

Abstract

Als Ursache für das Auftreten sowohl sporadischer als auch hereditärer Formen des medullären Schilddrüsenkarzinoms (MTC) gelten aktivierende Mutationen im *RET* Proto-Onkogen, die in über 95% aller untersuchten Karzinome gefunden wurden. Das *RET* Proto-Onkogen kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die im Normalfall an Entwicklungsprozessen beteiligt ist. Durch onkogene Mutationen kommt es dabei zur konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinase, was hier eine entscheidende Bedeutung für die Tumorentstehung hat.

Ziel der Arbeit war es daher, durch Gentransfer dominant-negativer Mutanten des RET Rezeptors, die onkogen veränderten RET Proteine in einer MTC-Zelllinie (TT) zu inhibieren und die daraus entstehenden Konsequenzen in Bezug auf eine potenzielle therapeutische Anwendung hin zu untersuchen. Zum Gentransfer dieser Mutanten wurden demzufolge adenovirale Vektoren eingesetzt, wobei ein synthetischer Calcitonin-Promotor (TSE2.CP1) zur Gewährleistung einer Zielzell-selektiven Expression verwendet wurde. Durch Reporteranalysen konnte hier verdeutlicht werden, dass der TSE2.CP1-Promotor, auch im Kontext adenoviraler Vektoren, die Selektivität für C-Zellen, wie hier am Beispiel der TT-Zelllinie gezeigt, behält.

Zwei zuvor beschriebene, dominant-negative RET Mutanten (RET HSCR32 und RET flag) wurden so unter der Kontrolle des TSE2.CP1-Promotors mit Hilfe adenoviraler Vektoren in der TT-Zelllinie, die eine häufige MTC-assoziierte *RET* Mutation trägt, exprimiert. Durch Mutationen in der extrazytoplasmatischen Region werden diese Mutanten nicht auf der Zelloberfläche exprimiert und stattdessen im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten. Der dominant-negative Effekt der Mutanten beruht dabei auf der intrazellulären Dimerisierung mit onkogenen RET Mutanten. Wie hier gezeigt wurde, wird endogenes onkogenes RET in TT-Zellen nach Gentransfer der dominant-negativen Mutanten effizient im ER zurückgehalten. Darüber hinaus war eine ausgeprägte Zytotoxizität bei Expression von RET HSCR32 und RET flag zu beobachten, die auf Apoptose-Induktion beruhte. Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchungen lag in der *in vivo*-Analyse des Antitumor-Potenzials der dominant-negativen Mutante RET flag, exemplarisch für beide extrazytoplasmatischen Mutanten, im Xenotransplantatmodell. Die erzielten Ergebnisse verdeutlichten dabei, dass eine signifikante Lebensverlängerung der so behandelten Mäuse zu beobachten war. In einem einzigen Fall (10 %) konnte darüber hinaus eine vollständige Heilung erzielt werden.

Da der pro-apoptische Effekt von RET HSCR32 und RET flag jedoch, wie anschließend gezeigt werden konnte, unabhängig von ihren dominant-negativen Eigenschaften war und stattdessen auf Apoptose-Mechanismen, die zu Stressreaktionen im endoplasmatischen Retikulum führten, zurückzuführen war, wurde weiterhin das Antitumor-Potenzial einer Tyrosinkinase-deletierten RET Mutante (RET Δ TK) untersucht, die keine extrazytoplasmatischen Mutationen aufwies. Diese Mutante dimerisiert mit onkogenem RET an der Zelloberfläche und inhibiert dadurch die RET *trans*-Autophosphorylierung. Der adenovirale Gentransfer von RET Δ TK unter der Kontrolle des CMV-Promotors in TT-Zellen bestätigt diesen Sachverhalt. Nach Inhibition der endogenen *trans*-Autophosphorylierung onkogener RET Mutanten war eine signifikante Wachstumsreduktion von TT-Zellen zu beobachten. Diese war selektiv auf die Inhibition der RET *trans*-Autophosphorylierung zurückzuführen, da RET-negative Zellen unbeeinflusst blieben. Als Ursache konnte sowohl eine gesteigerte Apoptoserate wie auch eine reduzierte Proliferationsrate identifiziert werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Resultate liefern also einen ersten Hinweis darauf, dass die Inhibition von onkogen aktiviertem RET durch dominant-negative Mutanten in der Zukunft eine alternative Strategie zur Behandlung von MTCs darstellen könnte.