 Nachweis der Ret-mRNA in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien

Für den Nachweis des Ret-Rezeptors auf mRNA-Ebene wurde zunächst die gesamt-RNA der humanen Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1, BxPC-3 und AsPC-1 sowie der humanen neuronalen Zelllinie SK-N-SH isoliert, und daraus cDNA hergestellt. Der Nachweis der Ret-mRNA in den verschiedenen Zelllinien erfolgte mittels PCR, durch Amplifikation eines zentralen, 557 bp langen Fragmentes (Exon 6-9). Als Kontrolle für die cDNA-Qualität und -Menge wurde außerdem je Versuchsansatz eine β -Aktin-PCR durchgeführt. Anschließend wurde die Anwesenheit der Ret- und β -Aktin-Transkripte nach Auftrennen von je 1/10 der PCR-Ansätze in einem 1 %igen Agarosegel überprüft. Abbildung 8 zeigt das Ergebnis.

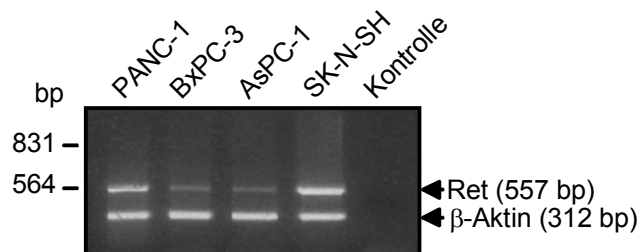


Abb. 8: Nachweis des Ret-Rezeptors. Für den mRNA-Nachweis des Ret-Rezeptors wurden PCRs mit der cDNA aus den Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1, BxPC-3 und AsPC-1 sowie aus der neuronalen Zelllinie SK-N-SH durchgeführt. Die cDNA-Qualität wurde durch Amplifikation eines β -Aktin-Fragmentes überprüft. Als Kontrolle beider PCRs diente je ein Ansatz ohne cDNA. Dargestellt ist das 1 %ige Agarosegel nach Auftrennung von je 1/10 der PCR-Ansätze.

Die β -Aktin-PCR demonstrierte eine gleichbleibende cDNA-Qualität in allen Ansätzen. Ein Ret-Transkript konnte in allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien sowie in der neuronalen Zelllinie SK-N-SH nachgewiesen werden. Da das PCR-Fragment die Sequenz mehrerer Exone beinhaltet, konnte eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Um die Identität der Ret-PCR-Fragmente zu bestätigen, wurden diese aus dem Gel eluiert, in den pCR[®] 2.1-Vektor kloniert und vollständig sequenziert. Der Ret-Nachweis in den verschiedenen Zelllinien konnte in mehreren unabhängigen PCRs reproduziert werden, wobei die eingesetzten cDNA-Proben aus unterschiedlichen gesamt-RNA-Proben synthetisiert worden waren.

7.3.1.2 Expression verschiedener Ret-Isoformen in PANC-1-Zellen

Für Ret konnte in verschiedenen Geweben die Expression von drei unterschiedlichen Isoformen gezeigt werden, welche durch alternatives Spleißen am 3'-Ende des *c-ret*-Gens entstehen. Sie unterscheiden sich auf Proteinebene in den letzten 9, 43 bzw. 51 Aminosäuren (Myers et al., 1995; O'Rourke et al., 1999). Als nächstes wurde daher das Expressionsmuster der Ret-Isoformen in PANC-1-Zellen über RT-PCR-Analysen näher charakterisiert. Nach Isolierung von gesamt-RNA aus PANC-1-Zellen und Herstellung von cDNA, wurden PCRs durchgeführt, in welchen ein 5'-Oligonukleotid aus Exon 16 jeweils mit einem von drei Isoform-spezifische 3'-Oligonukleotiden kombiniert wurde. Abbildung 9 verdeutlicht die Lokalisation der verwendeten Oligonukleotide.

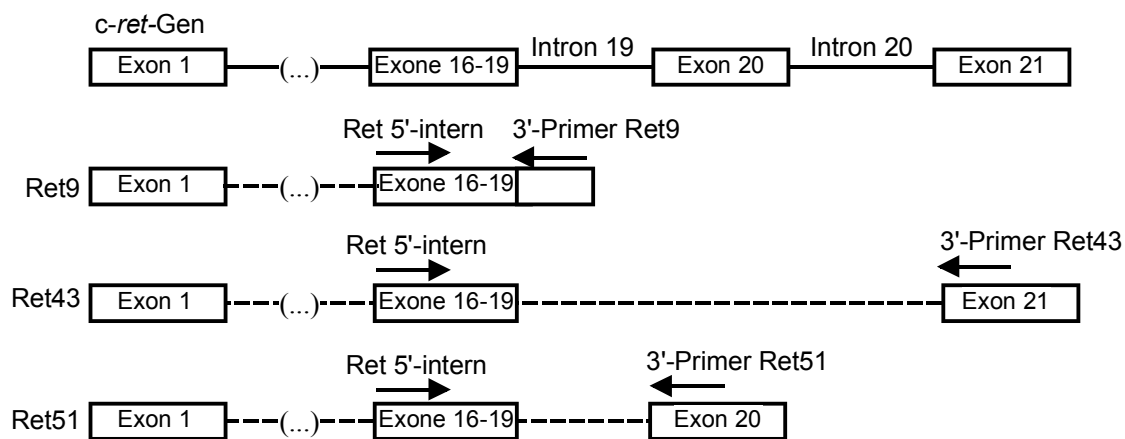


Abb. 9: Lokalisation der Oligonukleotide für den Nachweis der Ret-Isoformen. Das *c-ret*-Gen besteht aus 21 Exonen, von welchen das erste und die letzten sechs schematisch dargestellt sind. Die Exone dazwischen sind durch (...) angedeutet. Während die Nukleotidsequenz bis Exon 19 in allen Ret-Isoformen vorkommt, liegen die Isoform-spezifischen Sequenzen von Ret43 und Ret51 in Exon 21 und Exon 20. Im Gegensatz dazu wird bei der Generierung der Ret9-Isoform die Sequenz aus Exon 19 um 30 bp verlängert. Die gestrichelten Linien zwischen den Exonen stellen die bei der Transkription herausgespleißten Intronsequenzen dar. Die Exon- und Intronlängen, sowie die Längen der durch Pfeile repräsentierten Oligonukleotide sind nicht maßstabsgerecht.

Zur Überprüfung der in den PCRs amplifizierte Fragmente wurde je 1/10 der PCR-Ansätze in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Abbildung 10 zeigt, dass die Transkripte von Ret9 (448 bp), Ret43 (504 bp) und Ret51 (579 bp) in PANC-1-Zellen vorhanden sind.

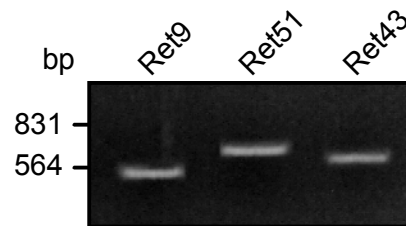


Abb. 10: Expression von Ret-Isoformen in PANC-1-Zellen. Für den Nachweis der Ret-Isoformen Ret9, Ret43 und Ret51, wurden PCR-Analysen mit der cDNA aus PANC-1-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden Isoform-spezifische 3'-Oligonukleotide mit einem 5'-Oligonukleotid aus Exon 16 kombiniert. Je 1/10 der PCR-Ansätze wurde in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Um auszuschließen, dass das Ret9-Fragment infolge einer genomischen DNA-Kontamination in den cDNA-Proben auftrat, wurde eine Ret9-PCR mit drei verschiedenen Kontrollen durchgeführt. In allen Kontroll-PCRs wurde neben dem 5'-Oligonukleotid aus Exon 16 ein 3'-Oligonukleotid eingesetzt, dessen Sequenz nach der letzten Polyadenylierungsstelle der Ret9-Sequenz lokalisiert ist (3'-Oligo Ret9-Test). Die Lokalisation der verwendeten Oligonukleotide ist in Abbildung 11 grobschematisch wiedergegeben.

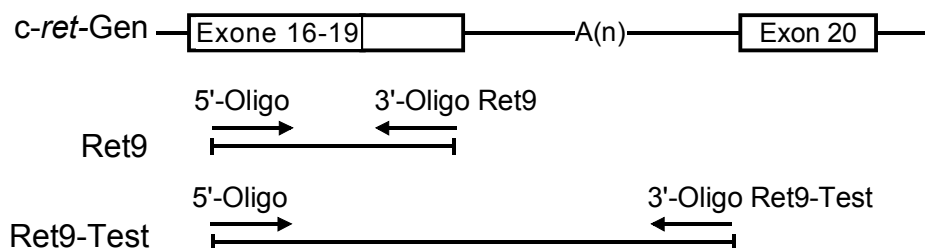


Abb. 11: Lokalisation der Ret9- und Ret9-Test-Oligonukleotide. Die Exon-Intron Struktur am 3'-Ende des *c-ret*-Gens ist von Exon 16 bis Exon 20 schematisch wiedergegeben. Die Oligonukleotide für die Ret9- und die Ret9-Test-PCR sind als Pfeile eingezeichnet. Die putativ letzte Polyadenylierungsstelle im Ret9-Transkript wurde in Intron 19 als A(n) eingezeichnet. Die Exon- und Intronlängen sowie die Längen der Oligonukleotide (Pfeile) sind nicht maßstabsgerecht wiedergegeben.

Der Ret9-PCR-Ansatz wurde in Spur 1 (Abb. 12) aufgetragen, und die Ret9-Test-PCR-Ansätze in den Spuren 2-4. Nur im Kontrollansatz 3 wurde cDNA als Matrize eingesetzt (Abbildung 12; Spur 4). Kontrollansatz 1 enthielt stattdessen das entsprechende Volumen ddH₂O (Spur 2), und in Kontrollansatz 2 wurde gesamt-RNA eingesetzt, welche alle cDNA-Synthese-Schritte in Abwesenheit der Polymerase durchlaufen hatte (Spur 3).

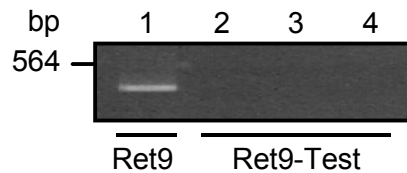


Abb. 12: PCRs zum Ausschluss möglicher Kontaminationen mit genomischer DNA. Um eine Kontamination der cDNA von PANC-1-Zellen mit genomischer DNA zu überprüfen, wurden folgende Ret9 und RET9-Test-PCR-Ansätze durchgeführt. **1**, Ret9-PCR mit cDNA aus PANC-1. **2**, Kontrollansatz 1 ohne cDNA. **3**, Kontrollansatz 2 mit gesamt-RNA. **4**, Kontrollansatz 3 mit cDNA aus PANC-1. Je 1/10 der PCR-Ansätze wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Im Ret9-PCR-Ansatz wurde ein DNA-Fragment (448 bp) amplifiziert, während in den Ret9-Test-PCRs der Kontrollansätze keine PCR-Produkte nachgewiesen werden konnten. Eine Kontamination der Reagenzien für die cDNA-Synthese und die PCR sowie der cDNA aus PANC-1-Zellen mit genomischer und fremder (c)DNA konnte damit ausgeschlossen und die Expression eines Ret9-Transkriptes bestätigt werden.

In PCRs mit anderen cDNA-Präparationen aus PANC-1-Zellen konnten die Ergebnisse zur Expression der Ret-Isoformen ($n = 3$) reproduziert werden. Anschließend wurden die PCR-Produkte jeweils entweder direkt oder nach Klonierung in den pCR[®]2.1-Vektor sequenziert und die Identität der Ret-Fragmente überprüft.

7.3.1.3 Sequenzanalyse des *c-ret*-Gens aus PANC-1-Zellen

Das *c-ret*-Gen wurde 1985 entdeckt und als chimäres *c-ret*-PTC (*papillary thyroid cancer*)-Onkogen beschrieben (Takahashi et al., 1985). Für die Syndrome MEN2A/B und FMTC konnte gezeigt werden, dass verschiedene Ausprägungen von Schilddrüsenkarzinomen mit dem Auftreten spezifischer Punktmutationen im *c-ret*-Gen korrelieren. Auf Proteinebene tritt hierbei eine Häufung der Mutationen in der Cystein-reichen Region und den Tyrosinkinase-Domänen I und II auf (Abbildung 13).

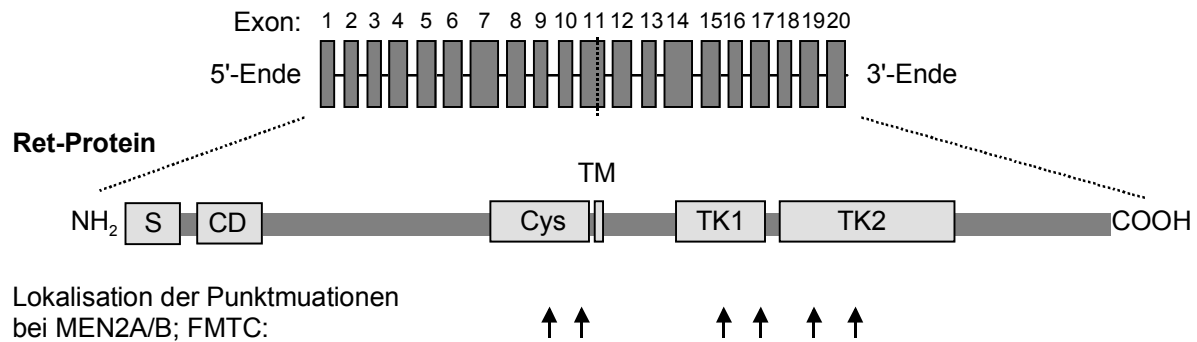
c-ret-mRNA Ret51

Abb. 13: Lokalisation von Tumor-assoziierten Punktmutationen im Ret-Rezeptor. Die Lokalisation der Punktmutationen im Ret-Protein, welche mit der Entstehung autosomal-dominant vererbter Formen von Schilddrüsenkarzinomen (MEN2A, MEN2B, FMTC) korrelieren, sind mit ↑ gekennzeichnet. Der Austausch spezifischer Aminosäuren führt hierbei zu einer konstitutiven Aktivierung des Ret-Rezeptors. S, Signalsequenz. CD, Cadherin-homologe Domäne. Cys, Cystein-reiche Region. TM, Transmembrane Region. TK1, 2, Tyrosinkinase-Domänen 1, 2 (Abbildung in Anlehnung an Ederly et al., 1997 und Anders et al., 2001). Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht.

Um zu untersuchen, ob PANC-1-Zellen ein mutiertes *c-ret*-Gen exprimieren, wurde die cDNA-Sequenz des *c-ret*-Gens auf mögliche Mutationen hin analysiert. Dazu wurden über PCR und sog. *primer walking* 6 überlappende RT-PCR-Fragmente amplifiziert, welche die Sequenz der langen Ret51-Isoform abdecken. Die Lokalisation der verschiedenen RT-PCR-Fragmente in bezug auf die Struktur des *c-ret*-Gens ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

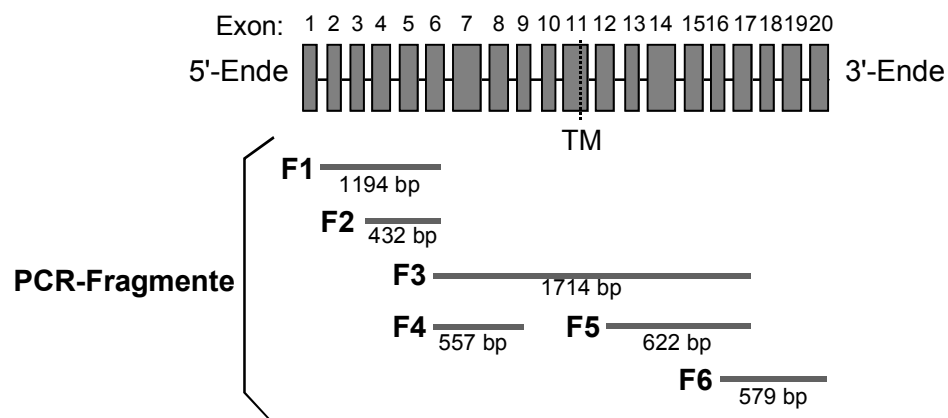
c-ret-mRNA/cDNA

Abb. 14: Lokalisation der Ret51-RT-PCR-Fragmente. Mit Ret-spezifischen Oligonukleotiden wurden 6 verschiedene RT-PCR-Fragmente der Ret51-Isoform generiert (F1-6). Die Länge der jeweiligen Fragmente ist in bp angegeben.

Anschließend wurden die PCR-Produkte isoliert und in den pCR2.1[®]-Vektor kloniert. Die RT-PCR-Fragmente wurden sowohl mit 12 Ret-spezifischen Oligonukleotiden, die z. T. auch für die Amplifikation der Ret-Fragmente verwendet worden waren, als auch mit zwei Vektor-spezifischen Oligonukleotiden, dem *reverse* und *universal primer*, sequenziert. Die Basenabfolge wurde jeweils mit der Ret-Sequenz in der GenBank-Datenbank verglichen. Je Fragment wurden 4 verschiedene cDNA-Proben für 7 unterschiedliche PCR-Ansätze verwendet. Die Analyse der cDNA-Sequenz des *c-ret*-Gens führte zu folgenden Ergebnissen:

1. In 60 % der Sequenzen der F3- und F4-Fragmente wurde in Kodon 432 (Exon 7) ein Basenaustausch von GCG(Ala)→GCA(Ala) festgestellt, so dass es sich hierbei um eine stille Mutation in der *c-ret*-Sequenz von PANC-1-Zellen handelt.
2. Die in PANC-1-Zellen exprimierte Ret-Sequenz entspricht auf Aminosäureebene in allen Fällen der in GenBank angegebenen Ret-Sequenz.

Die Sequenzierung der *c-ret*-Transkripte zeigt, dass der in PANC-1-Zellen exprimierte Ret-Rezeptor keine Mutation gegenüber der GenBank-Sequenz (Nr. 14745698) aufweist.

7.3.1.4 Nachweis der mRNA von GFR α 1 und GFR α 2 in PANC-1-Zellen

Von den insgesamt 4 in Säugern exprimierten GFR α -Proteinen, GFR α 1-4, konnte insbesondere für GFR α 1, aber auch für GFR α 2, eine Interaktion mit dem neuronalen Faktor GDNF gezeigt werden (Klein et al., 1997; Sanicola et al., 1997). Daher wurde als nächstes die Expression der GFR α -mRNA in PANC-1-Zellen untersucht. Nach Isolierung von Gesamt-RNA aus PANC-1- und SK-N-SH-Zellen und Herstellung von cDNA, wurden mit GFR α 1- und GFR α 2-spezifischen Oligonukleotiden PCRs durchgeführt. In Abbildung 15 ist das Ergebnis einer GFR α -PCR dargestellt.

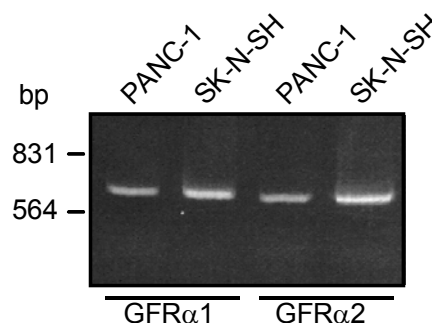


Abb. 15: Nachweis der GFR α -Expression in PANC-1- und SK-N-SH-Zellen über PCR. Für den Nachweis der GFR α -mRNA-Expression in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 und der neuronalen Zelllinie SK-N-SH wurden PCRs mit spezifischen GFR α -Oligonukleotiden durchgeführt. Die Amplifikation von GFR α 1(605 bp)- und GFR α 2(575 bp)-Fragmenten wurde durch Auftrennung von je 1/10 der PCR-Ansätze in einem 1 %igen Agarosegel überprüft.

Auch in anderen PCR-Ansätzen mit insgesamt vier verschiedenen cDNAs wurden beide GFR α -Transkripte nachgewiesen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigte die Identität der GFR α -Fragmente.

Die Ret- und GFR α -PCR-Analysen demonstrierten, dass in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 sowohl der Ret-Rezeptor als auch die GFR α -Korezeptoren 1 und 2 auf mRNA-Ebene vorliegen.

7.3.2 Nachweis der GDNF-Expression in PANC-1-Zellen

Zahlreiche Tumorarten weisen eine Überexpression von Faktor-Rezeptoren und deren entsprechenden Liganden auf (Korc et al., 1992, Friess et al., 1994, 1996; Yamanaka et al., 1993). Über autokrine und parakrine Rückkoppelungsmechanismen führen die Faktoren dann zu einer von äußeren Faktoren unabhängigen Proliferation und tragen damit zur Tumorprogression bei. Um zu untersuchen, ob in PANC-1-Zellen neben dem GDNF-Rezeptor-Komplex auch GDNF exprimiert wird, wurden Polymerase-Kettenreaktionen mit GDNF-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Dazu wurden verschiedene cDNA-Proben aus PANC-1-Zellen eingesetzt (n = 3). Abbildung 16 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer PCR, in welcher neben der cDNA aus PANC-1-Zellen auch eine cDNA-Probe aus den neuronalen Zellen SK-N-SH eingesetzt wurde.

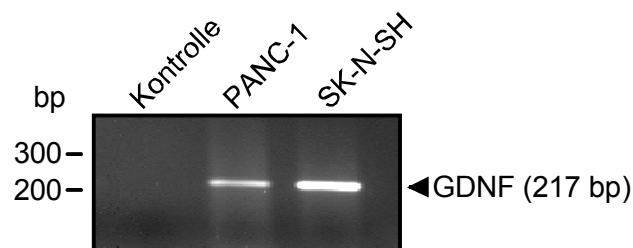


Abb. 16: Expression des neuronalen Faktors GDNF in PANC-1- und SK-N-SH-Zellen. Um die GDNF-Expression in PANC-1- und SK-N-SH-Zellen auf mRNA-Ebene zu überprüfen, wurden PCRs mit GDNF-spezifischen Oligonukleotiden (Exon 3) durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne cDNA. Je 1/10 der PCR-Ansätze wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Diese und weitere PCR-Analysen zeigten, dass GDNF-mRNA in PANC-1- und SK-N-SH-Zellen vorliegt.

7.3.3 Nachweis des GDNF-Rezeptors auf Proteinebene

Um zu untersuchen, ob die Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 die Rezeptor-Komponenten Ret und GFR α 1 auch auf Proteinebene exprimiert, wurden Immunoblot-Analysen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Für den Ret-Nachweis wurden PANC-1-Zellen bis zu einer Konfluenz von 90 % in DMEM-Medium mit 10 % FCS kultiviert und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 8 mg Gesamtprotein für eine Immunpräzipitation (IP) mit einem Ret-spezifischen Antikörper eingesetzt. Ein zweiter IP-Ansatz ohne RIPA-Lysat diente als Kontrolle. Beide IP-Ansätze sowie ein dritter Ansatz mit PANC-1-RIPA-Lysat wurden in einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Ret-Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper, welcher auch für die IP verwendet wurde, im Immunoblot detektiert. Abbildung 17 zeigt den Immunoblot nach ECL-Entwicklung.

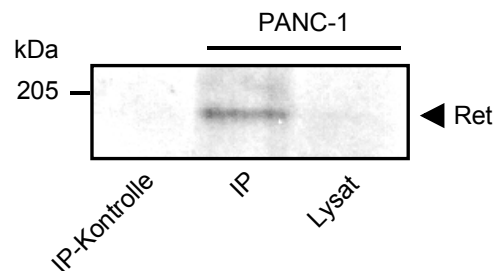


Abb. 17: Nachweis des Ret-Proteins aus PANC-1-Zellen im Immunoblot. Die Immunpräzipitation (IP) des Ret-Proteins erfolgte durch Inkubation von PANC-1-RIPA-Lysat (8 mg) mit Protein A, einem anti-Ziege IgG sowie einem spezifischen anti-Ret-Antikörper für 2 Std. bei 4 °C. Ein IP-Ansatz ohne RIPA-Lysat diente als IP-Kontrolle. In einem dritten Ansatz wurde das Ret-Protein direkt aus dem RIPA-Lysat nachgewiesen. Alle Ansätze wurden in einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Banden des Ret-Proteins im Immunoblot mit einem spezifischen anti-Ret-Antikörper nach ECL-Entwicklung detektiert.

Nach Immunpräzipitation des Ret-Proteins war die Ret-Bande deutlich zu erkennen. Im RIPA-Lysat konnte die Ret-Bande dagegen nur schwach detektiert werden. Aus den Immunoblot-Versuchen wurde gefolgert, dass PANC-1-Zellen den Ret-Rezeptor auch auf Proteinebene exprimieren.

Für den Nachweis des GFR α -Proteins wurden RIPA-Lysate der Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1 und AsPC-1, der glialen Zelllinie B49 sowie der Insektenzelllinie Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) hergestellt. Als Kontrollen für die GFR α -Expression dienten dabei die Zelllysate von B49- und Sf9-Zellen, sowie spezifische Gewebeproben aus humanem Magen und der

Hirnanhangsdrüse von Ratten. Der GFR α 1-Nachweis erfolgte nach SDS-PAGE und Proteintransfer auf Nitrozellulose im Immunoblot mit einem spezifischen GFR α 1-Antikörper. In Abbildung 18 ist das Ergebnis einer GFR α 1-Immunoblot-Analyse wiedergegeben (n = 3).

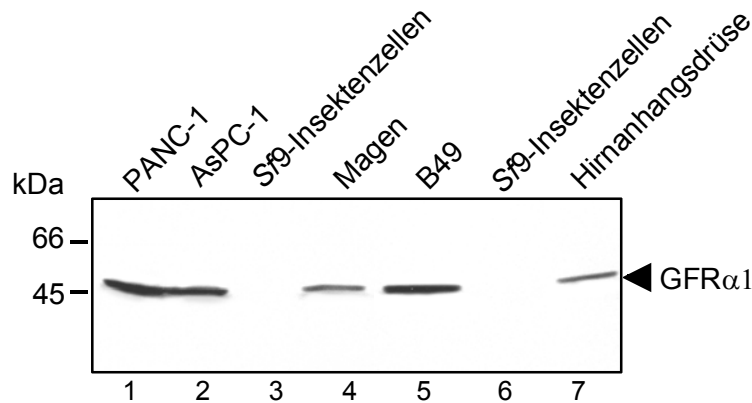


Abb. 18: Expression des GFR α 1-Proteins in verschiedenen Zelllinien und Gewebeproben. Für den Expressions-Nachweis des GFR α 1-Proteins im Immunoblot wurden je 20 μ g RIPA-Lysat der Zelllinien PANC-1, AsPC-1 und B49 und je 10 μ g RIPA-Lysat der Sf9-Insektenzellen eingesetzt. Außerdem wurden Gewebeproben aus Magen (20 mg) und Hirnanhangsdrüse (4 μ g) eingesetzt. Der Nachweis des GFR α 1-Proteins erfolgte mit einem spezifischen anti-GFR α 1-Antikörper im Immunoblot. Spuren 1, 2, 4: human. Spur 5: murin. Spuren 3, 6: Insektenzellen.

