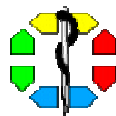


Institut für Molekularbiologie  
(Tumorforschung)



**Gentherapeutische Intervention beim medullären  
Schilddrüsenkarzinom durch adenoviral vermittelte Expression  
dominant-negativer *RET* Proto-Onkogen Mutanten**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
des Fachbereichs  
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur  
an der  
Universität Essen

vorgelegt von

Matthias Drost  
aus Recklinghausen

Februar 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) der Universität Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Brigitte M. Pützer
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang U. Müller
3. Gutachter: Priz.-Doz. Dr. Bertram Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Günther Obe

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Juni 2003

## Inhalt

<b>Inhalt</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das medulläre Schilddrüsenkarzinom .....	1
1.2 Das <i>RET</i> Proto-Onkogen .....	3
1.3 MTC-assoziierte Mutationen im <i>RET</i> Proto-Onkogen .....	6
1.4 Aktivierte onkogene Signaltransduktionswege .....	8
1.5 Hirschsprung-Erkrankung.....	10
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	15
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>16</b>
2.1.1 Chemikalien, Puffer, Enzyme .....	16
2.1.2 Vektoren.....	16
2.1.3 Bakterienstämme .....	18
2.1.4 Zelllinien .....	19
2.1.5 Versuchstiere.....	19
2.1.6 Oligonukleotide .....	19
2.1.7 Antikörper.....	20
<b>2.2 DNA-Arbeitstechniken</b> .....	<b>20</b>
2.2.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Bakterien (Mini-Präparation) .....	20
2.2.2 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Bakterien (Maxi-Präparation).....	21
2.2.3 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Bakterien .....	22
2.2.4 Transformation von DNA mittels Elektroporation.....	22
2.2.5 Transformation von DNA mittels Hitzeschock .....	23
2.2.6 Restriktion von DNA.....	23
2.2.7 Auffüllen von 5'- und Verdau von 3'-überhängenden Enden .....	23
2.2.8 Dephosphorylierung von restringierter DNA.....	23
2.2.9 Ligation von DNA .....	24
2.2.10 Elektrophorese von DNA .....	24
2.2.11 Elution von DNA aus Agarosegelen .....	24
2.2.12 DNA-Amplifikationen (PCR) .....	24
2.2.13 PCR-Mutagenese .....	25
2.2.14 DNA-Konzentrationsbestimmungen .....	25

---

<b>2.3</b>	<b>RNA-Arbeitstechniken</b> .....	<b>26</b>
2.3.1	RNA-Präparation .....	26
2.3.2	RNA-Konzentrationsbestimmungen .....	26
2.3.3	Reverse Transkription.....	26
<b>2.4</b>	<b>Protein-Arbeitstechniken</b> .....	<b>27</b>
2.4.1	Herstellung von Zellextrakten .....	27
2.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmungen .....	27
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.4.4	Western Blot .....	28
2.4.5	Immundetektion.....	28
2.4.6	Immunpräzipitation .....	28
2.4.7	<i>In vitro</i> Kinaseassay .....	29
<b>2.5</b>	<b>Zellkultur und Transfektionen</b> .....	<b>29</b>
2.5.1	Kultivierung von Zellen .....	29
2.5.2	Zellzahlbestimmungen .....	29
2.5.3	Kalziumphosphat-Transfektion .....	30
2.5.4	Elektroporation .....	30
2.5.5	Sonstige Transfektionsmethoden .....	30
<b>2.6</b>	<b>Adenovirale Arbeitstechniken</b> .....	<b>31</b>
2.6.1	Das AdEasy-System .....	31
2.6.2	Klonierung und Herstellung adenoviraler Vektoren.....	31
2.6.3	Transduktion .....	32
2.6.4	CsCl-Aufreinigung viraler Partikel.....	32
2.6.5	Titration.....	33
<b>2.7</b>	<b>Reporteranalysen</b> .....	<b>34</b>
2.7.1	Luciferase-Reporteranalyse.....	34
2.7.2	Bestimmung der GFP-Expression im Durchflusszytometer .....	34
<b>2.8</b>	<b>Immunfluoreszenz-Mikroskopie</b> .....	<b>35</b>
<b>2.9</b>	<b>Zytotoxizitätsanalysen</b> .....	<b>35</b>
2.9.1	MTT-Assay.....	35
2.9.2	Bestimmung apoptotischer Zellen durch durchflusszytometrische Messung des DNA-Gehalts .....	36
2.9.3	BrdU-Markierung .....	36
2.9.4	Caspase-3 Aktivitätsbestimmung .....	36
<b>2.10</b>	<b>Tierexperimente</b> .....	<b>36</b>

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Eigenschaften der dominant-negativen Mutante RET HSCR32 im MTC-Modell.....</b>	<b>38</b>
3.1.1	Verifizierung des dominant-negativen Effektes von RET HSCR32 in COS-7 Zellen .....	39
3.1.2	Generierung MTC-selektiver adenoviraler Vektoren .....	41
3.1.3	Konstruktion des Ad-Vektors Ad.TSE2.CP1.RET <sup>51</sup> HSCR32 .....	43
3.1.4	Dominant-negativer Effekt von Ad.TSE2.CP1.RET <sup>51</sup> HSCR32 in TT-Zellen..	45
3.1.5	Zytotoxische Eigenschaften von Ad.TSE2.CP1.RET <sup>51</sup> HSCR32 .....	45
<b>3.2</b>	<b>Antitumor-Potenzial der dominant-negativen Mutante RET<sup>51</sup>flag 50</b>	
3.2.1	Konstruktion und Expressionsprofil von Ad.TSE2.CP1.RET <sup>51</sup> flag.....	50
3.2.2	RET <sup>51</sup> flag übt einen dominant-negativen Effekt gegenüber onkogenem RET aus.....	52
3.2.3	Einfluss der RET <sup>51</sup> flag Expression auf die Zellvitalität.....	54
3.2.4	Antitumor-Eigenschaften von Ad.TSE2.CP1.RET <sup>51</sup> flag <i>ex</i> und <i>in vivo</i> .....	57
<b>3.3</b>	<b>Mechanismus der Apoptose-Induktion durch RET HSCR32.....</b>	<b>60</b>
3.3.1	Apoptose-Induktion nach RET HSCR32 Expression in 293-Zellen.....	60
3.3.2	Apoptose-Induktion nach Gentransfer von RET HSCR32 in TT-Zellen .....	63
<b>3.4</b>	<b>Wachstums-inhibitorische Mechanismen der dominant-negativen RET Proto-Onkogen Mutante RET DTK .....</b>	<b>66</b>
3.4.1	Konstruktion und Überprüfung der RET ΔTK-Expression des Ad-Vektors Ad.CMV.RET ΔTK.....	66
3.4.2	Dominant-negativer Effekt von Ad.CMV.RET ΔTK in TT-Zellen .....	68
3.4.3	Zytotoxische Eigenschaften von Ad.CMV.RET ΔTK.....	70
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>74</b>
<b>4.1</b>	<b>Konstruktion C-Zell selektiver adenoviraler Vektoren .....</b>	<b>75</b>
<b>4.2</b>	<b>Dominant-negative Eigenschaften von RET HSCR32 und RET flag im MTC-Modell .....</b>	<b>77</b>
<b>4.3</b>	<b>Stresssignale aus dem ER als Ursache der Apoptose-Induktion durch RET HSCR32: Implikationen zur Entstehung der Hirschsprung-Erkrankung.....</b>	<b>78</b>
<b>4.4</b>	<b>Antitumor-Potenzial der dominant-negativen RET Mutante RET flag .....</b>	<b>80</b>
<b>4.5</b>	<b>TT-Zellwachstum ist abhängig von der konstitutiven Aktivität onkogener RET Mutanten .....</b>	<b>81</b>
<b>4.6</b>	<b>Ausblick: Perspektiven und Anwendungspotenziale dominant-negativer RET Proto-Onkogen Mutanten .....</b>	<b>84</b>

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>88</b>
	<b>Danksagungen .....</b>	<b>103</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>104</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>105</b>

## Abkürzungen

<b>Ad</b>	Adenovirus
<b>Akt</b>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
<b>AP1</b>	Activator protein 1
<b>ATC</b>	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
<b>ATF4/6</b>	Activating transcription factor 4/6
<b>ATP</b>	Adenosin-5' Triphosphat
<b>Bad</b>	Bcl2 antagonist of cell death
<b>Bcl-2</b>	B-cell CLL/lymphoma 2
<b>Bcl-x<sub>L</sub></b>	B-cell CLL/lymphoma x <sub>L</sub>
<b>BiP</b>	Binding Immunoglobulin Protein
<b>bp</b>	Basenpaar(e)
<b>BrdU</b>	5'-Brom-2'-Desoxyuridin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CAD</b>	Caspase-aktivierte DNase
<b>Cdc42</b>	Cell division cycle 42
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA
<b>CHOP</b>	C/EBP-homologous protein
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>CPE</b>	zytopathischer Effekt
<b>DAPI</b>	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>Dok1</b>	Docking protein 1
<b>EDNRB</b>	Endothelin-Rezeptor B
<b>EDTA</b>	N,N-Ethylendiaminotetraessigsäure
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EMCV</b>	Encephalomyocarditis Virus
<b>EOR</b>	ER-Overload Response
<b>ER</b>	endoplasmatisches Retikulum
<b>ERBB2/4</b>	Avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2/4
<b>ERK</b>	Extracellular signal regulated kinase
<b>ERSE</b>	ER-Stress responsive Elemente
<b>FACS</b>	Durchflusszytometer
<b>FAK</b>	Focal adhesion kinase
<b>FCS</b>	Fötales Kälberserum
<b>FGFR</b>	Fibroblast growth factor receptor
<b>FITC</b>	Fluorescein-Isothiocyanat
<b>FKHR</b>	Forkhead transcription factor
<b>FMTC</b>	Familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom
<b>FRS2</b>	Fibroblast growth factor receptor substrate 2
<b>FTC</b>	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
<b>Gab 1/2</b>	Grb2 associated binding protein 1/2
<b>gadd153</b>	Growth arrest and DNA damage gene 153
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase
<b>GDNF</b>	Glial cell-line derived neurotrophic factor
<b>GFL</b>	GDNF family ligands
<b>GFP</b>	Grün-fluoreszierendes Protein
<b>GFPS</b>	GFP- Fusionsprotein mit der Pleckstrin-Homologie-Domäne des humanen β1ΣII Spektrins
<b>GFR<sub>α</sub></b>	GDNF family receptor α
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>Grb 2/7/10</b>	Growth factor receptor bound protein 2/7/10
<b>grp78</b>	Glucose regulated protein of 78 kDa

<b>HA</b>	Hemagglutinin
<b>HBS</b>	HEPES-buffered saline
<b>HGF/SF</b>	Hepatocyte growth factor/scatter factor
<b>HSCR</b>	Hirschsprung-Erkrankung
<b>ICAD</b>	Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase
<b>iNOS</b>	NO-Synthase II
<b>Ire1</b>	Protein kinase/ribonuclease IRE1
<b>IRES</b>	Interne Ribosomeneingangssequenz
<b>IRS-1</b>	Insulin receptor substrate-1
<b>JNK</b>	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
<b>LAR</b>	Leukocyte Common Antigen
<b>LUC</b>	Luciferase
<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>MBP</b>	Myelin Basic Protein
<b>MEN2A</b>	Multiple endokrine Neoplasien Typ 2A
<b>MEN2B</b>	Multiple endokrine Neoplasien Typ 2B
<b>moi</b>	Infektionsmultiplizität
<b>mRNA</b>	Boten-RNA
<b>MTC</b>	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
<b>MTT</b>	[3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid]
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor $\kappa$ B
<b>NO</b>	Stickoxid
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PDGFR</b>	Platelet-derived growth factor receptor
<b>PERK</b>	Double-stranded RNA-activated protein-line endoplasmic reticulum kinase
<b>pfu</b>	Plaques-bildende Einheiten
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-Kinase
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Phospholipase C $\gamma$
<b>PTB</b>	Phosphotyrosin binding domain
<b>PTC</b>	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
<b>pTyr</b>	Phosphotyrosin
<b>RET</b>	Rearranged during Transfection
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkription PCR
<b>SCG</b>	automone sympathische Ganglienzellen
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SH2</b>	Src homology 2
<b>Shc</b>	Src homology 2 (SH2)-containing proto-oncogene product
<b>SHP1</b>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6 (PTPN6)
<b>Src</b>	Rous sarcoma proto-oncogene
<b>SV40</b>	Simian virus 40
<b>TCID<sub>50</sub></b>	infektiöse Dosis in Zellkultur
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>TSE2.CP1</b>	synthetischer Calcitonin-Promotor
<b>Tyr</b>	Tyrosin
<b>UPR</b>	Unfolded Protein Response
<b>v/v</b>	volume per volume
<b>VEGFR</b>	Vascular endothelial growth factor receptor
<b>w/v</b>	weight per volume
<b>wt</b>	Wildtyp
<b>XBP</b>	X-box binding protein

Allgemein übliche Abkürzungen und gebräuchliche Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt. Abkürzungen für Aminosäuren, Nukleotide oder chemische Verbindungen entsprechen den IUPAC-Regeln.



# 1 Einleitung

Die Existenz vielzelliger Organismen hängt strikt von der Balance zwischen dem Überleben und dem Tod einzelner Zellen ab. Sollte diese Homöostase innerhalb der verschiedenen Gewebe nicht aufrecht erhalten werden können, droht ein unkontrolliertes Wachstum einzelner Zellen, was schließlich zum Auftreten von Tumorerkrankungen führen kann. Besonders das feinregulierte Verhältnis zwischen Wachstum (Proliferation) und programmiertem Zelltod (Apoptose) ist für die Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase essentiell (Hanahan und Weinberg, 2000). Dabei können Defekte in apoptotischen Vorgängen, wie auch fehlregulierte Wachstumsstimuli, zu unkontrolliertem Wachstum, also der Tumorentstehung, führen (Igney und Krammer, 2002). Ursachen für die Fehlregulation solcher Mechanismen sind häufig in genetischen Anomalien zu finden, die die fein aufeinander abgestimmten intrazellulären Regulationsvorgänge in Richtung einer verstärkten Zellproliferation verschieben. Zur Ausbildung des vollständig transformierten Phänotyps einer Zelle sind in der Regel genetische Anomalien auf multifaktorieller Basis notwendig. Davon können allerdings einzelne Faktoren unterschiedliche Gewichtung erlangen. Faktoren von besonderem Rang, die meist essentielle Positionen in der Regulation von Gewebekomöostasen einnehmen, sind u. a. sogenannte Proto-Onkogene, die durch Mutationen zu Onkogenen, d. h. zu Tumor-induzierenden Genen werden können. Ein wichtiges Beispiel für solch eine Fehlregulation, die besonders ausgeprägte Konsequenzen mit sich bringt, stellt das *RET* Proto-Onkogen dar, das durch Mutationen zu einem bedeutenden auslösenden Faktor sowohl für das medulläre als auch für das papilläre Schilddrüsenkarzinom wird. Anhand dieser Modelle lassen sich tiefere Einblicke in die zugrundeliegenden Mechanismen der onkogen-induzierten Tumorigenese gewinnen sowie daraus resultierende Therapieansätze ableiten.

## 1.1 Das medulläre Schilddrüsenkarzinom

Nach aktuellen Schätzungen stellen Schilddrüsenkarzinome mit ca. 1 % aller auftretenden Neoplasien eine eher geringe, aber dennoch nicht zu vernachlässigende Zahl im Gesamtzusammenhang der Tumorerkrankungen dar (Gimm, 2001). Von allen Schilddrüsenkrebsarten sind es vier Varianten, die mehr als 98 % der auftretenden Fälle repräsentieren. Neben dem follikulären (FTC) und dem papillären (PTC)

Schilddrüsenkarzinom, die beide als differenzierte Ausprägungen zusammengefasst werden können, spiegeln das anaplastische (ATC) und das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC) die undifferenzierten Fälle wider (Gimm, 2001). Während FTC, PTC und ATC aus den follikulären Epithelzellen hervorgehen, stellt das MTC insofern eine Besonderheit dar, als dass es aus den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse entsteht (Gimm, 2001). Mit ca. 5-10 % aller Schilddrüsenkarzinome verkörpert das MTC zwar eine Minderheit, erlangt aber durch seine aggressive Ausprägung einen besonderen Stellenwert (Vitale *et al.*, 2001). Die Prognose ist weitgehend abhängig vom Tumorstadium mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von ca. 75 % (Hundahl *et al.*, 1998).

Interessanterweise treten beim MTC neben sporadischen Formen (ca. 70-75 %) auch hereditäre Varianten auf (25-30 %). Die sporadischen Fälle sind durch eine unifokale klonale Tumorzell-Population gekennzeichnet, während die hereditären Varianten multifokalen Ursprungs sind (Hazard, 1977; Orlandi *et al.*, 2001). Hereditäre Varianten des MTCs, die autosomal dominant vererbt werden, sind verantwortlich für drei klinische Syndrome, die durch eine Reihe von Endokrinopathien gekennzeichnet sind: Die Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2A (MEN2A), die Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2B (MEN2B) und das familiäre Schilddrüsenkarzinom (FMTC) (Hoff *et al.*, 2000). Diese 3 Syndrome unterscheiden sich in ihrer Aggressivität und in ihren Begleiterscheinungen.

Die MEN2A, als häufigstes vererbtes MTC-Syndrom, macht ca. 90 % aller MEN2 Fälle aus und beinhaltet neben dem MTC (100 %) auch das Auftreten von Phäochromozytomen (50 %) und dem Hyperparathyroidismus (15-30 %). Mit der MEN2B liegt die weitaus aggressivere Variante der MEN2 mit ca. 5 % aller Fälle vor. Dieses Syndrom ist durch die gleichen Eigenschaften wie MEN2A gekennzeichnet, wobei das initiale Auftreten 10 Jahre früher erfolgt. Entwicklungsstörungen wie Ganglioneuromatosen oder gastrointestinale Fehlbildungen sind ebenso Bestandteil des MEN2B-Syndroms wie ein marfanoider Habitus (Bachelot *et al.*, 2002; Eng, 1999; Ponder und Smith, 1996). Dagegen ist beim FMTC als einzige Ausprägung das medulläre Schilddrüsenkarzinom ohne assoziierte Endokrinopathien zu beobachten. Somit präsentiert sich das FMTC als indolenteste Form des MTCs (Randolph und Maniar, 2000).

Durch genetische Kopplungsanalysen konnte 1987 eine Region auf Chromosom 10 identifiziert werden, die zur Prädisposition für das MTC beiträgt (Mathew *et al.*, 1987; Simpson *et al.*, 1987). Durch weiterführende Analysen konnte die Lokalisation auf Chromosom 10q11.2 eingegrenzt werden. In dieser Region lag zudem der genomische Locus des kurz zuvor identifizierten *RET* Proto-Onkogens (Ishizaka *et al.*, 1989). Dies legte die Vermutung nahe, dass dieser Locus verantwortlich für hereditäre Formen des

MTCs sein könnte (Ishizaka *et al.*, 1989). Die Tatsache, dass Deletionen in einem oder beiden Allelen praktisch nicht vorkamen, bekräftigte die Annahme, dass hier nicht etwa der Verlust eines Tumorsuppressorgens, sondern eine andere genetische Anomalie dieses Locus eine wichtige Rolle spielt (Landsvater *et al.*, 1989; Nelkin *et al.*, 1989). Tatsächlich konnten 1993 Mutationen im *RET* Proto-Onkogen als genetische Ursachen sowohl für die MEN2A bzw. MEN2B, als auch für das sporadische MTC identifiziert werden (Donis-Keller *et al.*, 1993; Hofstra *et al.*, 1994; Mulligan *et al.*, 1993; Mulligan *et al.*, 1994). Darüber hinaus sind rearrangierte Varianten des *RET* Proto-Onkogens durch Fusion mit Dimerisierungsdomänen verschiedener Proteine (H4, R1 $\alpha$ , ELE1, RFG5, HTIF, RGF7 oder ELKS) die Ursache für die Entstehung des papillären Schilddrüsenkarzinoms (Jhiang, 2000).

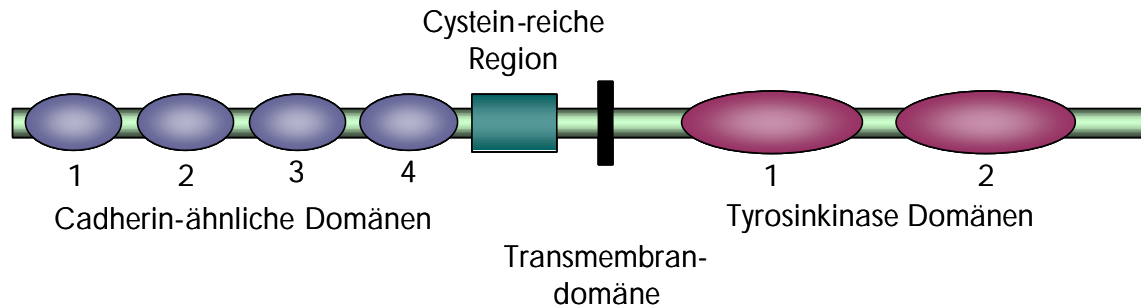
Inaktivierende Mutationen im *TP53* Tumorsuppressorgen sowie aktivierende Mutationen der *H-* und *K-Ras* Onkogene scheinen im Prozess der Tumorigenese von MTCs eine untergeordnete Rolle zu spielen (Herfarth *et al.*, 1997; Bockhorn *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu vielen anderen Tumorarten, bei denen darüber hinaus Mutationen des *INK4a*-Lokus bzw. *RB*-Tumorsuppressorgens beschrieben wurden (Sherr, 2001), sind bei medullären Schilddrüsenkarzinomen bisher keine signifikant erhöhten Mutationsraten in diesen Genen bekannt, was nochmals die Bedeutung von Mutationen im *RET* Proto-Onkogen unterstreicht (Yane *et al.*, 1996).

