

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

Dissertation vorgelegt von Dorit Hella Arlt

### **Zusammenfassung**

Das RET-Protein gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen. 1993 wurde das *RET*-Gen als Protoonkogen identifiziert. Aktivierende Mutationen sind mit der autosomal dominant vererbaren Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN 2) assoziiert. Es gibt drei Subtypen der MEN2, die durch das Auftreten von benignen oder malignen Veränderungen an verschiedenen endokrinen Organen gekennzeichnet sind. Teilweise gibt es auch Veränderungen an Nerven-, Muskel- und Bindegewebe. Verschiedene Mutationen im *RET*-Protoonkogen haben bestimmte klinische Phänotypen zur Folge. Für einige Mutationen ist jedoch der Phänotyp nicht einheitlich. Teilweise gibt es innerhalb betroffener Familien eine besonders hohe Variabilität. Klinische Daten zeigen, dass die Penetranz der MEN 2-assoziierten Mutationen nicht gleich hoch sind. In den letzten Jahren wurden Untersuchungen zum Pathomechanismus zu den am häufigsten auftretenden Mutationen in eukaryotischen Zell-Systemen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Aktivierungsmechanismen eine ligandenunabhängige Autophosphorylierung der intrazellulären Kinase-Domäne zur Folge haben und intrazelluläre Signalkaskaden induzieren.

In dieser Arbeit wurden selten auftretende Mutationen im *RET*-Protoonkogen auf ihren Pathomechanismus untersucht. Diese seltenen Mutationen schliessen eine neue Klasse von MEN 2-assoziierten Mutationen, bei der ein Sequenzbereich der cysteinreichen Region des Rezeptors codiert dupliziert wird, ein. Ebenfalls untersucht wurden zwei Mutationen, die Aminosäure-Substitutionen in der Tyrosinkinase-Domäne zur Folge haben. Dazu wurden die Mutationen mittels PCR-Mutagenese in die wt-cDNA eingefügt und in eukaryotische Zellen transfiziert. Für die stabile Transfektion mit dem mutierten *RET* Proto-Onkogen

wurden Mäusefibroblasten der Linie NIH3T3 eingesetzt. Die Expression wurde durch Western Blot-Analysen überprüft. Für die Charakterisierung der exprimierten RET-Rezeptoren wurden die Proteine in einem Polyacrylamidgel unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen getrennt. Mittels Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern wurden die Proteine detektiert. Für die Duplikationen konnte eine ligandenunabhängige Dimerisierung nachgewiesen werden, die zur Aktivierung der Rezeptoren durch Autophosphorylierung führt. Die Aminosäure-Substitutionen resultieren nicht in einer ligandenunabhängigen Dimerisierung und eine Autophosphorylierung ist nur für eine der beiden untersuchten Mutationen eindeutig nachweisbar.

Die Transformationseffizienz der in dieser Arbeit untersuchten Mutationen wurde mittels eines Assays bestimmt, der auf dem substratunabhängigen Wachstums transformierter Zellen basiert. Für eine der Duplikationen wurde eine transformierende Wirkung nachgewiesen. Die unterschiedlichen Klassen von Mutationen haben charakteristische Veränderungen der Zell-Morphologie von NIH3T3-Zellen zur Folge.

Für weitere Untersuchungen zur Aktivierung durch die Duplikationen und Substitutionen wurde die humane neuroektodermale Tumorzelllinie SK-N-MC transfiziert. Es zeigte sich, dass die untersuchte Duplikation den für diese Zellen beschriebenen Phänotyp ausprägt, der durch aktivierte RET-Rezeptoren induziert wird. Die RET-transfizierten Zellen mit Aminosäure-Substitutionen weisen ein von wt-RET-transfizierten Zellen divergenten Phänotyp auf. Dieser ist nicht identisch mit dem Phänotyp, der für aktiviertes RET gezeigt ist, hat jedoch eine höhere Proliferation der SK-N-MC-Zellen zur Folge.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit der Aktivierungsmechanismus der Duplikationen in der extrazellulären cysteinreichen Domäne des RET-Rezeptors untersucht und aufgeklärt. Für die in dieser Arbeit untersuchten Basen-Substitutionen in der intrazellulären Kinase-Domäne konnten erstmals charakteristische Veränderungen eukaryotischer Zellsysteme nachgewiesen werden.