In beiden Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1 und AsPC-1 konnte der GFR α 1-Korezeptor anhand von Immunoblot-Analysen nachgewiesen werden. Die als Positiv-Kontrollen eingesetzten Gewebeproben und das RIPA-Lysat der B49-Zellen zeigten ebenfalls eine deutliche GFR α 1-Expression. Die Kreuzreaktivität des eingesetzten Antikörpers erlaubte den Nachweis des GFR α 1-Proteins in den Proben verschiedener Spezies. In den jeweiligen Negativ-Kontrollen waren keine spezifischen Proteinbanden zu erkennen.

Beide GDNF-Rezeptor-Komponenten Ret und GFR α 1 wurden damit auch auf Proteinebene nachgewiesen. Da es bisher keinen spezifischen anti-GFR α 2-Antikörper gibt, konnte die Proteinexpression dieses Korezeptors in PANC-1-Zellen nicht nachgewiesen werden. Sie ist jedoch aufgrund des GFR α 2-mRNA-Nachweises wahrscheinlich. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die GDNF-induzierte Migration von PANC-1-Zellen auf eine spezifische Interaktion von GDNF mit dem Ret/GFR α -Rezeptor-Komplex zurückzuführen ist.

7.4 Einfluss von GDNF auf verschiedene Signalwege und Relevanz dieser Signalwege für die Zellmigration

7.4.1 Untersuchung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade

7.4.1.1 Aktivierung der MAP-Kinase ERK2 durch GDNF

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Behandlung von PANC-1-Zellen mit verschiedenen Liganden von Rezeptortyrosinkinasen, wie den Faktoren EGF, HGF oder TGF α , zu einer deutlichen Aktivierung der MAP-Kinase ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase 2*) in diesen Zellen führt (Giehl et al., 2000). Für neuronale Zellen wurde darüber hinaus demonstriert, dass GDNF über den Ret-Rezeptor eine Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade induziert (Santoro et al., 1994b; Worby et al., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob der neurotrophe Faktor GDNF auch in PANC-1-Zellen eine Aktivierung dieser Kaskade, und insbesondere der MAP-Kinase ERK2, bewirkt. Dazu wurden *in vitro* Phosphorylierungsversuche mit dem MBP (*myelin basic protein*)-Peptid als Substrat für die immunpräzipitierte ERK2 durchgeführt.

Zur Untersuchung einer möglichen ERK2-Aktivierung wurden ausgehungerte PANC-1-Zellen für 5 min, 10 min, 15 min, 30 min oder 1 Std. mit 100 ng/ml GDNF inkubiert und RIPA-Lystate hergestellt. Ein Ansatz ohne Faktor diente als Kontrolle. Die Proteinkonzentrationen der RIPA-Lysate wurden mittels BCA-Proteinbestimmung ermittelt und ERK2 wurde aus je 1 mg RIPA-Extrakt mit einem anti-ERK2-Antikörper immunpräzipitiert. Je 1/3 der Ansätze mit der immunpräzipitierten MAP-Kinase wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die präzipitierten Proteine anschließend mit dem anti-ERK2-Antikörper im Immunoblot detektiert. Die verbliebenen 2/3 der IP-Ansätze wurden für die radioaktive *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen eingesetzt. Das Ergebnis eines repräsentativen Versuches (n = 2) ist in Form eines Balkendiagrammes in Abbildung 19 dargestellt.

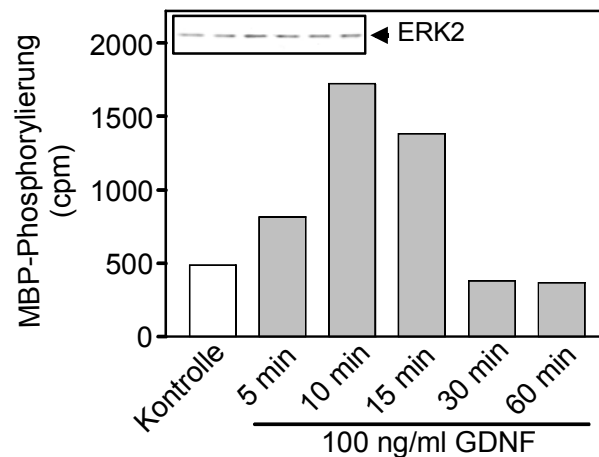


Abb. 19: Zeitabhängigkeit der ERK2-Aktivierung in PANC1-Zellen. Ausgehungerte PANC-1-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 ng/ml GDNF inkubiert und die ERK2-Aktivität anschließend in einem *in vitro* Phosphorylierungsexperiment mit MBP-Peptid als Substrat ermittelt. Ein Ansatz ohne Faktor diente als Kontrolle. Dargestellt ist die MBP-Peptid-Phosphorylierung in cpm (*counts per minute*). Bild-Einsatz: 1/3 der IP-Ansätze der MAP-Kinase ERK2 wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und ERK2 mit einem anti-ERK2-Antikörper im Immunoblot nachgewiesen.

Die Inkubation von PANC-1-Zellen mit GDNF führte in beiden Versuchen bereits nach 5 min zu einer leichten Steigerung der ERK2-Phosphorylierung gegenüber den nicht-behandelten Zellen. Das Maximum wurde nach 10 bis 15 min Inkubationszeit erreicht. Nach 30 min war die ERK2-Aktivität wieder vollständig abgeklungen und lag sogar unterhalb des Ausgangswertes. Die Ergebnisse aus dem dargestellten und einem weiteren Phosphorylierungsversuch zeigten, dass ERK2 durch GDNF aktiviert wird und dass diese Aktivierung bis zu 30 min anhält.

Um zu untersuchen, ob die GDNF-induzierte ERK2-Aktivierung von der eingesetzten GDNF-Konzentration abhängig ist, wurden ausgehungerte PANC-1-Zellen für je 10 min bzw. 15 min mit 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml GDNF bzw. 30 ng/ml EGF behandelt und die Zellen anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Ein Ansatz mit Zellen ohne Faktor diente als Kontrolle. Je 1 mg der RIPA-Extrakte wurde für die Präzipitation der MAP-Kinase ERK2 eingesetzt. Die *in vitro* Phosphorylierungsreaktion wurde mit 2/3 der IP-Ansätze durchgeführt. In den jeweils verbliebenen 1/3 wurden die für die Phosphorylierungsreaktion eingesetzten ERK2-Mengen über SDS-PAGE und Immunoblot mit einem anti-ERK2-Antikörper überprüft (nicht gezeigt). Abbildung 20 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Versuches (n = 1 für 10 min und n = 1 für 15 min).

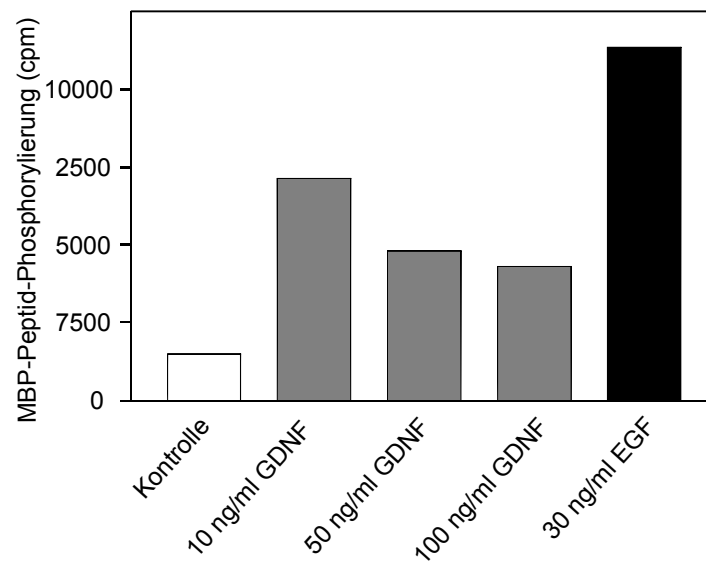


Abb. 20: Einfluss der GDNF-Konzentration auf die ERK2-Aktivität in PANC-1-Zellen. Ausgehungerte PANC-1-Zellen wurden mit den angegebenen GDNF-Konzentrationen oder 30 ng/ml EGF für 15 min behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der immunpräzipitierten ERK2 in einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit MBP-Peptid als Substrat ermittelt. Dargestellt ist die MBP-Peptid-Phosphorylierung der jeweiligen Ansätze in cpm (*counts per minute*).

Die verschiedenen GDNF-Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 100 ng/ml führten nach 15 min (bzw. 10 min) zu einer annähernd 5fachen Stimulation der Proteinkinase ERK2 gegenüber der Kontrolle. Bei 10 min und 15 min Behandlungszeit der Zellen reichte eine GDNF-Konzentration von 10 ng/ml hierfür bereits aus. Die ca. 8fache Steigerung der ERK2-Aktivität nach Zugabe von EGF zeigte jedoch, dass das Maximum einer möglichen ERK2-Aktivierung in PANC-1 Zellen durch den neurotrophen Faktor GDNF nicht erreicht wurde.

7.4.1.2 Einfluss von GDNF auf die Ras-Aktivität in PANC-1-Zellen

Expression und von GST und GST-RBD

Als nächstes wurde untersucht, ob die in PANC-1-Zellen beobachtete GDNF-induzierte ERK2-Aktivierung über die kleine GTPase Ras reguliert wird. Dazu wurden Ras-GTP-Bindungsversuche durchgeführt. Die Präzipitation von aktivem Ras-GTP erfolgte hierbei mit der minimalen Ras-Bindungsdomäne (RBD) aus dem Ras-Effektorprotein c-Raf1 (AS51-131), welche zunächst als GST-RBD-Fusionsprotein hergestellt wurde. Für die Ras-GTP-Bindungsversuche wurden die Proteine GST und GST-RBD in *E. coli*-BL21(DE3)-Bakterienzellen, wie im Methoden-Teil (s. 6.1.4.3) beschrieben, exprimiert und

Bakterienlysate mit den löslichen Proteinen GST und GST-RBD hergestellt. Der GST-Anteil des GST-RBD-Fusionsproteins ermöglichte eine Immobilisierung von GST-RBD an Glutathion Sepharose™ 4B. Somit konnte Ras-GTP nach Bindung an GST-RBD mit Hilfe der Sepharose aus dem RIPA-Lysat von PANC-1-Zellen präzipitiert werden. Die Detektion des isolierten Ras-GTPs erfolgte mit einem anti-Ras-Antikörper im Immunoblot. Abbildung 21 zeigt die Bestimmung der Mengen exprimierter GST- und GST-RBD-Proteine nach Kopplung dieser Proteine aus verschiedenen Volumina Bakterienlysate an 40 µl Glutathion Sepharose™ 4B. Nach Präzipitation wurden die Proteine GST und GST-RBD zusammen mit verschiedenen Mengen BSA in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Färben des Gels mit *Coomassie*-Blau ermöglichte anschließend die Visualisierung der Proteine im Gel (s. Abbildung 21).

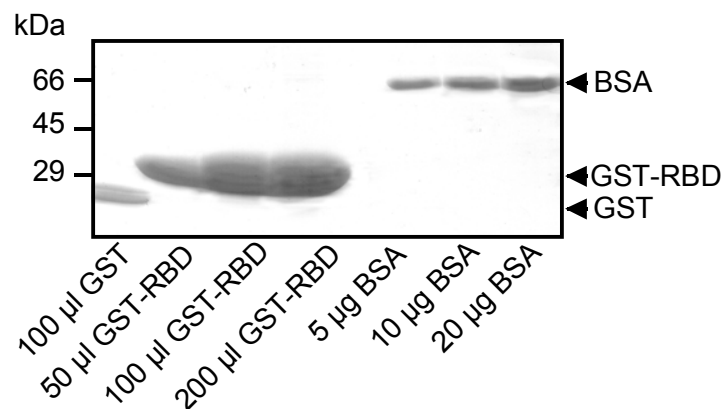


Abb. 21: Nachweis der GST- und GST-RBD-Expression in BL21(DE3). Für den Expressions-Nachweis und die Quantifizierung von GST (27 kDa) und GST-RBD (37,5 kDa) wurden verschiedene Mengen Bakterienlysate mit je 40 µl Glutathion Sepharose™ 4B inkubiert und die GST-Proteine an die Sepharose gekoppelt. Nach Präzipitation der Proteine wurden diese in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch Färben des Gels mit *Coomassie*-Blau visualisiert. Verschiedene Mengen (5 µg, 10 µg und 20 µg) BSA (67 kDa) dienten als Kontrolle.

Für die Quantifizierung der GST- und GST-RBD-Mengen wurden die jeweiligen Proteinbanden mit den verschiedenen Banden der BSA-Kontrolle verglichen. Für einen Ras-GTP-Bindungsversuch wurden je 100 µl GST und 150 µl GST-RBD eingesetzt.

Ras-GTP-Präzipitationsversuche

Von der kleinen GTPase Ras existieren drei Isoformen, welche als H-Ras, K-Ras und N-Ras bezeichnet und von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Alternatives Spleißen führt zur Expression von zwei unterschiedlichen K-Ras-Varianten, K-Ras 4A und 4B. In PANC-1-Zellen wurde bisher insbesondere die Expression von K-Ras und N-Ras nachgewiesen. Zudem konnte für PANC-1-Zellen gezeigt werden, dass das K-*ras*-Gen eine Punktmutation in

Kodon 12 (G12D) trägt, welche zur Expression konstitutiv-aktiver K-Ras-Proteine in diesen Zellen führt (Giehl et al. 2000). Da in unserer Arbeitsgruppe eine N-Ras-Aktivierung nach Behandlung von PANC-1-Zellen mit EGF demonstriert werden konnte, erfolgte in dem folgenden Versuch eine Fokussierung auf diese Ras-Isoform.

Zur Untersuchung des Einflusses der GDNF-Konzentration auf die Ras-Aktivität, wurden PANC-1-Zellen für 24 Std. in serumfreiem DMEM-Medium inkubiert und anschließend für 3 min mit 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml GDNF oder 30 ng/ml EGF behandelt. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert und Ras-GTP wurde mit Hilfe von GST-RBD aus 0,6 mg Gesamtprotein je Ansatz isoliert. Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und N-Ras-GTP wurde im Immunoblot mit einem anti-N-Ras-Antikörper detektiert. Zur Kontrolle der Ras-Expression wurden außerdem 30 µg RIPA-Lysat je Ansatz separat über SDS-PAGE aufgetrennt und die N-Ras-Proteine ebenfalls spezifisch im Immunoblot nachgewiesen. Abbildung 22 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Ras-GTP-Bindungsversuches (n = 2).

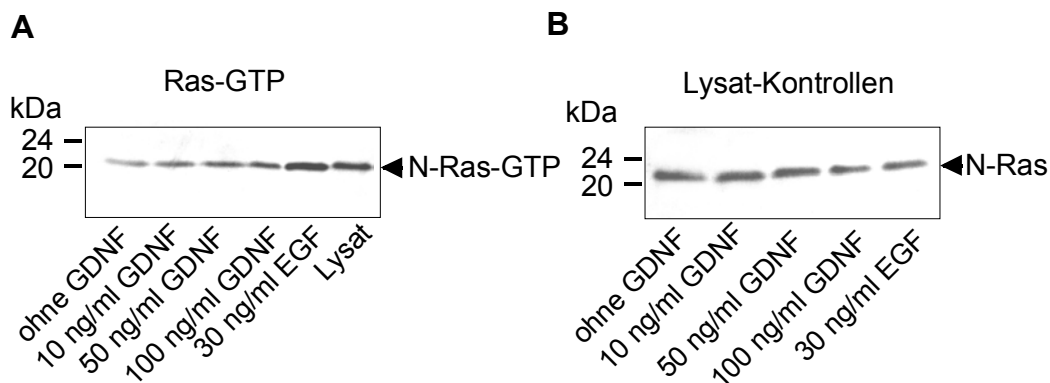


Abb. 22: Einfluss verschiedener GDNF-Konzentration auf die Ras-Aktivität in PANC-1-Zellen. **A,** Ausgehungerte PANC-1-Zellen wurden für 3 min mit den angegebenen GDNF-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde aktives Ras-GTP mit GST-RBD aus 0,6 mg RIPA-Lysaten je Ansatz präzipitiert. Zellen ohne Behandlung und solche, die für 3 min mit 30 ng/ml EGF inkubiert worden waren, dienten als Positiv-Kontrollen. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und aktives N-Ras-GTP wurde mit einem N-Ras-spezifischen Antikörper im Immunoblot detektiert. **B,** Zur Überprüfung der im Ras-GTP-Bindungsversuch eingesetzten Proteinmengen, wurden je 1/10 der RIPA-Lysate in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die N-Ras-Proteine im Immunoblot mit einem anti-N-Ras-Antikörper nachgewiesen.

Die Inkubation von PANC-1-Zellen mit GDNF, führte zu einer ca. 1,5fachen Zunahme der N-Ras-GTP-Menge im Vergleich zu Zellen ohne GDNF-Behandlung. Die maximale N-Ras-Aktivierung war bereits bei einer GDNF-Konzentration von 10 ng/ml erreicht, welche sich auch durch Verwendung der 10fachen GDNF-Konzentration nicht weiter steigern ließ.

Damit konnte in dieser Arbeit mit Hilfe der Ras-Bindungsversuche gezeigt werden, dass der neurotrophe Faktor GDNF in PANC-1-Zellen nach 3 Minuten zu einer N-Ras-Aktivierung in diesen Zellen führt.

7.4.1.3 Einfluss dominant-negativer H-Ras(S17N)-Proteine auf die GDNF-induzierte Migration

In unserer Arbeitsgruppe wurden kürzlich PANC-1-Zellklone generiert, die dominant-negatives H-Ras(S17N) als EGFP-Fusionsproteine stabil exprimieren. Die Funktionalität der EGFP-H-Ras(S17N)-Fusionsproteine wurde anschließend in Ras-GTP-Präzipitationsversuchen verifiziert und die H-Ras-Mutanten standen dann für die Charakterisierung der Ras-Funktion in PANC-1-Zellen zur Verfügung.

Um zu untersuchen, ob die Ras-Aktivität für die GDNF-induzierte Chemotaxis von PANC-1-Zellen notwendig ist, wurden im modifizierten *Boyden*-Kammer-System Migrationsstudien mit EGFP-H-Ras(S17N)-exprimierenden PANC-1-Zellen durchgeführt. PANC-1-Zellen, die das EGFP-Protein stabil exprimierten, dienten als Kontrolle. Für die Migrationsversuche wurden EGFP- und EGFP-H-Ras(S17N)-exprimierende PANC-1-Zellen auf porösen PET-Membranen in Zellkultureinsätzen ausgesät und die Proliferation durch Behandlung mit dem Zytostatikum Mitomycin C unterbunden. Die Migration der Zellen wurde nach 40 Std. Inkubation mit 10 ng/ml GDNF oder 10 μ M LPA analysiert. Für die Quantifizierung der gewanderten Zellen wurden je Ansatz drei repräsentative Gesichtsfelder ausgezählt. Für alle Migrationsversuche wurden von den EGFP-exprimierenden PANC-1-Zellen Klon 21 und von den EGFP-H-Ras(S17N)-exprimierende Zellen die Klone 2 und 4 eingesetzt. Das Balkendiagramm in Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse eines Migrationsversuches (n = 3).

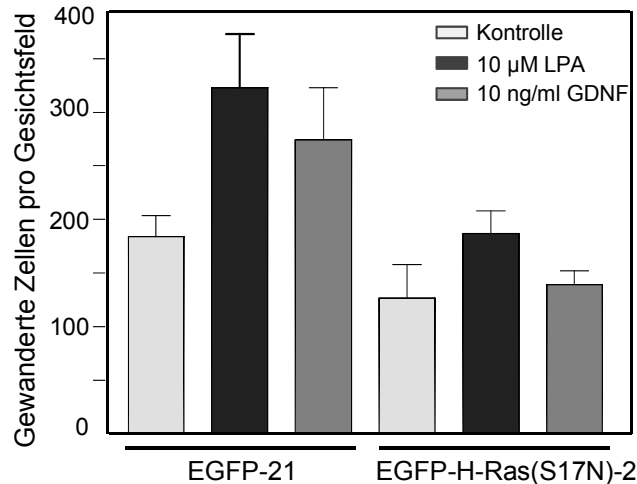


Abb. 23: Einfluss von H-Ras(S17N) auf die GDNF-induzierte Migration von PANC-1-Zellen. In modifizierten *Boyden*-Kammern wurden Migrationsversuche mit PANC-1-Zellklone durchgeführt, welche die Proteine EGFP und EGFP-H-Ras(S17N) stabil exprimieren. Die Chemotaxis der Zellen wurde durch Zugabe von 10 ng/ml GDNF oder 10 µM LPA induziert. Unbehandelte PANC-1-Zellen dienten jeweils als Kontrolle. Nach 40 Std. wurden die gewanderten Zellen durch Auszählen von drei willkürlich gewählten Gesichtsfeldern am Lichtmikroskop quantifiziert (200fache Vergrößerung). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM der gewanderten Zellen eines repräsentativen Versuches ($n = 3$).

Die Inkubation von EGFP- und EGFP-H-Ras(S17N)-exprimierenden PANC-1-Zellen mit 10 ng/ml GDNF oder 10 µM LPA führte in allen Migrationsversuchen zur Induktion einer chemotaktischen Antwort gegenüber unbehandelten Zellen. Die Zugabe von Faktoren zu EGFP-exprimierenden PANC-1-Zellen führte dabei zu einer Zunahme der Zellwanderung um das 1,54fache \pm 0,082 (GDNF) oder 1,74fache \pm 0,016 (LPA). Dagegen fiel die Zunahme der Migration nach Inkubation von EGFP-H-Ras(S17N)-exprimierenden Zellen mit GDNF oder LPA um durchschnittlich 19,4 % (GDNF) bzw. 12,5 % (LPA) geringer aus (s. Tabelle 2). Die Expression eines dominant-negativen H-Ras(S17N)-Proteins in PANC-1-Zellen reduzierte damit die Zunahme der Zellmigration durch GDNF und LPA im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Zellen. Die Auswertung der Migrationsversuche zeigt Tabelle 2.

PANC-1-Zellklon:	Zunahme der Migration		Abnahme der Migration	
	10 µM LPA ($n = 2$)	10 ng/ml GDNF ($n = 2$)	LPA	GDNF
pEGFP-C3 Klon 21:	1,74 \pm 0,016	1,54 \pm 0,082		
H-Ras(S17N) Klon 2:	1,39 \pm 0,08	1,15 \pm 0,193	- 20 %	- 25 %
H-Ras(S17N) Klon 4:	1,65 \pm 0,046	1,327 \pm 0,373	- 5 %	- 13,8 %

Tab. 2: Vergleich der Steigerung der Zellmigration bei EGFP- und EGFP-H-Ras(S17N)-exprimierenden PANC-1-Zellen. Steigerung der Migration \pm SEM von EGFP- und EGFP-H-Ras(S17N)-exprimierenden Zellklonen nach Zugabe von LPA oder GDNF gegenüber Zellen ohne Faktor-Zugabe. Prozentuale Abnahme der Chemotaxis von EGFP-H-Ras(S17N)-exprimierenden Zellen im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Zellen.

7.4.1.4 Einfluss von MEK1 auf die GDNF-induzierte Migration von PANC-1-Zellen

In Migrationsversuchen mit dem MEK1-Inhibitor PD98059 wurde die Relevanz der Proteinkinase MEK1 für die GDNF-induzierte Chemotaxis von PANC-1-Zellen in einem modifizierten *Boyden*-Kammer-System analysiert. PANC-1-Zellen wurden für 24 Std. in serumfreiem DMEM-Medium ausgehungert, und durch Zugabe des Zytostatikums Mitomycin C wurde die Proliferation dieser Zellen gehemmt. Anschließend wurden die Zellen für 40 Std. mit 10 ng/ml GDNF oder 10 μ M LPA in An- oder Abwesenheit des MEK1-Inhibitors PD98059 (10 μ M bzw. 25 μ M) behandelt. Ansätze ohne Faktor, mit oder ohne 25 μ M PD98059, dienten als Kontrollen. Die Quantifizierung der gewanderten Zellen erfolgte durch Auszählen von drei repräsentativen Gesichtsfeldern je Ansatz am Lichtmikroskop. Abbildung 24 zeigt die statistische Auswertung von drei unabhängigen Versuchen. Die Migration wurde als Vielfaches der Kontrolle angegeben.

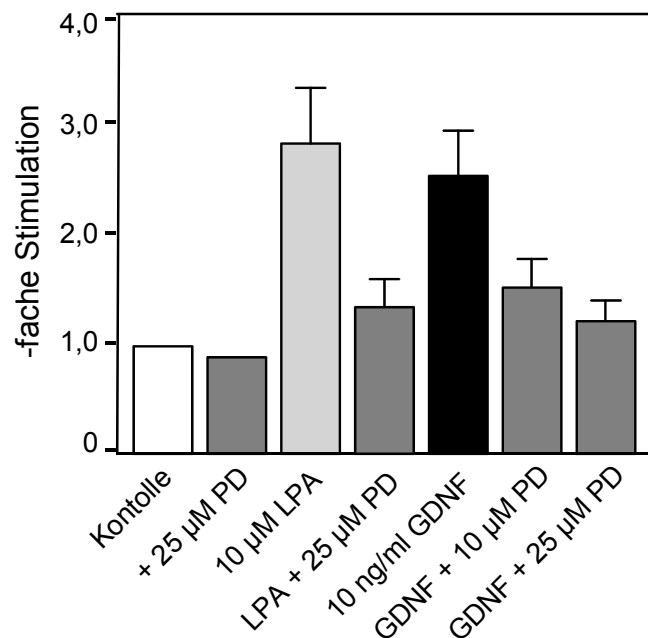


Abb. 24: Einfluss des MEK-1-Inhibitors PD98059 auf die GDNF-induzierte Migration. Die Chemotaxis von PANC-1-Zellen wurde in einem modifizierten *Boyden*-Kammer-System nach Zugabe von 10 ng/ml GDNF oder 10 μ M LPA in An- oder Abwesenheit von PD98059 (10 μ M und 25 μ M) untersucht. Die Darstellung zeigt die -fache Stimulation migrierter Zellen nach Faktor-Behandlung bezogen auf die Wanderung von Zellen ohne Faktor gemittelt aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Zugabe von GDNF führte bei PANC-1-Zellen zu einer Zunahme der Migration um das ca. 2,5fache (SEM \pm 0,24) bezogen auf die Anzahl gewanderter Zellen im Kontrollansatz. Hierbei war die durch GDNF induzierte Migration ähnlich hoch wie nach Behandlung der Zellen mit LPA. Die Inhibition der MEK-ERK-Kaskade durch den MEK1-Inhibitor hatte sowohl bei GDNF- als auch bei LPA-behandelten Zellen einen deutlichen Rückgang der Zellwanderung zur Folge. Dieser lag bei GDNF und LPA (jeweils 25 μ M) bei ca. 53 %. Dagegen konnte die Spontanwanderung der Zellen im Kontrollansatz durch Zugabe von 25 μ M PD98059 nur um ca. 15 % gesenkt werden. Bei GDNF war die Hemmung außerdem abhängig von der eingesetzten PD98059-Konzentration (ca. 12 % Unterschied zwischen 10 μ M und 25 μ M PD98059).