## 1.2 Das *RET* Proto-Onkogen

Ursprünglich wurde das *RET* Proto-Onkogen als Teil eines umgeordneten Fusionsproteins entdeckt, das in der Lage ist, NIH3T3-Zellen zu transformieren. Es wurde postuliert, dass es durch Rekombination zweier nicht gekoppelter chromosomaler Segmente höchstwahrscheinlich während einer Transfektion entstand, weshalb diesem Protein der Name RET (REarranged during Transfection) gegeben wurde (Takahashi *et al.*, 1985). Später stellte sich heraus, dass es sich beim Produkt des *RET* Proto-Onkogens um eine Rezeptor-Tyrosinkinase handelt, die präferentiell in Geweben neuroektodermalen Ursprungs exprimiert wird (Takahashi *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1990; Takahashi *et al.*, 1991).

Durch Sequenzhomologievergleiche und molekulare Modellierungsstudien ist die Domänenstruktur des RET Proteins mittlerweile gut bekannt (Anders *et al.*, 2001). Hieraus wird ersichtlich, dass dem RET Protein durch das Vorhandensein mehrerer

potenzieller Cadherin-ähnlicher Domänen eine besondere Stellung innerhalb der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen zukommt (Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1: Domänenstruktur des RET Proto-Onkogens.** In der extrazellulären Region finden sich vier Cadherin-ähnliche Domänen (blau), sowie eine Domäne reich an Cysteinresten (grün). Die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne ist beim RET Protein interkaliert (violett).

Cadherine sind Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-abhängige Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, bei denen die Bindung von Kalzium eine wichtige Rolle bei der Linearisierung und Ausbildung einer starren Proteinstruktur spielt (Manie *et al.*, 2001). Tatsächlich wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass die RET Expression auf der Zelloberfläche stark  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist (van Weering *et al.*, 1998). Der experimentelle Beweis einer direkten Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die extrazelluläre Domäne deutet des Weiteren darauf hin, dass dies für die Stabilisierung der Konformation der extrazellulären Domäne und für eine effiziente Ligandenbindung erforderlich ist (Anders *et al.*, 2001). In der Cystein-reichen Region befinden sich 28 Cysteinreste, die essentiell für die Dimerisierung des Rezeptors in Folge einer Aktivierung durch entsprechende Liganden sind. Die Dimerisierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen ist ein wesentlicher Bestandteil ihrer physiologischen Aktivierung (Heldin, 1995). Beim aktivierten RET Rezeptor werden zwei Moleküle mittels kovalenter Verknüpfung der Cysteinreste räumlich in die Lage versetzt, durch *trans*-Autophosphorylierung der Tyrosinreste in der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne nachfolgende Signaltransduktionswege zu aktivieren (van Weering und Bos, 1998). Eine weitere Besonderheit des RET Rezeptors ist die interkalierte Tyrosinkinasedomäne, die sonst nur noch bei den am nächsten verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen FGFR, PDGFR und VEGFR zu finden ist (Robinson *et al.*, 2000).

Durch alternatives Spleißen der 3'-Exone entstehen drei verschiedene Transkripte, die in drei unterschiedliche Proteine translatiert werden (Myers *et al.*, 1995; Tahira *et al.*, 1990). Diese Isoformen unterscheiden sich in den C-Termini durch die letzten 9 ( $\text{RET}^9$ ), 43 ( $\text{RET}^{43}$ ) und 51 ( $\text{RET}^{51}$ ) Aminosäuren, so dass Proteine von 1072, 1106 und 1114

Aminosäuren entstehen. Alle Transkripte werden in verschiedenen adulten bzw. fetalen Geweben exprimiert, wobei die Expression der RET<sup>9</sup> und RET<sup>51</sup> Transkripte wesentlich stärker ist als die sehr geringen Expressionsspiegel der RET<sup>43</sup> Isoform (Carter *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die drei Isoformen auch unterschiedliche biologische Funktionen besitzen (Borello *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002).

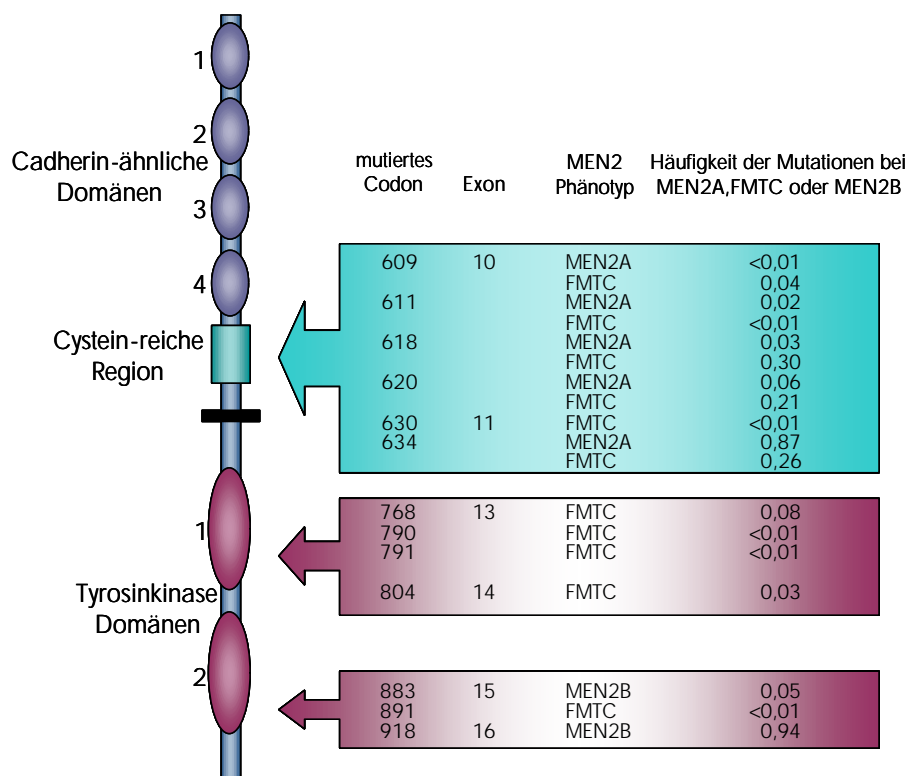
Als physiologische Liganden der RET Rezeptor-Tyrosinkinase konnte der neurotrophe Faktor GDNF (Glial cell-line derived neurotrophic factor) sowie die nah verwandten homologen Faktoren Neurturin, Artemin und Persephin identifiziert werden (Airaksinen und Saarma, 2002). Diese als GFLs (GDNF family ligands) bezeichneten Faktoren nutzen den RET Rezeptor als gemeinsame Signaltransduktionseinheit, wobei die Spezifität durch ligandenspezifische Co-Rezeptoren gewährleistet wird (Airaksinen *et al.*, 1999). Zuerst binden die GFLs ihre Co-Rezeptoren, die als GFR $\alpha$ -Rezeptoren (GFR $\alpha$ 1-4) bezeichnet werden und über GPI-Anker an der äußeren Zellmembran befestigt sind. Im zweiten Schritt bilden sie dann einen Komplex mit dem RET Rezeptor, der dadurch aktiviert wird (Airaksinen und Saarma, 2002).

Im lebenden Organismus ist diese komplexe Signaltransduktionsmaschinerie essentiell für die Embryonalentwicklung der Niere. RET<sup>-/-</sup>-Mäuse sind nicht lebensfähig, da neben dem Fehlen von funktionsfähigen Nieren auch die Innervation des Darms nahezu vollständig reduziert ist (Schuchardt *et al.*, 1994). Durch das Fehlen von autonomen sympathischen Ganglien (SCG) lassen sich wesentliche, für das Überleben notwendige Funktionen nicht mehr aufrecht erhalten. Wie schon die Tatsache, dass neurotrophe Faktoren als Liganden identifiziert wurden, vermuten lässt, spielt der Komplex aus RET/GFL/GFR $\alpha$  eine entscheidende Rolle in der Transduktion von Proliferations- und Überlebenssignalen für eine Reihe wichtiger Neurone, wie z.B. dopaminerge, noradrenerge und cholinerge Neurone des zentralen bzw. peripheren Nervensystems sowie Neurone des autonomen Nervensystems (Airaksinen und Saarma, 2002; Capes-Davis und Robinson, 1999; Manie *et al.*, 2001).

Das Produkt des *RET* Proto-Onkogens wird während der Synthese im endoplasmatischen Retikulum (ER) in seiner extrazellulären Region stark glykosyliert, so dass je nach Isoform Proteine von 170-175 kDa auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Diese Glykosylierung ist notwendig für den Transport zur Zellmembran, nicht vollständig glykosylierte Formen verbleiben im ER und falsch glykosylierte Proteine werden abgebaut (Carlomagno *et al.*, 1996; Cosma *et al.*, 1998; Iwashita *et al.*, 1996b). Unvollständig glykosylierte RET Isoformen sind als 150-155 kDa Proteine sichtbar. Eine Ablösung der Glykosylreste durch Verdauung mit der EndoH-Deglykosylase reduziert das Molekulargewicht auf ca. 120 kDa (Cosma *et al.*, 1998).

### 1.3 MTC-assozierte Mutationen im *RET* Proto-Onkogen

Seitdem im Jahre 1993 Punktmutationen im *RET* Proto-Onkogen erstmals mit dem medullären Schilddrüsenkarzinom in Verbindung gebracht wurden, sind eine Reihe verschiedener Mechanismen, die zur Tumorentstehung führen, entschlüsselt worden. Mittlerweile wurden in über 95 % aller hereditären und bis zu 70 % aller sporadischen Formen des MTCs Mutationen im *RET* Proto-Onkogen entdeckt (Decker und Peacock, 1997). Die mit Abstand häufigste MTC-assozierte Mutation im *RET* Gen betrifft den Cysteinrest im Codon 634. Nahezu 90 % aller Mutationen beim MEN2A-Syndrom befinden sich in diesem Codon (Abb. 1.2).



**Abbildung 1.2: Mutationen in *RET* Proto-Onkogen.** Die betroffenen Codons mit entsprechenden Exonen sowie die assoziierten Phänotypen sind dargestellt. Weiterhin wird die Häufigkeit der Mutationen nach Phänotypen angezeigt (nach Eng, 1999; Hansford und Mulligan, 2000; verändert).

Interessanterweise lassen sich alle mit dem MEN2A-Syndrom assoziierten Mutationen einem von sechs Cysteinresten der Cystein-reichen Region zuordnen (Eng, 1999). Durch diese Punktmutationen entstehen ungepaarte Cysteinreste, die dann intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden, so dass die mutierten Rezeptoren in einer Liganden-

unabhängigen Weise dimerisieren und es so zu einer konstitutiven Rezeptoraktivierung kommt (Asai *et al.*, 1995; Borello *et al.*, 1995; Santoro *et al.*, 1995). Die Tatsache, dass RET Proteine mit MEN2A-Mutationen in der Lage sind, NIH3T3-Zellen zu transformieren und transgene Mäuse mit der C634R-Mutation schnell wachsende medulläre Schilddrüsenkarzinome entwickeln, spiegelt die Bedeutung dieser Mutationen für die Tumorigenese des MTCs wider (Kawai *et al.*, 2000; Michiels *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 2001). Dieser Mechanismus gilt gleichermaßen für Mutationen in der Cystein-reichen Region, die mit dem FMTC-Syndrom verbunden sind. Die transformierende Aktivität von RET Mutationen in den Codons 609, 618 oder 620 ist jedoch vergleichsweise gering im Gegensatz zur Cystein-634 Mutation, denn diese Mutationen reduzieren zusätzlich die RET Expressionsspiegel auf der Zelloberfläche (Carlomagno *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1997). Durch die niedrigen transformierenden Eigenschaften dieser Mutationen lässt sich die Prädisposition zur Entstehung von FMTC erklären (Takahashi, 2001).

Die häufigste, bei der weitaus aggressiveren MTC-Variante MEN2B gefundene Mutation ist in ca. 94 % aller Fälle im Codon 918 lokalisiert (Hofstra *et al.*, 1994; Abb. 1.2). Diese, wie auch die seltene Mutation im Codon 883, führen ebenfalls zu einer konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinase, jedoch kommt es hierbei nicht zu einer Dimerisierung des Rezeptors (Borello *et al.*, 1995; Santoro *et al.*, 1995). Vielmehr führen die MEN2B-Mutationen, die allesamt die RET Kinase-Domäne betreffen, zu einer Aktivierung des RET Rezeptors in seiner monomeren Form. Wahrscheinlich ist dies auf eine Konformationsänderung im katalytischen Zentrum zurückzuführen, denn mehrere Studien deuten auf eine Veränderung in der Substratspezifität durch MEN2B Mutationen hin (Bocciardi *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1999; Santoro *et al.*, 1995). Weiterhin wurde gezeigt, dass die MEN2B Mutation die Assoziation des RET Rezeptors mit dem Adaptermolekül Shc verstärkt und es dadurch zu einer gesteigerten Aktivierung der Ras/ERK- und PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionswege kommt (Salvatore *et al.*, 2001). Transgene Mausmodelle für MEN2B entwickeln ebenfalls C-Zell-Hyperplasien und medulläre Schilddrüsenkarzinome, allerdings in schwächerer Ausprägung, so dass die Akkumulation einer weiteren genetischen Veränderung wahrscheinlich für den Erwerb des vollständigen MEN2B-Phänotyps in Mäusen notwendig ist (Acton *et al.*, 2000; Smith-Hicks *et al.*, 2000).

Diese Art der Genotyp-Phänotyp-Korrelationen spiegelt damit erneut die enorme Bedeutung von Mutationen im RET Proto-Onkogen für die Tumorigenese des medullären Schilddrüsenkarzinoms wider.

## 1.4 Aktivierte onkogene Signaltransduktionswege

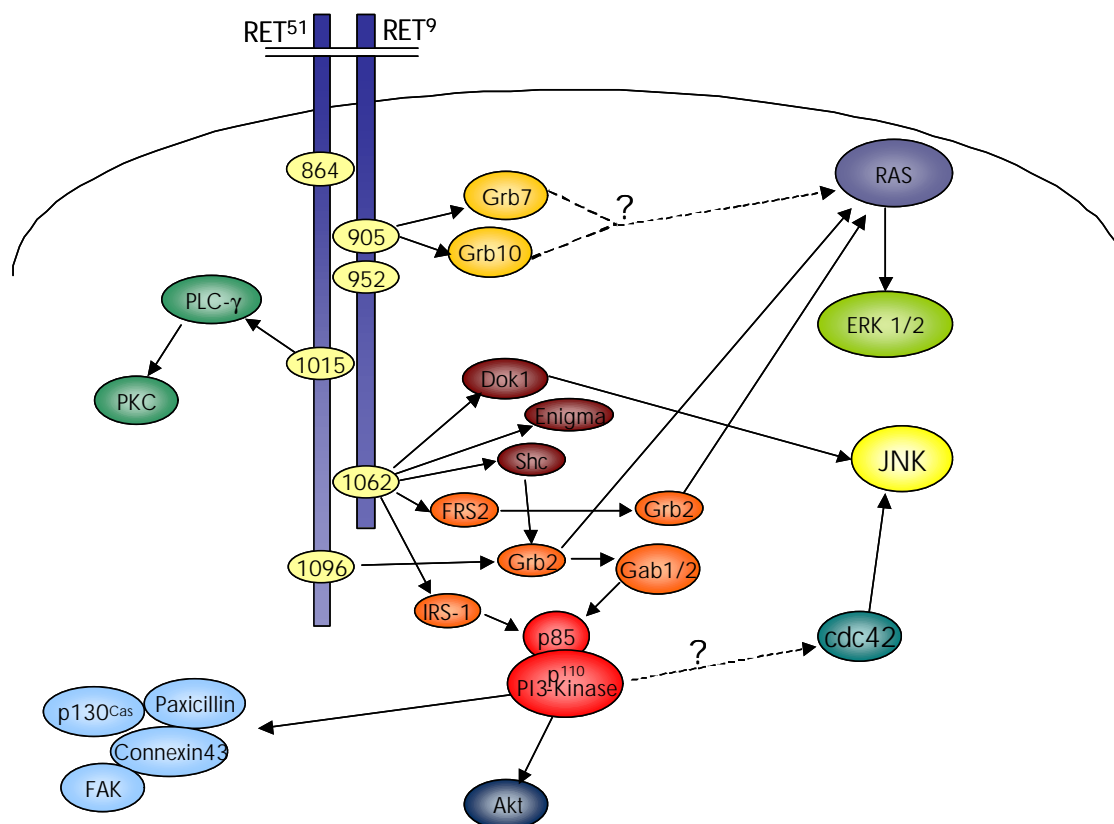
Wie alle Rezeptor-Tyrosinkinase kann auch RET nach Aktivierung eine Reihe intrazellulärer Signaltransduktionswege durch *trans*-Autophosphorylierung der Tyrosinreste der zytoplasmatischen Kinase-Domäne in Gang setzen (Blume-Jensen und Hunter, 2001; Van Weering und Bos, 1998). Die kurze Isoform RET<sup>9</sup> besitzt 16 intrazelluläre Tyrosinreste, wohingegen die lange Isoform RET<sup>51</sup> noch zwei weitere Tyrosinreste aufweist, von denen sich zwei nahe der Zellmembran befinden, elf in der Kinase-Domäne und weitere fünf nahe des Carboxy-terminalen Endes lokalisiert sind. Unter diesen Tyrosinresten spielen die Reste 905, 1015, 1062 und 1096, wenn phosphoryliert, als Bindungsstellen für intrazelluläre Adapter- und Signaltransduktions-effektormoleküle eine bedeutende Rolle (Takahashi, 2001).

Der Tyrosinrest 905 korrespondiert mit dem konservierten Tyrosinrest 416 des aktiven Zentrums der zytoplasmatischen Tyrosinkinase Src, wo er entscheidend an der Aktivierung der Kinase beteiligt ist (Coulpier *et al.*, 2002; Hanks *et al.*, 1988). Das Fehlen dieses Tyrosinrestes im RET Rezeptor resultiert in einer starken Beeinträchtigung der Kinase-Aktivität und der transformierenden Eigenschaften der MEN2A-Mutante C634R (Iwashita *et al.*, 1996a). Weiterhin konnte der Tyrosinrest 905 als ein an der Bindung zweier SH2-Domänen beinhaltenender Adapterproteine, Grb7 und Grb10, beteiligter Rest identifiziert werden (Pandey *et al.*, 1995; Pandey *et al.*, 1996, Abb. 1.3). Nach Aktivierung der RET Rezeptor-Tyrosinkinase werden sechs weitere Tyrosinreste autophosphoryliert (Tyr<sup>687</sup>, Tyr<sup>826</sup>, Tyr<sup>1015</sup>, Tyr<sup>1029</sup>, Tyr<sup>1062</sup> und Tyr<sup>1096</sup>). Die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung von Tyr<sup>687</sup>, Tyr<sup>826</sup> und Tyr<sup>1029</sup> ist allerdings unklar, wohingegen den phosphorylierten Tyrosinresten 1015, 1062 und 1096 eine wesentliche Rolle bei der Signaltransduktion zukommt (Liu *et al.*, 1996). Der Tyrosinrest 1015 beinhaltet das Motiv YLXL, das eine Konsensussequenz für die Bindung der Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) darstellt und damit an der Aktivierung der Proteinkinase C beteiligt ist. Die korrespondierende Aminosäure im rearrangierten Onkogen RET/PTC2 konnte tatsächlich als hochaffine Bindestelle für PLC $\gamma$  identifiziert werden und die Mutation dieser Aminosäure reduziert die onkogenen Eigenschaften auf drastische Weise (Borello *et al.*, 1996; Abb. 1.3).

Der Tyrosinrest 1062, der Bestandteil des Bindemotivs NKXY ist, stellt die Bindestelle für eine Reihe von Adapterproteinen dar. Einerseits binden die Faktoren Shc und FRS2 an diesen Tyrosinrest und stellen somit die Verbindung zu mitogenen und anti-apoptischen Signaltransduktionswegen wie den Ras/ERK- und PI3K/Akt-Signalkaskaden her (Arighi *et al.*, 1997; Borrello *et al.*, 1994; Melillo *et al.*, 2001b). Die Tatsache, dass FRS2 nicht mit Grb2 und Gab1/2, sondern nur mit Grb2 assoziiert



ist, legt die Vermutung nahe, dass über diesen Adapter in der Hauptsache der Ras/ERK-Signaltransduktionsweg aktiviert wird (Kurokawa *et al.*, 2001). Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges verläuft dagegen höchstwahrscheinlich über die Adapter Grb2 und Gab1/2 (Hayashi *et al.*, 2000) sowie durch die Rekrutierung von IRS-1 (Melillo *et al.*, 2001a). Die Fähigkeit der MEN2A-Mutante C634R zur Zelltransformation hängt dabei zu einem großen Teil von der Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges ab (Segouffin-Cariou und Billaud, 2000). Die Aktivierung von Akt durch RET ist zusätzlich für die Steigerung von Zellmotilität und -interaktionen verantwortlich, wie die Induktion von Paxillin, Connexin43, p130<sup>Cas</sup> und FAK zeigt (Murakami *et al.*, 1999; Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3: Aktivierte Signaltransduktionswege des RET Proto-Onkogens.** Die phosphorylierten Tyrosinreste 864, 905, 952, 1015, 1062 und 1096 (Gelb) sind als Teile der intrazytoplasmatischen Domänen der kurzen (RET<sup>9</sup>) und langen Isoform (RET<sup>51</sup>) dargestellt. Cdc42, Cell division cycle 42. Dok1, Docking protein 1. ERK 1/2, Extracellular signal regulated kinase 1/2. FAK, Focal adhesion kinase. FRS2, Fibroblast growth factor receptor substrate 2. Gab1/2, Grb2 associated binding protein 1/2. Grb2/7/10, Growth factor receptor bound protein 2/7/10. IRS-1, Insulin receptor substrate-1. JNK, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase. PI3-Kinase, Phosphatidylinositol 3-Kinase. PLCγ, Phospholipase C-γ. PKC, Proteinkinase C. RAS, Rat sarcoma oncogene. Shc, Src homology 2 (SH2)-containing proto-oncogene product. Erläuterungen im Text.

