

5. Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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