Die Migrationsstudien verdeutlichten, dass eine MEK1-Aktivierung für die GDNF- und LPA-induzierte Chemotaxis von PANC-1-Zellen notwendig ist. Da die Zellwanderung in Ansätzen mit dem MEK1-Inhibitor jedoch nicht wieder den Basalwert erreichte, war entweder die eingesetzte PD98059-Konzentration zu gering, oder es gibt in PANC-1-Zellen noch andere Signalwege, die für die GDNF-induzierte Migration erforderlich sind.

7.4.2 Einfluss von GDNF auf die Aktivität von Rac und JNK/SAPK in PANC-1-Zellen

Für neuronale Zellen konnte gezeigt werden, dass GDNF neben der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade noch eine weitere *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Kaskade aktiviert. Die beiden wichtigsten Signalmoleküle dieser weiteren Signaltransduktionskaskade sind die kleine GTPase Rac und die MAP-Kinase JNK/SAPK (*c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*). Um den Einfluss von GDNF auf diese Signalmoleküle in PANC-1-Zellen zu untersuchen, wurde eine mögliche Aktivierung von Rac in Rac-GTP-Bindungsversuchen und von JNK in *in vitro* Phosphorylierungsversuchen näher analysiert.

7.4.2.1 Einfluss von GDNF auf die Rac-GTP-Menge in PANC-1-Zellen

Expression von GST und GST-PAK-CD

Wie bei kleinen GTPasen der Ras-Familie erfolgt auch bei Rac der Übergang von einem inaktiven in einen aktiven Zustand durch einen Austausch von GDP durch GTP. Um einen möglichen Einfluss von GDNF auf die Rac-Aktivität zu analysieren, wurden Rac-GTP-

Präzipitationsversuche durchgeführt (Sander et al., 1998). Hierzu wurde zunächst die GTPase-Bindungsdomäne (CRIB domain) aus dem Rac/Cdc42-Effektorprotein PAK1b (p21-*activated protein kinase* 1b), an die aktives Rac-GTP mit hoher Affinität bindet (Manser et al., 1994), als GST-PAK-CD-Fusionsprotein hergestellt. Die Proteine GST (Glutathion-S-Transferase) und GST-PAK-CD wurden in *E. coli*-Bakterien exprimiert und anschließend an Glutathion Sepharose™ 4B gekoppelt (zur GST-PAK-CD-Expression s. a. Methoden unter 6.1.4.2). Zur Quantifizierung wurden verschiedene Mengen GST und GST-PAK-CD gebunden an Glutathion-Sepharose™ 4B sowie verschiedene BSA-Mengen in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Abbildung 25 zeigt exemplarisch ein solches Gel nach Färbung mit *Coomassie*-Blau.

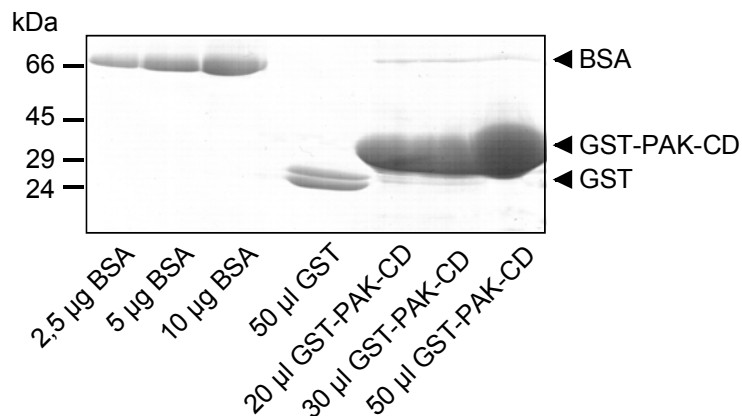


Abb. 25: Expression und Quantifizierung von GST und GST-PAK-CD. Für den Expressions-Nachweis und die Quantifizierung von GST und GST-PAK-CD wurden verschiedene Mengen GST (27 kDa) und Sepharose-präzipitierte GST-PAK-CD (36 kDa) über SDS-PAGE aufgetrennt, und die Proteine anschließend durch Färben des Gels mit *Coomassie*-Blau visualisiert. Als Kontrolle dienen verschiedene BSA-Mengen (67 kDa).

Eine semi-quantitative Bestimmung der GST- und GST-PAK-CD-Mengen erfolgte durch Vergleich der jeweiligen Proteinbanden mit dem BSA-Standard. Für einen Rac-GST-PAK-Präzipitationsversuche wurden 30-50 µg GST-PAK-CD und 60 µg GST je Versuchsansatz eingesetzt.

Rac-GTP-Präzipitationsversuche

Für die Rac-GTP-Bindungsversuche wurden ausgehungerte PANC-1-Zellen für 1 min, 2 min, 5 min und 10 min mit 10 ng/ml GDNF inkubiert. Ein Ansatz mit PANC-1-Zellen ohne Faktor diente als Kontrolle. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert und Rac-GTP aus 1 mg RIPA-Lysat je Ansatz mit GST-PAK-CD-Sepharose präzipitiert. Die Detektion und Quantifizierung von Rac-GTP erfolgte nach SDS-PAGE mit einem anti-Rac-Antikörper im Immunoblot. Zur

Kontrolle der für den Präzipitationsversuch eingesetzten Rac-Mengen wurden je 1/10 der Ansätze in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und Rac mit einem anti-Rac-Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. In Abbildung 26 ist das Ergebnis eines Rac-GTP-Bindungsversuches zu sehen (n = 3).

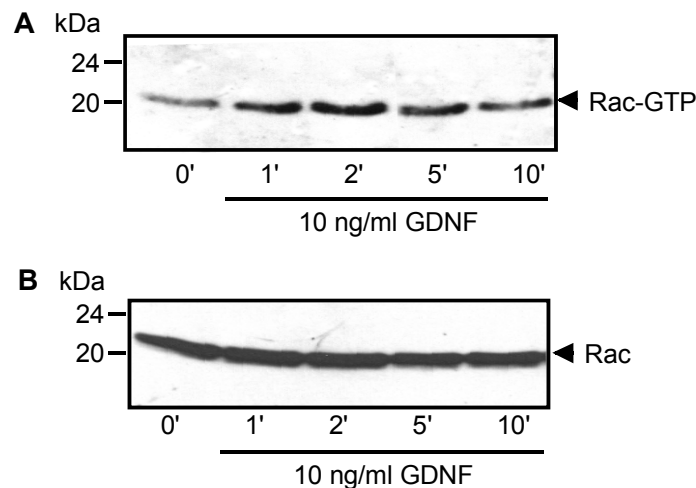


Abb. 26: Einfluss von GDNF auf die Aktivität der kleinen GTPase Rac in PANC-1-Zellen. **A**, Ausgehungerte PANC-1-Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit 10 ng/ml GDNF behandelt. Es wurden RIPA-Lysate hergestellt und Rac-GTP wurde mit GST-PAK-CD aus 1 mg RIPA-Lysat je Ansatz präzipitiert. Der Nachweis von Rac-GTP erfolgte im Immunoblot mit einem anti-Rac-Antikörper. **B**, Zur Kontrolle der für die Präzipitation von Rac-GTP eingesetzten Rac-Mengen wurden je 1/10 der RIPA-Lysate in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und Rac mit einem anti-Rac-Antikörper detektiert.

Die Inkubation von PANC-1-Zellen mit 10 ng/ml GDNF führte nach 2 min zu einer maximalen Rac-Aktivität, welche ca. 2,5mal so hoch war wie die Rac-Aktivität unbehandelter Zellen. Die Ergebnisse aus diesem und zwei weiteren Präzipitationsversuchen zeigten damit, dass Rac durch den neurotrophen Faktor GDNF aktiviert wird und eine GDNF-Konzentration von 10 ng/ml dafür bereits ausreicht.

7.4.2.2 Einfluss von GDNF auf die JNK-Aktivität in PANC-1-Zellen

Um den Einfluss des neurotrophen Faktors GDNF auf die JNK-Aktivität zu untersuchen, wurden in serumfreiem DMEM-Medium ausgehungerte PANC-1-Zellen für 5 min, 10 min, 15 min und 30 min sowie 1 Std. und 2 Std. mit 100 ng/ml GDNF inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte PANC-1-Zellen. Da Stressoren wie Hitze zu einer maximalen Aktivierung des Rac-regulierten Signalweges und damit von JNK führen (Davies et al., 1994; Minden et al., 1994), wurden Zellen im Kontrollansatz für 20 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Die Aktivität der immunpräzipitierten JNK wurde in einem *in vitro* Phosphorylierungsversuch analysiert. Als Substrat für die aktive Kinase diente das

Fusionsprotein GST-c-Jun, dessen Phosphorylierung als Maß für die JNK-Aktivität genutzt wurde. Die Phosphorylierungsansätze wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das radioaktiv-markierte GST-c-Jun autoradiographisch detektiert. Zur Überprüfung der für die Phosphorylierungsreaktion eingesetzten Proteinmengen wurde je 1/3 der Ansätze nach Immunpräzipitation von JNK in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die JNK-Proteine wurden mit einem anti-JNK-Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. In Abbildung 27 ist das Ergebnis eines Experimentes (n = 2) dargestellt.

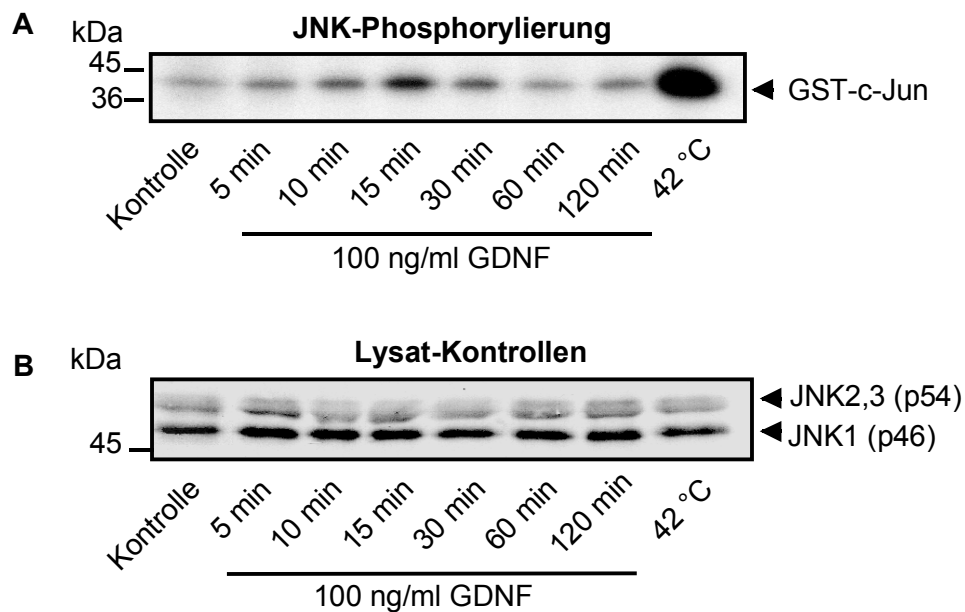


Abb. 27: JNK-Aktivierung in PANC-1-Zellen nach Behandlung mit GDNF. **A**, Ausgehungerte PANC-1-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 ng/ml GDNF behandelt und die JNK-Aktivität in einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit GST-c-Jun als Substrat bestimmt. PANC-1-Zellen, welche für 20 min bei 42 °C inkubiert worden waren, dienen als Positiv-Kontrolle. Die Visualisierung des phosphorylierten GST-c-Jun's erfolgte über Autoradiographie. **B**, Zur Überprüfung der in der Phosphorylierungsreaktion eingesetzten JNK-Mengen wurde 1/3 der immunpräzipitierten JNK je Ansatz in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit einem anti-JNK-Antikörper im Immunoblot nachgewiesen.

Die Behandlung von PANC-1-Zellen mit 100 ng/ml GDNF führte zu einer deutlichen Zunahme der JNK-Aktivität, welche nach 15 min einen maximalen Wert erreichte. Die stärkste JNK-Aktivierung konnte bei der Positiv-Kontrolle durch Hitze-Behandlung (42 °C) der Zellen hervorgerufen werden.

Sowohl Rac, als auch JNK, konnten durch Inkubation von PANC-1-Zellen mit GDNF deutlich aktiviert werden. Die maximal Aktivität der beiden Proteine wurde nach unterschiedlichen Zeiten erreicht. Da beide Proteine Teil der Rac-MEKK1-MKK4-

JNK/SAPK-Kaskade sind (Minden et al., 1994), wäre es denkbar, dass GDNF zu einer Aktivierung des gesamten Signalweges in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 führt. Ob dieser Signalweg, und insbesondere Rac, darüber hinaus an der GDNF-induzierten Migration von PANC-1-Zellen beteiligt ist, wird Gegenstand zukünftiger Experimente sein. Da Rac auch über die Organisation des Zytoskelettes die Ausbildung von Lamellipodien und *membrane ruffles* induziert, ist eine Involvierung der kleinen GTPase an GDNF-induzierten Wanderungsvorgängen wahrscheinlich.

7.4.3 Einfluss von GDNF auf die PI3-Kinase-Aktivität und Relevanz für die Chemotaxis von PANC-1-Zellen

7.4.3.1 Untersuchung der PI3-Kinase-Aktivität

In neuronalen Zellen konnte gezeigt werden, dass GDNF über den Ret-Rezeptor zu einer Aktivierung PI3-Kinase-abhängiger Signalwege führt. Die wichtigsten Effektoren der PI3-Kinase sind hierbei die Proteinkinase Akt/PKB und die kleine GTPase Rac1.

Als nächstes wurde daher der Einfluss von GDNF auf die PI3-Kinase-Aktivität in PANC-1-Zellen analysiert. Als Maß für die PI3-Kinase-Aktivität diente hierbei die Ser(473)-Phosphorylierung der Proteinkinase Akt/PKB, welche einen wichtigen Effektor der PI3-Kinase darstellt. In serumfreiem DMEM-Medium ausgehungerte PANC-1-Zellen wurden für 7 min mit 50 ng/ml GDNF oder 10 μ M LPA inkubiert (vgl. Soler et al., 1999). Je ein Ansatz mit GDNF oder LPA wurde außerdem für 20 min mit 30 μ M PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 präinkubiert. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer mit Phosphataseinhibitoren lysiert und die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt/PKB nach SDS-PAGE im Immunoblot mit einem anti-P-Ser(473)-Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis der Akt/PKB-Expression in PANC-1-Zellen erfolgte mit einem anti-Akt/PKB-Antikörper. Abbildung 28 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Versuches (n = 2).

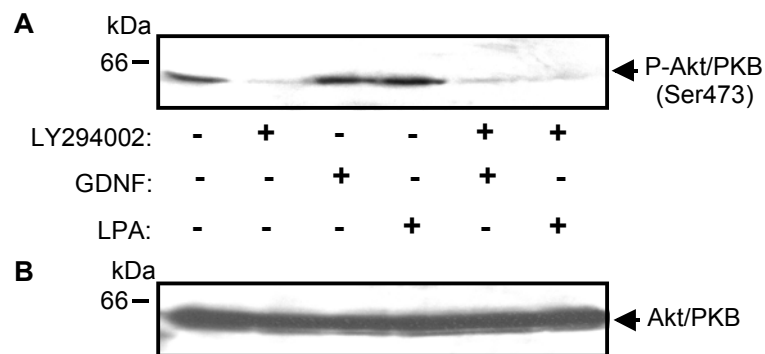


Abb. 28: Einfluss von GDNF auf die Ser(473)-Phosphorylierung der Proteinkinase Akt/PKB. Ausgehungerte PANC-1-Zellen wurden für 7 min mit 50 ng/ml GDNF oder 10 μ M LPA in An- oder Abwesenheit des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 (30 μ M, 20 min Präinkubation) inkubiert. Zwei Ansätze mit unbehandelten PANC-1-Zellen mit oder ohne LY dienten als Kontrollen. **A**, Die Akt/PKB-Aktivität wurde mit einem anti-P-Ser(473)-Antikörper im Immunoblot überprüft. **B**, Der Nachweis der Akt/PKB-Expression in PANC-1-Zellen erfolgte nach Auftrennung von je 80 μ g RIPA-Lysat in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel im Immunoblot mit einem anti-Akt/PKB-Antikörper.

Die Versuche zeigten, dass in ausgehungerten PANC-1-Zellen bereits eine basale Aktivität der Proteinkinase Akt/PKB vorliegt, welche durch Inkubation der Zellen mit den Faktoren GDNF oder LPA nicht weiter gesteigert werden kann. Der Rückgang der Ser(473)-Phosphorylierung in Ansätzen mit LY294002 zeigte zudem, dass die basale Ser(473)-Phosphorylierung in PANC-1-Zellen in PI3-Kinase-abhängiger Weise reguliert wird.

7.4.3.2 Relevanz der PI3-Kinase für die GDNF-induzierte Migration

Um die Frage zu klären, ob die PI3-Kinase-Aktivität für die GDNF-induzierte Migration von PANC-1-Zellen von Bedeutung ist, wurden Migrationsversuche mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 in einem modifizierten *Boyden*-Kammer-System durchgeführt. PANC-1-Zellen wurden auf porösen Membranen in Zellkultureinsätze ausgesät und mit 10 ng/ml GDNF oder 10 μ M LPA in An- oder Abwesenheit von 10 μ M oder 25 μ M LY294002 für 40 Std. inkubiert. Ansätze ohne Faktor mit oder ohne LY294002 dienten als Kontrollen. Die Quantifizierung der gewanderten Zellen erfolgte durch Auszählen von drei willkürlich gewählten Gesichtsfeldern am Lichtmikroskop. Abbildung 29 zeigt die statistische Auswertung von drei Migrationsversuchen. Die basale Zellwanderung der Zellen im Kontrollansatz wurde auf eins normiert und die Migration der Zellen in den verschiedenen Versuchsansätzen wurden als Vielfaches dieses Wertes \pm SEM angegeben.

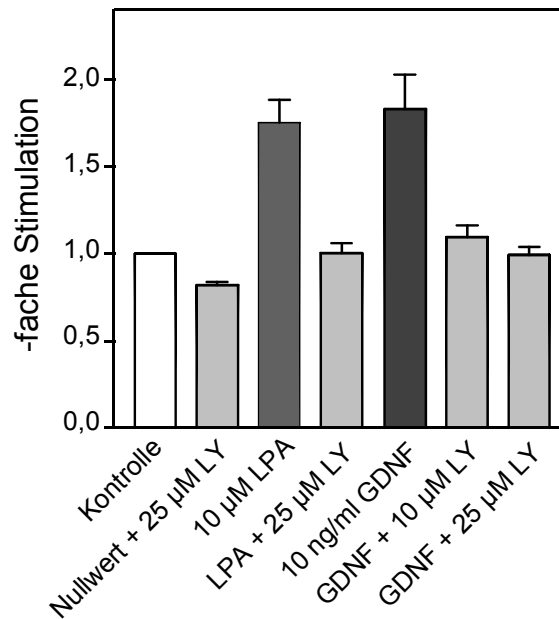


Abb. 29: Einfluss des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 auf die GDNF- oder LPA-induzierte Migration von PANC-1-Zellen. PANC-1-Zellen wurden in einem modifizierten *Boyden*-Kammer-System auf porösen (8 µm) Membranen ausgesät und in An- oder Abwesenheit des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 (10 µM oder 25 µM) für 40 Std. mit 10 ng/ml GDNF oder 10 µM LPA kultiviert. Die Quantifizierung der gewanderten Zellen erfolgte durch Auszählen von drei repräsentativen Gesichtsfeldern am Lichtmikroskop (200fache Vergrößerung). Die Darstellung zeigt die statistische Analyse von drei unabhängigen Migrationsversuchen. Die Anzahl gewanderter Zellen wurden als Vielfaches der auf eins normierten Zellwanderung im Kontrollansatz angegeben.

Die Migrationsstudien mit dem PI3-Kinase-Inhibitor zeigten, dass die Aktivität der PI3-Kinase und nachgeschalteter Signalwege für die GDNF-induzierte Chemotaxis von PANC-1-Zellen notwendig ist. Sowohl die Inkubation der Zellen mit 10 µM LPA, als auch mit 10 ng/ml GDNF führten zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl gewanderter Zellen gegenüber unbehandelten Zellen. Nach Zugabe des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 in Versuchsansätzen mit LPA oder GDNF, wurde die Migration nahezu vollständig gehemmt.

7.5 Klonierung und Expression des Ret-Rezeptors

7.5.1 Klonierung der Ret51-cDNA-Sequenz aus PANC-1-Zellen in den pEGFP-N1-Vektor

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die kodierende DNA-Sequenz der langen Ret51-Isoform aus PANC-1-Zellen isoliert und in den eukaryontischen pEGFP-N1-Vektor kloniert. Die wildtypische Ret51-cDNA-Sequenz sollte als Ausgangssequenz zur Herstellung verschiedener Mutanten dienen. Geplant sind Kinase-defiziente, dominant-negative Mutanten,

oder Mutanten, in welchen die Konsensussequenzen für die Bindung spezifischer Adapter- und Effektormoleküle durch den Austausch bestimmter Aminosäurereste mutiert wären. Durch Transfektion Ret/GFR α -negativer oder -positiver eukaryontische Zellen mit diesen Ret-Mutanten könnte so der Einfluss des Ret-Proteins auf die GDNF-induzierte Migration analysiert und die Bedeutung einzelner Adapter- und Effektormoleküle sowie nachgeschalteter Signalwege auf die Motilität dieser Zellen charakterisiert werden. Darüber hinaus könnten nach zusätzlicher PCR-Amplifikation und Klonierung der kurzen Ret9-Isoform aus PANC-1-Zellen Isoform-spezifische Unterschiede in bezug auf die GDNF-induzierte Migration analysiert werden.

Für die Klonierung der langen Ret51-Isoform in den pEGFP-N1-Vektor wurden über RT-PCR zwei überlappende Ret-Fragmente generiert, ein Ret 5'-Fragment (1194 bp) und ein Ret 3'-Fragment (2583 bp). Diese wurden anschließend in mehreren Klonierungsschritten über eine *KpnI*-Schnittstelle innerhalb der kodierenden *c-ret*-DNA zur vollständigen Ret51-Sequenz im pEGFP-N1-Vektor zusammengesetzt (schematische Abbildung 30).

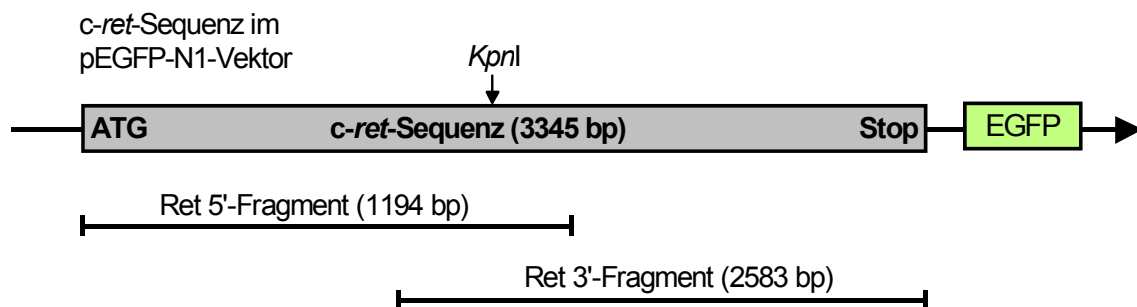


Abb. 30: Lage der Ret-Fragmente. Über PCR wurden zwei Ret-Fragmente (1194 bp, 2583 bp) generiert, welche anschließend über die *single cut*-Schnittstelle *KpnI* zur vollständigen Ret51-Sequenz (3345 bp) im pEGFP-N1-Vektor kombiniert wurden.

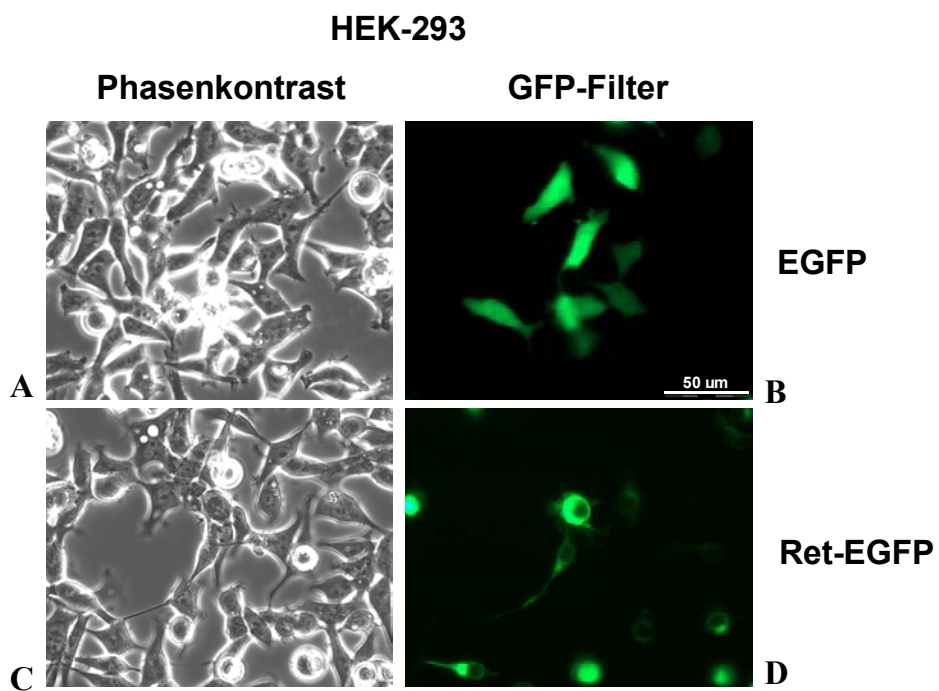
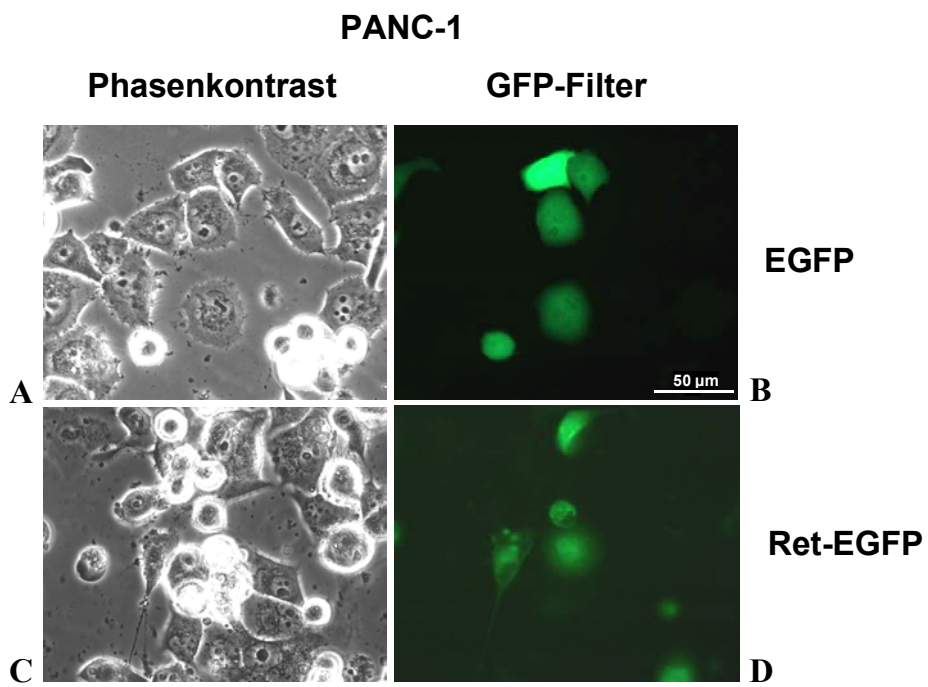
Die einzelnen Klonierungsschritte zur Herstellung eines Ret-EGFP-Expressionsvektors, ausgehend von den Ret RT-PCR-Fragmenten, sind im Methoden-Teil (6.2.16) detailliert dargestellt. Die Ret51-Sequenz wurde wie bei der Sequenzanalyse mit verschiedenen Oligonukleotiden und *primer walking* verifiziert. Die Expression des Ret-EGFP-Fusionsproteins in eukaryontischen Zellen wurde in Transfektionsexperimenten nachgewiesen.