Der Tyrosinrest 1062 ist essentiell für die Signalweiterleitung sowohl mitogener als auch anti-apoptotischer Stimuli, wie durch Mutation dieses Restes gezeigt wurde (Asai *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 2000; Abb. 1.3). Zudem lässt die Bindung von Molekülen wie Dok1 oder Enigma an diesen Tyrosinrest die Vermutung aufkommen, dass weitere Signalkomplexe an der Transduktion von Signalen durch die RET Rezeptor-Tyrosinkinase beteiligt sind (Borrello *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2002). So wurde in diesem Zusammenhang die Aktivierung der p38MAPK- und JNK- (über cdc42)-Signaltransduktionswege beobachtet, wobei möglicherweise auch eine Verbindung zwischen Dok1 und der JNK-Aktivierung besteht (Hayashi *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 2002). Die durch alternatives Spleißen entstandene Isoform RET<sup>9</sup> besitzt im Gegensatz zu RET<sup>51</sup> die perfekte Konsensussequenz zur Bindung von SH2-Domänen, die sich direkt im Anschluss an Tyr<sup>1062</sup> befindet (Coulpier *et al.*, 2002). Dies würde die präferentielle Bindung von PTB- und SH2-Domänen-tragenden Zielproteinen an den Tyrosinrest 1062 der kurzen Isoform andeuten.

Der Tyrosinrest 1096, der nur in der langen Isoform RET<sup>51</sup> vorkommt, ist Teil der Konsensussequenz PYXNX, die als Bindestelle des Adapterproteins Grb2 bekannt ist (Coulpier *et al.*, 2002). Zwar binden beide Isoformen (RET<sup>9</sup> und RET<sup>51</sup>) an Grb2, die längere bindet aber mit deutlich höherer Affinität (Alberti *et al.*, 1998; Abb. 1.3). Im Gegensatz dazu ist die Interaktion der kürzeren Isoform mit dem Adapterprotein Enigma wesentlich stärker, da auch nur RET<sup>9</sup> die vollständige Konsensussequenz der Enigma-Bindestelle aufweist (Borrello *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang erlangt die Erkenntnis zusätzliche Bedeutung, dass die RET<sup>9</sup>- und RET<sup>51</sup>-Isoformen unabhängige Signaltransduktionseinheiten darstellen, d. h. nur Proteine der gleichen Isoform können nach Aktivierung dimerisieren (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002).

## 1.5 Hirschsprung-Erkrankung

Neben Mutationen im *RET* Proto-Onkogen, die zu einer gesteigerten Aktivität, d. h. zu einem Funktionsgewinn des RET Proteins führen, gibt es eine Reihe von Mutationen, die einen gegenteiligen Effekt bewirken. All diese Mutationen können mit einer Entwicklungsstörung, der sogenannten Hirschsprung-Erkrankung (HSCR), in Verbindung gebracht werden.

Die Hirschsprung-Erkrankung ist eine relativ häufige, kongenitale Missbildung, die durch das Fehlen von intrinsischen Ganglienzellen im Bereich des distalen Kolons charakterisiert ist. Durch fehlende Relaxation des betroffenen Darmsegmentes kommt es

zur Passagebehinderung und zur Dilatation des vorgeschalteten Segmentes, die zum sogenannten Megakolon führen kann (Amiel und Lyonnet, 2001; Parisi und Kapur, 2000). Basierend auf der Länge des aganglionären Segmentes werden HSCR Patienten in zwei Gruppen unterteilt: Patienten mit fehlenden Ganglien bis hin zur rektosigmoidalen Verbindung gehören demnach zu Gruppe des „short-segment type“ und Patienten mit einem aganglionären Segment, das darüber hinaus verläuft, zum „long-segment type“ (Iwashita *et al.*, 2001). Neben Mutationen im *RET* Proto-Onkogen, die zur Entstehung der Hirschsprung-Erkrankung durch Funktionsverlust der *RET*-assoziierten Signaltransduktion beitragen (Edery *et al.*, 1993; Pasini *et al.*, 1995), können u. a. auch die Gene des Endothelin-Rezeptors B (*EDNRB*), der Transkriptionsfaktoren *Sox10* und/oder *SIP1* (*SMAD-interacting protein-1*) durch inaktivierende Mutationen betroffen sein (Manie *et al.*, 2001). Insgesamt können Mutationen in acht verschiedenen Genen an der Ätiologie der Hirschsprung-Erkrankung beteiligt sein, die allesamt an der frühen Entwicklung des Nervensystems beteiligt sind und in einer noch nicht genauer untersuchten Form an der *RET*- oder *EDNRB*-Signaltransduktion beteiligt sind (Carrasquillo *et al.*, 2002).

Die Mutationen im *RET* Proto-Onkogen sind für eine dominante Form der HSCR verantwortlich, die 50 % aller vererbten Fälle ausmacht (Manie *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den *MEN2*-Syndromen sind die Mutationen (u. a. Deletionen, Insertionen, Leserasterverschiebungen, Missense- und Nonsense-Mutationen) über den gesamten Leserahmen verteilt und lassen die Vermutung aufkommen, dass HSCR aus einer *RET*-Haploinsuffizienz entsteht, was im Einklang mit dem Funktionsverlust durch die *RET* Mutationen steht (Parisi und Kapur, 2000). Die funktionellen Konsequenzen der *RET* Mutationen korrelieren grob mit der Position im *RET* Gen und lassen sich daher provisorisch in vier Klassen unterteilen (Iwashita *et al.*, 2001; Manie *et al.*, 2001; Pelet *et al.*, 1998).

Die HSCR Mutationen, die dem extrazytoplasmatischen Teil des *RET* Proto-Onkogens zugeordnet werden können, wurden als der Klasse I zugehörig zusammengefasst. Durch Austausch der Aminosäuren wird die Reifung bzw. die Glykosylierung der extrazellulären Domäne gestört, so dass es zum Verbleiben der mutierten Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) kommt. Dies wurde ausführlich am Beispiel der *S32L*-Mutation gezeigt, bei der der Serinrest 32 an einer vorhergesagten Wasserstoffbrückenbindung mit *Tyr<sup>36</sup>* beteiligt zu sein scheint (Anders *et al.*, 2001; Cosma *et al.*, 1998). Durch Austausch mit Leucin kommt es demnach zu einer Konformationsänderung, die zum Ausbleiben der Glykosylierung führt. In der Studie von Cosma *et al.* (1998) wurde der experimentelle Beweis erbracht, dass diese Mutante tatsächlich nicht mehr vollständig glykosyliert wird, so dass es zum Abbau im intrazellulären Bereich kommt und somit die Expression auf der Zelloberfläche

ausbleibt. Interessanterweise lässt sich bei Mutationen, die zur Gruppe des „long-segment type“ zählen (z. B. S32L, L40P, R330Q oder F393L), eine deutlich ausgeprägtere Störung beim Transport zur Zelloberfläche beobachten, als z. B. bei der Mutation P64L, die dem „short-segment type“ zugerechnet wird (Iwashita *et al.*, 1996b). Dies deutet darauf hin, dass die Expressionslevel der RET Mutanten mit dem HSCR-Phänotyp korrelieren.

Die Mutationen, die zur Klasse II zählen, führen zum Austausch eines von vier Cysteinresten der extrazytoplasmatischen Domäne (Cys<sup>609</sup>, Cys<sup>611</sup>, Cys<sup>618</sup> und Cys<sup>620</sup>) mit einer anderen Aminosäure. Überraschenderweise werden Mutationen eben dieser Cysteinreste auch bei den MEN2A- und FMTC-Syndromen gefunden. Tatsächlich kommen MEN2A bzw. FMTC und HSCR in einer Reihe von Familien mit *RET* Mutationen gemeinsam vor. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass diese Mutationen einen dualen Effekt auf die RET-Funktion ausüben: Zum einen eine konstitutive Aktivierung durch Ausbildung einer kovalenten Disulfidbrücke und zum anderen eine drastische Verringerung der Expressionsspiegel auf der Zelloberfläche (Chappuis-Flament *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1999). Die Klasse III-Mutationen beeinflussen dagegen die intrazytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne. Die Mutationen, die konservierte Aminosäuren innerhalb der Tyrosinkinase-Familie verändern, blockieren die Kinase-Aktivität vollständig, wohingegen nicht konservierte Reste diese Aktivität nur teilweise reduzieren, dafür aber die PLC $\gamma$ -assoziierte Signaltransduktion signifikant unterdrücken (Iwashita *et al.*, 2001; Manie *et al.*, 2001). Durch Mutationen der Klasse IV wird nicht etwa die Tyrosinkinase-Aktivität reduziert, sondern die Bindung von Transduktionseffektormolekülen an essentielle Tyrosinreste gestört. Zwei Mutationen zum Beispiel (Deletion von N1059 und L1061P) inhibieren die Assoziation von Shc, IRS-1 und FRS2 an den RET Rezeptor (Geneste *et al.*, 1999; Melillo *et al.*, 2001a; Melillo *et al.*, 2001b). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass diese Adaptermoleküle an Signaltransduktionsereignissen während der Neurogenese der Darminnervation beteiligt sind. Es ist nicht auszuschließen, dass eventuell noch weitere Mechanismen an der Entstehung von HSCR beteiligt sind, denn einige HSCR-assoziierte Mutationen können eine unlängst entdeckte pro-apoptotische Aktivität des RET Rezeptors, die in Abwesenheit des Liganden GDNF auftritt, in einer liganden-unabhängigen Weise stimulieren (Bordeaux *et al.*, 2000).

Eine Reihe von Studien demonstrierte kürzlich, dass einige HSCR-assoziierte Missense-Mutationen einen dominant-negativen Effekt gegenüber onkogenem RET ausüben (Cosma *et al.*, 1998; Pasini *et al.*, 1995). Zum Beispiel reduziert die Co-Expression der HSCR-Mutante S32L (HSCR32) RET-assoziierte Signaltransduktion in signifikanter Weise. Durch intrazelluläre Dimerisierung dieser Mutante mit onkogenem RET werden beide RET-Varianten im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und schließlich



Gleichermaßen beeinflusst die Co-Expression der HSCR-assoziierten RET Mutante R897Q, die zur Klasse IV zählt und die Funktion der Tyrosinkinase-Domäne außer Kraft setzt, die biologische Aktivität von MEN2A- und MEN2B-assoziierten RET Mutanten in negativer Weise (Cosma *et al.*, 1996). Dabei ist auch hier der negative Effekt dominant, so dass die *trans*-Autophosphorylierung der onkogenen RET Proteine vollständig unterbunden wird. Ein vergleichbarer dominant-negativer Effekt konnte ebenfalls für die HSCR-assoziierte RET Mutante S765P (Klasse III) ausgemacht werden (Pasini *et al.*, 1995). Aber nicht nur einzelne Punktmutationen, die die enzymatische Aktivität der RET Tyrosinkinase außer Kraft setzen, sondern auch die Deletion der gesamten Tyrosinkinase-Domäne führt zum Auftreten dominant-negativer Eigenschaften (Baldassarre *et al.*, 2002). Somit sind eine Reihe von dominant-negativen Mutanten des *RET* Proto-Onkogens beschrieben, die potenzielle Hilfsmittel zur Hemmung des *RET* Onkogens darstellen und dadurch zur Analyse der *RET*-bedingten Tumorigenese in Frage kommen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Umfunktionierung ehemals humanpathogener Viren zu Vehikeln, mit denen effizient Fremdgene in Zellen des menschlichen Organismus transportiert werden können, bietet gerade im Rahmen der Therapie von Krebserkrankungen völlig neuartige Perspektiven (McCormick, 2001). Insbesondere durch das zunehmende Verständnis von Krebserkrankungen auf molekularer Ebene kann die Technik der Genterapie einen wichtigen Beitrag zur Behandlung von Krebserkrankungen, entweder als Alternative zu herkömmlichen Therapieansätzen oder diese unterstützend, leisten.

Das Modell des medullären Schilddrüsenkarzinoms (MTC) ist dabei für die Etablierung eines solchen Ansatzes besonders geeignet, da mit aktivierenden Mutationen im *RET* Proto-Onkogen die Hauptursache für die Tumorentstehung lange bekannt ist. Ziel des vorliegenden Projektes war es daher, durch adenoviral vermittelten Gentransfer von verschiedenen dominant-negativen *RET* Proto-Onkogen Mutanten das Wachstum von medullären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien zu inhibieren. Dabei lagen die Schwerpunkte auf folgenden Aufgaben- bzw. Fragestellungen:

- (1) Konstruktion adenoviraler Vektoren zur Expression der dominant-negativen *RET* Proto-Onkogen Mutanten *RET* HSCR32, *RET* flag und *RET*  $\Delta$ TK und Überprüfung ihrer Funktionalität
- (2) Charakterisierung der potenziellen tumorsupprimierenden Eigenschaften und Mechanismen anhand eines humanen MTC-Modells *in vitro*
- (3) Analyse der antitumoralen Wirkungen des adenoviral vermittelten Gentransfers von dominant-negativem *RET* im MTC-Xenotransplantatmodell *in vivo*

Die experimentelle Bearbeitung dieser Fragestellungen sollte Hinweise über die Bedeutung der Inhibition von onkogen aktiviertem *RET* mit Hilfe dominant-negativer Mutanten für die Behandlung des MTCs bei Patienten und die der *RET*-assoziierten Tumorigenese zugrundeliegenden Mechanismen liefern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Puffer, Enzyme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Reagenzien und Chemikalien wurden in Analysequalität von den Firmen Biomol (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen.

Verwendete Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989).

Restriktions- und DNA-modifizierende Enzyme stammten von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg).

#### 2.1.2 Vektoren

Plasmid-Vektoren:

---

<b>pAdEasy1</b>	Plasmidvektor, der das Ad5 Genom trägt; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, USA; He <i>et al.</i> , 1998)
<b>pAdTrack.CMV.RET ΔTK</b>	Adenoviraler Shuttle-Vektor, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, USA; nach Einführung der RET ΔTK cDNA
<b>pBluescriptSK RET<sup>51</sup></b>	Klonierungsvektor zur Subklonierung, Stratagene, Heidelberg
<b>pBluescriptSK RET<sup>51</sup>flag</b>	Klonierungsvektor zur Subklonierung, Stratagene, Heidelberg; nach Einführung eines Flag-Epitops in die RET <sup>51</sup> cDNA
<b>pBluescriptSK RET<sup>51</sup>HSCR32</b>	Klonierungsvektor zur Subklonierung, Stratagene, Heidelberg; nach Einführung der HSCR32-Punktmutation durch PCR-Mutagenese
<b>pBluescriptSK RET<sup>9</sup></b>	Klonierungsvektor zur Subklonierung, Stratagene, Heidelberg
<b>pBluescriptSK RET<sup>9</sup>HSCR32</b>	Klonierungsvektor zur Subklonierung, Stratagene, Heidelberg; nach Einführung der HSCR32-Punktmutation durch PCR-Mutagenese
<b>pCMV.EGFP-Spektrin</b>	Expressionsvektor, der das GFP-Spektrin Fusionsprotein exprimiert. (T. Shenk, Howard Hughes Medical Institute, Princeton University, New Jersey, USA; Kalejta <i>et al.</i> , 1997)
<b>pCR2.1-TOPO flag</b>	Klonierungsvektor zur Subklonierung von PCR-Produkten, Invitrogen, Karlsruhe; zur Flag-Epitop PCR-Mutagenese
<b>pCR2.1-TOPO HSCR32</b>	Klonierungsvektor zur Subklonierung von PCR-Produkten, Invitrogen, Karlsruhe; zur HSCR32 PCR-Mutagenese
<b>pGL3basic<sup>TATA</sup></b>	Promotorloser Vektor zum Einsatz im Luciferase Assay, Promega, München; nach Einführung einer TATA-Box (Dank an T. Stiewe)



<b>pGL3<sup>TATA</sup> 3xAP1</b>	Luciferase Expressionsvektor nach Klonierung eines 3xAP1 Minimalpromotors
<b>pJ7<math>\Omega</math> RET<sup>51</sup></b>	Expressionsvektor; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Billaud, Lyon, Frankreich
<b>pJ7<math>\Omega</math> RET<sup>51</sup>C634R</b>	Expressionsvektor; durch ortsgerichtete Mutagenese generiert
<b>pJ7<math>\Omega</math> RET<sup>9</sup></b>	Expressionsvektor; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Billaud, Lyon, Frankreich
<b>pShuttle.CMV.RET<sup>51</sup>HSCR32</b>	Adenoviraler Shuttle-Vektor, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, USA; nach Einführung der RET <sup>51</sup> HSCR32 cDNA
<b>pShuttle.CMV.RET<sup>9</sup>HSCR32</b>	Adenoviraler Shuttle-Vektor, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, USA; nach Einführung der RET <sup>9</sup> HSCR32 cDNA
<b>pShuttle.TSE2.CP1.GFP-LUC</b>	Adenoviraler Shuttle-Vektor, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, USA; nach Einführung der Expressionskassette aus TSE2.CP1 Promotor, GFP-Spektrin cDNA, interner Ribosomenbindestelle, Luciferase cDNA und SV40 Polyadenylierungssignal
<b>pShuttle.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag</b>	Adenoviraler Shuttle-Vektor, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, USA; nach Einführung der Expressionskassette aus TSE2.CP1 Promotor, der RET <sup>51</sup> HSCR32 cDNA und dem SV40 Polyadenylierungssignal
<b>pShuttle.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32</b>	Adenoviraler Shuttle-Vektor, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, USA; nach Einführung der Expressionskassette aus TSE2.CP1 Promotor, der RET <sup>51</sup> HSCR32 cDNA und dem SV40 Polyadenylierungssignal
<b>pTSE2.CP1.GL3</b>	Luciferase Expressionsvektor, der den synthetischen Calcitonin-Promotor TSE2.CP1 beinhaltet (Dank an M. Messina; Messina <i>et al.</i> , 2000)
<b>pVDB2</b>	Expressionsvektor, der zwei Proteine innerhalb einer mRNA durch die interne Ribosomeneingangssequenz (IRES) des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) exprimiert (in der Arbeitsgruppe vorhanden, Dank an B.M. Pützer)

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Konstrukte im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

## Adenovirale Vektoren:

<b>Ad.CMV.GFP</b>	Ad-Vektor der ersten Generation; exprimiert das GFP-Spektrin Fusionsprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors (in der Arbeitsgruppe vorhanden, Dank an T. Stiewe; Pützer <i>et al.</i> , 2000)
<b>Ad.CMV.LUC</b>	Ad-Vektor der ersten Generation; exprimiert das Luciferase-Protein unter der Kontrolle des CMV-Promotors (in der Arbeitsgruppe vorhanden, Dank an T. Stiewe; Pützer <i>et al.</i> , 2000)
<b>Ad.CMV.p53</b>	Ad-Vektor der ersten Generation; exprimiert das humane Wildtyp-p53 Protein unter der Kontrolle des CMV-Promotors (in der Arbeitsgruppe vorhanden, Dank an T. Stiewe)
<b>Ad.CMV.RET ΔTK</b>	Ad-Vektor der ersten Generation; exprimiert die dominant-negative RET Mutante RET ΔTK unter der Kontrolle des CMV Promotors (im Rahmen dieser Arbeit generiert)
<b>Ad.TSE2.CP1.GFP-LUC</b>	Ad-Vektor der ersten Generation; beinhaltet eine Expressionskassette aus TSE2.CP1 Promotor, GFP-Spektrin cDNA, interner Ribosomenbindestelle, Luciferase cDNA und SV40 Poladenylierungssignal (im Rahmen dieser Arbeit generiert)
<b>Ad.TSE2.CP1.RET51flag</b>	Ad-Vektor der ersten Generation; exprimiert die dominant-negative RET Mutante RET <sup>51</sup> flag unter der Kontrolle des TSE2.CP1 Promotors (im Rahmen dieser Arbeit generiert)
<b>Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32</b>	Ad-Vektor der ersten Generation; exprimiert die dominant-negative RET Mutante RET <sup>51</sup> HSCR32 unter der Kontrolle des TSE2.CP1 Promotors (im Rahmen dieser Arbeit generiert)

## 2.1.3 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp
<i>E. coli</i> BJ5183	<i>endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR</i> (Str <sup>r</sup> ) (zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, USA; He <i>et al.</i> , 1998)
<i>E. coli</i> TOP10F'	F' [ <i>lacI<sup>q</sup> Tn10(Tet<sup>R</sup>)</i> ] <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80/lacI<sup>q</sup>ZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galJ galK rspL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen, Karlsruhe)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 relA1 lac</i> [F' <i>proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)</i> ] (Stratagene, Heidelberg)
<i>E. coli</i> XL2-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup></i> ] (Stratagene, Heidelberg)
<i>E. coli</i> XL10-Gold	<i>Tet<sup>r</sup>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup></i> ]

### 2.1.4 Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft
293	mit Ad5-E1A stabil transformierte menschliche embryonale Nierenzellen (Graham <i>et al.</i> , 1977); Microbix Biosystems Inc. (Toronto, Canada)
COS-7	SV40 transformierte Nierenzelllinie aus der grünen afrikanischen Meerkatze (ATCC, Manassas, USA; Gluzman, 1981)
H1299	etablierte Zelllinie aus einem humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom; zur Verfügung gestellt von B. Opalka (Innere Tumorklinik, Essen)
MZA	humane pankreatische Adenokarzinom-Zelllinie (zur Verfügung gestellt von D. I. Smith, Rochester, USA)
TT	etablierte humane Zelllinie aus einem medullären Schilddrüsenkarzinom (ATCC, Manassas, USA; CRL-1803) (Leone <i>et al.</i> , 1981)

### 2.1.5 Versuchstiere

Die Versuchstiere (NMRI/nude-Mäuse) wurden aus der Zucht des zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Essen bezogen und in einem Alter von 6-8 Wochen verwendet.