7.5.2 Charakterisierung der Ret-EGFP-Expression

PANC-1- und HEK-293-Zellen wurden mit den Plasmiden pEGFP-N1 und pEGFP-N1/Ret51 transfiziert, und die Expression der Proteine EGFP und Ret51-EGFP wurde nach 48 Std. mittels Fluoreszenzmikroskop-Analysen überprüft. Die in Abbildung 31 dargestellten Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop durch Anregung der EGFP-Proteine bei einer Wellenlänge von 488 nm gemacht. Die jeweiligen Phasenkontrastaufnahmen dienten zur Kontrolle der Zellmorphologie.

Zu den Abbildungen auf der folgenden Seite:

Abb. 31: Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen von PANC-1 und HEK-293-Zellen. PANC-1- und HEK-293-Zellen wurden mit dem pEGFP- und pEGFP/Ret-Vektor transfiziert. Nach 48 Std. wurde die Expression des EGFP- bzw. Ret-EGFP-Proteins in Fluoreszenzmikroskop-Analysen verifiziert. Die Fluoreszenzaufnahmen auf der rechten Seite (**B+D**) entstanden nach Anregung der EGFP-Proteine bei 488 nm. Die Phasenkontrastaufnahmen der entsprechenden Bildausschnitte zeigen die Zellmorphologie und ermöglichen die Identifizierung einzelner Zellen (**A+C**).



Ein spezifischer Nachweis der EGFP- und Ret-EGFP-Expression in PANC-1- und HEK-293-Zellen erfolgte über Immunoblot-Analysen. Dazu wurden 48 Std. nach Transfektion aus PANC-1- und HEK-293-Zellen zytosolische und partikuläre Fraktionen hergestellt. Verschiedene Proben der PANC-1- und HEK-293-Fraktionen wurden in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Für den EGFP-Nachweis wurden dazu 10 %ige und für den Ret-EGFP-Nachweis 7,5 %ige Gele verwendet. Abbildung 32 zeigt die Immunoblots nach Detektion der EGFP- und Ret-EGFP-Proteine mit einem spezifischen anti-GFP-Antikörper.

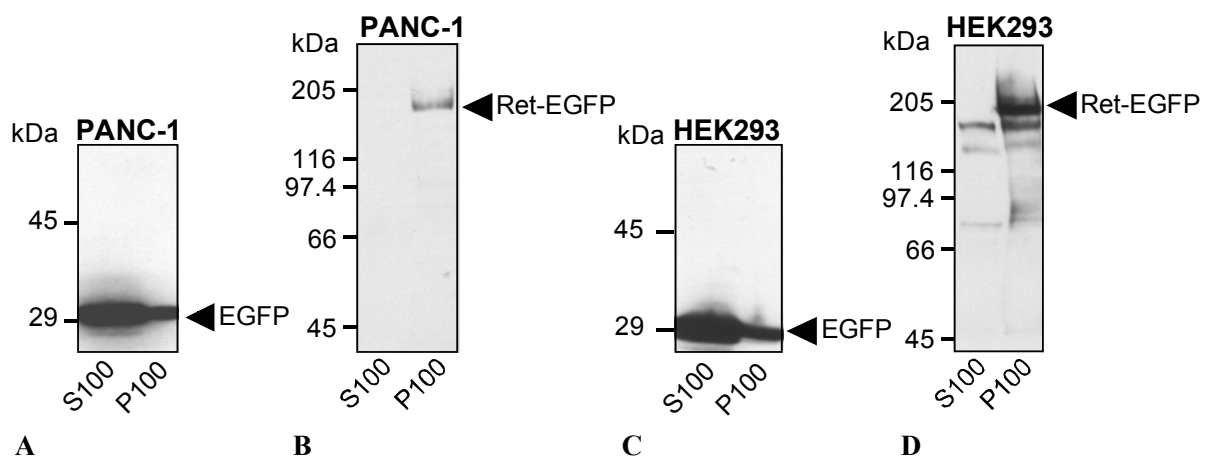


Abb. 32: Nachweis der EGFP- und Ret-EGFP-Expression in PANC-1 und HEK-293-Zellen. Für den Nachweis der Proteine EGFP und Ret-EGFP wurden verschiedene Proben der löslichen (S100) und partikulären (P100) Fraktionen von PANC-1- und HEK-293-Zellen in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von EGFP und EGFP-Ret im Immunoblot erfolgte mit einem anti-GFP-Antikörper nach ECL-Entwicklung. **A, C,** 10 %ige Gele für den EGFP-Nachweis. **B, D,** 7,5 %ige Gele für den Nachweis der Ret-EGFP-Fusionsproteine.

Die Transfektionsexperimente mit PANC-1- und HEK-293-Zellen zeigten, dass der Ret-Rezeptor als Ret-EGFP-Fusionsprotein in den Zellen exprimiert wird und in der partikulären Fraktion vorhanden ist. Die Fluoreszenzmikroskop-Analysen weisen darüber hinaus auf eine Lokalisation in der Zytoplasmamembran hin. Die Expression von Ret-EGFP in den epithelialen HEK-293-Nierenzellen führte dazu, dass die Zellen ihre morphologische Gestalt veränderten und sich abkugelten. Das EGFP-Protein zeigte in den Fluoreszenzanalysen eine diffuse Verteilung innerhalb der Zellen und wurden im Immunoblot sowohl in der löslichen als auch in der partikulären Fraktion nachgewiesen.

7.6 Regulation der Migration durch die kleinen GTPasen RhoA und RhoC

Schon länger ist bekannt, dass Rho-GTPasen im Zusammenhang mit der Regulation der Motilität von Zellen stehen. Kürzlich wurde zudem gezeigt (Suwa et al., 1998), dass in metastasierenden Pankreaskarzinomzellen die mRNA-Überexpression der RhoC-Isoform mit der perineuralen Invasion dieser Zellen korreliert. In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst die RhoC-Expression in verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien untersucht. Um darüber hinaus Isoform-spezifische Unterschiede in der Funktion von RhoC und RhoA charakterisieren zu können, wurden die cDNA-Sequenzen dieser beiden Rho-Isoformen (je 582 bp), sowie der konstitutiv-aktiven Mutante RhoA(G14V/F25N) und der dominant-negativen Mutante RhoA(T19N/F25N) in verschiedene pro- und eukaryontische Vektorsysteme kloniert (s. 6.2.15).

7.6.1.1 Untersuchung der RhoC-Expression in Pankreaskarzinomzellen

Um die RhoC-mRNA-Expression in verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien zu untersuchen, wurden RT-PCR-Analysen mit RhoC-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Abbildung 33 zeigt das Ergebnis.

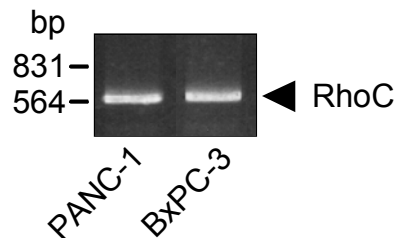


Abb. 33: Expression von RhoC in PANC-1- und BxPC-3-Zellen. Um die RhoC-Expression in PANC-1- und BxPC-3-Zellen auf mRNA-Ebene zu überprüfen, wurden PCRs bei einer *annealing*-Temperatur von 60 °C durchgeführt. Die verwendeten RhoC-spezifischen Oligonukleotide ermöglichten die Amplifikation der vollständigen 597 bp langen RhoC-cDNA.

Die RT-PCR-Analysen ergaben, dass beide Pankreaskarzinomzelllinien die RhoC-Isoform auf mRNA-Ebene deutlich exprimieren.

7.6.1.2 Klonierung der kodierenden RhoC-DNA-Sequenz aus BxPC-3-Zellen in verschiedene Vektorsysteme

Um die Frage zu klären, ob die RhoC-Expression einen Einfluss auf die Migration von Pankreaskarzinomzellen hat, wurde die aus BxPC-3-Zellen amplifizierte RhoC-DNA in

verschiedene pro- und eukaryontische Vektorsysteme kloniert. Die RhoC-RT-PCR-Fragmente wurden isoliert und aufgereinigt, und die Übereinstimmung der RhoC-cDNA-Sequenz mit der GenBank-Sequenz (Nr. 407698) wurde anhand von Sequenzierungen überprüft. Das RhoC-Fragment aus BxPC-3-Zellen wurde zunächst *blunt end* in einen mit *SmaI* linearisierten pKS(+)-Vektor subkloniert. Der pKS(+)/RhoC-Vektor diente als Ausgangsvektor für alle weiteren Klonierungen (s. a. 6.2.15). Der Nachweis des *rhoC*-cDNA-Fragmentes in unterschiedlichen Expressionsvektoren erfolgte durch Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen. In Abbildung 34 ist das Agarosegel nach Auftrennung von je 1/10 der Spaltansätze dargestellt.

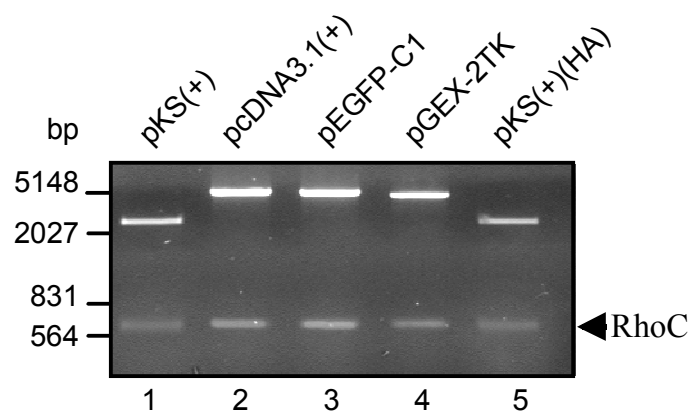


Abb. 34: Klonierung der RhoC-cDNA aus BxPC-3-Zellen in verschiedene pro- und eukaryontische Vektorsysteme. 1+2, RhoC aus pKS(+) (2,9 kb) und pcDNA3.1(+) (5,4 kb), gespalten mit *EcoRI/NotI*. 3 RhoC aus pEGFP-C1 (4,7 kb), gespalten mit *HindIII/BamHI*. 4 RhoC aus pGEX-2TK (4,9 kb), gespalten mit *BamHI/EcoRI*. 5 RhoC aus pKS(+)(HA), gespalten mit *NdeI/BamHI*.

7.6.1.3 Herstellung von EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellklonen

Um den Einfluss der kleinen GTPasen RhoA und RhoC auf das Migrations- und Invasionsverhalten von Pankreaskarzinomzellen untersuchen zu können, wurden PANC-1-Zellen stabil mit den Plasmiden pEGFP-C3 und pEGFP-C1/RhoC transfiziert. Um in späteren Migrationsexperimenten den Einfluss von RhoC mit dem von RhoA vergleichen zu können, wurden darüber hinaus PANC-1-Zellklone generiert, die das pEGFP-C2/RhoA-Plasmid stabil exprimieren. Die Selektion der EGFP- oder EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen erfolgte durch Kultivierung in G418-haltigem Medium und Expansion einzelner Zellklone nach Identifizierung am Fluoreszenzmikroskop. Abbildung 35 zeigt im Vergleich die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von PANC-1-Zellen, welche die Proteine EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC stabil exprimieren.

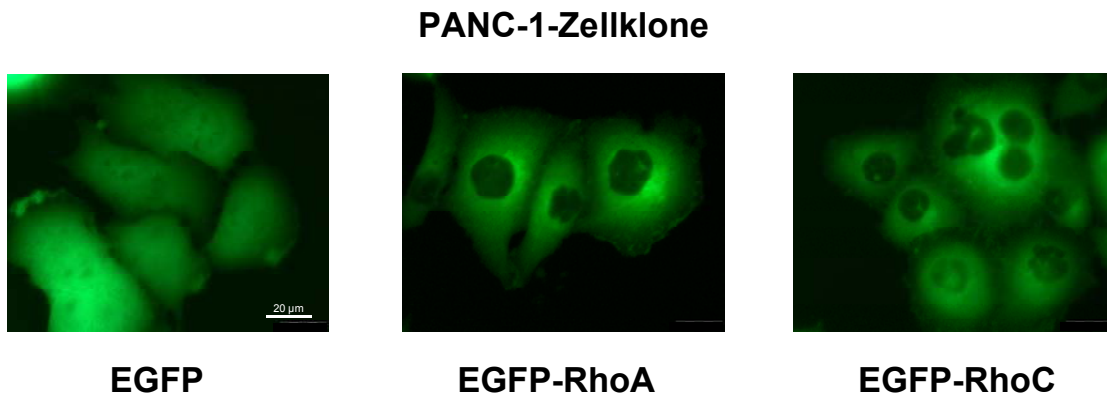


Abb. 35: Fluoreszenzmikroskopische Analysen von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen. Durch Anregung der EGFP-Proteine bei 488 nm konnte in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die jeweilige Lokalisation der Proteine charakterisiert werden. Während das EGFP-Protein in der gesamten Zelle und im Zellkern vorkommt, sind die EGFP-Rho-Fusionsproteine überwiegend im Zytosol lokalisiert. Darüber hinaus liegen die Fusionsproteine zu einem geringeren Anteil auch assoziiert an die Zytoplasmamembran vor.

Die Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen zeigten einen deutlichen Unterschied in der Lokalisation der Proteine EGFP und EGFP-Rho. Hierbei war das EGFP-Protein in der gesamten Zelle verteilt, während die EGFP-Rho-Fusionsproteine größtenteils im Zytosol vorlagen, daneben aber auch zu einem geringeren Teil an die Zytoplasma-Membran assoziiert waren. Eine Isoform-spezifische Verteilung der EGFP-Rho-Fusionsproteine in den Pankreaskarzinomzellen konnte nicht beobachtet werden. Morphologische Unterschiede waren in Phasenkontrastanalysen weder zwischen EGFP- und EGFP-Rho-exprimierenden, noch zwischen EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellklonen feststellbar.

Der spezifische Nachweis des ektopisch exprimierten EGFP-RhoC-Fusionsproteins sowie der endogen exprimierten Proteine RhoA und RhoC in verschiedenen PANC-1-Zellklonen erfolgte im Immunoblot mit einem anti-Rho-Antikörper. Abbildung 36 zeigt das Ergebnis für drei verschiedene EGFP-RhoC-exprimierende PANC-1-Zellklone.

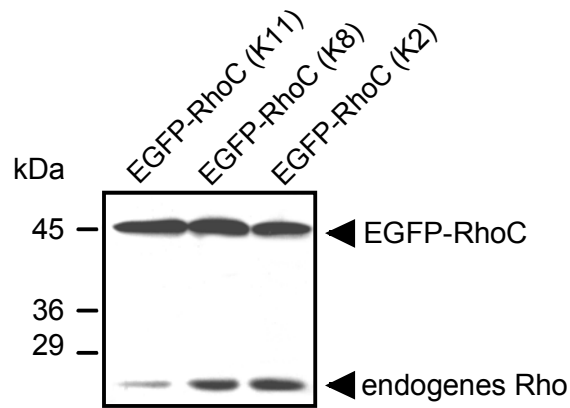


Abb. 36: Nachweis der EGFP-RhoC-Expression in verschiedenen PANC-1-Zellklonen. PANC-1-Zellen wurden mit Hilfe von DMRIE-C mit dem Plasmid pEGFP-C1/RhoC stabil transfiziert. Die Expression der EGFP-RhoC-Fusionsproteine (50 kDa) wurde nach Auftrennung von je 30 μ g RIPA-Lysat im Immunoblot mit einem anti-Rho-Antikörper nachgewiesen.

In den PANC-1-Zellklonen K11, K8 und K2 konnte eine vergleichbare EGFP-RhoC-Expression bei ca. 50 kDa nachgewiesen werden. Endogenes Rho war auf einer Höhe von 21 kDa nachweisbar.

7.6.1.4 Vergleich der Migrationseigenschaften von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden-PANC-1 Zellen

Mögliche Unterschiede in den Migrationseigenschaften von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellklonen wurden in *Boyden*-Kammer-Experimenten analysiert. Als Kontrollen dienten EGFP-exprimierende PANC-1-Zellklone sowie PANC-1-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Std. in serumfreiem DMEM-Medium ausgehungert. Die Proliferation wurde durch Behandlung mit Mitomycin C unterbunden. Für die Migrationsversuche wurden die PANC-1-Zellen und -Zellklone für 21 Std. in DMEM-Medium inkubiert und die untere Kammer mit DMEM-Medium + 10 % FCS als chemotaktisches Agens gefüllt. Die Anzahl gewanderter Zellen wurde anschließend am Lichtmikroskop ermittelt. Abbildung 37 zeigt die statistische Auswertung von drei unabhängigen Versuchen.

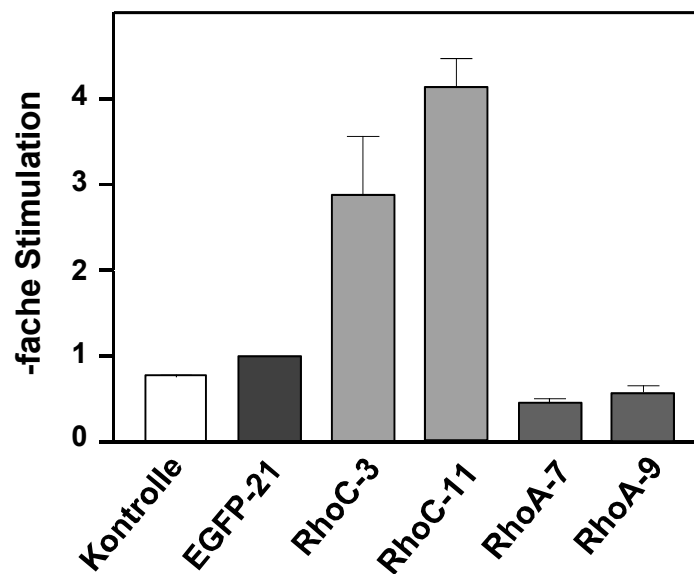


Abb. 37: Vergleich der Migration von EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden Zellen. PANC-1-Zellen/-Zellklone, welche die Proteine EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC stabil exprimieren, wurden für 24 Std. in serumfreiem DMEM-Medium ausgehungert und zur Unterbindung der Proliferation für 3 Std. mit Mitomycin C behandelt. Die PANC-1-Zellen/-Zellklone wurden dann für 21 Std. in modifizierten *Boyden*-Kammern inkubiert, in welchen die oberen Kammern mit DMEM-Medium und die unteren mit DMEM-Medium + 10 % FCS gefüllt waren. Angegeben ist das Vielfache der Stimulation der Migration \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Expression von EGFP-RhoC-Fusionsproteinen in PANC-1-Zellen führte zu einer Steigerung der gewanderten Zellen um das 3-4fache gegenüber der Kontrolle. Die Expression von EGFP und EGFP-RhoA hatte hingegen keinen steigernden Effekt auf die Zellmotilität dieser Zellen. Bei EGFP-RhoA-exprimierenden Zellklonen konnte sogar ein Rückgang der Zellwanderung um ca. 30-40 % gegenüber der Kontrolle beobachtet werden.

Damit zeigen die Migrationsexperimente zum einen, dass die RhoC-Expression die FCS-induzierte Chemotaxis von PANC-1-Zellen deutlich steigert, und zum anderen, dass RhoA und RhoC einen unterschiedlichen Einfluss auf die Motilität von PANC-1-Zellen haben.

8 Diskussion

8.1 Chemotaxis von Pankreaskarzinomzellen

Metastasierende Tumorzellen des exokrinen Pankreas infiltrieren in hohem Maße intra- und extrapancreatische periphere Nerven (Nakao et al., 1996; Takahashi et al., 1997; Ozaki et al., 1999). Histologische Studien zeigen, dass die Tumorzellen bis ins Endoneurium der Nervenfasern vordringen und hierbei das Gewebe zerstören. Durch Wanderung entlang von sympathischen Nervenfasern gelangen sie bis zum Ganglion coeliacum, dessen Befall ein Hauptkriterium für die Resektabilität des Primärtumors ist (Bockman et al., 1994; *manual der Chirurgische Klinik und Poliklinik der TU München*, 1997, <http://nt1.chir.med.tu-muenchen.de/manual/KLIFI60.HTM>). Die hohe Affinität der Tumorzellen zu peripheren Nerven macht eine chemotaktische Anlockung durch spezifische Chemokine und Zytokine wahrscheinlich (Ardestani et al., 1999). In diesem Zusammenhang konnten Zhu et al. kürzlich eine Überexpression des Neurotrophins β -NGF (β -*nerve growth factor*) und seines TrkA-Rezeptors in Pankreaskarzinomzellen nachweisen und eine Korrelation zwischen der Expression dieses Liganden und seines Rezeptors und der perineuralen Invasion (PNI) aufdecken (Zhu et al., 2001). Die erwähnte Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus demonstrieren, dass die Behandlung humaner Pankreaskarzinomzellen mit β -NGF zu einer gesteigerten Proliferation führt, obgleich die Zellen dieses Polypeptid selbst exprimieren. Die Beobachtungen von Miknyoczki et al., dass die Neurotrophine β -NGF, BDNF und NT3 die Invasivität verschiedener humaner Pankreaskarzinomzelllinien in Abhängigkeit von der Konzentration *in vitro* beeinflussen, ergänzten diese Ergebnisse (Miknyoczki et al., 1999).

Ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neuronale Faktoren zu identifizieren, die bei humanen Pankreaskarzinomzellen Chemotaxis induzieren und damit möglicherweise auch *in vivo* an der PNI von Pankreaskarzinomzellen beteiligt sind. Dazu wurde der Einfluss des Zellkulturüberstandes verschiedener neuronaler und glialer Zelllinien auf das Wachstums- und Wanderungsverhalten humaner Pankreaskarzinomzelllinien in Zellkultursystemen analysiert. Die zunächst durchgeführten Proliferationsversuche mit den konditionierten Medien der humanen neuronalen Zelllinien SK-N-SH, LS und SK-N-LO führten bei PANC-1-Zellen zu keiner Steigerung des Zellwachstums. Da die DNA-Synthese von PANC-1-Zellen nach Behandlung mit den konditionierten Medien sogar geringer war als die DNA-Synthese von Zellen in 0,1 % FCS, kann spekuliert werden, dass von den neuronalen

Zellen Faktoren sezerniert wurden, welche die DNA-Synthese in den Pankreaskarzinomzellen hemmen. Die Expression eines solchen Faktors, dem autokrin wirkenden *schwann cell growth-inhibitory factor* (SGIF), konnte für Schwann'sche Zellen gezeigt werden (Rushton et al., 1999). Ob ein entsprechender Faktor auch von den hier analysierten Zellen sezerniert wird, ist nicht bekannt.

Um das Migrationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen zu analysieren, wurden Kokultivierungsexperimente der Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1 und Mia PaCa-2 mit humanen, neuronalen SK-N-SH und murinen, glialen B49-Zellen durchgeführt. Es wurden zudem neuronale Primärkulturen aus den Mesencephali embryonaler Mäuse angelegt (E15) und die motogene Wirkung der konditionierten Medien in Migrationsexperimenten analysiert. Keiner der dargestellten Ansätze führte jedoch zu einem Anstieg der Zellwanderung der Pankreaskarzinomzellen. Dies könnte entweder bedeuten, dass kein chemotaktisch wirkender Faktor im Zellkulturüberstand vorhanden war, oder dass verschiedene Parameter, wie die Faktor-Konzentration, der Beobachtungszeitraum oder die zwischenzeitliche Lagerung der Zellkulturüberstände bei -20 °C für das Fehlen einer chemotaktischen Reaktion verantwortlich waren. Bei den konditionierten Medien muriner Zellen könnten darüber hinaus Spezies-spezifische Unterschiede in der Proteinstruktur der Faktoren die Bindung an den korrespondierenden humanen Rezeptor und dessen Aktivierung verhindert haben.

Im peripheren Nervensystem sind die Axone der Nerven über weite Strecken von Schwann'schen Zellen umgeben (Bockman et al., 1994). Sowohl neuronale als auch Schwann'sche Zellen exprimieren eine Reihe von Faktoren. Dazu gehören neben β -NRG 1 (β -Neuregulin 1), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), IGF I (*insulin like growth factor I*) und PDGF-BB (*platelet-derived growth factor BB*) auch CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), LIF (*leukaemia inhibitory factor*), HGF/SF (*hepatocyte growth factor/scatter factor*) und GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) (Grinspan et al., 1996; Raabe et al., 1996; Davies, 1998; Mirsky und Jessen, 1999). Für einige dieser Faktoren wurde bereits gezeigt, dass sie eine mitogene und/oder chemotaktische Wirkung auf Pankreaskarzinomzellen ausüben können (Di Renzo, 1995; Miknyoczki et al., 1999; Zhu, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss einzelner neurotropher Faktoren auf das Zellwachstum und die gerichtete Migration von Pankreaskarzinomzelllinien analysiert. Die Inkubation von PANC-1-Zellen mit 10 ng/ml BDNF oder 10 ng/ml GDNF hatte dabei keine Wirkung auf die Proliferation der untersuchten Pankreaskarzinomzellen. Als

nächstes wurde der Einfluss verschiedener neuronaler Faktoren auf das Migrationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen untersucht. Miknyoczki et al. (Miknyoczki et al., 1999) konnten bereits zeigen, dass verschiedene neuronale Faktoren einen Konzentrations-abhängigen Effekt auf die Chemotaxis von PANC-1-Zellen ausüben. Hierbei führte die Zugabe von 100 ng/ml BDNF zu einer Reduktion der Zellmigration um 40 % bezogen auf die basale Wanderung dieser Zellen, während die Zugabe geringerer Konzentrationen unterhalb von 25 ng/ml BDNF eine Steigerung der Chemotaxis um 25 % gegenüber der Kontrolle hervorrief. Im der vorliegenden Arbeit wurden daher je 10 ng/ml β -NGF, BDNF und GDNF eingesetzt, um den Einfluss dieser neurotrophen Faktoren auf die Chemotaxis von PANC-1-Zellen zu analysieren. Die Zugabe von β -NGF und BDNF führte nicht zu einer Änderung des Migrationsverhaltens von PANC-1-Zellen.

Interessanterweise induzierte jedoch GDNF einen deutlichen Anstieg der Zellwanderung. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit der neurotrophe Faktor GDNF als Chemotaxis-induzierender Faktor für PANC-1-Zellen identifiziert werden. Die Untersuchung verschiedener GDNF-Konzentrationen auf die gerichtete Wanderung von PANC-1-Zellen machte deutlich, dass bereits 0,5 ng/ml GDNF ausreichen, um eine deutliche Steigerung der Zellmigration dieser Pankreaskarzinomzellen herbeizuführen. Diese Ergebnisse bestätigten von Okada et al. (1999) veröffentlichte Daten, die zeigten, dass die Inkubation von AsPC-1- und Mia PaCa-2-Zellen mit 1 ng/ml GDNF zu einer bis zu 7fachen Steigerung der Invasion dieser Zellen führt, und dass die durch Kokultivierung von Pankreaskarzinomzellen mit glialen T98G-Zellen hervorgerufene Chemotaxis der Pankreaskarzinomzellen mit einem anti-GDNF-Antikörper um 30 % verringert werden konnte.

Die Signalweiterleitung von GDNF erfolgt über einen heterodimeren Rezeptor-Komplex, bestehend aus der Rezeptortyrosinkinase Ret und dem GPI-Anker-Protein $GFR\alpha$. Die Arbeitsgruppe von Okada et al. konnte nur den Ret-Rezeptor, nicht aber den direkt an den GDNF-Liganden bindenden $GFR\alpha$ -Korezeptor nachweisen. Um die beobachtete GDNF-induzierte Migration von PANC-1-Zellen auf eine spezifische Liganden-Rezeptor-Interaktion zwischen GDNF und dem Ret/ $GFR\alpha$ -System zurückführen zu können, wurde daher in der vorliegenden Arbeit die Expression von Ret und $GFR\alpha$ in PANC-1-Zellen analysiert.

8.2 Darstellung des Ret/GFR α -Rezeptor-Komplexes in PANC-1-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der beiden GDNF-Rezeptor-Komponenten Ret und GFR α in Pankreaskarzinomzelllinien, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen. Die Anwesenheit des Ret-Rezeptors auf mRNA-Ebene wurde durch RT-PCR-Analysen für die humanen Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1, AsPC-1 und BxPC-3 gezeigt. Durch Verwendung von zwei Ret-spezifischen Oligonukleotiden aus Exon 6 und Exon 9 konnte die Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen werden. Der Nachweis des *c-ret*-Transkriptes in den drei untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Transkript generell in Pankreaskarzinomzellen exprimiert wird. Um eine endgültige Aussage machen zu können, müsste jedoch die *c-ret*-Expression in weiteren Pankreaskarzinomzelllinien, primären Pankreaskarzinomzellen und nicht-transformierten Zellen des Pankreas analysiert werden. Die Detektion des *c-ret*-Transkriptes in AsPC-1-Zellen bestätigte darüber hinaus die Ergebnisse von Okada et al. (Okada et al., 1999). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass AsPC-1-Zellen, welche wie PANC-1-Zellen nach GDNF-Zugabe verstärkt migrierten, den Ret-Rezeptor auf mRNA- und Proteinebene exprimieren. Im Gegensatz zu der erwähnten Publikation konnte in der vorliegenden Arbeit über RT-PCR-Analysen auch die mRNA-Expression von zwei Korezeptoren, GFR α 1 und GFR α 2, in PANC-1-Zellen nachgewiesen werden. Eine hochaffine Interaktion mit dem neurotrophen Faktor GDNF wurde für beide Lipid-Anker-Proteine gezeigt (Klein et al., 1997; Sanicola et al., 1997).

Verschiedene Mutationen im *c-ret*-Gen stehen in einem engem Zusammenhang mit der Entstehung neuroektodermaler Tumorerkrankungen des Menschen und führen zu einer konstitutiven Aktivierung der Ret-Rezeptoren (Takahashi et al., 1988, 1989; Avantaggiato, 1994). Die häufigsten mit Ret-Mutationen assoziierten Syndrome sind MEN2A, MEN2B (*multiple endocrine neoplasia type 2A/B*) und FMTC (*familial medullary thyroid carcinoma*). Beim MEN2A-Syndrom konnte eine Korrelation mit verschiedenen Punktmutationen in Exon 10 und 11 festgestellt werden, welche in der Cystein-reichen Domäne des Ret-Proteins zu einem Cystein-Arginin-Austausch führen. In 80 % der Tumoren erfolgt der Austausch dabei in Kodon 634 (C634R) (Ponder und Smith, 1996, Pasini et al., 1996). Für das MEN2B-Syndrom wurden dagegen die Mutationen A883F und M918T in den intrazellulären Tyrosinkinase-Domänen identifiziert, wobei in 95 % der Tumore die zuletzt genannte

Mutation von Methionin zu Threonin (ATG→ACG) auftritt (Mulligan et al., 1994; Mulligan und Ponder 1995). Bei FMTC-Schilddrüsenkarzinomen werden Mutationen sowohl in der Cystein-reichen Region als auch in den Tyrosinkinase-Domänen nachgewiesen. Alle genannten Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung der Ret-Proteine. Die transformierende Wirkung der Ret-Rezeptoren kann dabei auf die Aktivierung spezifischer Signalwege über die Tyrosin-Reste Y905 und Y1062 zurückgeführt werden (Asai et al., 1996; Iwashita et al., 1999, 2000; Takahashi, 2001). Ein Vergleich aller aufgeführten Mutationen zeigt, dass das Ret-Protein mit der M918T-Mutation das größte transformierende Potential besitzt (Iwashita et al., 1999). Um zu überprüfen, ob PANC-1-Zellen die wildtypische *c-ret*-mRNA exprimieren, wurden über RT-PCR-Experimente und *primer walking* 6 überlappende RT-PCR-Fragmente amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzanalysen zeigten, dass in 4 von 7 durchgeführten RT-PCR-Analysen die *c-ret*-Transkripte aus PANC-1-Zellen im Vergleich zur GenBank-Sequenz eine Mutation in Kodon 432 (Exon 7) trugen. Der Basenaustausch GCG(Ala)→GCA(Ala) hatte jedoch keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz. Die Tatsache, dass die Punktmutation in ca. 50 % der untersuchten *c-ret*-Transkripte nachgewiesen wurde, könnte zudem auf einen mono-allelischen Basenaustausch hindeuten.

In der Literatur sind drei verschiedene Ret-Isoformen, Ret9, Ret43 und Ret51, beschrieben worden, welche durch alternatives Spleißen am 3'-Ende des *c-ret*-Gens entstehen. Die drei Isoformen unterscheiden sich hierbei in den letzten 9, 43 bzw. 51 Aminosäuren (Takahashi et al., 1988; Myers et al., 1995; Lorenzo et al., 1995). Interessanterweise befindet sich die Spleißstelle unmittelbar nach einem für die Signaltransduktion bedeutenden Tyrosin-Rest an Position 1062. Es konnte gezeigt werden, dass die zum Tyrosin-Rest Y1062 benachbarten Aminosäuren verschiedene Konsensussequenzen für die Bindung von Adapter-Proteinen repräsentieren. In allen Ret-Isoformen findet man eine Bindungsstelle (IENKLY¹⁰⁶²) für die SH2-Domäne von Shc, während nur in der kurzen Isoform zusätzlich eine Konsensussequenz für die Assoziation mit der PTB-Domäne (Y¹⁰⁶²GRI) des Proteins Shc nachgewiesen werden konnte (Asai et al., 1996; Arighi et al., 1997; Lorenzo et al., 1997; Ishiguro et al., 1999). Darüber hinaus kommen in der langen Isoform noch zwei weitere Tyrosin-Reste vor. Für Y1096 konnte eine Phosphorylierung (Liu et al., 1996) und eine Interaktion mit dem Adapterprotein Grb2 nachgewiesen werden (Alberti et al., 1998). Die selektive Bindung von Adapter-Proteinen an die drei Ret-Isoformen führt zur Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass sich die Ret-Isoformen auch in ihrer physiologischen Funktion unterscheiden. Von Rossel et al. (1997) wurde

gezeigt, dass die transformierende Wirkung der langen Isoform von Ret/MEN2A und Ret/MEN2B in NIH/3T3 Zellen größer ist als die der kurzen Isoform, und dass Ret51 in PC12 Zellen einen deutlicheren Differenzierungsprozess zu induzieren vermag als Ret9. Eine andere Arbeitsgruppe konnte demonstrieren, dass zwar Ret9^{-/-}, nicht aber Ret51^{-/-} *knockout*-Mäuse, schwerwiegende Nierenmissbildungen und eine unvollständige Innervierung des enterischen Nervensystems zeigen (Le Hir et al., 2000). Diesen Ergebnissen zufolge hätte die kurze Ret-Isoform eine größere Bedeutung im Verlauf der Embryonalentwicklung, während die lange Ret-Isoform bei der Zelldifferenzierung und bei der Karzinogenese eine wichtige Funktion hätte. Für die mittlere Ret43-Isoform konnte gezeigt werden, dass sie im Vergleich zur kurzen und langen Ret-Isoform seltener in verschiedenen humanen Geweben und Organen exprimiert wird, und in Ratten überhaupt nicht vorkommt (Le Hir et al., 2000; Matera et al., 2000). Es wird daher angenommen, dass Ret43 lediglich eine untergeordnete physiologische Bedeutung zukommt. Zur Klärung der Frage, welche Ret-Isoformen in PANC-1-Zellen exprimiert werden, und um einen Hinweis auf mögliche GDNF-induzierte Signalwege in diesen Zellen zu erhalten, wurden RT-PCR-Analysen mit Isoform-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Hierbei konnten in PANC-1-Zellen die Transkripte aller drei Ret-Isoformen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob der Ret/GFR α -Rezeptor-Komplex auch auf Proteinebene in PANC-1-Zellen exprimiert wird, wurden *Western blot*-Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Ret-Rezeptoren sowohl nach Immunpräzipitation der Ret-Proteine als auch direkt aus dem RIPA-Zellysate mit einem spezifischen anti-Ret-Antikörper, der nicht zwischen den verschiedenen Ret-Isoformen differenziert, im Immunoblot nachgewiesen. Da der neurotrophe Faktor GDNF nicht direkt an den Ret-Rezeptor binden kann, sondern zunächst eine Assoziation mit dem GFR α -Korezeptor erfolgt, wurde die GFR α 1-Expression mit einem anti-GFR α 1-Antikörper im Immunoblot analysiert. Hierbei wurde die Proteinexpression von GFR α 1 für die beiden humanen Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1 und AsPC-1 demonstriert. Mit dem Nachweis der GFR α 1-Expression in AsPC-1-Zellen wurden die Ergebnisse von Okada et al. (1999) komplettiert, die zwar die Ret-, nicht aber die GFR α -Expression in diesen Zellen demonstrieren konnten.

Der Nachweis der beiden GDNF-Rezeptor-Komponenten Ret und GFR α in AsPC-1- und PANC-1-Zellen unterstützt die Annahme, dass der neurotrophe Faktor GDNF seine

chemotaktische Wirkung durch spezifische Bindung an den vollständigen GDNF-Rezeptor-Komplex entfaltet.

Zudem ist es unter Berücksichtigung der Literaturdaten zur GDNF-induzierten Chemotaxis sehr unwahrscheinlich, dass die gerichtete Migration von PANC-Zellen durch Assoziation von GDNF mit dem GFR α -Korezeptor alleine vermittelt wird (Robertson und Mason, 1997; Airaksinen et al., 1999; Eketjäll et al., 1999; Mason, 2000). Eine generelle Interaktion des neurotrophen Faktors mit GFR α 1 oder GFR α 2 ohne Beteiligung von Ret kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden (Poteryaev et al., 1999; Trupp et al., 1999).

8.3 Sequenzanalyse der langen Ret51-Isoform aus PANC-1-Zellen und Klonierung in den pEGFP-N1-Vektor

Um die in PANC-1-Zellen exprimierte *c-ret*-mRNA-Sequenz auf mögliche Mutationen hin zu untersuchen, wurden Sequenzanalysen durchgeführt. Diese ergaben, dass in PANC-1-Zellen die wildtypische *c-ret*-mRNA-Sequenz exprimiert wird.

Zur weiterführenden Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen der Ret-Expression und der GDNF-induzierten Migration und Signaltransduktion von Pankreaskarzinomzellen, wurde die kodierende Ret51-DNA-Sequenz der PANC-1-Zellen amplifiziert und die cDNA in den pEGFP-N1-Vektor kloniert. Hierdurch konnte das Ret-Protein als Ret-EGFP-Fusionsprotein mit einem C-terminalen EGFP-Protein-Anteil in verschiedenen eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Von Tang et al. (1998) wurde für einen C-terminal zur *c-ret*-Sequenz lokalisierten HA-Epitop-*tag* gezeigt, dass dieser die Funktionalität des Ret-Rezeptors nicht beeinflusst.

Die Expression der Proteine EGFP und Ret-EGFP nach transienter Transfektion wurde in PANC-1-Zellen und der humanen epithelialen Nierenzelllinie HEK-293 überprüft. Im Unterschied zu PANC-1-Zellen exprimieren die Nierenzellen den Ret/GFR α -Rezeptor nicht endogen und dienten damit als Kontrollzelllinie (Bordeaux et al., 2000). Fluoreszenzmikroskopische Analysen bestätigten 48 Std. nach Transfektion die Expression von EGFP und Ret-EGFP in PANC-1- und HEK-293-Zellen. Hierbei konnten Unterschiede in der Lokalisation der beiden Proteine festgestellt werden. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Gerdes und Kaether (Gerdes und Kaether, 1996) waren die EGFP-

Proteine überwiegend im Zytosol und in geringeren Mengen auch im Zellkern der Zellen vorhanden, während bei den Ret-EGFP-Fusionsproteinen eine Anreicherung in der Zellmembran der Pankreaskarzinomzellen stattfand. Die Expression von Ret-EGFP-Fusionsproteinen in PANC-1- und HEK-293-Zellen führte zu einer modifizierten Zellmorphologie im Vergleich zu den korrespondierenden EGFP-exprimierenden Zellen. Die Ret-EGFP-exprimierenden Zellen waren nach 24-48 Std. abgerundet und die Zelladhäsion dieser Zellen war stark vermindert. Bordeaux et al. (2000) zeigten kürzlich in diesem Zusammenhang, dass die Expression von Ret9-Proteinen in HEK293-Zellen zu einer verstärkten Apoptose dieser Zellen führt. Da durch Zugabe von GDNF die Apoptose-induzierende Wirkung des Ret-Rezeptors in Konzentrations-abhängiger Weise unterbunden werden konnte, wurde dieser von der erwähnten Arbeitsgruppe erstmals als *dependence receptor* klassifiziert. In der hier vorliegenden Arbeit wurden zur Überprüfung dieser Hypothese Transfektionsexperimente in Anwesenheit von 100 ng/ml GDNF durchgeführt. Die Zugabe von GDNF führte jedoch nicht zu einer verminderten Abrundung der Zellen. Isoform-spezifische Unterschiede könnten zumindest bei HEK-293-Zellen die Ursache dafür sein, dass GDNF zwar bei Ret9, nicht aber bei der langen Ret51-Isoform die Abrundung der Zellen und damit eventuell das Zellsterben reduziert.

Neben den fluoreszenzmikroskopischen Analysen zur Charakterisierung der EGFP- und Ret-EGFP-Expression in PANC-1- und HEK-293-Zellen, wurde die Verteilung der Proteine in diesen Zellen nach subzellulärer Auftrennung im Immunoblot mit einem anti-GFP-Antikörper untersucht. Übereinstimmend mit den Beobachtungen am Fluoreszenzmikroskop konnte die Expression beider Proteine bestätigt werden. Dabei lagen die EGFP-Proteine überwiegend in der löslichen, daneben aber auch in der partikulären Fraktion vor. Für die Ret-EGFP-Fusionsproteine konnte hingegen eine eindeutige Anreicherung in den partikulären, membranhaltigen Fraktionen beider Zelllinien demonstriert werden. Die Lokalisation des Ret-EGFP-Rezeptors in der Zytoplasma-Membran von PANC-1- und HEK-293-Zellen verdeutlicht, dass das EGFP-Protein am C-Terminus der Ret-Aminosäuresequenz den Membraneinbau des Fusionsproteins nicht beeinträchtigt.

8.4 Charakterisierung GDNF-induzierter Signalwege in PANC-1-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Signaltransduktionswege in PANC-1-Zellen nach GDNF-Zugabe aktiviert werden, und welche Signalwege für die GDNF-induzierte Chemotaxis dieser Pankreaskarzinomzellen von Bedeutung sind. Hierbei wurde gezeigt, dass sowohl die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade, als auch PI3-Kinase-gesteuerte Signalwege für die GDNF-induzierte Migration von PANC-1-Zellen relevant sind. Darüber hinaus wurde nach Behandlung von PANC-1-Zellen mit GDNF eine Aktivierung der kleinen GTPase Rac und der MAP-Kinase JNK nachgewiesen.

In der Vergangenheit wurden Ret-abhängige Signaltransduktionswege insbesondere in neuronalen Zellen untersucht. Hier beeinflussen die Ret-gesteuerten Signalwege insbesondere das Überleben, die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen. (Robertson und Mason, 1998; Mason et al., 2000). Darüber hinaus gibt es in der Literatur einige Daten über Signalwege, welche an der GDNF-induzierten Migration neuronaler Zellen beteiligt sind (Meyer et al., 2001; Young et al., 2001). Da kürzlich gezeigt wurde, dass die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade für die EGF-induzierte Migration von PANC-1-Zellen von großer Bedeutung ist (Giehl et al., 2000), und die Signaltransduktion von EGF, wie die von GDNF, durch eine spezifische Bindung an eine Rezeptortyrosinkinase vermittelt wird, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluss von GDNF auf diesen Ras-regulierten Signalweg analysiert. Hierbei wurde gezeigt, dass 10-100 ng/ml GDNF in PANC-1-Zellen zu einer Ras-Aktivierung und zu einer PD98059-sensitiven ERK2-Aktivierung führen. Diese Ergebnisse stimmten mit der für die meisten Wachstumsfaktoren beschriebenen Ras-Aktivierung nach 3-5 min überein. Im Gegensatz dazu wurde jedoch von Trupp et al. (1999) nach Behandlung von Motorneuronen mit GDNF erst nach 15 min eine Ras-Aktivierung nachgewiesen.

Als nächstes wurde in dieser Arbeit eine mögliche ERK2-Aktivierung nach GDNF-Behandlung von PANC-1-Zellen untersucht. Die Phosphorylierungsexperimente ergaben eine 2,5fache Steigerung der ERK2-Aktivität nach 10-15 min gegenüber Zellen ohne Faktor. Interessanterweise wurde kürzlich von Delehedde et al. (2001) für Rama-27-Zellen eine HGF-induzierte, biphasische Aktivierung der MAP-Kinase ERK2 beschrieben. In der ersten Phase war die ERK2-Aktivität nach 10-15 min maximal und erreichte nach 20 min wieder den Ausgangswert. Die zweite Aktivierungsphase war durch einen langsamen Anstieg der ERK2-

Aktivität gekennzeichnet, welche jedoch erst 3-10 Std. nach HGF-Behandlung dieser Zellen einsetzte. Eine zweite Aktivierungsphase der MAP-Kinase ERK2 nach GDNF-Behandlung von PANC-1-Zellen soll in weiteren Experimenten analysiert werden.

Die Hemmung der ERK2-Aktivität durch den spezifischen MEK1-Inhibitor PD98059 zeigte, dass die ERK2-Phosphorylierung durch die Proteinkinase MEK1 erfolgt. Der PD98059-induzierte Rückgang der ERK2-Aktivität in Ansätzen ohne GDNF deutet auf eine basale MEK-vermittelte ERK2-Aktivität in PANC-1-Zellen hin. Die dargestellten Resultate bestätigten die kürzlich von You et al. (2001) beschriebenen Ergebnisse, die eine GDNF-induzierte, Ras-abhängige Raf-, MEK- und ERK2-Aktivierung in kornealen Epithelzellen nachweisen konnten. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die Behandlung der Epithelzellen mit GDNF zu einer verstärkten chemotaktischen Reaktion führt und die Phosphorylierung einiger an der Zytoskelett-Organisation beteiligter Proteine, wie Paxillin und der nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase FAK, induziert. Um im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der kleinen GTPase Ras und der Proteinkinasen MEK1 und ERK2 für die GDNF- und LPA-induzierte Chemotaxis von PANC-1-Zellen zu analysieren, wurden Migrationsversuche mit PANC-1-Zellen durchgeführt, die das dominant-negative EGFP-H-Ras(S17N)-Fusionsprotein stabil exprimieren. Für NIH/3T3 Fibroblasten wurde demonstriert, dass bei einer 3fachen Menge EGFP-H-Ras(S17N)-Fusionsproteinen im Vergleich zu endogenen Ras-Proteinen bereits alle Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) von den Mutanten gebunden werden (Feig, 1999). Da GEF-Proteine bei der Ras-Aktivierung den GDP-GTP-Austausch katalysieren, konnte hierdurch eine Aktivierung endogener Ras-Proteine wirkungsvoll unterbunden werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Migrationsstudien mit PANC-1/EGFP-H-Ras(S17N)-Zellklonen zeigten, dass die Expression der EGFP-H-Ras(S17N)-Fusionsproteine zu einer verminderten LPA- bzw. GDNF-induzierten Steigerung der Migration führt. Die beobachteten Unterschiede in der Stimulierung der Zellmigration durch LPA und GDNF könnten auf die verschiedenen Rezeptortypen der beiden Faktoren und die jeweils nachgeschalteten Signalwegen zurückzuführen sein, da GDNF an eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) bindet und LPA mit einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) interagiert (Contos et al., 2000).

Sowohl für LPA als auch für GDNF wurde die Bedeutung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade für die Faktor-induzierte Chemotaxis in Migrationsexperimenten mit dem MEK1-Inhibitor demonstriert. Die Inkubation von PANC-1-Zellen mit GDNF in Anwesenheit des MEK1-

Inhibitors PD98059 führte zu einem signifikanten Rückgang der Migration in Abhängigkeit von der eingesetzten Inhibitor-Menge. Es ist daher wahrscheinlich, dass die GDNF-induzierte Migration von PANC-1-Zellen über die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade vermittelt wird. Diese könnte ihre Wirkung z. B. über die Aktivierung von *immediate early genes*, wie dem *c-fos*-Gen (Davis et al., 1995), oder die ERK1,2-abhängige Phosphorylierung der MLCK (*myosin light chain kinase*) entfalten (Klemke et al., 1997).

Neben der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade wurde auch für PI3-Kinase-regulierte Signalwege eine Beteiligung an Faktor-induzierten Migrationsprozessen demonstriert (Vanhaesebroeck et al., 1996; Carpenter und Cantley, 1996; Nakamura et al., 2001). Im Zusammenhang mit dem Ret/GFR α -System konnte in neuronalen Zellen die Bedeutung der PI3-Kinase-Aktivierung, insbesondere für die Vermittlung anti-apoptotischer Signale, nachgewiesen werden (Soler et al., 1999, Chen et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der PI3-Kinase-Aktivität auf die GDNF-induzierte Chemotaxis von PANC-1-Zellen analysiert. Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit GDNF zu einer Aktivierung PI3-Kinase-regulierter Signalwege in PANC-1-Zellen führt. Anhand von Migrationsversuchen in An- oder Abwesenheit des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 wurde gezeigt, dass eine PI3-Kinase-Aktivität für die GDNF-induzierte Migration von PANC-1-Zellen notwendig ist. Wie bei Verwendung des MEK1-Inhibitors PD98059 konnte auch durch LY294002 die gerichtete Zellwanderung in Abhängigkeit von der eingesetzten Inhibitor-Konzentration gehemmt werden.

Zwei wichtige Effektormoleküle der PI3-Kinase sind die Proteinkinase Akt/PKB und die kleine GTPase Rac, welche unabhängig voneinander durch die PI3-Kinase aktiviert werden (Tolias et al., 1995; Reif et al., 1996; Krasilnikov, 2000; Okkenhaug und Vanhaesebroeck, 2001). Für die Proteinkinase Akt/PKB wurde gezeigt, dass eine Aktivierung durch Phosphorylierung der spezifischen Reste Threonin(308)- und Serin(473) erfolgt. Die Phosphorylierung dieser Aminosäure-Reste erfolgt hierbei durch Proteinkinasen, welche von den Lipid-Spaltprodukten der PI3-Kinase, PtdIns(3,4) P_2 (Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphat) und PtdIns(3,4,5) P_3 (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat), abhängig sind. Die Proteinkinase, welche zur Thr(308)-Phosphorylierung führt, wird hierbei als PDK1 (PtdIns(3,4) P_2 /(3,4,5) P_3 -dependent kinase 1) bezeichnet (Vanhaesebroeck et al., 1997), während spezielle Proteinkinasen zur Ser(473)-Phosphorylierung noch nicht identifiziert werden konnten. Da die Thr(308)- im Gegensatz zur Ser(473)-Phosphorylierung auch

unabhängig von der PI3-Kinase reguliert werden kann (Konishi et al., 1997; Yano et al., 1998; Filippa et al., 1999; Ouyang et al., 2000), wurde in der vorliegenden Arbeit nach GDNF-Behandlung von PANC-1-Zellen die Ser(473)-Phosphorylierung untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass in PANC-1-Zellen ohne Zugabe eines chemotaktisch wirkenden Faktors bereits eine basale Ser(473)-Phosphorylierung vorhanden ist. Eine Inhibition der basalen Ser(473)-Phosphorylierung nach Behandlung von PANC-1-Zellen mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 bestätigte außerdem die PI3-Kinase-Abhängigkeit des Effektes. Die basale Ser(473)-Phosphorylierung der Proteinkinase Akt/PKB in PANC-1-Zellen könnte mit der K-Ras(G12D)-Mutation in diesen Zellen zusammenhängen. Von Rodriguez-Viciana et al. (Rodriguez-Viciana et al., 1994; 1996; 1997) wurde in diesem Zusammenhang zum einen gezeigt, dass die katalytische Untereinheit der PI3-Kinase p110 mit der kleinen GTPase Ras interagieren und hierdurch aktiviert werden kann. Zum anderen wurde von van Weering et al. (1998b) eine Ras-induzierte PI3-Kinase-vermittelte Akt/PKB-Aktivierung nach Behandlung von neuronalen SKF5 Zellen mit bFGF (*basic fibroblast growth factor*) nachgewiesen. Daneben gibt es jedoch auch Daten, die gegen die K-Ras(G12D)-Mutation als Ursache für eine ständige Akt/PKB α -Aktivierung in PANC-1-Zellen sprechen. So konnten Brognard et al. (2001) zeigen, dass eine konstitutive Akt/PKB-Aktivierung in NSCLC Zellen nicht mit der in einigen Subtypen dieser Zellen vorliegenden K-Ras(G12V)-Mutation korreliert, und Gupta et al. (Gupta et al., 2001) demonstrierten für humane Fibrosarkomzellen, dass eine N-Ras(G12V)-Mutation in diesen Zellen in keinem Zusammenhang mit einer ständigen Akt/PKB-Aktivierung steht.