### 2.1.6 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
HSCR32-left5	5'-ATG GCG AAG GCG ACG TCC GGT-3'
HSCR32-left3	5'-TAA GCA TCC CTC AAG AAA GTA GAG GC-3'
HSCR32-right5	5'-GCC TCT ACT TCT TGA GGG ATG CTT A-3'
HSCR32-right3	5'-TCG GTT CTC CCG AAT GCG GAA GGA-3'
Flag-left3	5'-CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC GGC CGC CTG GTC CAC ATA CAG CTT CTC-3'
Flag-right5	5'-GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GGC ACG CCC TTG CTG TAC GTC CAT GCC CTG-3'
3xAP1 fwd	5'-GCT CAG ACG CGT TGA GGT CAT GAG GTC ATG AGG TCA CTC GAG GCT AGC-3'
3xAP1 rev	5'- GCT CAG ACG CGT TGA GGT CAT GAG GTC ATG AGG TCA CTC GAG GCT AGC-3'
C634R fwd	5'-ACT GTG CGA CGA GCT CCG CCG CAC GGT GAT CG-3'
C634R rev	5'-CGA TCA CCG TGC GGC GGA GCT CGT CGC ACA GT-3'
RET $\Delta$ TK-HA fwd	5'-CCG CCC AAG CTT ATG GCG AAG GCG ACG TCC GGT GCC-3'
RET $\Delta$ TK-HA rev	5'-CGG CGG AAG CTT TTA GAG GCT AGC ATA ATC AGG AAC ATC ATA CGG ATA TTC CCA CTT TGG ATC CTC CAG GAT CTT GAA G-3'
CHOP fwd	5'-GGC AGC TGA GTC ATT GCC TTT CTC TTC C-3'
CHOP rev	5'-TCC GTT TCC TGG TTC TCC CTT GGT CTT C-3'
BiP fwd	5'-CAC AAT CAC CAA TGA CCA GAA TCG CCT G-3'
BiP rev	5'-AAT GTC AGC ATC TTG GTG GCT TTC CAG C-3'

### 2.1.7 Antikörper

Ziel	Bezeichnung	Bemerkungen	Vertrieb
<b>RET</b>	c-20	erkennt spezifisch die lange Isoform RET <sup>51</sup>	Santa Cruz Biotechnology
<b>RET</b>	c-19	erkennt spezifisch die kurze Isoform RET <sup>9</sup>	Santa Cruz Biotechnology
<b>RET</b>	H-300	erkennt ein extrazelluläres RET Epitop	Santa Cruz Biotechnology
<b>Flag</b>	M2	gegen Flag-Epitop gerichtet (Polyasparaginsäure-Epitop)	Stratagene
<b>HA</b>	Y-11	gegen HA-Tag gerichtet (Hemagglutinin-Tag)	Santa Cruz Biotechnology
<b>Caspase-12</b>		<i>freundlicherweise zu Verfügung gestellt von J. Yuan (Boston, USA; Nakagawa et al., 2000)</i>	
<b>p-Tyr</b>	4G10	gegen phosphorylierte Tyrosinreste	Upstate Biotechnology

Alle verwendeten Antikörper wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Die entsprechenden Sekundärantikörper waren bei Anwendung in der Chemilumineszenz-Detektion mit der Horseradish-Peroxidase gekoppelt und wurden von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen. Bei Verwendung in der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden entweder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-, Alexa Fluor<sup>488</sup>- oder Alexa Fluor<sup>546</sup>-gekoppelte Sekundärantikörper nach Angaben der jeweiligen Hersteller (Pharmingen; BD Biosciences, Heidelberg; Calbiochem, Bad Soden und Molecular Probes, Leiden, Niederlande) eingesetzt.

## 2.2 DNA-Arbeitstechniken

### 2.2.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Bakterien (Mini-Präparation)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden die entsprechenden *E. coli*-Stämme in 5 ml LB-Medium unter Selektionsbedingungen (50 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin) über Nacht vermehrt. Von diesen wurden 2 ml sedimentiert (2 min, RT, 4000 x g) und das Bakterienpellet in 300 µl S1 Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl S2 Puffer erfolgte die Lyse der Bakterien für 5 min bei RT. Anschließend wurden 300 µl S3 Puffer zugefügt und die Proteine für 10 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 4°C, 12000 x g) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA

wurde durch Zugabe von 630 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 4°C, 12000 x g) pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (10 min, 4°C, 12000 x g) und luftgetrocknet. Die DNA wurde schließlich in 30 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und stand so für Restriktionsanalysen zur Verfügung.

S1 Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
S2 Puffer:	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
S3 Puffer:	2,6 M Kaliumacetat pH 7,2

### 2.2.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Bakterien (Maxi-Präparation)

Die Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab erfolgte durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurden die Bakterien in 500 ml SB-Medium unter entsprechenden Selektionsbedingungen über Nacht bei 37°C angezogen. Bei 4000 x g und 4°C wurden die Ansätze für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 40 ml GTE-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurde dem Ansatz 80 ml Lysepuffer zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt, verblieb 10 min auf Eis, bevor 40 ml Kaliumacetatlösung zugefügt wurden. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20 min auf Eis erfolgte eine Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 10 min) und die Überführung des Überstandes durch einen Faltenfilter in ein neues Zentrifugationsgefäß. Dort wurde die DNA durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol gefällt (30 min bei RT) und pelletiert (4000 x g, 4°C, 15 min). Das Pellet wurde schließlich luftgetrocknet und in 7 ml 0,1 x SSC resuspendiert. Pro ml des resuspendierten Volumens wurden 1 g CsCl untergemischt und die Lösung für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 20 min) wurde der Überstand in ein Beckman-Ultrazentrifugenröhrchen überführt, 200 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid zugefügt, mit Mineralöl überschichtet, dann mit dem Beckman Quick Sealer verschlossen und für 16 h bei 55000 rpm im TI75 Rotor ultrazentrifugiert. Die deutlich sichtbare Plasmidbande wurde mittels einer 18-Gauge-Kanüle abgezogen und das Ethidiumbromid durch mehrfaches Extrahieren mit TE-gesättigtem Butanol entfernt. Schließlich wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 3 Volumen TE-Puffer und 8 Volumen Ethanol gefällt (4000 x g, 4°C, 30 min). Nach Waschen des Pellets mit 5 ml 70 % Ethanol wurde dies für 5 min bei 65°C getrocknet und in 0,1 x SSC resuspendiert.

GTE-Puffer:	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8 10 mM EDTA 5 mg/ml Lysozym
-------------	---

Lysepuffer:	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Kaliumacetatlösung:	3 M Kaliumacetat mit Eisessig pH 5,5
20 x SSC-Puffer:	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat pH 7
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8 1 mM EDTA

### 2.2.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Stämme wurden die Bakterien in 250 ml LB-Medium bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,6 wachsen gelassen. Nachdem die Ansätze für 15 min auf Eis verblieben, wurden die Bakterien sedimentiert (2500 x g, 4°C, 15 min) und in 100 ml vorgekühltem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Es schloss sich ein erneuter Zentrifugationsschritt (2500 x g, 4°C, 15 min) an. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml gekühltem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach weiterem Pelletieren (2500 x g, 4°C, 15 min) wurden die Bakterien jetzt in 4 ml 10 % Glycerin aufgenommen. Schließlich erfolgte eine abschließende Zentrifugation unter gleichen Bedingungen, wobei das Pellet nun in 400 µl 10 % Glycerin resuspendiert wurde. Die kompetenten Bakterien wurden zu je 40 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.4 Transformation von DNA mittels Elektroporation

Die Transformation von Ligationsansätzen oder Plasmid-DNA wurde mit 20 µl elektrokompetenter *E. coli*-Bakterien durchgeführt. Dazu wurden 1,5 µl aus Ligationsansätzen, bzw. eine entsprechende Menge Plasmid-DNA gemeinsam mit den Bakterien in vorgekühlte 0,2 mm-Elektroporationsküvetten (Peclab) gegeben und bei 1,7 kV im *E. coli*-Pulser (Bio-Rad, München) elektroporiert. Sofort wurden 200 µl SOC-Medium zugefügt und für 30-60 min bei 37°C im Bakterienschüttler rotiert. Schließlich wurden die Ansätze auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium:	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose
-------------	---

### 2.2.5 Transformation von DNA mittels Hitzeschock

Zu 30 µl chemisch kompetenten Bakterien wurden 3 µl eines Ligationsansatzes oder 10-100 ng Plasmid-DNA gegeben. Die Ansätze verblieben für 30 min auf Eis. Anschließend wurden sie einem Hitzeschock für 30 s bei 42°C unterzogen. Nachdem sie für 2 min auf Eis abgekühlt wurden, erfolgte die Zugabe von 200 µl SOC-Medium (2.2.4). Die weitere Durchführung erfolgte nun analog zu 2.2.4.

### 2.2.6 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von DNA wurden pro µg eingesetzter DNA 1-2 Enzymeinheiten der entsprechenden Restriktionsenzyme verwendet. Die Inkubationsbedingungen wurden nach Angaben der Hersteller gewählt. Die Analyse von DNA-Restriktionen erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (2.2.10).

### 2.2.7 Auffüllen von 5'- und Verdau von 3'-überhängenden Enden

Das Auffüllen von 5'-überhängenden Enden erfolgte in einem 20 µl-Ansatz, wobei der DNA 2 µl 10 x Klenow-Puffer, 1 µl Klenow-Enzym (Roche, Mannheim) und 1 µl dNTP-Mix (je 10 µM) zugegeben wurde. Das Volumen wurde auf 20 µl aufgefüllt und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert.

Zur Entfernung von 3'-überhängenden Enden wurde die DNA mit den entsprechenden Enzymeinheiten Mungbohnen-Nuklease (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben inkubiert.

10 x Klenow-Puffer:	0,5 M Tris/HCl pH 7,5 0,1 M MgCl <sub>2</sub>
---------------------	--

### 2.2.8 Dephosphorylierung von restringierter DNA

Um eine Religation linearisierter Vektoren zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen abgespalten. Dazu wurden der DNA 4 Enzymeinheiten alkalischer Phosphatase (Roche, Mannheim) und 4 µl 10-fach Puffer zugegeben. Das Reaktionsvolumen wurde auf 40 µl aufgefüllt und der Ansatz für 2-3 h bei 37°C inkubiert.

### 2.2.9 Ligation von DNA

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden pro Fragment 200-500 ng DNA mit einer Enzymeinheit T4 DNA Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) über Nacht bei 16°C inkubiert. Bei Ligationen von Fragmenten mit überhängenden Enden wurden der entsprechende Vektor und das jeweilige Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3, bei Ligationen von Fragmenten mit stumpfen Enden im Verhältnis von 1:5 eingesetzt.

Alternativ wurde zur Klonierung von mit der Taq-Polymerase generierten PCR-Produkten das TOPO TA-Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

### 2.2.10 Elektrophorese von DNA

Um DNA-Fragmente verschiedener Größe zu trennen, wurden die Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. Unter Einsatz von 1 x TAE-Puffer kamen Gele von 0,8-3 % Agarose zum Einsatz. Diese wurden mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 5-20 V/cm durchgeführt.

50 x TAE-Puffer:	2 M Tris/Acetat 150 mM EDTA, pH 8,0
10 x DNA-Probenpuffer:	0,5 % (w/v) Bromphenolblau 0,5 % (w/v) Xylencyanol 50 % (v/v) Glycerin

### 2.2.11 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte grundsätzlich mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Vorgaben des Herstellers.

### 2.2.12 DNA-Amplifikationen (PCR)

Zur sequenzspezifischen Amplifikation von Nukleinsäuren wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt (Mullis *et al.*, 1986). Zur Verwendung kamen dabei je nach Fragestellung die „Hot Star Taq DNA Polymerase“ (Qiagen, Hilden), die „Pfu DNA Polymerase“ (Stratagene, Heidelberg) oder die „Platinum Pfx Polymerase“ (Invitrogen, Karlsruhe).

Zur Amplifikation revers transkribierter cDNA (Kapitel 2.3.3) wurde ein typischer Ansatz wie folgt zusammengesetzt:



3 µl	10 x PCR Puffer incl. 25 mM MgCl <sub>2</sub>
1,8 µl	15 mM MgCl <sub>2</sub>
0,6 µl	dNTPs (je 10 µM)
0,6 µl	5'-Primer (50 pmol/µl)
0,6 µl	3'-Primer (50 pmol/µl)
0,3 µl	Hot Star Taq DNA Polymerase (10 units/µl)
2 µl	cDNA (nach Kapitel 2.3.3)
21,1 µl	H <sub>2</sub> O

Die Reaktionsbedingungen sind folgendem Schema zu entnehmen, wobei die cDNA mittels eines Touchdown-Programms (Don *et al.*, 1991) amplifiziert wurde:

95°C	10 min		
95°C	15 s	} 10 Zyklen	
T <sub>m</sub> + 2°C (-0,5°C/Zyklus)	30 s		
72°C	1 min		
95°C	15 s	} 14-22 Zyklen	
T <sub>m</sub> - 3°C	30 s		
72°C	1 min		
72°C	4 min		

Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese bzw. Polyacrylamidgелеlektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989) kontrolliert.

### 2.2.13 PCR-Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen in die RET cDNAs wurden verschiedene Varianten der PCR-Mutagenese verwendet. Die HSCR32 Punktmutation (Cosma *et al.*, 1998) wurde im Wesentlichen nach Carlomagno *et al.* (1996) hergestellt. In analoger Weise wurde zur Einführung eines Polyasparaginsäure-Epitops vorgegangen. Zur Generierung weiterer RET-Punktmutationen wurde das „Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind Abschnitt 2.1.6 zu entnehmen.

### 2.2.14 DNA-Konzentrationsbestimmungen

Zur photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Aus den Messwerten wurde die DNA-Konzentration mittels folgender Formel bestimmt, wobei die Werte für die Extinktion bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) und 280 nm (OD<sub>280</sub>) um die bei 320 nm gemessene Extinktion korrigiert wurden:

$$c = 62.9 \times OD_{260} - 36.0 \times OD_{280} \text{ [µg/ml]}$$

## 2.3 RNA-Arbeitstechniken

### 2.3.1 RNA-Präparation

Die Präparation von Gesamt-RNA wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde pro Ansatz das Zellmaterial einer 60 mm Zellkulturschale verwendet. Zur Entfernung von DNA-Kontaminationen erfolgte ein DNA-Verdau auf der Säule mit dem „RNase-Free DNase Set“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 30 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O eluiert und bei -80°C gelagert.

### 2.3.2 RNA-Konzentrationsbestimmungen

Die RNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde anhand ihrer Extinktion im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Hierbei entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 40 µg RNA/ml.

### 2.3.3 Reverse Transkription

Zur Überführung von RNA in cDNA zur weiterführenden Analyse der Genexpressionsmuster verschiedener zellulärer Gene durch RT-PCR, wurde das „Omniscript RT Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Ausgehend von 1 µg Gesamt-RNA erfolgte die Durchführung der Reaktion nach Herstellerangaben. Als Primer zur cDNA-Synthese kamen „Random Hexamer Primer (Perkin Elmer, Weiterstadt) zu einer Endkonzentration von 1 µM zur Anwendung. Den Ansätzen wurden zusätzlich 10 Einheiten „RNasin“ RNase-Inhibitor (Promega, Mannheim) hinzugegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurde diese durch Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase für 5 min bei 93°C gestoppt und den Ansätzen 40 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O zugefügt. Die weitergehende Analyse erfolgte durch PCR (2.2.12), wobei 2 µl aus der verdünnten RT-Reaktion als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde.

## 2.4 Protein-Arbeitstechniken

### 2.4.1 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtprotein-Zellextrakten wurde das Zellmaterial von der entsprechenden Zellkulturplatte abgeschabt und mitsamt dem Medium in ein steriles 15 ml- bzw. 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt (300 x g, 4°C, 10 min), wonach der Überstand verworfen wurde. Je nach Anzahl der Zellen wurde das Pellet in 50-200 µl RIPA-Puffer (zuzüglich Proteaseinhibitor-Cocktail Complete Mini, Roche, Mannheim) resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und zur Trennung von unlöslichem Zelldebris noch einmal zentrifugiert (12000 x g, 4°C, 15 min). Das Zellysate wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

RIPA-Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,2
	150 mM NaCl
	0,1 % (w/v) SDS
	1 % Na-Desoxycholat
	1 % Triton X-100

### 2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmungen

Die Proteinkonzentrationen von Zellextrakten wurden mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers ermittelt. Die Messung erfolgte im Spektralphotometer (DU-64, Beckman, Unterschleißheim) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand einer vorher bestimmten Eichkurve bekannter Konzentrationen abgeleitet.

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen oder -präzipitaten erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen. Dabei kam das diskontinuierliche System nach Laemmli (1970) zur Anwendung. Je nach aufzutrennendem Proteingemisch lag die Acrylamidkonzentration des Trenngels bei 6-10 %. Die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989).

Zur Elektrophorese wurden 50-100 µg Gesamtproteinextrakt in SDS-Ladepuffer aufgenommen und 5 min bei > 95°C inkubiert. Die Gelelektrophorese wurde mit dem Mini PROTEAN III-System (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben durchgeführt.

SDS-Ladepuffer:	50 mM Tris/HCl pH 6,8 100 mM Dithiothreitol 2 % SDS 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 10 % (v/v) Glycerol
-----------------	--

#### 2.4.4 Western Blot

Zur Übertragung von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) wurde das „semi-dry blotting“-Verfahren mit Hilfe der Trans Blot SD-Zelle (Bio-Rad, München) angewendet. Der Transfer erfolgte je nach Proteingröße und Gelkonzentration für 30-90 min bei 1,4 mA/cm<sup>2</sup>. Alle Bestandteile wurden vorher in 1 x Blotpuffer äquilibriert.

5 x Blotpuffer:	970 mM Glycin 125 mM Tris/HCl, pH 8,3
-----------------	--

#### 2.4.5 Immundetektion

Je nach verwendetem Primärantikörper wurde die Nitrozellulosemembran entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in TBS mit 0,1 % Tween-20 (TBST 0,1 %) und 10 % Milchpulver oder 5 % BSA blockiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte nach Angaben der jeweiligen Hersteller. Nach dreimaligem Waschen mit TBST 0,1 % wurde die Membran mit dem jeweilig entsprechenden Horseradish-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nach Herstellerangaben inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBST 0,1 % erfolgte die Chemilumineszenz-Detektion. Dazu wurde das „Super Signal Dura Extended Kit“ (Pierce, Bonn) mit dem „Scientific Imaging Film X-OMAT AR“ (Kodak, Rochester, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

#### 2.4.6 Immunpräzipitation

Die Präzipitation endogener Proteine erfolgte, um anschließend einen *in vitro* Kinaseassay (2.4.7) mit diesen durchzuführen. Dazu wurden 300 µg Gesamtzellextrakt mit 20 µl Protein A/G-Plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) für 1 h auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert (Vorklärung). Anschließend erfolgte das Entfernen der Agarose durch Zentrifugation (300 x g, 4°C, 5 min). Der geklärte Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 1 h mit 1,5 µg des Antikörpers gegen das zu präzipitierende Protein versetzt. Erneut wurden 20 µl Protein A/G-Plus Agarose zur eigentlichen Präzipitation zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Agarose wurde pelletiert (300 x g, 4°C, 5 min) und das

Agarosepellet 3 x in RIPA-Puffer (2.4.1) gewaschen. Abschließend wurden die Agarosepellets zweimal in Kinasepuffer (Kinaseassay, 2.4.7) gewaschen.

### 2.4.7 *In vitro* Kinaseassay

Zur Bestimmung der *in vitro* Kinaseaktivität endogener RET-Proteinspiegel wurden diese aus 300 µg Gesamtproteinextrakt (2.4.1) mit 1,5 µg  $\alpha$ -RET<sup>9</sup>-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) präzipitiert (2.4.6). Die Inkubation der präzipitierten Proteine erfolgte in 30 µl 1 x Kinasepuffer unter Zugabe von 2 µg Myelin Basic Protein (Sigma, München) als exogenes Substrat und 10 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (Hartmann Analytic). Die Reaktion wurde für 20 min bei 30°C inkubiert (nach Qiao *et al.*, 2001) und durch Addition von 30 µl 2 x SDS-Ladepuffer gestoppt. Die Ansätze wurden dann durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.4.3) separiert, die Gele für 30 min fixiert und anschließend getrocknet. Die Detektion von übertragenen Phosphatgruppen erfolgte per Autoradiographie, wobei die getrockneten Gele bei -80°C gegen Biomax-Röntgenfilme (Kodak, Rochester, USA) exponiert wurden.