Es ist bekannt, dass verschiedene Faktoren durch Bindung an korrespondierende Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) zu einer Aktivierung der PI3-Kinase und der nachgeschalteten Proteinkinase Akt/PKB führen können. Hierzu gehören neben EGF, PDGF, bFGF und IGF auch VEGF, Insulin und β -NGF (Franke et al., 1993; Burgering et al., 1995; Datta et al., 1999). Gleichzeitig konnte für die meisten dieser Faktoren eine (Über-)Expression in verschiedenen primären Pankreaskarzinomzellen und Zelllinien nachgewiesen werden, wo sie über autokrine und parakrine Rückkoppelungsmechanismen die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen regulieren (Beauchamp et al., 1990; Bergmann et al., 1995; Sirivatanauksorn et al., 1998; Korc et al., 1998; Schneider et al., 2001). Es könnte daher sein, dass die (Über-)Expression spezifischer Faktoren in PANC-1-Zellen zu einer para- bzw. autokrinen Akt/PKB-

Aktivierung in diesen Zellen führt. Für IGF konnte von Tanno et al. (2001) demonstriert werden, dass die Expression dieses Faktors in PANC-1-Zellen über die Akt/PKB-Aktivität reguliert wird, und dass eine IGF-Expression möglicherweise wiederum eine Akt/PKB-Phosphorylierung in diesen Tumorzellen induziert. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus eine Korrelation zwischen einer Akt/PKB-Aktivierung und einer gesteigerten Invasivität der Pankreaskarzinomzelllinien nachweisen.

Der kleinen GTPase Rac, einem anderen Effektorprotein der PI3-Kinase, kommt eine wichtige Bedeutung bei der Organisation des Zytoskelettes und der Modulation der Zellarchitektur zu. Gemeinsam mit anderen Rho-Proteinen steuert Rac die Motilität und Invasivität von Zellen (Ridley et al., 1992; Nobes et al., 1995; Hawkins et al., 1995; Michiels et al., 1995). Um den Einfluss von GDNF auf die Rac-Aktivität in PANC-1-Zellen zu analysieren, wurden Rac-GTP-Präzipitationsversuche in Anlehnung an die von Sander et al. (Sander et al., 1998) publizierte Methode durchgeführt. Hierbei konnte ein Anstieg der Rac-GTP-Menge mit einem Maximum 2 min nach GDNF-Zugabe beobachtet werden. Damit wurde in der vorliegenden Arbeit eine GDNF-induzierte Rac-Aktivierung zum ersten Mal direkt nachgewiesen.

Neben dem Einfluss von Rac auf die Zytoskelett-Organisation wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass die monomere GTPase auch zur Stimulation der MEKK1-MEK4-JNK/SAPK-Kaskade führt (Sanchez et al., 1994; Minden et al., 1994, 1995; Coso et al. 1996; Westwick et al., 1997). Diese Kaskade wird durch verschiedene Stressoren wie UV-Strahlung und Hitze, aber auch durch extrazelluläre Signalmoleküle aktiviert. Um in der vorliegenden Arbeit die Frage zu klären, ob die Rac-regulierte Signalkaskade in PANC-1-Zellen durch GDNF aktiviert wird, wurde die Kinaseaktivität der MAP-Kinase JNK anhand von *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten analysiert. Hierbei wurde gezeigt, dass die Behandlung von PANC-1-Zellen mit 100 ng/ml GDNF zu einer deutlichen JNK-Phosphorylierung mit einem Maximum 15 min nach GDNF-Zugabe führt. Die GDNF-induzierte JNK-Phosphorylierung war geringer als die Aktivierung nach Hitzebehandlung der Zellen, doch führen Stressoren generell zu einer stärkeren JNK-Aktivierung als extrazelluläre Signalmoleküle (Davies et al., 1994; Minden et al., 1994). Von Lallemand et al. (1998) konnte gezeigt werden, dass die JNK-Aktivität in subkonfluenten und wandernden Fibroblasten größer ist, als in konfluenten und adhären Zellen. Es wäre daher denkbar, dass die kleine GTPase Rac sowohl über eine Veränderung der Zellarchitektur, als auch über die

Rac-MEKK1-MEK4-JNK/SAPK-Kaskade in die GDNF-induzierte Chemotaxis von PANC-1-Zellen involviert ist (Van Weering et al., 1997). Die am häufigsten beschriebene Bedeutung der Rac-MEKK1-MEK4-JNK/SAPK-Kaskade liegt jedoch in einem Schutz vor dem programmierten Zelltod, indem sie die Expression spezifischer Gene, wie z. B. des *c-jun*-Gens, induziert (Minden et al., 1994).

Mit den vorliegenden Ergebnissen zur Signaltransduktion in PANC-1-Zellen konnte gezeigt werden, dass der neurotrophe Faktor GDNF in PANC-1-Zellen verschiedene Signalwege aktiviert, welche die gerichtete Migration dieser Zellen vermitteln. Da in dieser Arbeit die Anwesenheit des vollständigen Ret/GFR α -Rezeptor-Komplexes in PANC-1-Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene demonstriert wurde, ist es wahrscheinlich, dass die Aktivierung der verschiedenen Signalwege durch die spezifische Bindung von GDNF an den heterodimeren Rezeptor-Komplex erfolgt. Auch die in dieser Arbeit nachgewiesene GDNF-induzierte Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade und Rac-gesteuerter Signalwege spricht für eine Interaktion von GDNF mit dem vollständigen Ret/GFR α -Rezeptor-Komplex, da die beschriebenen Signaltransduktionskaskaden für den Ret-Rezeptor charakteristisch sind.

Neben der Bedeutung spezifischer Liganden-Rezeptor-Systeme für die gerichtete Zellmigration konnte in der Vergangenheit insbesondere für kleine, monomere GTPasen der Rho-Familie ein Zusammenhang mit der Regulation von Migrations- und Invasionsprozessen herausgestellt werden (Schmitz et al., 2000; Ridley, 2001). Für Pankreaskarzinomzellen wurde gezeigt, dass eine Überexpression der kleinen GTPase RhoC mit der perineuralen Invasion dieser Zellen und der ungünstigen Prognose für Bauchspeicheldrüsenkrebs korreliert (Suwa et al., 1998). Es wurde daher auch die RhoC-Expression in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien analysiert und die kodierende *rhoC*-Sequenz aus BxPC-3-Zellen in verschiedene pro- und eukaryontische Expressionsvektoren kloniert

8.5 Einfluss von Rho-GTPasen auf die Motilität von Tumorzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals über RT-PCR-Analysen die Expression von RhoC auf mRNA-Ebene in den humanen Pankreaskarzinomzelllinien BxPC-3 und PANC-1 gezeigt. Damit konnten die von Suwa et al. (1998) veröffentlichten Daten zur Expression von RhoC auf mRNA-Ebene in primären Pankreaskarzinomzellen für Zelllinien bestätigt werden. Die

erwähnte Arbeitsgruppe hatte in einer klinischen Studie mit 33 Pankreaskarzinom-Fällen demonstriert, dass in metastasierenden Tumorzellen eine RhoC-Überexpression auftritt, welche mit dem Tumorstadium und der ungünstigen Prognose der Erkrankung korreliert. Am stärksten war die RhoC-Expression dabei in perineural invasiven Pankreaskarzinomzellen und in Tumorzellen aus Lymphknoten-Metastasen. Eine Überexpression der beiden Rho-Isoformen RhoA und RhoB konnte nicht festgestellt werden, obgleich von verschiedenen Arbeitsgruppen ein Zusammenhang zwischen einer RhoA-Überexpression, die zu einer erhöhten RhoA-Aktivität in den Zellen führt (Yoshioka et al., 1999), und der Tumorprogression nachgewiesen werden konnte (Nakamori et al., 1996; Yoshioka et al., 1998, 1999; Fritz et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde die kodierende RhoC-DNA-Sequenz über RT-PCR aus der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 amplifiziert und mögliche Mutationen in der DNA-Sequenz durch Sequenzierung ausgeschlossen. Die Arbeitsgruppe von Suwa et al. konnte ebenfalls in keiner der drei Rho-Isoformen eine Mutation nachweisen. Die Ergebnisse für primäre Pankreaskarzinomzellen und Zelllinien stimmten somit mit den bis dahin vorliegenden Resultaten überein, dass *rho*-Gene in Tumorzellen üblicherweise keine Mutationen tragen (Moscow et al., 1994; Rihet et al., 2001). In Konkordanz mit dem Auftreten von K-Ras(G12V)-Mutationen in bis zu 95 % aller exokrinen Pankreaskarzinome (Hilgers und Kern, 1999) konnten Suwa et al. in 80 % der Tumorzellen ein mutiertes *K-ras*(G12V)-Gen detektieren. Eine Korrelation zwischen dem Auftreten einer *K-ras*(G12V)-Mutation und der Überexpression von RhoC bestand jedoch nicht. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Expression der *rhoC*-mRNA ebenfalls in Zelllinien mit und ohne K-Ras-Mutation nachgewiesen werden (Tan et al., 1986; Giehl et al., 2000).

Um zukünftig die Funktion der kleinen GTPase RhoC *in vitro* näher charakterisieren und mit den bereits gut belegten Effekten von RhoA vergleichen zu können, wurde in dieser Arbeit die kodierende RhoC-DNA-Sequenz aus BxPC-3-Zellen sowie die DNA-Sequenzen von RhoA, der konstitutiv-aktiven RhoA(G14V/F25N)-Mutanten und der dominant-negativen RhoA(T19N/F25N)-Mutanten in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Das Einbringen der Rho-Sequenzen in den pEGFP-Vektor und die anschließende Transfektion von PANC-1-Zellen mit den pEGFP/Rho-Plasmiden erlaubte die Generierung von PANC-1-Zellklonen, welche die EGFP-Rho-Fusionsproteine stabil exprimieren. Da von Suwa et al. ein Zusammenhang zwischen der RhoC-Überexpression und dem Metastasierungsgrad von

Pankreaskarzinomzellen aufgedeckt wurde, und die Beteiligung von Rho-GTPasen an Zellmigrationsprozessen hinreichend bekannt ist (Sander und Collard, 1999; Schmitz et al., 2000; Ridley, 2001), wurden mit den EGFP-Rho-exprimierenden PANC-1-Zellklonen Migrationsexperimente durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die ektopische Expression von EGFP-RhoC im Vergleich zur Expression von EGFP und EGFP-RhoA zu einer stärkeren Migration der Zellen führt. Somit trug die Überexpression von RhoC in PANC-1-Zellen zur Entstehung eines motilen Phänotyps bei. Eine ähnliche Wirkung der RhoC-Überexpression wurde kürzlich von Clark et al. für Melanomzellen gezeigt (Clark et al., 2000). Die Arbeitsgruppe konnte anhand eines Mausmodelles zur Metastasierung und der *Microarray*-Technik demonstrieren, dass stark metastasierende Melanomzellen eine $\geq 2,5$ -fach höhere RhoC-mRNA-Expression aufweisen als vergleichsweise schwach metastasierende Melanomzellen. Darüber hinaus konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass nach Transfektion von A375M/P-Melanomzellen mit RhoC oder RhoA, lediglich RhoC zu einer erhöhten Migration der Zellen führt. Auch waren bei einer vergleichbaren Expression von RhoA und RhoC, RhoC-exprimierende Zellen stärker motil. Die Expression einer dominant-negativen RhoA(T19N)-Mutanten in stark metastasierenden A375M-Zellen konnte die Serum-induzierte Chemotaxis und Invasion um mehr als 50 % inhibieren (Clark et al., 2000). Das Prinzip der Hemmung der Rho-GTPasen durch dominant-negative RhoA(T19N)-Proteine beruht wie bei H-Ras(S17N)-Proteinen (Feig, 1999) darauf, dass dominant-negative RhoA-Mutanten eine höhere Affinität zu den für die Rho-Aktivierung erforderlichen GEF(*guanine nucleotide exchange factors*)-Proteinen haben als wildtypische Rho-Proteine. Da RhoA und RhoC eine 92 %ige Sequenzhomologie auf Aminosäureebene aufweisen (Ridley, 1997), und damit beide Rho-Isoformen vermutlich mit den gleichen GEF-Molekülen interagieren, konnte anhand der dominant-negativen RhoA(T19N)-Proteine eine RhoC-Aktivierung unterbunden werden. Da die Serum-induzierte Chemotaxis und Invasion von A375M-Zellen durch die Expression dominant-negativer RhoA(T19N)-Proteine jedoch nicht vollständig unterbunden werden konnte, sind wahrscheinlich noch weitere Faktoren für die gesteigerte Motilität dieser Zellen von Bedeutung.

Es konnte gezeigt werden, dass die kleinen GTPasen RhoA und RhoC in bezug auf die gerichtete Migration und Invasion von Tumorzellen eine unterschiedliche Wirkung entfalten. Daher muss an dieser Stelle die Frage nach differentiellen Effekten der beiden Rho-Isoformen gestellt werden. Obgleich es nicht viele Anhaltspunkte für Isoform-spezifische Effektorproteine und Steuerungsmechanismen in der Literatur gibt, könnte der speziell an

Position 188 des RhoA-Proteins auftretende Serin-Rest ein erster Hinweis sein. Es wurde gezeigt, dass der Serin-Rest, im Gegensatz zum Arginin-Rest an der entsprechenden Position in RhoC, durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden kann (Lang et al., 1996) und eine Inhibition der Serin-Phosphorylierung zu einer verminderten Membran-Lokalisation führt. Dieser Serin-Rest könnte daher für die subzelluläre Lokalisation von RhoA entscheidend sein und einen bedeutenden Einfluss auf den Aktivierungsmodus dieser kleinen GTPase haben. Dass eine RhoC-Überexpression bei Pankreaskarzinomzellen und Melanomzellen auftritt, verdeutlicht, dass die RhoC-Überexpression kein Charakteristikum einer spezifischen Tumorart darstellt. Bei beiden Tumorarten ist die perineurale Invasion jedoch ein hervorstechendes Merkmal der Metastasierung (Terashi et al., 1997).

8.6 Ausblick

In der Vergangenheit wurden verschiedene Ansätze zur Therapie des Pankreaskarzinoms verfolgt. Dabei wurden insbesondere Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren und monoklonale Antikörper eingesetzt.

Das im Rahmen dieser Arbeit für PANC-1-Zellen identifizierte und charakterisierte GDNF/Ret/GFR α -System könnte die Entwicklung spezifischer Therapie-Ansätze einleiten. Denkbar wäre die Herstellung von Chemotherapeutika, welche eine inhibierende oder antagonistische Wirkung in bezug auf Ret- und GFR α -Moleküle entfalten. Daneben könnten monoklonale Antikörper gegen die Ret/GFR α -Rezeptor-Komponenten eingesetzt werden. Durch eine gezielte Inhibition migrationsrelevanter Signaltransduktionswege in Pankreaskarzinomzellen könnte zudem die GDNF-induzierte Chemotaxis dieser Zellen gehemmt werden.

9 Literaturverzeichnis

- Airaksinen M. S., Titievsky A., Saarma M. (1999) GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* **13**, 313-325
- Alberti L., Borrello M. G., Ghizzoni S., Torriti F., Rizzetti M. G., Pierotti M. A. (1998) Grb2 binding to the different isoforms of Ret tyrosine kinase. *Oncogene* **17**, 1079-87
- Alessi D. R., James S. R., Downes C. P., Holmes A. B., Gaffney P. R., Reese C. B., Cohen P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* **7**, 261-9
- Amiel J., Lyonnet S. (2001) Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J Med Genet* **38**, 729-39
- Anders J., Kjar S., Ibanez C. F. (2001) 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* **276**, 35808-17
- Aoki K., Yoshida T., Matsumoto N., Ide H., Sugimura T., Terada M. (1997) Suppression of Ki-ras p21 levels leading to growth inhibition of pancreatic cancer cell lines with Ki-ras mutation but not those without Ki-ras mutation. *Mol Carcinog* **20**, 251-8
- Ardestani S. K., Inserra P., Solkoff D., Watson R. R. (1999) The role of cytokines and chemokines on tumor progression: A review. *Cancer Detect Prev* **23**, 215-25
- Arenas E. , Trupp M., Akerud P., Ibanez C. F. (1995) GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* **15**, 1465-73
- Arighi E., Alberti L., Torriti F., Ghizzoni S., Rizzetti M. G., Pelicci G., Pasini B., Bongarzone I., Piutti C., Pierotti M. A., Borrello M. G. (1997) Identification of Shc docking site on Ret tyrosine kinase. *Oncogene* **14**, 773-82
- Asai N., Iwashita T., Matsuyama M., Takahashi M. (1995) Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol* **15**, 1613-9
- Asai N., Murakami H., Iwashita T., Takahashi M. (1996) A mutation at tyrosine 1062 in MEN2A-Ret and MEN2B-Ret impairs their transforming activity and association with shc adaptor proteins. *J Biol Chem* **271**, 17644-9
- Avantaggiato V., Dathan N. A., Grieco M., Fabien N., Lazzaro D., Fusco A., Simeone A., Santoro M. (1994) Developmental expression of the RET protooncogene. *Cell Growth Differ* **5**, 305-11
- Baloh R. H., Tansey M. G., Golden J. P., Creedon D. J., Heuckeroth R. O., Keck C. L., Zimonjic D. B., Popescu N. C., Johnson E. M. Jr., Milbrandt J. (1997) TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. *Neuron* **18**, 793-802

- Baloh R. H., Tansey M. G., Lampe P. A., Fahrner T. J., Enomoto H., Simburger K. S., Leitner M. L., Araki T., Johnson E. M. Jr., Milbrandt J. (1998) Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* **21**, 1291-302
- Baloh R. H., Enomoto H., Johnson E. M. Jr, Milbrandt J. (2000) The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 103-10
- Beauchamp R. D., Lyons R. M., Yang E. Y., Coffey R. J. Jr, Moses H. L. (1990) Expression of and response to growth regulatory peptides by two human pancreatic carcinoma cell lines. *Pancreas* **5**, 369-80
- Beck K. D., Valverde J., Alexi T., Poulsen K., Moffat B., Vandlen R. A., Rosenthal A., Hefti F.(1995) Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* **373**, 339-41
- Bergmann U., Funatomi H., Yokoyama M., Beger H. G., Korc M. (1995) Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res* **55**, 2007-11
- Berrozpe G., Schaeffer J., Peinado M. A., Real F. X., Perucho M. (1994) Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer* **58**, 185-91
- Besset V., Scott R. P., Ibanez C. F. (2000) Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* **275**, 39159-66
- Blaikie P., Immanuel D., Wu J., Li N., Yajnik V., Margolis B.(1994) A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors. *J Biol Chem* **269**, 32031-4
- Bockman D. E., Buchler M., Beger H. G. (1994) Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Gastroenterology* **107**, 219-30
- Bongarzone I., Monzini N., Borrello M. G., Carcano C., Ferraresi G., Arighi E., Mondellini P., Della Porta G., Pierotti M. A. (1993) Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and the regulatory subunit RI alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol Cell Biol* **13**, 358-66
- Bonni A., Brunet A., West A. E., Datta S. R., Takasu M. A., Greenberg M. E. (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**, 1358-62
- Bordeaux M.-C., Forcet C., Granger L., Corset V., Bidaud C., Billaud M., Bredsen D. E., Edery P., Mehlen P. (2000) The ret proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J* **19**, 4056-4063

- Borrello M. G., Alberti L., Arighi E., Bongarzone I., Battistini C., Bardelli A., Pasini B., Piutti C., Rizzetti M. G., Mondellini P., Radice M. T., Pierotti M. A. (1996) The full oncogenic activity of Ret/ptc2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase Cgamma. *Mol Cell Biol* **16**, 2151-63
- Bostwick D. G., Grignon D. J., Hammond M. E., Amin M. B., Cohen M., Crawford D., Gospodarowicz M., Kaplan R. S., Miller D. S., Montironi R., Pajak T. F., Pollack A., Srigley J. R., Yarbrow J.W. (1999) Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement. *Arch Pathol Lab Med* **124**, 995-1000
- Bottenstein J. E., Sato G. H. (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 514-7
- Bredesen D. E., Ye X., Tasinato A., Sperandio S., Wang J. J., Assa-Munt N., Rabizadeh S. (1998) p75^{NTR} and the concept of cellular dependence: seeing how the other half die. *Cell Death Differ* **5**, 365-71
- Brognaard J., Clark A. S., Ni Y., Dennis P. A. (2001) Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* **61**, 3986-97
- Buj-Bello A., Buchman V. L., Horton A., Rosenthal A., Davies A. M. (1995) GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* **15**, 821-8
- Burgering B. M., Coffey P. J. (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* **376**, 599-602
- Carpenter C. L., Cantley L. C. (1996) Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 153-8
- Casaccia-Bonnet P., Kong H., Chao M. V. (1998) Neurotrophins: the biological paradox of survival factors eliciting apoptosis. *Cell Death Differ* **5**, 343-5
- Chao M. V., Hempstead B. L. (1995) p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* **18**, 321-6
- Chen C., Okayama H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**, 2745-52
- Chen Y., Chen Q., Lu G., Fan Z., Zhong S. (1994) The autocrine regulatory effect of vasoactive intestinal peptide on the growth of human pancreatic carcinoma cells. *Chin Med Sci J* **9**, 215-9
- Chen Z., Chai Y., Cao L., Huang A., Cui R., Lu C., He C. (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes survival and induces differentiation through the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathway respectively in PC12 cells. *Neuroscience* **104**, 593-8

- Chiariello M., Visconti R., Carlomagno F., Melillo R. M., Bucci C., de Franciscis V., Fox G. M., Jing S., Coso O. A., Gutkind J. S., Fusco A., Santoro M. (1998) Signalling of the Ret receptor tyrosine kinase through the c-Jun NH2-terminal protein kinases (JNK): evidence for a divergence of the ERKs and JNKs pathways induced by Ret. *Oncogene* **16**, 2435-45
- Cik M., Masure S., Lesage A. S., Van Der Linden I., Van Gompel P., Pangalos M. N., Gordon R. D., Leysen J. E. (2000) Binding of GDNF and neurturin to human GDNF family receptor alpha 1 and 2. Influence of cRET and cooperative interactions. *J Biol Chem* **275**, 27505-12
- Clark E. A., Golub T. R., Lander E. S., Hynes R. O. (2000) Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* **406**, 532-5
- Contos J. J., Ishii I., Chun J. (2000) Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* **58**, 1188-96
- Copeland N. G., Zelenetz A. D., Cooper G. M. (1979) Transformation of NIH/3T3 mouse cells by DNA of Rous sarcoma virus. *Cell* **17**, 993-1002
- Coso O. A., Chiariello M., Yu J.-C., Teramoto H., Crespo P., Xu N., Miki T., Gutkind J. S. (1995a) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-1146
- Coso O. A., Chiariello M., Kalinec G., Kyriakis J. M., Woodgett J., Gutkind J. S. (1995b) Transforming G-protein coupled receptors potentially activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. *J Biol Chem* **270**, 5620-5624
- Coulson E. J., Reid K., Bartlett P. F. (1999) Signaling of neuronal cell death by the p75NTR neurotrophin receptor. *Mol Neurobiol* **20**, 29-44
- Creedon D. J., Tansey M. G., Baloh R. H., Osborne P. A., Lampe P. A., Fahrner T. J., Heuckeroth R. O., Milbrandt J., Johnson E. M. Jr. (1997) Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 7018-23
- Datta S. R., Brunet A., Greenberg M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* **13**, 2905-27
- Davies A. M. (1998) Neuronal survival: early dependence on Schwann cells. *Curr Biol* **8**, R15-8
- Davis R. J. (1994) MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* **19**, 470-3
- Delehedde M., Sergeant N., Lyon M., Rudland P. S., Fernig D. G. (2001) Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates migration of rat mammary fibroblasts through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways. *Eur J Biochem* **268**, 4423-9

- Djakiew D., Pflug B. R., Delsite R., Onoda M., Lynch J. H., Arand G., Thompson E. W. (1993) Chemotaxis and chemokinesis of human prostate tumor cell lines in response to human prostate stromal cell secretory proteins containing a nerve growth factor-like protein. *Cancer Res* **53**, 1416-20
- Donis-Keller H., Dou S., Chi D., Carlson K. M., Toshima K., Lairmore T. C., Howe J. R., Moley J. F., Goodfellow P., Wells S. A. Jr. (1993) Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* **2**, 851-6
- Dudek H., Datta S. R., Franke T. F., Birnbaum M. J., Yao R., Cooper G. M., Segal R. A., Kaplan D. R., Greenberg M. E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* **275**, 628-30
- Durbec P., Marcos-Gutierrez C. V., Kilkenny C., Grigoriou M., Wartowaara K., Suvanto P., Smith D., Ponder B., Costantini F., Saarma M. (1996) GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* **382**, 29-30
- Durick K., Gill G. N., Taylor S. S. (1998) Shc and Enigma are both required for mitogenic signaling by Ret/ptc2. *Mol Cell Biol* **18**, 2298-308
- Ebert M., Yokoyama M., Friess H., Buchler M. W., Korc M. (1994) Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* **54**, 5775-8
- Ederly P., Eng C., Munnich A., Lyonnet S. (1997) RET in human development and oncogenesis. *Bioessays* **19**, 389-95
- Eigenbrot C., Gerber N. (1997) X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 Å resolution and implications for receptor binding. *Nat Struct Biol* **4**, 435-8
- Eketjäll S., Fainzilber M., Murray-Rust J., Ibanez C. F. (1999) Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFRalpha1 and activation of the GFRalpha1-c-Ret receptor complex. *EMBO J* **18**, 5901-10
- Evers E. E., Zondag G. C., Malliri A., Price L. S., ten Klooster J. P., van der Kammen R. A., Collard J. G. (2000) Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer* **36**, 1269-74
- Feig L. A. (1999) Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* **1**, E25-27
- Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 7413-7
- Felgner P. L. (1996) Improvements in cationic liposomes for in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther* **7**, 1791-3
- Filippa N., Sable C. L., Filloux C., Hemmings B., Van Obberghen E. (1999) Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* **19**, 4989-5000

- Forcet C., Ye X., Granger L., Corset V., Shin H., Bredesen D. E., Mehlen P. (2001) The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3416-21
- Franke T. F., Yang S. I., Chan T. O., Datta K., Kazlauskas A., Morrison D. K., Kaplan D. R., Tsichlis P. N. (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81**, 727-36
- Friess H., Korc M., Buchler M. W. (1994) Molecular biology of pancreatic cancer: overexpression of fibroblast growth factors. *Chirurg* **65**, 604-10
- Friess H., Berberat P., Schilling M., Kunz J., Korc M., Buchler M. W. (1996) Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors. *J Mol Med* **74**, 35-42
- Friess H., Kleeff J., Korc M., Buchler M. W. (1999) Molecular aspects of pancreatic cancer and future perspectives. *Dig Surg* **16**, 281-90
- Fritz G., Just I., Kaina B. (1999) Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* **81**, 682-7
- Geldof A. A., De Kleijn M. A., Rao B. R., Newling D. W. (1997) Nerve growth factor stimulates in vitro invasive capacity of DU145 human prostatic cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **123**, 107-12
- Gerdes H. H., Kaether C. (1996) Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett* **389**, 44-7
- Giehl K., Skripczynski B., Mansard A., Menke A., Gierschik P. (2000) Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene* **19**, 2930-42
- Gomez J, Martinez-A C, Gonzalez A, Rebollo A. (1998) Dual role of Ras and Rho proteins: at the cutting edge of life and death. *Immunol Cell Biol* **76**, 125-34
- de Graaff E., Srinivas S., Kilkenny C., D'Agati V., Mankoo B. S., Costantini F., Pachnis V. (2001) Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes Dev* **15**, 2433-44
- Graham F. L. Smiley J., Russell W. C., Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-72
- Graham C. W., Lynch J. H., Djakiew D. (1992) Distribution of nerve growth factor-like protein and nerve growth factor receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma. *J Urol* **147**, 1444-7

- Grieco M., Santoro M., Berlingieri M. T., Melillo R. M., Donghi R., Bongarzone I., Pierotti M. A., Della Porta G., Fusco A., Vecchio G. (1990) PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* **60**, 557-63
- Grimm L., Holinski-Feder E., Teodoridis J., Scheffer B., Schindelhauer D., Meitinger T., Ueffing M. (1998) Analysis of the human GDNF gene reveals an inducible promoter, three exons, a triplet repeat within the 3'-UTR and alternative splice products. *Hum Mol Genet* **7**, 1873-86
- Grinspan J. B., Marchionni M. A., Reeves M., Coulaloglou M., Scherer S. S. (1996) Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci* **16**, 6107-18
- Gudjonsson B. (1987) Cancer of the pancreas. 50 years of surgery. *Cancer* **60**, 2284-2303
- Guo Y. S., Townsend C. M. (2000) Jr. Roles of gastrointestinal hormones in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **7**, 276-85
- Gupta S., Stuffrein S., Plattner R., Tencati M., Gray C., Whang Y. E., Stanbridge E. J. (2001) Role of phosphoinositide 3-kinase in the aggressive tumor growth of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Mol Cell Biol* **21**, 5846-56
- Gutthoff A., Rothke B., Klapdor R., Klöppel G. (1987) Rezidivdiagnostik des Pankreaskarzinoms (abstract). *Klin Wochenschr* **65**, 48
- Hawkins P. T., Eguinoa A., Qiu R. G., Stokoe D., Cooke F. T., Walters R., Wennstrom S., Claesson-Welsh L., Evans T., Symons M., et al. (1995) PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol* **5**, 393-403
- Hayashi H., Ichihara M., Iwashita T., Murakami H., Shimono Y., Kawai K., Kurokawa K., Murakumo Y., Imai T., Funahashi H., Nakao A., Takahashi M. (2000) Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oncogene* **19**, 4469-75
- Hearn C. J., Murphy M., Newgreen D. (1998) GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons in vitro. *Dev Biol* **197**, 93-105
- Henderson C. E., Phillips H. S., Pollock R. A., Davies A. M., Lemeulle C., Armanini M., Simmons L., Moffet B., Vandlen R. A., Simpson L. C. et al. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* **266**, 1062-4
- Le Hir H., Charlet-Berguerand N., Gimenez-Roqueplo A., Mannelli M., Plouin P., de Franciscis V., Thermes C. (2000) Relative expression of the RET9 and RET51 isoforms in human pheochromocytomas. *Oncology* **58**, 311-8
- Ishiguro Y., Iwashita T., Murakami H., Asai N., Iida K., Goto H., Hayakawa T., Takahashi M. (1999) The role of amino acids surrounding tyrosine 1062 in ret in specific binding of the shc phosphotyrosine-binding domain. *Endocrinology* **140**, 3992-8

- Ivanchuk S. M., Eng C., Cavenee W. K., Mulligan L. M. (1997) The expression of RET and its multiple splice forms in developing human kidney. *Oncogene* **14**, 1811-8
- Ivanchuk S. M., Myers S. M., Mulligan L. M. (1998) Expression of RET 3' splicing variants during human kidney development. *Oncogene* **16**, 991-6
- Iwashita T., Kato M., Murakami H., Asai N., Ishiguro Y., Ito S., Iwata Y., Kawai K., Asai M., Kurokawa K., Kajita H., Takahashi M. (1999) Biological and biochemical properties of Ret with kinase domain mutations identified in multiple endocrine neoplasia type 2B and familial medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* **18**, 3919-22
- Iwashita T., Murakami H., Kurokawa K., Kawai K., Miyauchi A., Futami H., Qiao S., Ichihara M., Takahashi M. (2000) A two-hit model for development of multiple endocrine neoplasia type 2B by RET mutations. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 804-808
- Iwamoto T., Taniguchi M., Asai N., Ohkusu K., Nakashima I, Takahashi M. (1993) cDNA cloning of mouse ret proto-oncogene and its sequence similarity to the cadherin superfamily. *Oncogene* **8**, 1087-91
- Jing S., Wen D., Yu Y., Holst P. L., Luo Y., Fang M., Tamir R., Antonio L., Hu Z., Cupples R., Louis J. C., Hu S., Altrock B. W., Fox G. M. (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* **85**, 1113-24
- Jing S., Yu Y., Fang M., Hu Z., Holst P. L., Boone T., Delaney J., Schultz H., Zhou R., Fox G. M. (1997) GFRalpha-2 and GFRalpha-3 are two new receptors for ligands of the GDNF family. *J Biol Chem* **272**, 33111-7
- Joneson T., McDonough M., Bar-Sagi D., Van Aelst L. (1996) RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase. *Science* **274**, 1374-6
- Kimura W., Morikane K., Esaki Y., Chan W. C., Pour P. M. (1998) Histologic and biologic patterns of microscopic pancreatic ductal adenocarcinomas detected incidentally at autopsy. *Cancer* **82**, 1839-49
- Klein R. D., Sherman D., Ho W. H. , Stone D., Bennett G. L., Moffat B., Vandlen R., Simmons L., Gu Q., Hongo J. A., Devaux B., Poulsen K., Armanini M., Nozaki C., Asai N., Goddard A., Phillips H., Henderson C., Takahashi M., Rosenthal A. (1997) A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature* **387**, 717-721
- Klemke R. L., Cai S., Giannini A. L., Gallagher P. J., de Lanerolle P., Cheresch D. A. (1997) Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* **137**, 481-92
- Klöppel G., Heitz P. U. (1984) Pancreatic, non endocrine-tumours. *Pancreatic pathology*, New York: Churchill Livingstone, 79-113
- Klöppel G., Heitz P. U. (1988) Pancreatic endocrine tumors. *Pathol Res Pract* **183**, 155-68

- Koch C. A., Anderson D., Moran M. F., Ellis C., Pawson T. (1991) SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **252**, 668-74
- Kokaia Z., Airaksinen M. S., Nanobashvili A., Larsson E., Kujamaki E., Lindvall O., Saarma M. (1999) GDNF family ligands and receptors are differentially regulated after brain insults in the rat. *Eur J Neurosci* **11**, 1202-16
- Konishi H., Matsuzaki H., Tanaka M., Takemura Y., Kuroda S., Ono Y., Kikkawa U. (1997) Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett* **410**, 493-8
- Korc M. (1998) Role of growth factors in pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am* **7**, 25-41
- Kozak M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **15**, 8125-48
- Krasilnikov M. A. (2000) Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc)* **65**, 59-67
- Kurokawa K., Iwashita T., Murakami H., Hayashi H., Kawai K., Takahashi M. (2001) Identification of SNT/FRS2 docking site on RET receptor tyrosine kinase and its role for signal transduction. *Oncogene* **20**, 1929-38
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lallemant D., Ham J., Garbay S., Bakiri L., Traincard F., Jeannequin O., Pfarr C. M., Yaniv M. (1998) Stress-activated protein kinases are negatively regulated by cell density. *EMBO J* **17**, 5615-26
- Lang P., Gesbert F., Delespine-Carmagnat M., Stancou R., Pouchelet M., Bertoglio J. (1996) Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J* **15**, 510-9
- Lassus P., Roux P., Zugasti O., Philips A., Fort P., Hibner U. (2000) Extinction of rac1 and Cdc42Hs signalling defines a novel p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* **19**, 2377-85
- Li L., Wu W., Lin L. F., Lei M., Oppenheim R. W., Houenou L. J. (1995) Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9771-5
- Lin L. F., Doherty D. H., Lile J. D., Bektesh S., Collins F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* **260**, 1130-2
- Lin L. F., Zhang T. J., Collins F., Armes L.G. (1994) Purification and initial characterization of rat B49 glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* **63**, 758-68

- Liu A. X., Testa J. R., Hamilton T. C., Jove R., Nicosia S. V., Cheng J. Q. (1998) AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras, and v-src through phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* **58**, 2973-7
- Liu X., Vega Q. C., Decker R. A., Pandey A., Worby C. A., Dixon J. E. (1996) Oncogenic RET receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities. *J Biol Chem* **271**, 5309-12
- Lorenzo M. J., Eng C., Mulligan L. M., Stonehouse T. J., Healey C. S., Ponder B. A., Smith D. P. (1995) Multiple mRNA isoforms of the human RET proto-oncogene generated by alternate splicing. *Oncogene* **10**, 1377-83
- Lorenzo M. J., Gish G. D., Houghton C., Stonehouse T. J., Pawson T., Ponder B. A., Smith D. P. (1997) RET alternate splicing influences the interaction of activated RET with the SH2 and PTB domains of Shc, and the SH2 domain of Grb2. *Oncogene* **14**, 763-71
- Mak Y. F., Ponder B. A. (1996) RET oncogene. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 82-6
- Manie S., Santoro M., Fusco A., Billaud M. (2001) The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet* **17**, 580-9
- Marczell A., Glaser K., Karner J., Mischinger H. J., Schratte-Sehn A., Tatzer G. (1998) Pancreatic and periampullary cancer, *ACO-Manual (Austrian Society of Surgical Oncology)* zu finden unter: www.aco.at/manual/pankreas/stat.html
- Di Marco E., Pierce J. H., Aaronson S. A., Di Fiore P. P. (1990) Mechanisms by which EGF receptor and TGF alpha contribute to malignant transformation. *Nat Immun Cell Growth Regul* **9**, 209-21
- Mason I. (2000) The RET receptor tyrosine kinase: activation, signalling and significance in neural development and disease. *Pharm Acta Helv* **74**, 261-4
- Matera I., De Miguel-Rodriguez M., Fernandez-Santos J. M., Santamaria G., Puliti A., Ravazzolo R., Romeo G., Galera-Davidson H., Ceccherini I. (2000) cDNA sequence and genomic structure of the rat RET proto-oncogene. *DNA Seq* **11**, 405-17
- Mehlen P., Bredesen D. E. (2000) Dependence receptors as links between apoptosis, nervous system, development and control of tumorigenesis. *Bulletin du Cancer* **87**, 537-41
- Melillo R. M., Santoro M., Ong S. H., Billaud M., Fusco A., Hadari Y. R., Schlessinger J., Lax I. (2001) Docking protein FRS2 links the protein tyrosine kinase RET and its oncogenic forms with the mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *Mol Cell Biol* **21**, 4177-87
- Meyer G. E., Shelden E., Kim B., Feldman E. L. (2001) Insulin-like growth factor I stimulates motility in human neuroblastoma cells. *Oncogene* **20**, 7542-50
- Michiels F., Habets G. G., Stam J. C., van der Kammen R. A., Collard J. G. (1995) A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* **375**, 338-40

- Miknyoczki S. J., Klein-Szanto A. J., Ruggeri B. A. (1996) Neurotrophin-Trk receptor interactions in neoplasia: a possible role in interstitial and perineural invasion in ductal pancreatic cancer. *Crit Rev Oncog* **7**, 89-100
- Miknyoczki S. J., Lang D., Huang L., Klein-Szanto A. J., Dionne C. A., Ruggeri B. A. (1999) Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *Int J Cancer* **81**, 417-27
- Milbrandt J., de Sauvage F. J., Fahrner T. J., Baloh R. H., Leitner M. L., Tansey M. G., Lampe P. A., Heuckeroth R. O., Kotzbauer P. T., Simburger K. S., Golden J. P., Davies J. A., Vejsada R., Kato A. C., Hynes M., Sherman D., Nishimura M., Wang L. C., Vandlen R., Moffat B., Klein R. D., Poulsen K., Gray C., Garces A., Johnson E. M. Jr. et al. (1998) Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* **20**, 245-53
- Minden A., Lin A., McMahon M., Lange-Carter C., Derijard B., Davis R. J., Johnson G. L., Karin M. (1994) Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* **266**, 1719-23
- Minden A., Lin A., Claret F. X., Abo A., Karin M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**, 1147-57
- Mirsky R., Jessen K. R. (1999) The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol* **9**, 293-311
- Mograbli B., Bocciardi R., Bourget I., Busca R., Rochet N., Farahi-Far D., Juhel T., Rossi B. (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activities exert opposing effects on the ERK pathway: importance for the rescue of neuroectodermic cells. *J Biol Chem* **276**, 45307-19
- Moore M. W., Klein R. D., Farinas I., Sauer H., Armanini M., Phillips H., Reichardt L. F., Ryan A. M., Carver-Moore K., Rosenthal A. (1996) Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* **382**, 76-9
- Moscow J. A., He R., Gnarr J. R., Knutsen T., Weng Y., Zhao W. P., Whang-Peng J., Linehan W. M., Cowan K. H. (1994) Examination of human tumors for rhoA mutations. *Oncogene* **9**, 189-94
- Mulligan L. M., Eng C., Healey C. S., Clayton D., Kwok J. B., Gardner E., Ponder M. A., Frilling A., Jackson C. E., Lehnert H., et al. (1994) Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet* **6**, 70
- Mulligan L. M., Ponder B. A. (1995) Genetic basis of endocrine disease: multiple endocrine neoplasia type 2. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 1989-95
- Myers S. M., Eng C., Ponder B. A., Mulligan L. M. (1995) Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene* **11**, 2039-45

- Nakamori S., Tamura S., Arai I., Kameyama M., Furukawa F., Ishikawa O., Imaoka S., Yoshioka K., Mukai M., Shinkai K., Akedo H. (1996) Increased expression of RhoAp21 protein is involved in progression and metastasis of colorectal carcinoma. *Rec Adv Gastroenterol Carcinogenesis* **1**, 901-904
- Nakamura T., Kanda S., Yamamoto K., Kohno T., Maeda K., Matsuyama T., Kanetake H. (2001) Increase in hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase activity in renal carcinoma cells is associated with increased motility partly through phosphoinositide 3-kinase activation. *Oncogene* **20**, 7610-23
- Nakao A., Harada A., Nonami T., Kaneko T., Takagi H. (1996) Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer. *Pancreas* **12**, 357-61
- Naveilhan P., ElShamy W. M., Ernfors P. (1997) Differential regulation of mRNAs for GDNF and its receptors Ret and GDNFR alpha after sciatic nerve lesion in the mouse. *Eur J Neurosci* **9**, 1450-60
- McNeal J. E. (1992) Cancer volume and site of origin of adenocarcinoma in the prostate: relationship to local and distant spread. *Hum Pathol* **23**, 258-66
- Nobes C. D., Hall A. (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* **23**, 456-9
- Nobes C. D., Hall A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144**, 1235-44
- Nosrat C. A., Tomac A., Lindqvist E., Lindskog S., Humpel C., Stromberg I., Ebendal T., Hoffer B. J., Olson L. (1996) Cellular expression of GDNF mRNA suggests multiple functions inside and outside the nervous system. *Cell Tissue Res* **286**, 191-207
- Nosrat C. A., Tomac A., Hoffer B. J., Olson L. (1997) Cellular and developmental patterns of expression of Ret and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha mRNAs. *Exp Brain Res* **115**, 410-22
- Okada Y., Takeyama H., Sato M., Morikawa M., Sobue K., Asai K., Tada T., Kato T., Manabe T. (1999) Experimental implication of celiac ganglionotropic invasion of pancreatic-cancer cells bearing *c-ret* proto-oncogene with reference for glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF). *Int J Cancer* **81**, 67-73
- Okkenhaug K. und Vanhaesebroeck B. (2001) New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha. *Sci STKE* **65**, PE1
- O'Rourke D. A., Sakurai H., Spokes K., Kjelsberg C., Takahashi M., Nigam S., Cantley L. (1999) Expression of *c-ret* promotes morphogenesis and cell survival in mIMCD-3 cells. *Am J Physiol* **276**, F581-8
- Ouyang Y. B., Zhang X. H., He Q. P., Wang G. X., Siesjo B. K., Hu B. R. (2000) Differential phosphorylation at Ser473 and Thr308 of Akt-1 in rat brain following hypoglycemic coma. *Brain Res* **876**, 191-5

- Ozaki H., Hiraoka T., Mizumoto R., Matsuno S., Matsumoto Y., Nakayama T., Tsunoda T., Suzuki T., Monden M., Saitoh Y., Yamauchi H., Ogata Y. (1999) The prognostic significance of lymph node metastasis and intrapancreatic perineural invasion in pancreatic cancer after curative resection. *Surg Today* **29**, 16-22
- Pandey A., Duan H., Di Fiore P. P., Dixit V. M. (1995) The Ret receptor protein tyrosine kinase associates with the SH2-containing adapter protein Grb10. *J Biol Chem* **270**, 21461-3
- Pandey A., Liu X., Dixon J. E., Di Fiore P. P., Dixit V. M. (1996) Direct association between the Ret receptor tyrosine kinase and the Src homology 2-containing adapter protein Grb7. *J Biol Chem* **271**, 10607-10
- Pandit S. D., O'Hare T., Donis-Keller H., Pike L.J. (1997) Functional characterization of an epidermal growth factor receptor/RET chimera. *J Biol Chem* **272**, 2199-206
- Paratcha G., Ledda F., Baars L., Couplier M., Besset V., Anders J., Scott R, Ibanez C. F. (2001) Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron* **29**, 171-84
- Parker S. L., Tong T., Bolden S., Wingo P. A., (1997) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **47**, 5-27
- Pasini B., Hofstra R. M., Yin L., Bocciardi R., Santamaria G., Grootsholten P. M., Ceccherini I., Patrone G., Priolo M., Buys C. H. (1995) The physical map of the human RET proto-oncogene. *Oncogene* **11**, 1737-43
- Pasini B., Ceccherini I., Romeo G. (1996) RET mutations in human disease. *Trends Genet* **12**, 138-44
- Pichel J. G., Shen L., Sheng H. Z., Granholm A. C., Drago J., Grinberg A., Lee E. J., Huang S. P., Saarma M., Hoffer B. J., Sariola H., Westphal H. (1996) Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* **382**, 73-6
- Ponder B. A., Smith D. (1996) The MEN II syndromes and the role of the ret proto-oncogene. *Adv Cancer Res* **70**, 179-222
- Pong K., Xu R. Y., Baron W. F., Louis J .C., Beck K. D. (1998) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks cellular differentiation mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor in dopaminergic neurons. *J Neurochem* **71**, 1912-9
- Poteryaev D., Titievsky A., Sun Y. F., Thomas-Crusells J., Lindahl M., Billaud M., Arumäe U., Saarma M. (1999) GDNF triggers a novel Ret-independent src kinase family-coupled signaling via GPI-linked GDNF-receptor. *FEBS Lett* **463**, 63-66
- Raabe T. D., Clive D. R., Neuberger T. J., Wen D., DeVries G. H. (1996) Cultured neonatal Schwann cells contain and secrete neuregulins. *J Neurosci Res* **46**, 263-70
- Ramer M. S., Priestley J. V., McMahon S. B. (2000) Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature* **403**, 312-6

- Ramo O. J., Balasubramaniam A., Sheriff S., Rogers D. H., McCullough P. J., Bell R. H. Jr. (1990) Neuropeptide Y and peptide YY stimulate the growth of exocrine pancreatic carcinoma cells. *Neuropeptides* **15**, 101-6
- Reif K., Nobes C. D., Thomas G., Hall A., Cantrell D. A. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr Biol* **6**, 1445-55
- Ren X.-D. und Schwartz M.A. (2000) Determination of GTP-loading on Rho. *Methods Enzymol* **325**, 246-272
- Ren X. D., Kiosses W. B., Schwartz M. A. (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* **18**, 578-85
- Di Renzo M. F., Poulson R., Olivero M., Comoglio P. M., Lemoine N. R. (1995) Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* **55**, 1129-38
- Ridley A. J., Paterson H. F., Johnston C. L., Diekmann D., Hall A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-10
- Ridley A. J. (1997) The GTP-binding protein Rho. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 1225-9
- Ridley A. J. (2001) Rho family proteins: coordinating cell response. *Trends Cell Biol* **11**, 471-7
- Rihet S., Vielh P., Camonis J., Goud B., Chevillard S., de Gunzburg J. (2001) Mutation status of genes encoding RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases in a panel of invasive human colorectal and breast tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**, 733-8
- Robertson K., Mason I. (1997) The GDNF-RET signalling partnership. *Trends Genet* **13**, 1-3
- Robinson D., He F., Pretlow T., Kung H. J. (1996) A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5958-62
- Rodriguez-Viciano P., Warne P. H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M. J., Waterfield M. D., Downward J. (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**, 527-32
- Rodriguez-Viciano P., Marte B. M., Warne P. H., Downward J. (1996) Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **351**, 225-31/discussion 231-2
- Rodriguez-Viciano P., Warne P. H., Khwaja A., Marte B. M., Pappin D., Das P., Waterfield M. D., Ridley A., Downward J. (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**, 457-67
- de Rooij J., Bos J. L. (1997) Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* **14**, 623-5

- Rosenthal A. (1999) The GDNF protein family: gene ablation studies reveal what they really do and how. *Neuron* **22**, 201-3
- Rossel M., Pasini A., Chappuis S., Geneste O., Fournier L., Schuffenecker I., Takahashi M., van Grunsven L. A., Urdiales J. L., Rudkin B. B., Lenoir G. M., Billaud M. (1997) Distinct biological properties of two RET isoforms activated by MEN 2A and MEN 2B mutations. *Oncogene* **14**, 265-75
- Ruan Y., Rabizadeh S., Camerini D., Bredesen D. E. (1997) Expression of CD40 induces neural apoptosis. *J Neurosci Res* **50**, 383-90
- Rudolph G., Schilbach-Stuckle K., Handgretinger R., Kaiser P., Hameister H. (1991) Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS. *Hum Genet* **86**, 562-6
- Ruggeri B. A., Huang L., Wood M., Cheng J. Q., Testa J. R. (1998) Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol Carcinog* **21**, 81-6
- Rushton J. A., Schmitz S., Gunn-Moore F., Sherman D., Pappas C. A., Ritchie J. M., Haynes L. W. (1999) Growth arrest and spontaneous differentiation are initiated through an autocrine loop in clonally derived Schwann cells by alpha1-procollagen I C-propeptide. *J Neurochem* **73**, 1816-27
- Sakamoto Y., Kitajima Y., Edakuni G., Sasatomi E., Mori M., Kitahara K., Miyazaki K. (2001) Expression of Trk tyrosine kinase receptor is a biologic marker for cell proliferation and perineural invasion of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep* **8**, 477-84
- Sakurai Y., Sawada T., Chung Y. S., Funae Y., Sowa M. (1997) Identification and characterization of motility stimulating factor secreted from pancreatic cancer cells: role in tumor invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* **15**, 307-17
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: laboratory manual, 2. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sanchez I., Hughes R. T., Mayer B. J., Yee K., Woodgett J. R., Avruch J., Kyriakis J. M., Zon L. I. (1994) Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* **372**, 794-8
- Sanchez M. P., Silos-Santiago I., Frisen J., He B., Lira S. A., Barbacid M. (1996) Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* **382**, 70-3
- Sander E. E., van Delft S., ten Klooster J. P., Reid T., van der Kammen R. A., Michiels F., Collard J. G. (1998) Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* **143**, 1385-98
- Sander E. E., Collard J. G. (1999) Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* **35**, 1905-11

- Sanicola M., Hession C., Worley D., Carmillo P., Ehrenfels C., Walus L., Robinson S., Jaworski G., Wei H., Tizard R., Whitty A., Pepinsky R. B., Cate R. L. (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 6238-43
- Santoro M., Dathan N. A., Berlingieri M. T., Bongarzone I., Paulin C., Grieco M., Pierotti M. A., Vecchio G., Fusco A. (1994a) Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* **9**, 509-16
- Santoro M., Wong W. T., Aroca P., Santos E., Matoskova B., Grieco M., Fusco A., di Fiore P. P. (1994b) An epidermal growth factor receptor/ret chimera generates mitogenic and transforming signals: evidence for a ret-specific signaling pathway. *Mol Cell Biol* **14**, 663-75
- Santoro M., Melillo R. M., Carlomagno F., Visconti R., De Vita G., Salvatore G., Lupoli G., Fusco A., Vecchio G. (1998) Molecular biology of the MEN2 gene. *J Intern Med* **243**, 505-8
- Santoro M., Melillo R. M., Carlomagno F., Visconti R., De Vita G., Salvatore G., Fusco A., Vecchio G. (1999) Different mutations of the RET gene cause different human tumoral diseases. *Biochimie* **81**, 397-402
- Sawada H., Ibi M., Kihara T., Urushitani M., Nakanishi M., Akaike A., Shimohama S. (2000) Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor in mesencephalic neurons. *J Neurochem* **74**, 1175-84
- Schindelhauer D., Schuffenhauer S., Gasser T., Steinkasserer A., Meitinger T. (1995) The gene coding for glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) maps to chromosome 5p12-p13.1. *Genomics* **28**, 605-7
- Schmitz A. A., Govek E. E., Bottner B., Van Aelst L. (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* **261**, 1-12
- Schneider M. B., Standop J., Ulrich A., Wittel U., Friess H., Andren-Sandberg A., Pour P. M. (2001) Expression of nerve growth factors in pancreatic neural tissue and pancreatic cancer. *J Histochem Cytochem* **49**, 1205-10
- Schubert D. (1974) Induced differentiation of clonal rat nerve and glial cells. *Neurobiology* **4**, 376-87
- Schuchardt A., D'Agati V., Larsson-Blomberg L., Costantini F., Pachnis V. (1994) Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* **367**, 380-3
- Seeger R. C., Rayner S. A., Banerjee A., Chung H., Laug W. E., Neustein H. B., Benedict W. F. (1977) Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* **37**, 1364-71

- Segouffin-Cariou C., Billaud M. (2000) Transforming ability of MEN2A-RET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway. *J Biol Chem* **275**, 3568-76
- Sirivatanauksorn V., Sirivatanauksorn Y., Lemoine N. R. (1998) Molecular pattern of ductal pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg* **383**, 105-15
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. und Klenk D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85
- Soler R. M., Dolcet X., Encinas M., Egea J., Bayascas J. R., Comella J. X. (1999) Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J Neurosci* **19**, 9160-9
- Springer J. E., Seeburger J. L., He J., Gabrea A., Blankenhorn E. P., Bergman L. W. (1995) cDNA sequence and differential mRNA regulation of two forms of glial cell line-derived neurotrophic factor in Schwann cells and rat skeletal muscle. *Exp Neurol* **131**, 47-52
- Stuart K. A., Riordan S. M., Lidder S., Crostella L., Williams R., Skouteris G. G. (2000) Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signalling. *Int J Exp Pathol* **81**, 17-30
- Su Z., Lebedeva I. V., Gopalkrishnan R. V., Goldstein N. I., Stein C. A., Reed J. C., Dent P., Fisher P.B. (2001) A combinatorial approach for selectively inducing programmed cell death in human pancreatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10028-30
- Suwa H., Ohshio G., Imamura T., Watanabe G., Ariis S., Imamura M., Narumiya S., Hiai H., Fukumoto M. (1998) Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer* **77**, 147-152
- Tahira T., Ishizaka Y., Itoh F., Sugimura T., Nagao M. (1990) Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. *Oncogene* **5**, 97-102
- Takahashi M., Ritz J., Cooper G. M. (1985) Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* **42**, 581-8
- Takahashi M., Cooper G. M. (1987) ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **7**, 1378-85
- Takahashi M., Buma Y., Iwamoto T., Inaguma Y., Ikeda H., Hiai H. (1988) Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* **3**, 571-8
- Takahashi M., Buma Y., Hiai H. (1989) Isolation of ret proto-oncogene cDNA with an amino-terminal signal sequence. *Oncogene* **4**, 805-6