1 x Kinasepuffer:	10 mM Tris/HCl pH 7,0 4,5 mM MgCl <sub>2</sub>
-------------------	---

## 2.5 Zellkultur und Transfektionen

### 2.5.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden auf beschichteten Zellkulturschalen bei 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Dabei wurden TT Zellen in RPMI 1640 und alle anderen Zelllinien in DMEM-Medium herangezogen. Alle verwendeten Medien enthielten grundsätzlich 10 % fötales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Penicillin und 100 Einheiten/ml Streptomycin. Zum Passagieren wurden die Zellen mit vorgewärmten PBS<sup>=</sup> gewaschen, durch Zugabe einiger Tropfen einer 0,5%igen EDTA-Lösung mit 2 mg/ml Trypsin abgelöst und ein Aliquot der Zellsuspension auf eine neue Zellkulturschale ausgesät.

### 2.5.2 Zellzahlbestimmungen

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte durch Auszählen entsprechender Verdünnungen einer Zellsuspension im Hämatozytometer (nach Neubauer). Zur Unterscheidung vitaler Zellen von Beschädigten, wurde ein gleiches Volumen 0,5 % Trypanblau zugegeben.

### 2.5.3 Kalziumphosphat-Transfektion

Die zu transfizierenden Zellen wurden auf 60 mm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70-80 % wachsen gelassen. Die DNA (5 µg) wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst. In ein vorbereitetes Reaktionsgefäß wurden 169 µl H<sub>2</sub>O vorgelegt und 5 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> zugegeben. Zunächst wurde tropfenweise erst die 50 µl DNA-Lösung, dann anschließend 26 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> hinzugefügt. Diese Lösung (5 µg DNA; 0,25 mM CaCl<sub>2</sub>) wurde nun tropfenweise zu 250 µl 2 x HBS gegeben, während gleichzeitig mit einer Pasteurpipette Luft in den Ansatz geblasen wurde. Die Präzipitate verblieben für 1 min bei RT, bevor sie auf die Zellen gegeben wurden. Nach Inkubation der Ansätze im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C für 6-12 h erfolgte der Austausch des Transfektionsansatzes durch frisches Zellkulturmedium.

### 2.5.4 Elektroporation

Die zu transfizierenden Zellen wurden durch Trypsinbehandlung von den Zellkulturschalen abgelöst, vereinigt und pelletiert (10 min, 4°C, 300 x g). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zu einer Konzentration von 3x10<sup>7</sup> Zellen/ml in Cytomix (van den Hoff *et al.*, 1992) resuspendiert. Die zu transfizierende DNA (10 µg in 25 µl H<sub>2</sub>O) wurde dann gemeinsam mit 225 µl der Zellsuspension in eine 4 mm Elektroporationsküvette (Peclab, Erlangen) gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde im Gene Pulser II (Bio-Rad, München) bei einer Spannung von 250 V und einer elektr. Kapazität von 975 µF durchgeführt. Nach erfolgtem Stromstoß wurden die Küvetten für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Zellkulturschalen ausgebracht.

Cytomix:	120 mM KCl
	0,15 mM CaCl <sub>2</sub>
	10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH7,6
	25 mM HEPES pH 7,6
	2 mM EGTA pH 7,6
	1 mM MgCl <sub>2</sub> pH 7,6
	2 mM ATP pH 7,6
	5 mM Glutathion (reduziert)
	10 % (v/v) FCS

### 2.5.5 Sonstige Transfektionsmethoden

In Ausnahmefällen wurden Zellen auch mit dem Effectene- oder Polyfect-Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden), sowie mit dem DMRIE-C-Transfektionsreagenz (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben transfiziert.

## 2.6 Adenovirale Arbeitstechniken

### 2.6.1 Das AdEasy-System

Zur Generierung adenoviraler (Ad-) Vektoren wurde das sog. AdEasy-System verwendet (He *et al.*, 1998). Dieses System beruht auf einem bakteriellen Plasmid, das das Genom von Ad5 in zirkulärer Form enthält. Durch Deletionen in den Regionen E1 und E3 entstehen replikationsdefekte Ad-Vektoren. Zum Einschleusen der Fremdgene steht ein weiteres Plasmid zur Verfügung, das kurze homologe Bereiche zum Ad-Genom enthält. Mittels homologer Rekombination in *E. coli* BJ5183 Bakterien wird nun ein Plasmid erzeugt, das neben dem Ad5-Genom auch eine Expressionkassette in der deletierten E1-Region enthält. Nach Linearisierung und Transfektion in 293 Zellen entstehen dann daraus die Ad-Vektoren. Alle Komponenten dieses Systems wurden freundlicherweise von B. Vogelstein (Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt.

### 2.6.2 Klonierung und Herstellung adenoviraler Vektoren

Zur Steuerung der Expression der dominant-negativen RET Mutanten (RET<sup>51</sup>.HSCR32 und RET<sup>51</sup>.flag) wurde der synthetische Calcitonin-Promotor TSE2.CP1 verwendet (Messina *et al.*, 2000; zur Verfügung gestellt von M. Messina). Dieser wurde gemeinsam mit der entsprechenden RET cDNA in den promotorlosen Vektor pShuttle kloniert. Zur Termination der Transkription beinhalteten die vollständigen Expressionskassetten das Simian Virus (SV) 40 Polyadenylierungssignal (aus dem pGL3-basic Vektor). Die daraus resultierenden Vektoren erhielten die Bezeichnungen pShuttle-TSE2.CP1-RET<sup>51</sup>.HSCR32, bzw. pShuttle-TSE2.CP1-RET<sup>51</sup>.flag. Zur Überprüfung der Selektivität des synthetischen Calcitonin-Promotors wurde ein Vektor konstruiert, der die Reportergene GFPS (kodiert für eine GFP-Variante, die als Fusionsprotein mit der Pleckstrin-Homologie-Domäne des humanen  $\beta$ II Spektins (Kalejta *et al.*, 1997) exprimiert wird) und Luciferase exprimiert. Beide Gene wurden als polycistronische mRNA, getrennt durch die interne Ribosomeneingangssequenz (IRES) des Encephalomyocarditis Virus, exprimiert. Der daraus resultierende Vektor trug die Bezeichnung pShuttle-TSE2.CP1-GFP/LUC. Die Konstruktion von Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK erfolgte durch Klonierung der RET  $\Delta$ TK cDNA in pAdTrack.CMV.

Zur Generierung der Ad-Vektoren erfolgte die homologe Rekombination der Shuttle-Vektoren mit pAdEasy1 in *E. coli* BJ5183 Bakterien. Der Standardansatz für die Rekombination setzte sich nach folgendem Schema zusammen:

1,5  $\mu$ g pShuttle-Vektor (mit *Pme*I linearisiert)  
 100 ng pAdEasy1  
 20  $\mu$ l elektrokompente *E. coli* BJ5183

Die Transformation, Selektion und Überprüfung der Rekombination erfolgte nach Angaben von He *et al.* (1998). Die rekombinierte DNA wurde anschließend in *E. coli* XL2-Blue vermehrt, mit *PacI* linearisiert und in 293 Zellen transfiziert. Die 293 Zelllinie stellt die deletierten Genprodukte der Ad 5 E1 Region *in trans* zur Verfügung und ist daher für die Propagation adenoviraler Vektoren essentiell. Zur Herstellung eines Arbeits-Stocks von adenoviralen Vektoren wurden acht 16 cm-Zellkulturplatten 293 Zellen infiziert und für 2-4 Tage im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C inkubiert. Sobald ein vollständiger CPE (zytopathischer Effekt) auftrat, wurden alle Zellen abgeschabt, vereinigt und für 10 min bei 4°C und 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 4 ml PBS<sup>++</sup> mit 10 % Glyzerin aufgenommen. Die Viren wurden durch dreimaliges „Knacken“ (Einfrieren in flüssigem Stickstoff bzw. Auftauen im 37°C Wasserbad) freigesetzt. Nach anschließender Titration (2.6.5) war der nun sog. „high-titer“-Stock für *in vitro*-Versuche verwendbar.

### 2.6.3 Transduktion

Die Transduktion von Zelllinien mit Ad-Vektoren erfolgte generell für 30 min bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Dabei wurde das Medium zuvor abgezogen, die Vektoren in einem minimalen Volumen (ca. 5 % des Ausgangsvolumens) zur effizienten Transduktion auf die Zellen gegeben und schließlich das entsprechende Medium wieder aufgefüllt. Zur Transduktion wurde für jede Zelllinie diejenige Infektionsmultiplizität (moi) gewählt, mit der eine einhundertprozentige Transduktion der Zelllinie erreicht wurde.

### 2.6.4 CsCl-Aufreinigung viraler Partikel

Zur CsCl-Dichtegradientenaufreinigung adenoviraler Partikel wurden 32 16 cm Zellkulturplatten 293 Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % wachsen gelassen. Die Zellen wurden nun mit 200-400 µl des „high-titer“ Stocks infiziert (2.6.3) und bis zum Auftreten eines vollständigen zytopathischen Effektes im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nun abgeschabt und mitsamt dem Medium in Zentrifugenbecher überführt. Nach erfolgter Pelletierung (15 min, 4°C, 1000 x g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 15 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8 resuspendiert. Zu dem Ansatz wurde dann 1,5 ml 5 % Natriumdesoxycholat gegeben. Es erfolgte nun eine dreißigminütige Inkubation bei RT. Danach wurden dem Lysat 150 µl 2 M MgCl<sub>2</sub> und 75 µl DNase I-Lösung (10 mg/ml) beigefügt und es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30-60 min. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4°C, 2500 x g) wurde der Überstand des Zelllysats auf den vorbereiteten Gradienten gegeben. Dieser Gradient setzte sich wie folgt zusammen (von oben nach unten):



3 ml	1,5 g/cm <sup>3</sup> CsCl in 10 mM Tris/HCl pH 8,0
3 ml	1,35 g/cm <sup>3</sup> CsCl in 10 mM Tris/HCl pH 8,0
0,5 ml	1,25 g/cm <sup>3</sup> CsCl in 10 mM Tris/HCl pH 8,0

Je 5 ml des Überstandes wurden auf einen vorbereiteten CsCl-Gradienten in einem „SW 40 Ultra Clear“-Zentrifugenröhrchen (Beckman, Unterschleißheim) gegeben. Es erfolgte ein erster Ultrazentrifugationsschritt im SW 40 Schwingrotor (1 h, 10°C, 35000 rpm). Die Virusbanden wurde nun mittels einer Kanüle aus den Zentrifugenröhrchen abgesaugt, vereinigt und in ein neues SW 40-Zentrifugationsröhrchen überführt. Dieses wurde mit 1,35 g/cm<sup>3</sup> CsCl in 10 mM Tris/HCl pH 8 aufgefüllt und für 16-24 h bei 10°C und 35000 rpm im SW 40 Schwingrotor zentrifugiert. Die Virusbande wurde erneut mit Hilfe einer Kanüle abgesaugt und in eine „Slide-A-Lyzer“-Dialysekassette (Pierce) gegeben. Die Dialyse erfolgte für 24 h bei 4°C gegen 10 mM Tris/HCl pH 8. Das aufgereinigte Virus wurde mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 10 % versetzt und bei -80°C gelagert.

### 2.6.5 Titration

Die Titration adenoviraler Vektoren erfolgte zum einen nach dem Standard-Plaqueassay in 293 Zellen (Graham und Prevec, 1991; Hitt *et al.*, 1994). Parallel wurde zur Titerbestimmung die infektiöse Dosis in Zellkultur (TCID<sub>50</sub>) bestimmt, die dann mit dem zuvor aus dem Standard-Plaqueassay bestimmten Titer in Bezug gesetzt wurde. Dazu wurde eine 96 Loch-Zellkulturplatte mit jeweils 1 x 10<sup>4</sup> 293-Zellen bestückt. Nach Adhärenz der Zellen (ca. 24 h später) wurden verschiedene Verdünnungen der Virus-Präparation in einem jeweils zehnfachen Ansatz auf die Zellen gegeben und die Plaquebildung nach 7-10 Tagen beobachtet. Der Titer wurde auf statistische Art nach der KÄRBER-Methode mit der Formel

$$T = 10^{1+d(S-0,5)}$$

bestimmt, wobei d der Log 10 der Verdünnung ist (=1 für eine 10-fache Verdünnung) und S der Summe aller Verhältnisse entspricht. Die Umrechnung in Plaque-bildende Einheiten pro ml (pfu/ml) erfolgte auf folgende Weise:

$$10^y \text{ TCID}_{50}/\text{ml} = 10^{y-0,7} \text{ pfu/ml.}$$

## 2.7 Reporteranalysen

### 2.7.1 Luciferase-Reporteranalyse

Zur Bestimmung der relativen Aktivität verschiedener Promotorkonstrukte wurde das „Luciferase Reporter Assay System“ (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Das Transaktivierungspotenzial verschiedener RET-Mutanten wurde gemessen, indem die AP1-Bindestelle des Enhancers A des Maus-H-2K<sup>b</sup>-Promotors (TGAGGTCA) in dreifacher Ausfertigung (Brockmann *et al.*, 1996) in den Vektor pGL3basic (Promega, Mannheim) kloniert wurde, dem zuvor eine sogenannte TATA-Box zugeführt wurde. Als Bezug diente der entsprechende Vektor ohne AP1-Bindestelle. Zum Vergleich der Promotorstärke des synthetischen Calcitonin-Promotors (TSE2.CP1) mit dem humanen Cytomegalievirus-Promotor (CMV) wurde ein Adenovirus-Vektor konstruiert, der das Luciferase-Gen unter der Kontrolle des TSE2.CP1-Promotors exprimiert (s. 2.6.2). Die Luciferase-Expression wurde dann mit der des zuvor beschriebenen Vektors Ad-CMV-Luc (Pützer *et al.*, 2000) verglichen. Die mit Hilfe des Luminometers Lumat LB 9501 (Berthold, Wildbad) bestimmten Werte wurden bezüglich der Gesamtprotein-Konzentration der Zellextrakte normalisiert.

### 2.7.2 Bestimmung der GFP-Expression im Durchflusszytometer

Die Grünfluoreszenz adenoviral transduzierter Zellen wurde in diesem Fall gemessen, um ein weiteres Maß für die Aktivität verschiedener Promotoren zu erhalten. Die cDNA einer Variante des grün-fluoreszierenden Proteins (GFPS), die als Fusionsprotein mit der Pleckstrin-Homologie-Domäne des humanen  $\beta$ II Spektrens exprimiert wird, diente hierzu als Reporter, da die Grünfluoreszenz des unmodifizierten GFP im Rahmen der erforderlichen Fixierung verloren geht, während das GFPS an der Zellmembran verankert erhalten bleibt (Kalejta *et al.*, 1997). Um die Aktivität des synthetischen Calcitonin-Promotors TSE2.CP1 mit der des CMV Promotors zu vergleichen, wurden verschiedene Zelllinien sowohl mit dem adenoviralen Vektor Ad.TSE2.CP1.GFP-LUC (s. 2.6.2), als auch mit dem zuvor beschriebenen Vektor Ad.CMV.GFPS (Pützer *et al.*, 2000) infiziert und für eine durchflusszytometrische Analyse prozessiert. Dazu wurden die Zellen samt Zellkulturüberstand gesammelt, zentrifugiert ( $300 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min), zweimal mit eiskaltem PBS<sup>=</sup> gewaschen, in 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem PBS<sup>=</sup> resuspendiert, unter vortexen mit 4,5 ml eiskaltem 70 % Ethanol fixiert und für mindestens 24 h bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Zur Messung wurden die fixierten Zellen sedimentiert ( $800 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min), der Ethanol sorgfältig abgenommen, das Pellet zweimal in eiskaltem PBS<sup>=</sup> gewaschen und schließlich in 2 ml PBS<sup>=</sup> aufgenommen. Die Datenaquisition erfolgte im FACSVantage Durchflusszytometer (Becton Dickinson) unter Verwendung der CellQuest

Software, wobei nicht die absolute, sondern die mittlere Grünfluoreszenz als Maß für die Promotorstärke diene.

## 2.8 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Analyse der Lokalisation zellulärer Proteine erfolgte durch Immunfluoreszenz-mikroskopie. Dazu wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät und bis zur vollständigen Adhärenz (24-48 h) im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Behandlung und weitere Inkubation der Zellen erfolgte je nach vorgegebener Fragestellung. Zur Proteindetektion wurden die Deckgläschen aus den entsprechenden Zellkulturschalen herausgenommen und die Zellen durch Zugabe von 500 µl eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) für 5 min fixiert bzw. prozessiert. Nach Lufttrocknung der Deckgläschen wurden die Ansätze für 20 min in 500 µl PBS<sup>=</sup> mit 10 % FCS geblockt. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen der Zellen mit 500 µl PBS. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte für 60 min in PBS<sup>=</sup> mit 1,5 % FCS, wobei die Antikörperkonzentrationen den Herstellerangaben entnommen wurden. Vor der Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden nun in analoger Weise zu den Ansätzen gegeben. Zur Gegenfärbung der Nuklei wurden die Ansätze für 10 min mit einer DAPI-Färbelösung (1 mg/ml in PBS) behandelt. Die Deckgläschen wurden dann zur Langzeiterhaltung der Fluoreszenz mit einem Eindeckmedium (Vectashield, Linaris, Wertheim) überschichtet und auf Objektträgern luftdicht versiegelt. Die Dokumentation der markierten Proteine erfolgte durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie oder konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM 510, Zeiss, Oberkochen).

## 2.9 Zytotoxizitätsanalysen

### 2.9.1 MTT-Assay

Zur Bestimmung des Einflusses der dominant-negativen RET Mutanten auf die Zellvitalität, wurden die Zellen in 96-Well Platten ausgesät. Nach vollständiger Adhärenz der Zellen wurden die Zellen mit den entsprechenden adenoviralen Vektoren infiziert, wobei die Verabreichung von 1,2 mM Staurosporin (Sigma, München) als Positivkontrolle diene. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte in 48 h-Abständen mit dem „CellTiter96 AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay“ (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

### 2.9.2 Bestimmung apoptotischer Zellen durch durchflusszytometrische Messung des DNA-Gehalts

Die Messung apoptotischer Zellen im Durchflusszytometer (FACS) beruht auf der Detektion von fragmentierter DNA als einem der wichtigsten Kennzeichen von programmiertem Zelltod (Ormerod, 1998). Die zu analysierenden Zellen wurden dafür mitsamt dem Kulturüberstand aufgenommen und für 10 min bei 4°C und 300 x g zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS<sup>=</sup> wurden die Zellen unter Vortexen in eiskaltem 70 % Ethanol fixiert und bei -20°C gelagert. In diesem Zustand verblieben die Zellen nun für mindestens 24 h. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 4°C, 800 x g) und das vorhandene Ethanol durch weiteres zweimaliges Waschen mit PBS<sup>=</sup> vollständig entfernt. Schließlich wurden die Zellen in 2 ml Propidiumiodid-Färbelösung aufgenommen und 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Erfassung der Daten erfolgte im FACSVantage Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) unter Verwendung der CellQuest Software.

Propidiumiodid-Färbelösung: 100 µg/ml Propidiumiodid  
100 µg/ml RNase A  
in PBS<sup>=</sup>

### 2.9.3 BrdU-Markierung

Zur Bestimmung aktiv proliferierender Zellpopulationen wurde das „In Situ Cell Proliferation Kit, FLUOS“ der Firma Roche (Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.9.4 Caspase-3 Aktivitätsbestimmung

Die Aktivität humaner Caspase-3 wurde mit dem „Caspase-3 Cellular Activity Kit“ (Calbiochem, Bad Soden) nach Herstellerangaben bestimmt.

## 2.10 Tierexperimente

Zur Bestimmung potenzieller antitumorale Eigenschaften der dominant-negatives RET-exprimierenden adenoviralen Vektoren *ex* und *in vivo* wurde mit der TT-Zelllinie ein Xenotransplantat-Modell eines humanen medullären Schilddrüsenkarzinoms verwendet. Die Bestimmung der tumorsupprimierenden Eigenschaften erfolgte durch *ex vivo*-Infektion von jeweils  $5 \times 10^7$  TT-Zellen mit den entsprechenden adenoviralen Vektoren. Die Zellen wurden dann 24 h nach Infektion trypsiniert, vereinigt und in 100 µl

Wachstumsmedium ohne weitere Zusätze aufgenommen. Anschließend wurden sie subkutan in die hintere rechte Flanke 6-8 Wochen alter NMRI/nude-Mäuse transplantiert und die Mäuse auf Tumorwachstum hin beobachtet. Die Induktion der Tumore für die *in vivo*-Behandlung erfolgte durch subkutane Injektion von  $1 \times 10^7$  TT-Zellen. Nach Etablierung deutlich sicht- und tastbarer Tumore erfolgte eine einzelne intratumorale Injektion von  $1 \times 10^9$  pfu Ad-Vektoren in 100  $\mu$ l PBS<sup>-</sup>. Nachfolgend wurden die Tumorumina 2 x wöchentlich mit Schieblehren vermessen, wobei die Volumina näherungsweise mit der Formel  $v=(\text{Länge} \times \text{Breite}^2)/2$  für längliche Sphäroide berechnet wurden (Pützer *et al.*, 1997). Sobald die Tumore 600 mm<sup>3</sup> überschritten, wurden die Tiere getötet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *Student'schen t-Tests*.