- Takahashi M., Buma Y., Taniguchi M. (1991) Identification of the ret proto-oncogene products in neuroblastoma and leukemia cells. *Oncogene* **6**, 297-301
- Takahashi M., Asai N., Iwashita T., Isomura T., Miyazaki K., Matsuyama M. (1993) Characterization of the ret proto-oncogene products expressed in mouse L cells. *Oncogene* **8**, 2925-9
- Takahashi M. (2001) The GDNF/Ret signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 361-371
- Takahashi T., Ishikura H., Motohara T., Okushiba S., Dohke M., Katoh H. (1997) Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J Surg Oncol* **65**, 164-70
- Tan M. H., Nowak N. J., Loor R., Ochi H., Sandberg A. A., Lopez C., Pickren J. W., Berjian R., Douglass H. O. Jr., Chu T. M. (1986) Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest* **4**, 15-23
- Tang M. J., Worley D., Sanicola M., Dressler G. R. (1998) The RET-glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) pathway stimulates migration and chemoattraction of epithelial cells. *J Cell Biol* **142**, 1337-45
- Tanno S., Tanno S., Mitsuuchi Y., Altomare D. A., Xiao G. H., Testa J. R. (2001) AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* **61**, 589-93
- Tansey M. G., Baloh R. H., Milbrandt J., Johnson EM Jr. (2000) GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* **25**, 611-23
- Terashi H., Kurata S., Tadokoro T., Ishii Y., Sato H., Kudo Y., Katagiri K., Itami S., Takayasu S. (1997) Perineural and neural involvement in skin cancers. *Dermatol Surg* **23**, 259-64; discussion 264-5
- Tezel E., Kawase Y., Takeda S., Oshima K., Nakao A. (2001) Expression of neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer. *Pancreas* **22**, 122-5
- Thompson J., Doxakis E., Pinon L. G., Strachan P., Buj-Bello A., Wyatt S., Buchman V. L., Davies A. M. (1998) GFRalpha-4, a new GDNF family receptor. *Mol Cell Neurosci* **11**, 117-26
- Tolias K. F., Cantley L. C., Carpenter C. L. (1995) Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem* **270**, 17656-9
- Treanor J. J., Goodman L., de Sauvage F., Stone D. M., Poulsen K. T., Beck C. D., Gray C., Armanini M. P., Pollock R. A., Hefti F., Phillips H. S., Goddard A., Moore M. W., Buj-Bello A., Davies A. M., Asai N., Takahashi M., Vandlen R., Henderson C. E., Rosenthal A. (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* **382**, 80-3

- Trupp M., Ryden M., Jornvall H., Funakoshi H., Timmusk T., Arenas E., Ibanez C. F. (1995) Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol* **130**, 137-48
- Trupp M., Arenas E., Fainzilber M., Nilsson A. S., Sieber B. A., Grigoriou M., Kilkenny C., Salazar-Grueso E., Pachnis V., Arumae U. (1996) Functional receptor for GDNF encoded by the *c-ret* proto-oncogene. *Nature* **382**, 29-30
- Trupp M., Belluardo N., Funakoshi H., Ibanez C. F. (1997) Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), *c-ret* proto-oncogene, and GDNF receptor- α indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci* **17**, 3554-67
- Trupp M., Raynoschek C., Belluardo N., Ibanez C. F. (1998) Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-Ret receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Neurosci* **11**, 47-63
- Trupp M., Scott R., Whittemore S.R., Ibanez C.F. (1999) Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem* **274**, 20885-94
- Tsuzuki T., Takahashi M., Asai N., Iwashita T., Matsuyama M., Asai J. (1995) Spatial and temporal expression of the *ret* proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues. *Oncogene* **10**, 191-8
- Unsicker K. (1996) GDNF: a cytokine at the interface of TGF- β s and neurotrophins. *Cell Tissue Res* **286**, 175-8
- Urrutia P., Di Magno E. P., (1997) Pancreatic cancer: cellular and molecular mechanism. *Encyclopedia of cancer* **II**, 1201-1211
- Vanhaesebroeck B., Stein R. C., Waterfield M. D. (1996) The study of phosphoinositide 3-kinase function. *Cancer Surv* **27**, 249-70
- Vanhaesebroeck B., Leever S. J., Panayotou G., Waterfield M. D. (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* **22**, 267-72
- Vega Q. C., Worby C. A., Lechner M. S., Dixon J. E., Dressler G. R. (1996) Glial cell line-derived neurotrophic factor activates the receptor tyrosine kinase RET and promotes kidney morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 10657-61
- Villers A., McNeal J. E., Redwine E. A., Freiha F. S., Stamey T. A. (1989) The role of perineural space invasion in the local spread of prostatic adenocarcinoma. *J Urol* **142**, 763-8
- De Vita G., Melillo R. M., Carlomagno F., Visconti R., Castellone M. D., Bellacosa A., Billaud M., Fusco A., Tschlis P. N., Santoro M. (2000) Tyrosine 1062 of RET-MEN2A mediates activation of Akt (protein kinase B) and mitogen-activated protein kinase pathways leading to PC12 cell survival. *Cancer Res* **60**, 3727-31

- Wang L. C., Shih A., Hongo J., Devaux B., Hynes M. (2000) Broad specificity of GDNF family receptors GFRalpha1 and GFRalpha2 for GDNF and NTN in neurons and transfected cells. *J Neurosci Res* **61**, 1-9
- van Weering D. H., Bos J. L. (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces Ret-mediated lamellipodia formation. *J Biol Chem* **272**, 249-54
- van Weering D. H., Bos J. L. (1998a) Signal transduction by the receptor tyrosine kinase Ret. *Recent Results Cancer Res* **154**, 271-81
- van Weering D. H., de Rooij J., Marte B., Downward J., Bos J. L., Burgering B. M. (1998b) Protein kinase B activation and lamellipodium formation are independent phosphoinositide 3-kinase-mediated events differentially regulated by endogenous Ras. *Mol Cell Biol* **18**, 1802-11
- Wells A. (2000) Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* **78**, 31-101
- Westwick J. K., Lambert Q. T., Clark G. J., Symons M, Van Aelst L., Pestell R. G., Der C. J. (1997) Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* **17**, 1324-35
- Worby C. A., Vega Q. C., Zhao Y., Chao H. H., Seasholtz A. F., Dixon J. E. (1996) Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 23619-22
- Wu R., Durick K., Songyang Z., Cantley L. C., Taylor S. S., Gill G. N. (1996) Specificity of LIM domain interactions with receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **271**, 15934-41
- Yan Q., Matheson C., Lopez O. T. (1995) In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature* **373**, 341-4
- Yano S., Tokumitsu H., Soderling T. R. (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* **396**, 584-7
- Yao R., Cooper G. M. (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* **267**, 2003-6
- Yoshioka K., Matsumura F., Akedo H., Itoh K. (1998) Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells. *J Biol Chem* **273**, 5146-54
- Yoshioka K., Nakamori S., Itoh K. (1999) Overexpression of small GTP-binding protein RhoA promotes invasion of tumor cells. *Cancer Res* **59**, 2004-10
- Young H. M., Hearn C. J., Farlie P. G., Canty A. J., Thomas P. Q., Newgreen D. F. (2001) GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Dev Biol* **229**, 503-16
- You L., Ebner S., Kruse F. E. (2001) Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)-induced migration and signal transduction in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 2496-504

- Zamboni G., Capelli P., Pesci A., Beghelli S., Lüttges J., Klöppel G. (2000) Pancreatic Head Mass: What Can Be Done? Classification: the Pathological Point of View. *Journal of the Pancreas* **1**, 77-84
- Zhu Z., Friess H., diMola F. F., Zimmermann A., Graber H. U., Korc M., Buchler M. W. (1999) Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **17**, 2419-28
- Zhu Z. W., Friess H., Wang L., Bogardus T., Korc M., Kleeff J., Buchler M. W. (2001) Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* **7**, 105-12
- Zurn A. D., Baetge E. E., Hammang J. P., Tan S. A., Aebischer P. (1994) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. *Neuroreport* **6**, 113-8
- Zwick E., Bange J., Ullrich A. (2001) Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* **8**, 161-173

10 Eigene Veröffentlichungen

Publikationsliste

Stähle M., **Veit C.**, Bachfischer U., Skripczynski B., Hall A., Gierschik P. and Giehl K.: Small GTPases and the localization of ERK to newly formed focal contact sites contribute to LPA-mediated tumor cell migration. in Vorbereitung

Abstracts

Giehl K., **Veit C.**, Genze F. and Gierschik P. (1999): The neurotrophic factor GDNF stimulates mitogen-activated protein kinases and induces chemotaxis of pancreatic carcinoma cells. 3. Joint Meeting der Signaltransduktions-Arbeitskreise der DGfL, der DGZ und der GBM-Studiengruppe Gentechnik/Biotechnologie, Berlin

Veit C., Mansard A., Gierschik P. and Giehl K. (2000): Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induces migration of human pancreatic carcinoma PANC-1 cells. 41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. Suppl. Vol.361 (4): 261 (R69)

Giehl K., Schierling K., Siegert P., Bachfischer U., **Veit C.** and Gierschik P. (2000): Functional analysis of GTPases in cellular transformation using EGFP-tagged Ras and Rac1. Millenium Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Signal Transduction (2001) Suppl. Vol.1: 55

Veit C., Mansard A., Gierschik P. and Giehl K. (2001): The GFR α -Ret-receptor complex is expressed in PANC-1 pancreatic carcinoma cells and regulates directed tumor cell migration *via* multiple signal transduction pathways. 42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. Suppl. Vol.363 (4): 255 (R67) Posterpreis

Stähle M., Skripczynski B., **Veit C.**, Bachfischer U., Hall A., Gierschik P. und Giehl K. (2001): Mechanisms in LPA-mediated tumor cell migration: contribution of multiple GTP-binding proteins and ERK2. Internationale Konferenz des Boehringer Ingelheim Fonds: The actin cytoskeleton: from signaling to bacterial pathogenesis. Titise/Neustadt.

Giehl K., **Veit C.**, Mansard A., Engst A. und P. Gierschik (2001): The neurotrophic factor GDNF induces chemotaxis of human pancreatic carcinoma cells via multiple signal transduction pathways. 5th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes. Signal Transduction (2001) Suppl. Vol.1-2: 104

Giehl K., **Veit C.**, Mansard A., Engst A. und P. Gierschik (2001): The neurotrophic factor GDNF induces chemotaxis of human pancreatic carcinoma cells via multiple signal transduction pathways. International Conference of the DFG - MDC: Cell Migration in Development and Disease. Berlin-Buch.

11 Anhang

Ret51-Sequenz (human; 3345 bp)

```

      M A K A T S G A A G L R L L L L L L L P      1
1  ATGGCGAAGGCGACGTCCGGTGCCGCGGGGCTGCGTCTGCTGTTGCTGCTGCTGCTGCCG
      L L G K V A L G L Y F S R D A Y W E K L      20
61 CTGCTAGGCAAAGTGGCATTGGGCCTCTACTTCTCGAGGGATGCTTACTGGGAGAAGCTG
      Y V D Q A A G T P L L Y V H A L R D A P      60
121 TATGTGGACCAGGCGGCCGCGCACGCCCTTGCTGTACGTCCATGCCCTGCGGGACGCCCT
      E E V P S F R L G Q H L Y G T Y R T R L      80
181 GAGGAGGTGCCCAGCTTCCGCCTGGGCCAGCATCTCTACGGCACGTACCGCACNCGGCTG
      H E N N W I C I Q E D T G L L Y L N R S      100
241 CATGAGAACAACCTGGATCTGCATCCAGGAGGACACCGGCCCTCCTCTACCTTAACCGGAGC
      L D H S S W E K L S V R N R G F P L L T      120
301 CTGGACCATAGCTCCTGGGAGAAGCTCAGTGTCCGCAACCGGGCTTTCCCTGCTCACC
      V Y L K V F L S P T S L R E G E C Q W P      140
361 GTCTACCTCAAGGTCTTCCCTGTCCACCCACATCCCTTCGTGAGGGCGAGTGCCAGTGGCCA
      G C A R V Y F S F F N T S F P A C S S L      160
421 GGCTGTGCCCGCGTATACTTCTCCTTCTTCAACACCTCCTTTCCAGCCTGCAGCTCCCTC
      K P R E L C F P E T R P S F R I R E N R      180
481 AAGCCCCGGGAGCTCTGCTTCCCAGAGACAAGGCCCTCCTTCCGCATTCCGGGAGAACCGA
      P P G T F H Q F R L L P V Q F L C P N I      200
541 CCCCCAGGCACCTTCCACCAGTTCCGCCTGCTGCCTGTGCAGTTCTTGTGCCCAACATC
      S V A Y R L L E G E G L P F R C A P D S      220
601 AGCGTGGCCTACAGGCTCCTGGAGGGTGAGGGTCTGCCCTTCCGCTGCGCCCCGGACAGC
      L E V S T R W A L D R E Q R E K Y E L V      240
661 CTGGAGGTGAGCACGCGCTGGGCCCTGGACCGCGAGCAGCGGGAGAAGTACGAGCTGGTG

```

A V C T V H A G A R E E V V M V P F P V 260
721 GCCGTGTGCACCGTGCACGCCGGCGCGCGAGGAGGTGGTGTGATGGTGCCTTCCCCGGTG

T V Y D E D D S A P T F P A G V D T A S 280
781 ACCGTGTACGACGAGGACGACTCGGCGCCCACCTTCCCCGCGGGCGTGCACACCGCCAGC

A V V E F K R K E D T V V A T L R V F D 300
841 GCCGTGGTGGAGTTCAAGCGGAAGGAGGACACCGTGGTGGCCACGCTGCGTGTCTTCGAT

A D V V P A S G E L V R R Y T S T L L P 320
901 GCAGACGTGGTACCTGCATCAGGGGAGCTGGTGTAGGCGGTACACAAGCAGCTGCTCCCC

G D T W A Q Q T F R V E H W P N E T S V 340
961 GGGGACACCTGGGCCCAGCAGACCTTCCGGGTGGAACACTGGCCCAACGAGACCTCGGTC

Q A N G S F V R A T V H D Y R L V L N R 360
1021 CAGGCCAACGGCAGCTTCGTGCGGGCGACCGTACATGACTATAGGCTGGTTCTCAACCGG

N L S I S E N R T M Q L A V L V N D S D 380
1081 AACCTCTCCATCTCGGAGAACCGCACCATGCAGCTGGCGGTGCTGGTCAATGACTCAGAC

F Q G P G A G V L L L H F N V S V L P V 400
1141 TTCCAGGGCCCAGGAGCGGGCGTCTCTTGCTCCACTTCAACGTGTGCGGTGCTGCCGGTC

S L H L P S T Y S L S V S R R A R R F A 420
1201 AGCCTGCACCTGCCCAGTACCTACTCCCTCTCCGTGAGCAGGAGGGCTCGCCGATTTGCC

Q I G K V C V E N C Q A F S G I N V Q Y 440
1261 CAGATCGGGAAAGTCTGTGTGGAAACTGCCAGGCGTTCAGTGGCATCAACGTCCAGTAC

K L H S S G A N C S T L G V V T S A E D 460
1321 AAGCTGCATTCTCTGGTGCCAACTGCAGCACGCTAGGGGTGGTACCTCAGCCGAGGAC

T S G I L F V N D T K A L R R P K C A E 480
1381 ACCTCGGGGATCCTGTTTTGTGAATGACACCAAGGCCCTGCGGCGGCCCAAGTGTGCCGAA

L H Y M V V A T D Q Q T S R Q A Q A Q L 500
1441 CTTCACTACATGGTGGTGGCCACCGACCAGCAGACCTCTAGGCAGGCCCAGGCCAGCTG

L V T V E G S Y V A E E A G C P L S C A 520
1501 CTTGTAACAGTGGAGGGGTCATATGTGGCCGAGGAGGCGGGCTGCCCCCTGTCTGTGCA

V S K R R L E C E E C G G L G S P T G R 540
1561 GTCAGCAAGAGACGGCTGGAGTGTGAGGAGTGTGGCGGCTGGGCTCCCCAACAGGCAGG

C E W R Q G D G K G I T R N F S T C S P 560
1621 TGTGAGTGGAGGCAAGGAGATGGCAAAGGGATCACCAGGAACCTTCTCCACCTGCTCTCCC

S T K T C P D G H C D V V E T Q D I N I 580
1681 AGCACCAAGACCTGCCCCGACGGCCACTGCGATGTTGTGGAGACCCAAGACATCAACATT

C P Q D C L R G S I V G G H E P G E P R 600
1741 TGCCCTCAGGACTGCCTCCGGGGCAGCATTGTTGGGGGACACGAGCCTGGGGAGCCCCGG

G I K A G Y G T C N C F P E E E K C F C 620
1801 GGGATTAAAGCTGGCTATGGCACCTGCAACTGCTTCCCTGAGGAGGAGAAGTGCTTCTGC

E P E D I Q D P L C D E L C R T V I A A 640
1861 GAGCCCGAAGACATCCAGGATCCACTGTGCGACGAGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC

A V L F S F I V S V L L S A F C I H C Y 660
1921 GCTGTCCTCTTCTCCTTCATCGTCTCGGTGCTGCTGTCTGCCTTCTGCATCCACTGCTAC

H K F A H K P P I S S A E M T F R R P A 680
1981 CACAAGTTTGGCCACAAGCCACCCATCTCCTCAGCTGAGATGACCTTCCGGAGGCCCGCC

Q A F P V S Y S S S G A R R P S L D S M 700
2041 CAGGCCTTCCCGGTGAGCTACTCCTCTTCCGGTGCCCGCCGCCCTCGCTGGACTCCATG

E N Q V S V D A F K I L E D P K W E F P 720
2101 GAGAACCAGGTCTCCGTGGATGCCTTCAAGATCCTGGAGGATCCAAAGTGGGAATTCCCT

R K N L V L G K T L G E G E F G K V V K 740
2161 CGGAAGAACTTGGTTCTTGGAAAACTCTAGGAGAAGGCGAATTTGGAAAAGTGGTCAAG

A T A F H L K G R A G Y T T V A V K M L 760
2221 GCAACGGCCTTCCATCTGAAAGGCAGAGCAGGGTACACCACGGTGGCCGTGAAGATGCTG

K E N A S P S E L R D L L S E F N V L K 780
2281 AAAGAGAACGCCTCCCCGAGTGAGCTTCCGAGACCTGCTGTGAGAGTTCAACGTCCTGAAG

Q V N H P H V I K L Y G A C S Q D G P L 800
2341 CAGGTCAACCACCCACATGTCATCAAATTGTATGGGGCCTGCAGCCAGGATGGCCCCGCTC

L L I V E Y A K Y G S L R G F L R E S R 820
2401 CTCCTCATCGTGGAGTACGCCAAATACGGCTCCCTGCGGGGCTTCTCCGCGAGAGCCGC

K V G P G Y L G S G G S R N S S S L D H 840
2461 AAAGTGGGGCCTGGCTACCTGGGCAGTGGAGGCAGCCGCAACTCCAGCTCCCTGGACCAC

P D E R A L T M G D L I S F A W Q I S Q 860
2521 CCGGATGAGCGGGCCCTCACCATGGGCGACCTCATCTCATTTGCCTGGCAGATCTCACAG

G M Q Y L A E M K L V H R D L A A R N I 880
2581 GGGATGCAGTATCTGGCCGAGATGAAGCTCGTTCATCGGGACTTGGCAGCCAGAAACATC

L V A E G R K M K I S D F G L S R D V Y 900
2641 CTGGTAGCTGAGGGGCGGAAGATGAAGATTTTCGGATTTTCGGCTTGTCCCGAGATGTTTAT

E E D S Y V K R S Q G R I P V K W M A I 920
2701 GAAGAGGATCCTACGTGAAGAGGAGCCAGGGTTCGGATTCCAGTTAAATGGATGGCAATTG

E S L F D H I Y T T Q S D V W S F G V L 940
2761 AATCCCTTTTTGATCATATCTACACCACGCAAAGTGATGTATGGTCTTTTTGGTGTCTCTGC

L W E I V T L G G N P Y P G I P P E R L 960
2821 TGTGGGAGATCGTGACCCTAGGGGGAAACCCCTATCCTGGGATTCCCTCCTGAGCGGCTCT

F N L L K T G H R M E R P D N C S E E M 980
2881 TCAACCTTCTGAAGACCGGCCACCGGATGGAGAGGCCAGACAACCTGCAGCGAGGAGATGT

Y R L M L Q C W K Q E P D K R P V F A D 1000
2941 ACCGCCTGATGCTGCAATGCTGGAAGCAGGAGCCGGACAAAAGGCCGGTGTTTGCGGACA

I S K D L E K M M V K R R D Y L D L A A 1020
3001 TCAGCAAAGACCTGGAGAAGATGATGGTTAAGAGGAGAGACTACTTGGACCTTGCGGCGT

S T P S D S L I Y D D G L S E E E T P L 1040
3061 CCACTCCATCTGACTCCCTGATTTATGACGACGGCCTCTCAGAGGAGGAGACACCGCTGG

V D C N N A P L P R A L P S T W I E N K 1060
3121 TGGACTGTAATAATGCCCCCTCCCTCGAGCCCTCCCTTCCACATGGATTGAAAACAAAC

L Y G M S D P N W P G E S P V P L T R A 1080
3181 TCTATGGCATGTGACACCCGAACTGGCCTGGAGAGAGTCTGTACCACTCACGAGAGCTG

D G T N T G F P R Y P N D S V Y A N W M 1100
 3241 ATGGCACTAACACTGGGTTTCCAAGATATCCAAATGATAGTGTATATGCTAACTGGATGC

 L S P S A A K L M D T F D S *
 3301 TTTCACCCTCAGCGGCAAAATTAATGGACACGTTTGATAGT**TAA**

RhoC-Sequenz (human; 582 bp)

M A A I R K K L V I V G D G A C G K T C 20
 1 **ATGGCTGCAATCCGAAAGAAGCTGGTGATCGTTGGGGATGGTGCCTGTGGGAAGACCTGC**

 L L I V F S K D Q F P E V Y V P T V F E 40
 61 CTCCTCATCGTCTTCAGCAAGGATCAGTTTCCGGAGGTCTACGTCCCTACTGTCTTTGAG

 N Y I A D I E V D G K Q V E L A L W D T 60
 121 AACTATATTGCGGACATTGAGGTGGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCTCTGTGGGACACA

 A G Q E D Y D R L R P L S Y P D T D V I 80
 181 GCAGGGCAGGAAGACTATGATCGACTGCGGCCTCTCTCCTACCCGGACACTGATGTCATC

 L M C F S I D S P D S L E N I P E K W T 100
 241 CTCATGTGCTTCTCCATCGACAGCCCTGACAGCCTGGAAAACATTCTGAGAAGTGGACC

 P E V K H F C P N V P I I L V G N K K D 120
 301 CCAGAGGTGAAGCACTTCTGCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTGGGAATAAGAAGGAC

 L R Q D E H T R R E L A K M K Q E P V R 140
 361 CTGAGGCAAGACGAGCACACCAGGAGAGAGCTGGCCAAGATGAAGCAGGAGCCCCGTTTCGG

 S E E G R D M A N R I S A F G Y L E C S 140
 421 TCTGAGGAAGGCCGGGACATGGCGAACCGGATCAGTGCCTTTGGCTACCTTGAGTGCTCA

 A K T K E G V R E V F E M A T R A G L Q 160
 481 GCCAAGACCAAGGAGGGAGTGCGGGAGGTGTTTGAGATGGCCACTCGGGCTGGCCTCCAG

 V R K N K R R R G C P I L *
 541 GTCCGCAAGAACAAGCGTTCGGAGGGGCTGTCCCATTCT**TGA**

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Peter Gierschik für die freundliche Aufnahme in der Abteilung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das große Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Peter Scheurich für die Offenheit meinem Vorhaben gegenüber und das Vertreten der Arbeit vor der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart.

Frau Dr. Klaudia Giehl für die erstklassige Betreuung der Arbeit und die mir entgegengebrachte Nachsicht und Geduld. Ihr großes Engagement und die wertvollen Anregungen haben zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen.

Weiter bedanke ich mich bei

Frau Angela Mansard für die MAPK-*assays* und die Hilfsbereitschaft im Labor

Frau Anja Engst für die Unterstützung meiner Arbeit - nicht nur mit den Rac-Assays - und die vielen interessanten Gespräche

Herrn Dr. Andre Menke für praktische Ratschläge zur RT-PCR und zeitweilige Mit-Betreuung de Arbeit

Herrn Dr. Jürgen Engele und Frau Dr. Gita Pezeshki für die Einführung in die Thematik neuronale Primärkulturen und für das stete Interesse an meiner Arbeit

der *Labcrew* für das angenehme Laborklima und die reibungslose Zusammenarbeit

allen Mitarbeitern der Abteilung für die Kollegialität und Kommunikationsbereitschaft

dem Graduiertenkolleg für das vielfältige Programmangebot

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei

meinen Eltern

Jürgen

meiner Schwester Annette und Thomas Beulich

Dr. C.-H. und E. Lübow

13 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christine Veit
Anschrift: Granitweg 15, 73760 Ostfildern
Geburtsdatum/-ort: 13. 01. 1972, Stuttgart-Hedelfingen

Schulbildung:

1978-1982: Grundschule in Vence, Frankreich
1982-1991: Heinrich-Heine-Gymnasium in Ostfildern

Studium:

1991-1992: Studium der Diplom-Biologie an der Universität Stuttgart-Hohenheim
1992-1996: Studium der Hauptfächer Biologie und Chemie für Höheres Lehramt an der Universität Stuttgart-Hohenheim
1997: 1. Staatsexamen in Biologie und Chemie
1997: Staatsexamensarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg (Abteilung Zelluläre Immunologie/Tumorimmunologie)
Titel: „Funktion von Asp698 in der $\alpha 4\beta 1$ (Integrin)-vermittelten Zellbindung“

Promotion:

1998-2002: Doktorarbeit in der Abteilung Zellbiologie und Immunologie an der Universität Stuttgart/ Durchführung der praktischen Arbeit extern in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm
Titel: „Charakterisierung der Regulation der gerichteten Migration und Invasion humaner Pankreaskarzinomzellen durch den neuronalen Wachstumsfaktor GDNF“
2001: Zertifikat des Graduiertenkolleges „Diagnostische und therapeutische Konzepte in der molekularen Medizin“ (Universität Ulm)