Die hier durchgeführten Tierexperimente wurden nach Richtlinien des zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

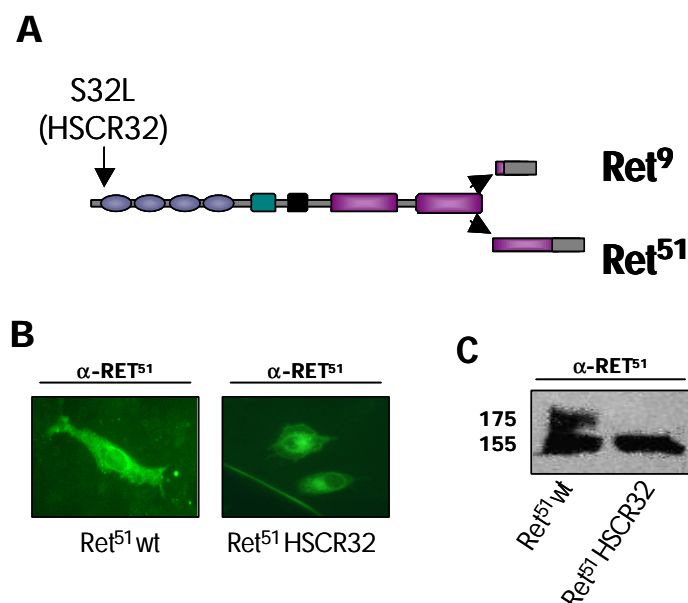
Nach Hanahan und Weinberg (2000) gibt es sechs fundamentale Fähigkeiten, die nahezu alle Arten von Tumoren erwerben müssen, um als unabhängige Entität im Organismus zu persistieren: (1) Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, (2) Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstumssignalen, (3) die Fähigkeit, Apoptose-Stimuli zu entkommen, (4) unbegrenztes replikatives Potenzial, (5) anhaltende Angiogenese, sowie (6) die Fähigkeit zur Gewebsinvasion und Metastasierung. Oft kann es schon ausreichen, an einem dieser Punkte regulierend einzugreifen, um einen signifikanten anti-tumoralen Effekt herbeizuführen. Insbesondere wenn ein Faktor, wie hier das aktivierte *RET* Proto-Onkogen beim medullären Schilddrüsenkarzinom, einen so hohen Stellenwert einnimmt, liegt es nahe, an dieser Stelle inhibierend in die Mechanismen der Tumorigenese einzugreifen. In diesem Zusammenhang wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene dominant-negative *RET* Proto-Onkogen Mutanten in einem Modell des medullären Schilddrüsenkarzinoms auf ihre anti-tumorale Wirksamkeit und eventueller zugrundeliegender Mechanismen hin untersucht.

#### 3.1 Eigenschaften der dominant-negativen Mutante RET HSCR32 im MTC-Modell

Die Inhibition onkogener Varianten des *RET* Proto-Onkogens kann ein entscheidender Schritt in Richtung einer effektiven Therapie des MTCs sein. Aus diesem Grund wurden zunächst die von Cosma *et al.* (1998) beschriebenen dominant-negativen *RET* Mutanten *RET* HSCR32 (Kapitel 3.1) und *RET* flag (Kapitel 3.2) auf ihre anti-tumorale Wirksamkeit im MTC-Modell hin untersucht. Die Mutante *RET* HSCR32 trägt einen Aminosäureaustausch im Codon 32 (Serin → Leucin), was höchstwahrscheinlich zu einer Konformationsänderung in der Cadherin-ähnlichen Domäne 1 führt (Anders *et al.*, 2001; Abb. 1.4). Dadurch kann das Protein nicht mehr vollständig glykosyliert werden, so dass der Transport zur Zellmembran ausbleibt und es intrazellulär abgebaut wird. Durch die Fähigkeit zur Dimerisierung mit onkogenen *RET* Mutanten erlangt diese Mutante einen dominant-negativen Charakter, denn die Dimerisierung führt zum proteolytischen Abbau sowohl dominant-negativer, als auch onkogener *RET* Proteine, so dass insbesondere die Exposition der onkogenen Variante an der Zelloberfläche verhindert wird.

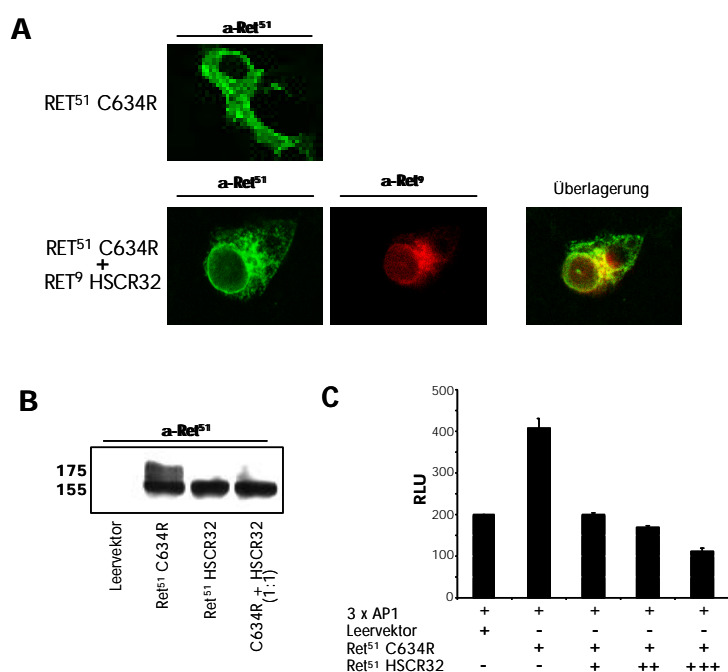
### 3.1.1 Verifizierung des dominant-negativen Effektes von RET HSCR32 in COS-7 Zellen

Mittels PCR-Mutagenese wurde die HSCR32 Mutation (S32L) in die cDNA sowohl der kurzen ( $RET^9$ ) als auch der langen RET Isoform ( $RET^{51}$ ) eingeführt (Abb. 3.1-A). Stellvertretend für beide Isoformen ist hier die Expression der langen Isoform ( $RET^{51}$ ) in RET-negativen COS-7 Zellen dargestellt. Im Gegensatz zur Wildtyp-RET Form, die als Membranprotein erwartungsgemäß gleichmäßig auf der gesamten Zelloberfläche sichtbar ist, ist die Expression der dominant-negativen Mutante  $RET^{51}$ HSCR32 auf den Bereich des endoplasmatischen Retikulums (ER) beschränkt (Abb. 3.1-B). Die typische Doppelbande der Wildtyp-Form, die im Western Blot zu erkennen ist, tritt nach Einführung der Mutation S32L nicht auf. Vielmehr verdeutlicht Abbildung 3.1-C, dass die Expression auf eine 155 kDa Bande reduziert ist, die mit der intrazellulären, nicht vollständig glykosylierten Form gleichzusetzen ist, wohingegen die 175 kDa-Bande den vollständig glykosylierten RET Proteinen an der Zelloberfläche entspricht.



**Abbildung 3.1:** Expression der dominant-negativen Mutante  $RET^{51}$ HSCR32 in COS-7 Zellen. (A) Schematische Darstellung der Punktmutation S32L innerhalb der  $RET^9$  und  $RET^{51}$  Isoformen. (B) Immunfluoreszenzaufnahmen einzelner COS-7 Zellen nach transienter Transfektion von  $RET^{51}$ wt und  $RET^{51}$ HSCR32. (C) Western Blot Analyse von COS-7 Zellen ebenfalls nach transienter Transfektion von  $RET^{51}$ wt und  $RET^{51}$ HSCR32-Expressionsplasmiden. Es wurden gleiche Mengen (100  $\mu$ g) Gesamtproteinextrakt eingesetzt.

Zur Verdeutlichung des beschriebenen dominant-negativen Effektes gegenüber onkogenem RET wurden Expressionsplasmide der häufigsten onkogenen Variante RET C634R und der dominant-negativen Mutante RET HSCR32 in COS-7 Zellen co-transfiziert. Wie aus Abb. 3.2-A ersichtlich, lässt sich die Expression der onkogenen C634R Mutante allein, analog zur Wildtyp-Form, über die gesamte Zelloberfläche detektieren. Eine Co-Transfektion der RET HSCR32 Mutante, die hier aus der kurzen Isoform (RET<sup>9</sup>) generiert wurde, führt dabei zu einer Verlagerung des Expressionsmusters der C634R Mutante in den Bereich des ERs. Zur Differenzierung der beiden Mutanten wurden unterschiedliche Isoformen gewählt, so dass sich durch Zuhilfenahme Isoform-spezifischer Antikörper gegen RET<sup>9</sup> (RET<sup>9</sup>HSCR32) und RET<sup>51</sup> (RET<sup>51</sup>C634R) die Co-Lokalisation der dominant-negativen mit der onkogenen RET-Form bei Überlagerung der immunfluoreszenzmikroskopisch erzeugten Bilder zeigt. Entsprechend führt die Co-Expression der dominant-negativen RET Form zur Reduktion der 175 kDa Bande im Western Blot (Abb. 3.2-B).



**Abbildung 3.2: Dominant-negativer Effekt von RET HSCR32 gegenüber RET C634R in COS-7 Zellen.** (A) Immunfluoreszenzaufnahmen der Expression sowohl RET<sup>51</sup>C634R allein, als auch nach Kontransfektion von RET<sup>9</sup>HSCR32. Beide Isoformen sind hier durch isoformspezifische Antikörper nach transienter Transfektion in COS-7 Zellen differenzierbar. (B) Western Blot Analyse des dominant-negativen Effektes nach transienter Transfektion in COS-7 Zellen. (C) Luciferase-Assay zur Demonstration des Transaktivierungspotenzials der RET<sup>51</sup>C634R und RET<sup>51</sup>HSCR32 Mutanten eines 3xAP1 Reporterkonstrukts. Konstanten Mengen der RET<sup>51</sup>C634R Mutante (2,5 µg) sind steigende Mengen an RET<sup>51</sup>HSCR32 (2,5, 5, 7,5 µg) zugegeben worden.



Zur Bestätigung funktioneller Konsequenzen nach Expression der dominant-negativen RET Mutante, wurde deren Einfluss auf die Signaltransduktion durch onkogenes RET untersucht. Die RET C634R Mutante ist in der Lage, ein Luciferase-Reporterkonstrukt, das die Konsensussequenz des AP1 Transkriptionsfaktor-Komplexes in dreifacher Ausfertigung enthält, zu transaktivieren (Cosma *et al.*, 1998; Abb. 3.2-C). Diese Transaktivierung entsteht durch Stimulation der Ras/ERK-Signaltransduktionskaskade, an deren Ende u. a. die Ausbildung von Jun-Fos Dimeren (AP1) steht, die wiederum an ihre responsiven Elemente in verschiedenen Promotoren binden (Cosma *et al.*, 1998; Worby *et al.*, 1996). Co-Transfektion der dominant-negativen Mutante führt hier zu einer drastischen Reduktion dieses Transaktivierungspotenzials (Abb. 3.2-C). Hieraus ergibt sich, dass die dominant-negative Mutante RET HSCR32 in der Lage ist, durch onkogenes RET stimulierte Signaltransduktionswege signifikant zu unterdrücken, da die Exposition von onkogenem RET an der Zelloberfläche deutlich reduziert wird.

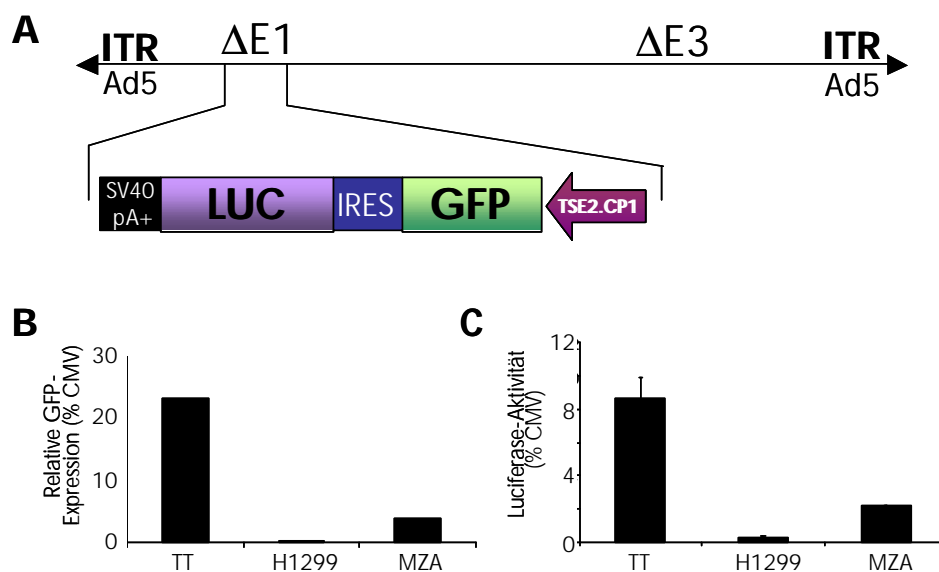
### 3.1.2 Generierung MTC-selektiver adenoviraler Vektoren

Für die vorliegenden Untersuchungen war es von großem Interesse, ein möglichst realitätsnahes Modell des medullären Schilddrüsenkarzinoms zu verwenden, um den Bezug zu einer potenziellen therapeutischen Anwendung herzustellen. Aus diesem Grund wurde die humane TT-Zelllinie verwendet, die aus einer Metastase eines humanen medullären Schilddrüsenkarzinoms isoliert und *in vitro* kultiviert worden ist (Leone *et al.*, 1981). Mehrere Faktoren machen diese Zelllinie zu dem am besten geeigneten humanen MTC-Modell, das derzeit zur Verfügung steht: (1) Die TT-Zelllinie exprimiert endogen hohe Level an onkogenem RET, das durch die häufigste MTC-assoziierte Mutation C634R gekennzeichnet ist (Carlomagno *et al.*, 1995). (2) Die Zelllinie weist weiterhin typische Charakteristika neuroendokriner C-Zellen auf und ist daher mit humanen Tumoren vergleichbar (Zabel und Grzeszkowiak, 1997). (3) Die Zelllinie sezerniert hohe Level an Calcitonin, was der eigentlichen Funktion humaner C-Zellen entspricht (Zabel und Grzeszkowiak, 1997).

Um einen wirksamen anti-tumoralen Effekt nach Expression der dominant-negativen RET Mutanten RET HSCR32 und RET flag im MTC-Modell erzielen zu können, muss gewährleistet sein, dass die Mutanten effizient in entartete Zielzellen transportiert werden. Aus diesem Grund wurde als Transfermethode die Transduktion mittels adenoviraler Vektoren gewählt. Diese haben sich in vielerlei Hinsicht als verlässliche Hilfsmittel zur Expression fremder Gene erwiesen (Hitt *et al.*, 1997; Hitt und Graham, 2000).

Um eine Zielzell-selektive Genexpression der dominant-negativen RET Mutanten zu gewährleisten, wurde die Expression unter die Kontrolle eines synthetischen Calcitonin-Promotors (TSE2.CP1) gestellt. Dieser Promotor ist durch eine hohe Aktivität in Calcitonin-sezernierenden C-Zellen charakterisiert, wobei eine deutlich höhere Selektivität für C-Zellen sowie sichtbar gesteigerte Expressionslevel im Vergleich zum relativ schwachen Wildtyp Calcitonin-Promotor vorliegen (Messina *et al.*, 2000).

Da bisher nicht bekannt war, ob durch das Vorhandensein regulatorischer Sequenzen im Adenovirus-Genom das Expressionsprofil des TSE2.CP1-Promotors moduliert wird, wurde zunächst ein Adenovirus-Vektor konstruiert, der die cDNAs der Reportergene GFPs (kodiert für das membranständige GFP-Spektrin Fusionsprotein, siehe Kapitel 2.6.2) und Luciferase unter der Kontrolle des TSE2.CP1-Promotors exprimiert (Ad.TSE2.CP1.GFP-LUC; Abb. 3.3-A). Mit Hilfe dieses Vektors wurde die Aktivität des TSE2.CP1-Promotors in der TT-Zelllinie, sowie zweier nicht-MTC-Zelllinien (H1299, MZA) untersucht (Abb. 3.3-B).



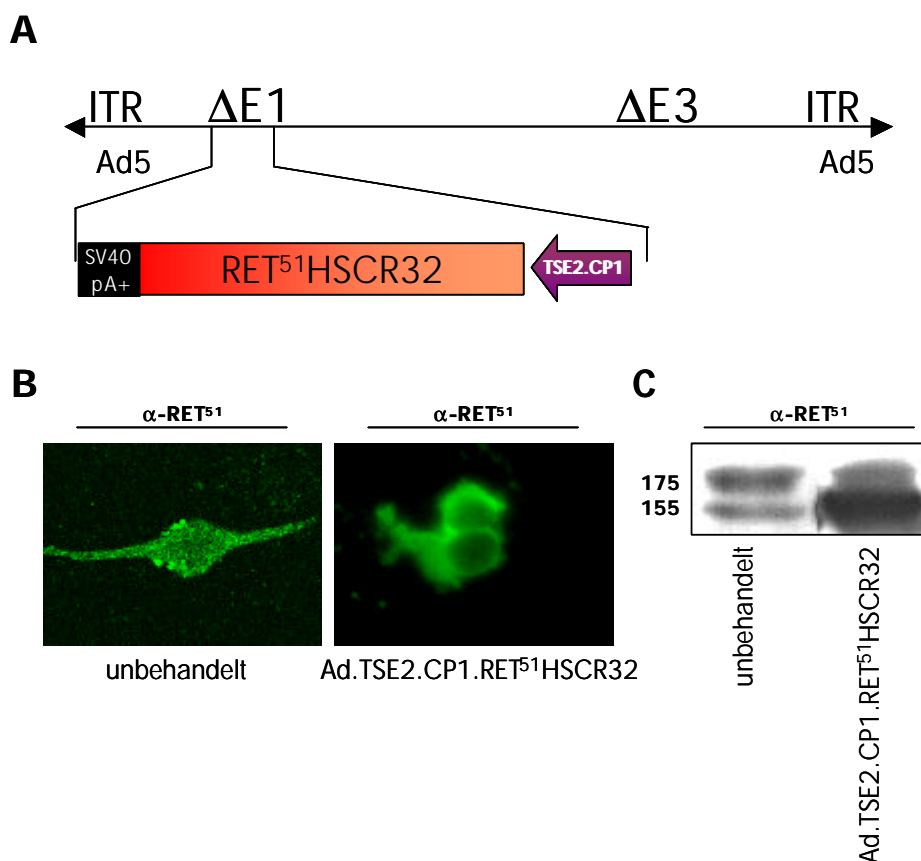
**Abbildung 3.3: C-Zell-Selektivität des TSE2.CP1-Promotors.** (A) Schematische Darstellung des Vektors Ad.TSE2.CP1.GFP-LUC. Die Expressionskassette aus TSE2.CP1-Promotor, GFP-cDNA, interner Ribosomenbindestelle (IRES), Luciferase-cDNA (LUC) sowie dem SV40 Polyadenylierungssignal wurde in die  $\Delta E1$ -Region kloniert. (B) Bestimmung der mittleren GFP-Expression im Durchflusszytometer nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.GFP-LUC. Dargestellt ist die Expression des TSE2.CP1-Promotors im Verhältnis zum CMV-Promotor nach paralleler Infektion mit Ad.CMV.GFP. (C) Relative Luciferase-Aktivität des TSE2.CP1-Promotors nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.GFP-LUC als Verhältnis der Luciferase-Aktivität von Ad.CMV.LUC. Sowohl die mittlere GFP-, als auch die Luciferase-Expression wurden 48 h nach Infektion bestimmt.

Bei Bestimmung der mittleren GFP-Expression im Durchflusszytometer betrug die Aktivität des TSE2.CP1-Promotors 23,17 % der CMV-Promotoraktivität in TT Zellen. In den beiden nicht-MTC Zelllinien, H1299 und MZA, lag das Verhältnis dagegen bei 0,15 %, respektive 3,70 % (Abb. 3.3-B). Ein analoges Verhältnis stellt sich nach Bestimmung der TSE2.CP1-kontrollierten Luciferase-Expressionslevel im Verhältnis zum CMV-Promotor dar. Wie aus Abb. 3.3-C ersichtlich, lag dieses Verhältnis in TT-Zellen bei 8,61 %, wohingegen in H1299-Zellen nur 0,24 % und in MZA-Zellen 2,21 % der CMV-Promotoraktivität erreicht wurden. Daraus lässt sich schließen, dass der TSE2.CP1-Promotor, auch basierend auf dem Hintergrund regulatorischer Elemente im Adenovirus-Genom, die Selektivität für C-Zellen, wie am Beispiel der TT-Zelllinie verdeutlicht, behält und ein geeignetes Expressionssystem für die vorliegenden Untersuchungen darstellt. Im Folgenden werden nun Untersuchungen bezüglich der anti-tumoralen Wirksamkeit der RET HSCR32 Mutante in den Vordergrund gestellt. Zur Veranschaulichung der mit der Mutante RET flag erzielten Resultate sei auf Kapitel 3.2 verwiesen.

### **3.1.3 Konstruktion des Ad-Vektors Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32**

Die Expression der dominant-negativen Mutante RET<sup>51</sup>HSCR32 wurde somit unter die Kontrolle des TSE2.CP1-Promotors gestellt. Dazu wurde ein Adenovirus-Vektor konstruiert, der eine Expressionskassette bestehend aus dem TSE2.CP1-Promotor, der RET<sup>51</sup>HSCR32 cDNA sowie dem SV40 Polyadenylierungssignal enthält (Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32; Abb. 3.4-A). Die RET Expression dieses Vektors wurde im Folgenden in TT-Zellen überprüft. Unbehandelte TT-Zellen weisen zunächst eine starke endogene RET Expression auf, die nach Inkubation mit einem Isoform-spezifischen Antikörper gegen RET<sup>51</sup> sichtbar wird. Im Gegensatz zur RET Expression in nicht-infizierten Zellen, die deutlich erkennbar homogen über die gesamte Zelloberfläche verteilt ist, zeigt sich 48 h nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 eine ausgeprägte RET Expression im Bereich des ERs (Abb. 3.4-B). Mit Hilfe dieses Isoform-spezifischen Antikörpers gegen RET<sup>51</sup> kann die typische RET-Doppelbande in unbehandelten TT-Zellen durch Western Blot Analysen nachgewiesen werden. Die endogenen RET-Proteinspiegel werden durch eine 175 kDa-Bande, stellvertretend für vollständig glykosylierte RET-Proteine auf der Zelloberfläche, und eine 155 kDa-Bande, die unvollständig glykosyliertes RET, das im Bereich des ERs akkumuliert, repräsentiert (Capes-Davis und Robinson, 1999). Nach Behandlung der TT-Zellen mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 für 48 h tritt eine massive Erhöhung der 155 kDa-Bande

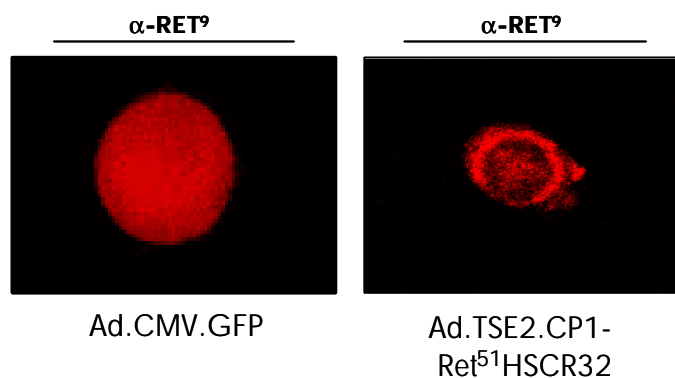
auf (Abb. 3.4-C). Dies zeigt die Funktionalität der Virus-exprimierten dominant-negativen Mutante RET<sup>51</sup>HSCR32 in TT-Zellen. Aufgrund der starken Expression von exogenem RET durch den Vektor Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 sind Voraussetzungen gegeben, die auf eine effektive Hemmung endogener onkogener RET Proteinspiegel schließen lassen.



**Abbildung 3.4:** Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32-vermittelte RET-Expression in TT-Zellen. (A) Schematische Darstellung des Vektors Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32. Die Expressionkassette, bestehend aus TSE2.CP1-Promotor, RET<sup>51</sup>HSCR32 cDNA und SV40 Polyadenylierungssignal, befindet sich in der deletierten E1-Region. (B) Immunfluoreszenzanalyse von unbehandelten TT-Zellen (links) und TT-Zellen 48 h nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 (rechts). RET-Expression ist durch Markierung mit dem Anti-RET<sup>51</sup>-Antikörper dargestellt. (C) Western Blot zur Demonstration der RET-Expression in unbehandelten TT-Zellen und 48 h nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32. Es wurden gleiche Mengen an Gesamtproteinextrakt aufgetragen (100 µg).

### 3.1.4 Dominant-negativer Effekt von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 in TT-Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob die Virus-vermittelte Expression von RET<sup>51</sup>HSCR32 in TT-Zellen nach Applikation von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 zu einer Inhibition von endogenem onkogenem RET führt, wurden TT-Zellen mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 und Ad.CMV.GFP als Kontrollvektor infiziert. Nach 72 h wurden die Zellen für Immunfluoreszenzaufnahmen prozessiert. Um die subzelluläre Lokalisation des endogenen RET zu überprüfen, wurde die hier ausschließlich endogen auftretende Isoform RET<sup>9</sup> durch einen isoformspezifischen Antikörper markiert. Da die verwendete dominant-negative Mutante RET<sup>51</sup>HSCR32 aus der langen Isoform RET<sup>51</sup> generiert wurde, ist sie bei Verwendung eines Antikörpers gegen RET<sup>51</sup> nicht vom endogenen RET<sup>51</sup> differenzierbar. Die TT-Zelllinie hingegen exprimiert beide Isoformen, so dass eine Inhibition der einen auch die Inhibition der anderen Isoform impliziert. Wie aus Abbildung 3.5 ersichtlich, wird die subzelluläre Lokalisation von endogenem RET<sup>9</sup> nicht durch den Kontrollvirus beeinflusst, wohingegen nach Applikation von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 eine deutliche Verlagerung der endogenen Isoform RET<sup>9</sup> in den Bereich um den Nukleus sichtbar wird.



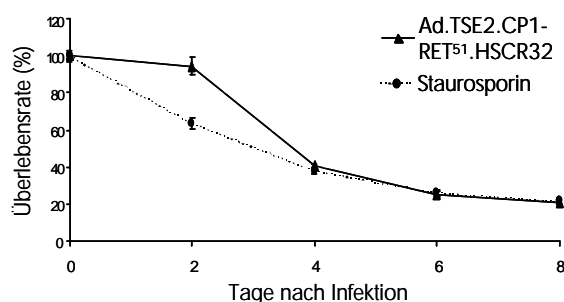
**Abbildung 3.5:** Dominant-negativer Effekt von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 in TT-Zellen. Immunfluoreszenzaufnahmen der endogenen RET<sup>9</sup>-Expression 72 h nach Infektion mit Ad.CMV.GFP (links) und Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 (rechts).

### 3.1.5 Zytotoxische Eigenschaften von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32

Nach Porter und Vaillancourt (1998) sind onkogene Rezeptor-Tyrosinkinasen verantwortlich für sowohl mitogene, als auch anti-apoptotische Stimuli. Aus diesem Grund können diese Mechanismen nach Gentransfer der dominant-negativen Mutante

RET<sup>51</sup>HSCR32 und der damit verbundenen Inhibition der endogenen RET-Expression in TT-Zellen beeinflusst werden. Um zu überprüfen, inwieweit diese Vorstellung zutrifft, wurden nun Untersuchungen durchgeführt, die auf eine Analyse solcher Mechanismen zielen.

Die Auswirkungen verschiedenster Reagenzien und Agenzien auf die Vitalität von Zellen im Allgemeinen lassen sich aus dem kolorimetrischen Umsatz von [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid] bestimmen (MTT Assay). TT-Zellen wurden in diesem Zusammenhang mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 sowie mit Ad.CMV.GFP als Kontrollvektor zum Ausschluss Virus-bedingter Nebeneffekte infiziert. Als Positivkontrolle diente Staurosporin, ein potenter Inhibitor der Proteinkinase C, der in höheren Konzentrationen ein effizientes Apoptose-induzierendes Agens darstellt (Jarvis *et al.*, 1994). Wie aus Abb. 3.6 zu entnehmen ist, kommt es nach Transduktion der RET<sup>51</sup>HSCR32-Mutante in TT-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität bezogen auf Kontrollvirus-infizierte Zellen (25,14 % Überlebensrate nach 6 Tagen und 21,19 % nach 8 Tagen).

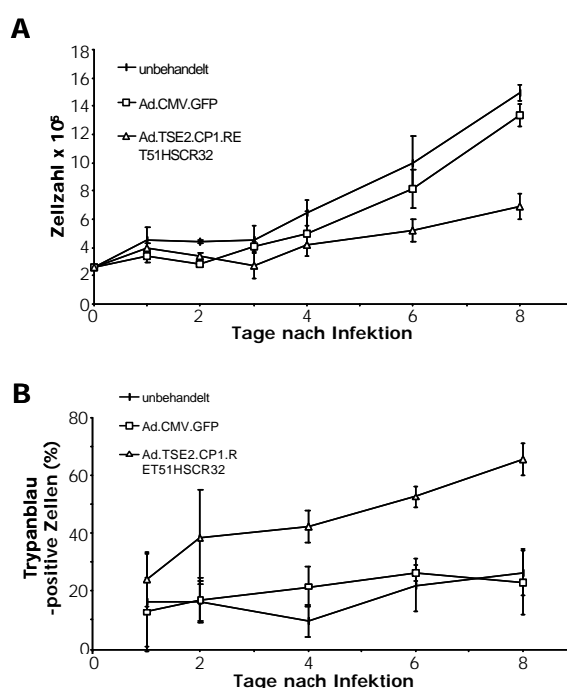


**Abbildung 3.6:** Analyse der Zytotoxizität nach Applikation von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 durch MTT Assay. In Intervallen von jeweils 48 h ist die Vitalität der TT-Zelllinie nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 bezogen auf Ad.CMV.GFP-infizierte Zellen gezeigt. Als Positivkontrolle diente 2,14  $\mu$ M Staurosporin. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen sowie die daraus resultierenden Standardabweichungen.

Die Verabreichung von Staurosporin führt zu vergleichbaren Toxizitätserscheinungen (26,11 % Überlebensrate nach 6 Tagen und 21,47 % nach 8 Tagen). Nach Virus-vermittelter Transduktion der dominant-negativen RET Mutante RET<sup>51</sup>HSCR32 wird demnach eine deutliche Reduktion der Zellvitalität sichtbar. Allerdings kann durch dieses Experiment keine Aussage über die Mechanismen der Toxizität gemacht werden, da ausschließlich metabolisch aktive Zellen zu diesen Messwerten beitragen. Eine

Differenzierung zwischen beispielsweise einer Proliferationsreduktion und aktiver Apoptose-Induktion ist daher nicht möglich.

Aus diesem Grund wurde nun versucht, Einblicke in potenzielle Einflüsse auf Proliferation und Apoptose zu erlangen. Zunächst wurden die Auswirkungen der RET<sup>51</sup>HSCR32-Expression auf das Wachstum der TT-Zelllinie untersucht. Dazu wurden TT-Zellen mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 und dem Kontrollvektor Ad.CMV.GFP infiziert sowie unbehandelt belassen. Zur Verifizierung der Proliferationsrate wurde die reine Zellzahl über einen Zeitraum von acht Tagen bestimmt. Wie aus Abb. 3.7-A zu erkennen ist, blieb die Zellzahl innerhalb der ersten drei Tage nach Infektion zwischen  $2,6 \times 10^5$  (Tag 0) und  $4,56 \times 10^5$  (Tag 3 bei unbehandelten Zellen) unverändert. Danach vermehrten sich unbehandelte und Kontrollvirus-infizierte Zellen exponentiell und erreichten nach acht Tagen Zellzahlen von  $1,496 \times 10^6$ , bzw.  $1,336 \times 10^6$ . Die Applikation von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 führte dagegen zu einem deutlich reduzierten Wachstum ( $6,88 \times 10^5$  Zellen nach 8 Tagen).



**Abbildung 3.7:** Einfluss von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 auf die Proliferation von TT-Zellen. (A) Wachstumskurve von TT-Zellen nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32, Ad.CMV.GFP und unbehandelten Zellen. Die Zellzahl wurde an den angegebenen Tagen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Daten entsprechen den Zellzahlen aus drei unabhängigen Versuchen mit entsprechenden Standardabweichungen. (B) Bestimmung des Verhältnisses aus vitalen und toten Zellen durch Trypanblau-Ausschluss. Der aus Abbildung 3.7-A bestimmten Gesamtzellzahl wurde 0,25 % Trypanblau zugegeben. Dargestellt ist das Verhältnis an Trypanblau-positiven Zellen.

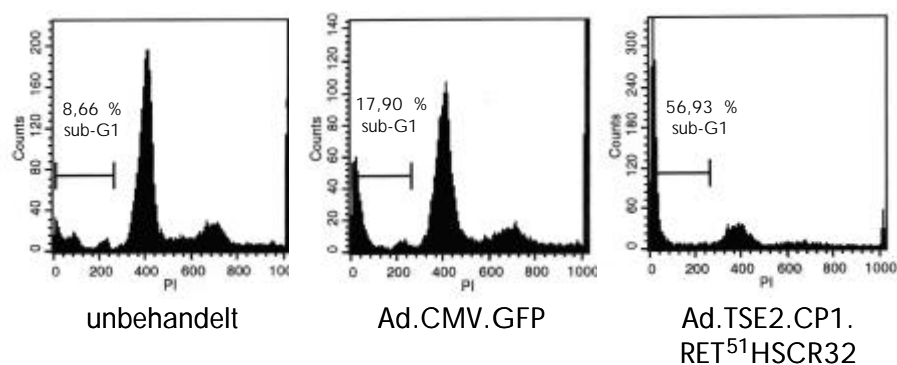
Da bei Bestimmung der Zellzahlen nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 nicht zwischen lebenden Zellen, die eine Reduktion ihrer Proliferationsrate zeigen bzw. im Zellzyklus arretiert sind, und apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen unterschieden werden kann, wurde gleichzeitig das Verhältnis aus lebenden und toten Zellen durch Ausschluss von Trypanblau bestimmt (Abb. 3.7-B). Unbehandelte sowie Kontrollvirus-infizierte Zellen weisen einen relativ konstanten Anteil Trypanblau-positiver Zellen auf. Nach 24 h lag der prozentuale Anteil bei 16,15 % (unbehandelt), sowie bei 12,70 % (Ad.CMV.GFP). Die Anteile der unbehandelten bzw. Ad.CMV.GFP-infizierten Trypanblau-positiven Zellen stiegen danach im Rahmen der Standardabweichungen nicht signifikant an, wobei nach 8 Tagen Verhältnisse von 26,35 % (unbehandelt) und 23,02 % (Ad.CMV.GFP) erreicht wurden. Im Gegensatz dazu erhöht sich der prozentuale Anteil Trypanblau-positiver Zellen deutlich nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 von 24,08 % (Tag 1) auf 65,47 % (Tag 8). Somit scheinen zytotoxische Mechanismen als Ursache für die im MTT Assay gemessene reduzierte Vitalität verantwortlich zu sein, denn die reine Abnahme der Proliferationsrate lässt sich aus diesen Daten nicht entnehmen.

Ein weiterer Hinweis auf mögliche Zytotoxizitätsmechanismen ergibt sich aus der Tatsache, dass onkogene Rezeptor-Tyrosinkinase für ihre Blockade von apoptotischen Signaltransduktionswegen bekannt sind (Porter und Vaillancourt, 1998). In erster Linie kann dies durch Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges geschehen, der für die Weiterleitung anti-apoptotischer Signale z. B. durch Phosphorylierung und Inaktivierung von Bad oder auch durch Induktion von NF- $\kappa$ B verantwortlich ist (Jarpe *et al.*, 1998). Um nun zu klären, ob eine erhöhte Apoptoserate für die Toxizität in Folge der Expression von RET<sup>51</sup>HSCR32 verantwortlich ist, wurde der Anteil an apoptotischen Zellen mit Hilfe durchflusszytometrischer Messung ihrer fragmentierten DNA bestimmt. Durch Aktivierung der Caspase-aktivierten DNase (CAD) wird im Verlauf der Apoptose die genomische DNA in charakteristischer Weise fragmentiert (Enari *et al.*, 1998) und lässt sich im Durchflusszytometer nach DNA-Markierung mit Propidiumiodid als sub-G1 Peak identifizieren.

Zur Charakterisierung von Apoptose-Induktion in Folge einer RET<sup>51</sup>HSCR32-Expression wurden TT-Zellen mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 oder Ad.CMV.GFP infiziert bzw. unbehandelt belassen. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mit 70 % Ethanol fixiert und für die durchflusszytometrische Messung prozessiert. Unbehandelte TT-Zellen weisen eine charakteristische Verteilung des DNA-Gehalts auf (Abb. 3.8). Die Mehrzahl der Zellen befindet sich in der G1-Phase, gefolgt von Zellen aus S- und G2-Phase. Das prozentuale Verhältnis von apoptotischen Zellen wird aus dem Quotienten der Gesamtzellzahl mit Zellen aus der sub-G1 Region bestimmt. In TT-Zellen, die keiner weiteren Behandlung unterzogen wurden, ist ein sub-G1 Verhältnis von 8,66 % zu erkennen.



Nach Infektion mit Ad.CMV.GFP erhöht sich dieses Verhältnis nur leicht auf 17,90 %. Die Applikation von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 führt dagegen zu einer signifikanten Steigerung des Anteils der Zellen in der sub-G1 Region auf 56,93 %.



**Abbildung 3.8:** Bestimmung der Apoptoserate nach RET<sup>51</sup>HSCR32-Expression in TT-Zellen. Das sub-G1 Verhältnis von unbehandelten Zellen (links), nach Ad.CMV.GFP-Infektion (Mitte) und nach Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32-Infektion (rechts) ist dargestellt. Die Zellen wurden 120 h nach Behandlung für die durchflusszytometrische Messung prozessiert.

Die RET Mutante RET HSCR32 übt diesen Ergebnissen nach auch in TT-Zellen einen dominant-negativen Effekt gegenüber endogenem RET, das durch die onkogene Mutation C634R konstitutiv aktiv ist, aus. Nach Expression von RET HSCR32 kommt es dabei zu einer ausgeprägten Reduktion der Vitalität von TT-Zellen, die auf Apoptose-Induktion zurückzuführen ist.

## 3.2 Antitumor-Potenzial der dominant-negativen Mutante RET<sup>51</sup>flag

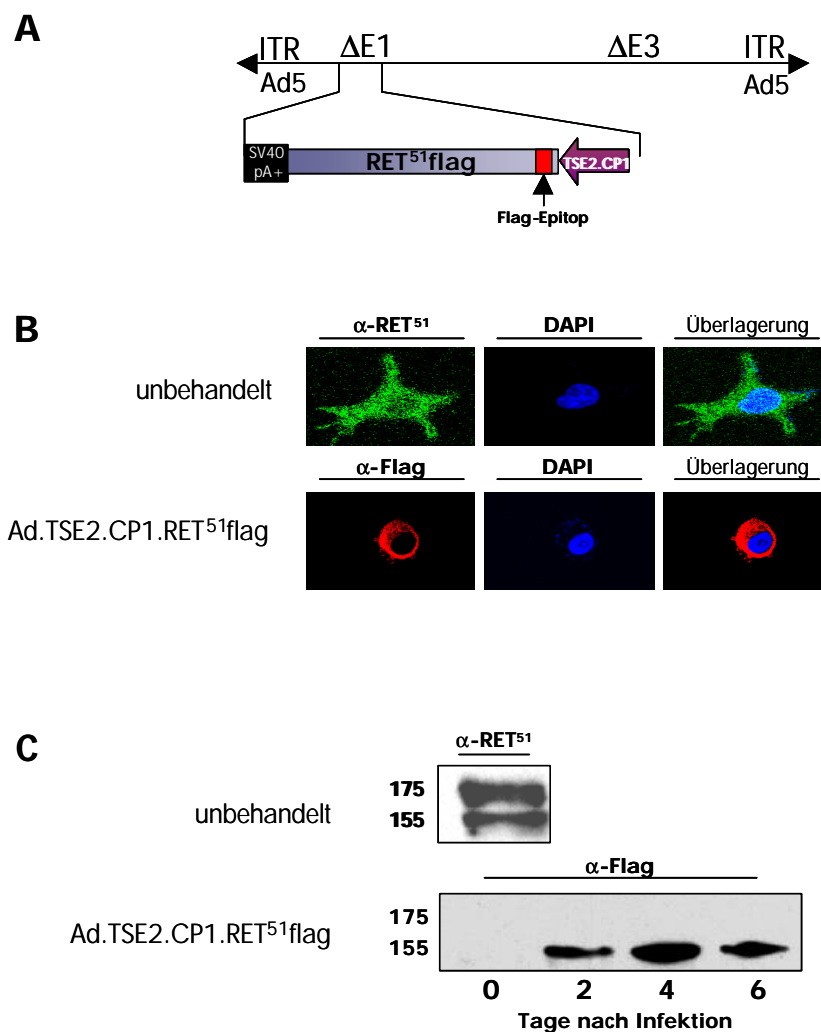
Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, weist die Einführung einer ursprünglich mit der Hirschsprung-Erkrankung assoziierten Mutation (S32L) in das *RET* Proto-Onkogen einen ausgeprägten dominant-negativen Charakter auf. Diese Mutation zerstört die Ausbildung der natürlichen Konformation der extrazellulären Domäne des *RET* Proteins und inhibiert somit die Glykosylierung extrazellulärer Aminosäuren (Anders *et al.*, 2001; Cosma *et al.*, 1998). Wie auch in Kapitel 3.1 gezeigt werden konnte, wird das mutierte Protein aufgrund der fehlenden Glykosylierung nicht an der Zelloberfläche exprimiert. Zusätzlich werden endogene onkogene *RET*-Varianten durch Dimerisierung mit der RET<sup>51</sup>HSCR32-Mutante effektiv im endoplasmatischen Retikulum zurückbehalten.

In der Studie von Cosma *et al.* (1998) wurde demonstriert, dass es allein schon ausreichend sein kann, die Ausbildung der korrekten extrazellulären Konformation zu unterbinden, um einen signifikanten dominant-negativen Effekt herbeizurufen. In dieser Untersuchung wurde am Beispiel der Einführung eines Polyasparaginsäure-Epitops (Flag-Epitop) in die extrazelluläre Region des *RET* Proto-Onkogens verdeutlicht, dass diese Modifikation ausreichend ist, um eine Konformationsänderung herbeizurufen, was ebenfalls zu einer Retention im ER und damit zum Auftreten dominant-negativer Eigenschaften führt. Durch die Einführung eines Flag-Epitops ergibt sich weiterhin ein entscheidender Vorteil gegenüber der S32L-Punktmutation: Die Verwendung eines Antikörpers, der gegen das Epitop gerichtet ist, erlaubt die spezifische Differenzierung zwischen endogen exprimierten und exogen transduzierten *RET* Proteinen. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob sich ein ähnlicher Wachstums-inhibitorischer oder zytotoxischer Effekt nach Einbringen in TT-Zellen darstellt. Weiterhin sollte das anti-tumorale Potenzial dieser Mutante in einem Xenotransplantatmodell untersucht werden.

### 3.2.1 Konstruktion und Expressionsprofil von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag

Die Einführung des Flag-Epitops in die cDNA der langen Isoform RET<sup>51</sup> erfolgte durch PCR-Mutagenese in analoger Weise zur Konstruktion der S32L-Punktmutation. Das Epitop wurde, wie von Cosma *et al.* (1998) beschrieben, zwischen Codon 46 und Codon 47 eingesetzt, so dass diese Mutation die Aminosäureabfolge der Cadherin-ähnlichen Domäne 1 verändert. Nachdem die mutierte cDNA so generiert worden war, wurde sie, wie zuvor die *RET* HSCR32 Mutante, unter der Kontrolle des synthetischen

Calcitonin-Promotors TSE2.CP1 in einen adenoviralen Vektor kloniert. Zur Termination der Transkription wurde das SV40 Polyadenylierungssignal verwendet. Der so entstandene Ad-Vektor Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag ist in Abbildung 3.9-A schematisch dargestellt. Um die Funktionsfähigkeit des Vektors zu überprüfen, wurde zunächst die Expression der RET<sup>51</sup>flag-Mutante kontrolliert.

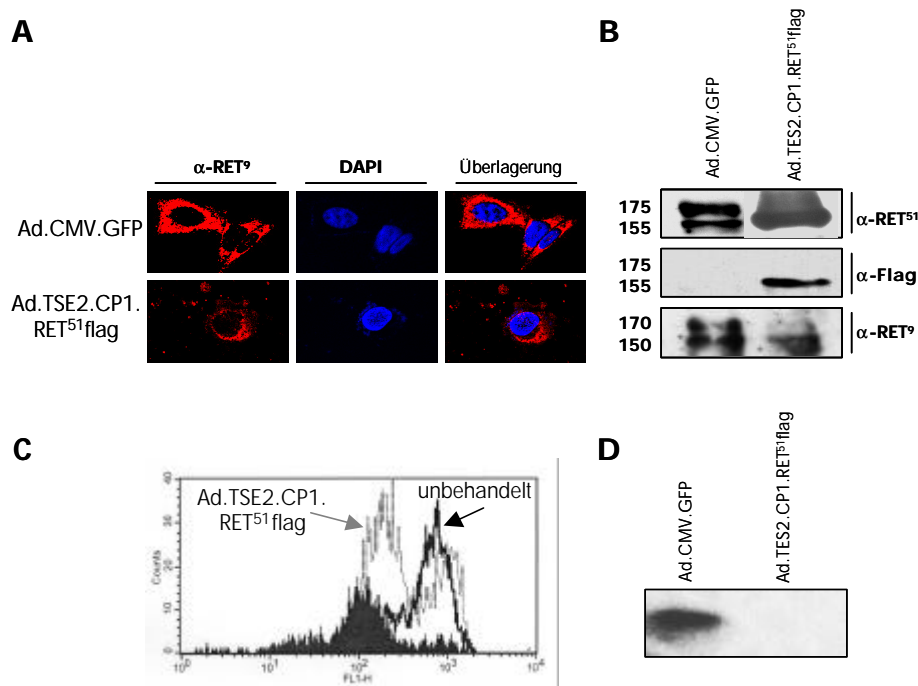


**Abbildung 3.9: Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag-vermittelte RET<sup>51</sup>flag-Expression.** (A) Schematische Darstellung des Vektors Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag. Die Expressionskassette aus TSE2.CP1-Promotor, RET<sup>51</sup>flag cDNA und dem SV40 Polyadenylierungssignal ist in der deletierten E1-Region lokalisiert. (B) Immunfluoreszenzaufnahmen der RET<sup>51</sup>flag-Expression nach Infektion von TT-Zellen mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag. Die Zellen wurden 48 h nach Transduktion für die mikroskopische Analyse durch Inkubation mit einem anti-Flag Antikörper prozessiert. Parallel ist der Nukleus durch DAPI-Gegenfärbung hervorgehoben. Als Kontrolle ist die RET<sup>51</sup>-Expression unbehandelter Zellen gezeigt. (C) Western Blot Analyse der Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag-vermittelten RET<sup>51</sup>flag-Expression. TT-Zellen wurden mit dem genannten Vektor infiziert und die Proteinexpression in Intervallen von je 48 h mit Hilfe eines Antikörpers gegen das Flag-Epitop dargestellt. Im Vergleich dazu ist die RET<sup>51</sup>-Expression in unbehandelten TT-Zellen gezeigt.

TT-Zellen wurden dazu mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag infiziert und für 48 h kultiviert. Durch Verwendung eines gegen das Flag-Epitop gerichteten Antikörpers ist eine auf den Bereich um den Zellkern reduzierte RET<sup>51</sup>flag Proteinexpression in Immunfluoreszenzaufnahmen nachweisbar (Abb. 3.9-B). Die unter der Kontrolle des TSE2.CP1-Promotors synthetisierten mutierten RET<sup>51</sup>flag Proteine werden demnach effizient im ER zurückgehalten. Dagegen ist die RET Expression in unbehandelten TT-Zellen homogen über die Zelloberfläche verteilt, wie durch Darstellung der RET<sup>51</sup> Expression in unbehandelten TT-Zellen mittels eines RET<sup>51</sup>-spezifischen Antikörpers zu erkennen ist. Die Ad Vektor-vermittelte Expression von RET<sup>51</sup>flag ist daneben im Western Blot als distinkte 155 kDa-Bande sichtbar (Abb. 3.9-C). Ein signifikanter Anstieg der Expressionslevel ist bis zum vierten Tag hin sichtbar, doch lassen sich auch nach 6 Tagen noch deutliche RET<sup>51</sup>flag Proteinspiegel erkennen. In unbehandelten TT-Zellen ist dagegen keine RET<sup>51</sup>flag Expression evident, so dass die Einführung eines Flag-Epitops hier die spezifische Differenzierung zwischen endogenem und exogenem RET erlaubt.

### **3.2.2 RET<sup>51</sup>flag übt einen dominant-negativen Effekt gegenüber onkogenem RET aus**

Um zu überprüfen, ob die adenoviral exprimierte Mutante RET<sup>51</sup>flag in der Lage ist, das endogen in TT-Zellen vorhandene onkogene RET zu inhibieren, wurden Zellen zum einen mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag und zum anderem mit Ad.CMV.GFP als Kontrolle infiziert und die subzelluläre Lokalisation der endogenen Isoform RET<sup>9</sup> immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Da TT-Zellen sowohl die RET<sup>9</sup>-, als auch die RET<sup>51</sup>-Isoform exprimieren, spiegelt das Expressionsmuster der kurzen Isoform RET<sup>9</sup> ein repräsentatives Bild der endogenen RET Expression wider. Wie aus Abbildung 3.10-A ersichtlich, hat die Behandlung von TT-Zellen mit Ad.CMV.GFP keinen Einfluss auf die endogene RET Lokalisation, die vollständig auf der gesamten Zelloberfläche detektierbar ist. Bei Applikation von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag kommt es dagegen zu einer deutlichen Verschiebung der subzellulären Lokalisation der endogenen RET<sup>9</sup> Isoform in den Bereich des ERs. Die im Western Blot erkennbare Doppelbande der RET<sup>51</sup> Expression bleibt nach der Kontrollvirusinfektion ebenfalls unbeeinflusst, wohingegen die Expression der dominant-negativen Mutante RET<sup>51</sup>flag eine drastische Zunahme der 155 kDa RET<sup>51</sup> Bande zur Folge hat (Abb. 3.10-B).



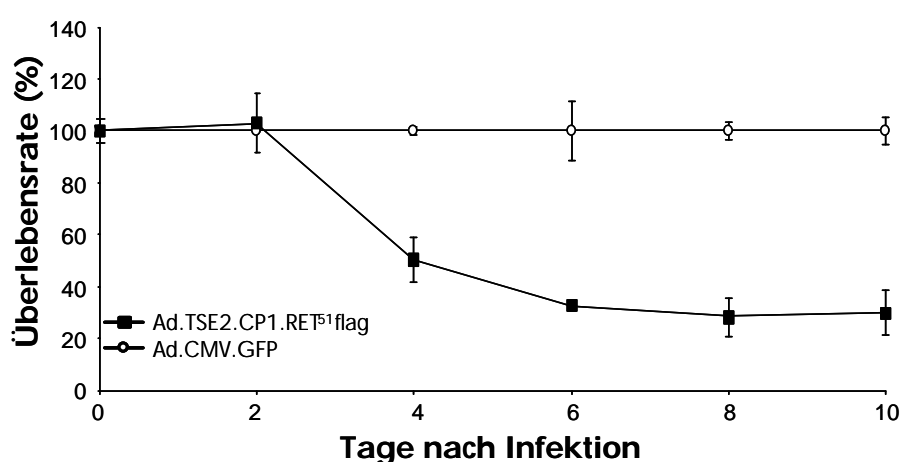
**Abbildung 3.10: Dominant-negative Auswirkungen durch Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag-vermittelte RET<sup>51</sup>flag Expression.** (A) Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation der RET<sup>9</sup> Isoform drei Tage nach Infektion mit Ad.CMV.GFP (oben) und Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag (unten). Die Gegenfärbung mit DAPI (blau) zeigt die Lage der Nuklei an. (B) Western Blot zur Verdeutlichung der RET<sup>51</sup> und RET<sup>9</sup> Expressionsspiegel. Drei Tage nach Infektion mit Ad.CMV.GFP oder Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag sind die Expressionslevel von RET<sup>51</sup> mit Hilfe eines RET<sup>51</sup>-spezifischen Antikörpers (oben) und eines Flag-spezifischen Antikörpers (Mitte) dargestellt. Endogene RET<sup>9</sup> Proteinspiegel sind durch einen RET<sup>9</sup>-spezifischen Antikörper sichtbar gemacht (unten). (C) Durchflusszytometrische Analyse der RET Expression an der Zelloberfläche. Drei Tage nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag (graue Linie) oder unbehandelten Zellen als Kontrolle (schwarze Linie) ist das Expressionsprofil der an der Zelloberfläche exponierten RET Moleküle mit Hilfe eines RET Antikörpers, der ein extrazelluläres Epitop erkennt, dargestellt. Die Proteinexpression wurde mittels eines FITC-markierten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle dienten Zellen ohne Primärantikörper (ausgefüllter Graph). (D) *In vitro* Kinase-Assay zur Verdeutlichung der funktionellen Auswirkungen reduzierter RET Expression an der Zelloberfläche. Endogenes RET wurde mit einem anti-RET<sup>9</sup> Antikörper präzipitiert. Die Phosphorylierung des exogenen Substrats Myelin Basic Protein (MBP) ist nach Inkubation mit 10 µCi [γ-<sup>32</sup>P]-ATP und 2 µg MBP in beiden Spuren dargestellt. TT-Zellen wurden dazu mit Ad.CMV.GFP (links) und Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag (rechts) infiziert und für drei Tage unter Zellkulturbedingungen herangezogen.

Bei Verwendung eines Antikörpers gegen das Flag-Epitop ist nur nach vorheriger Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag eine 155 kDa-Bande sichtbar, die das Vorhandensein von RET<sup>51</sup>flag demonstriert. Die Analyse der rein endogenen RET Expression erfolgte durch Markierung der RET<sup>9</sup> Isoform mit Hilfe eines isoformspezifischen Antikörpers. Die Applikation von Ad.CMV.GFP hat dabei keinen sichtbaren Einfluss auf die endogene RET Expression, die hier durch eine 170 kDa- bzw. eine 150 kDa-Bande erkennbar ist. Nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag tritt dagegen eine signifikante Reduktion der 170 kDa-Bande auf (Abb. 3.10-B). Mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen ein extrazelluläres Epitop des RET Proteins gerichtet ist, lassen sich auf der Zelloberfläche lokalisierte RET Proteinspiegel durch durchflusszytometrische Messung detektieren. Dazu wurden TT-Zellen in nicht-fixiertem Zustand einer durchflusszytometrischen Analyse der an der Zelloberfläche exprimierten RET Proteine unterzogen. Unbehandelte Zellen weisen dabei einen distinkten Peak bei ca.  $1 \times 10^3$  auf einer logarithmischen Skala der relativen RET Expression auf (Abb. 3.10-C). Drei Tage nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag ist die Zelloberflächen-nahe RET Expression deutlich reduziert, was anhand der Verschiebung des Fluoreszenz-Signals eines Großteils der Zellen sichtbar wird. Um darüber hinaus zu untersuchen, ob die verminderte RET Expression nach Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag Infektion funktionelle Auswirkungen auf die RET-vermittelte Signaltransduktion hat, wurde die RET Kinaseaktivität durch nachfolgende Phosphorylierung eines exogenen Substrats (Myelin Basic Protein, MBP) analysiert. In der Studie von Cosma *et al.* (1998) wurde in diesem Zusammenhang demonstriert, dass das Phosphorylierungspotenzial onkogener RET Proteine bei Co-Expression der dominant-negativen RET Mutante RET<sup>51</sup>flag deutlich abnimmt. Wie aus Abbildung 3.10-D erkennbar ist, hat die Infektion von TT-Zellen mit Ad.CMV.GFP keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des exogenen Substrats MBP. Im Gegensatz dazu kommt es nach Applikation von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag zum Ausbleiben der MBP Phosphorylierung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Reduktion der onkogenen RET Expression an der Zelloberfläche zur Hemmung der RET Signaltransduktion in TT-Zellen führt.

### 3.2.3 Einfluss der RET<sup>51</sup>flag Expression auf die Zellvitalität

Um im Weiteren zu überprüfen, ob die Expression der dominant-negativen Mutante RET<sup>51</sup>flag einen Einfluss auf die Vitalität von TT-Zellen hat, wurde die Zytotoxizität nach Ad Vektor-vermittelter Expression dieser Mutante im MTT-Assay untersucht. TT-Zellen wurden dazu mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag sowie mit Ad.CMV.GFP als Kontrolle infiziert.

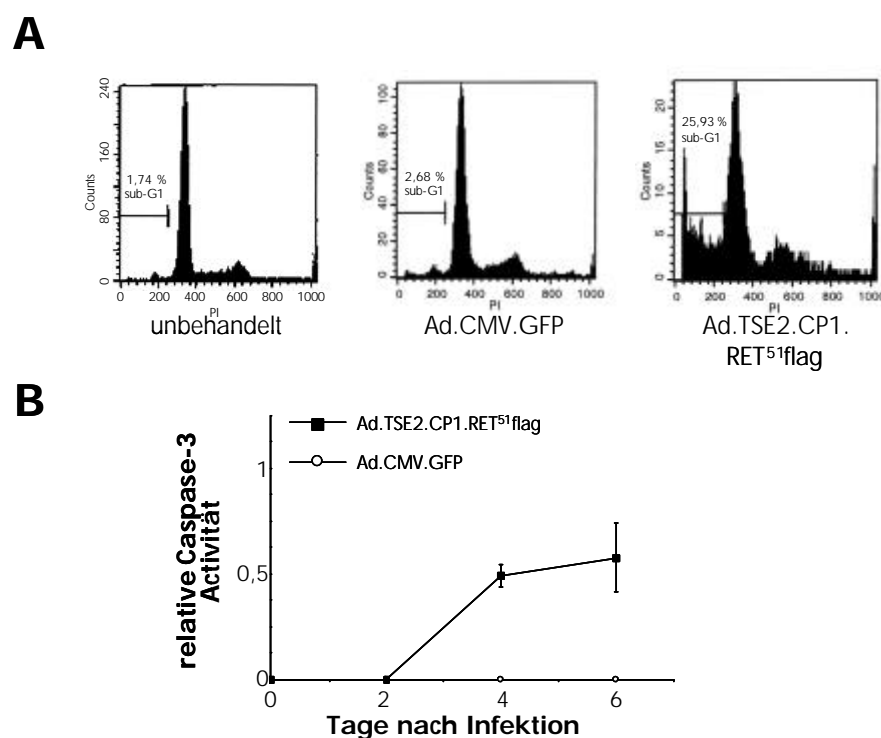
Die metabolisch aktiven Zellen wurden in Intervallen von je 48 h bestimmt. Wie Abbildung 3.11 zeigt, bleibt die Überlebensrate der TT-Zellen 2 Tage nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag im Verhältnis zu Kontrollvirus-infizierten Zellen unbeeinflusst. Nach 48 h allerdings sinkt die Überlebensrate in RET<sup>51</sup>flag exprimierenden Zellen drastisch ab, so dass nach 4 Tagen im Vergleich zu Ad.CMV.GFP-infizierten Zellen nur noch 50,06 % vitale Zellen vorhanden sind. Nach weiteren 48 h ist die Überlebensrate auf 32,72 % reduziert. Die Transduktion von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag führt demnach, wie schon nach Transduktion von RET HSCR32 beobachtet, zur Reduktion der Zellvitalität bzw. zum Absterben der Zellen.



**Abbildung 3.11: Darstellung der zytotoxischen Auswirkungen einer RET<sup>51</sup>flag Expression in TT-Zellen.** TT-Zellen wurden mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag bzw. mit Ad.CMV.GFP infiziert und die Vitalität der Zellen in 48 h Intervallen durch MTT-Assay bestimmt. Die Rate der nach Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag Infektion überlebenden Zellen ist als Verhältnis der Vitalität nach Ad.CMV.GFP Infektion dargestellt.

Als Ursache hierfür kann möglicherweise eine erhöhte Apoptoserate verantwortlich gemacht werden, denn zum einen leiten die bisher bekannten Signaltransduktionswege, die durch onkogenes RET aktiviert werden, anti-apoptotische Signale weiter (Takahashi, 2001). Zum anderen wurde bereits nach Transduktion von RET HSCR32 in TT-Zellen eine gesteigerte Apoptoserate beobachtet (3.1.5). Zur Charakterisierung der Apoptose-Induktion wurden die DNA-Profile unbehandelter TT-Zellen sowie von Zellen nach Infektion mit Ad.CMV.GFP oder Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag durchflusszytometrisch untersucht. Apoptotische Zellen weisen aufgrund ihrer fragmentierten DNA einen distinkten Peak in der sub-G1 Region der Zellpopulation auf. In unbehandelten TT-Zellen befinden sich hier 1,74 % aller Zellen in der sub-G1 Region (Abb. 3.12-A). Drei Tage nach Infektion mit Ad.CMV.GFP erhöht sich diese Verteilung nur minimal auf

2,68 %. Wird allerdings die sub-G1 Region drei Tage nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag betrachtet, ist eine signifikante Erhöhung der sub-G1 Proportion als charakteristisches Merkmal für Apoptose zu erkennen (25,93 %).



**Abbildung 3.12: Apoptoseinduktion nach Transduktion von Ad.TES2.CP1.RET<sup>51</sup>flag in TT-Zellen.** (A) Bestimmung der sub-G1 Proportion in unbehandelten TT-Zellen (links), nach Infektion mit Ad.CMV.GFP (Mitte) oder Ad.TES2.CP1.RET<sup>51</sup>flag (rechts). Drei Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert und anschließend für die durchflusszytometrische Messung prozessiert. (B) Bestimmung der relativen Caspase-3 Aktivität in TT-Zellen nach Transduktion von Ad.CMV.GFP oder Ad.TES2.CP1.RET<sup>51</sup>flag in Intervallen von je 48 h. Basale Level an Caspase-3 Aktivität wurden gleich Null gesetzt.

Darüber hinaus wurde die Caspase-3 Aktivierung als weiteres Kennzeichen für Apoptose und mögliche Ursache für die Zytotoxizität analysiert. Caspase-3 zählt zur Gruppe der Effektor-Caspasen, die am Ende der Caspase-Kaskade steht und deren Aktivierung zentrale Bedeutung für die Apoptose hat (Kumar, 1999). Aktivierte Caspase-3 ist unter anderem für die Spaltung und Inaktivierung der anti-apoptischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> (Clem *et al.*, 1998) sowie für die Spaltung von ICAD (Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase) verantwortlich, wodurch es zur Freisetzung und Aktivierung der Caspase-aktivierten DNase (CAD) und dadurch bedingter DNA-Fragmentierung kommt (Sakahira *et al.*, 1998). Wie aus Abbildung 3.12-B ersichtlich, führt die Infektion mit Ad.CMV.GFP nicht zur Caspase-3 Aktivierung. Die Transduktion von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag lässt bis 48 h nach Infektion ebenfalls keine Caspase-3



Aktivität erkennen. Danach steigt die Caspase-3 Aktivität jedoch bis 6. Tag sprunghaft an. Für den Zelltod nach Expression von RET<sup>51</sup>flag in TT-Zellen kann diesen Ergebnissen nach eine Apoptose-Induktion verantwortlich gemacht werden, denn sowohl die durchflusszytometrischen Analysen als auch die Bestimmung der Caspase-3 Aktivierung weisen darauf hin.

### 3.2.4 Antitumor-Eigenschaften von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag *ex* und *in vivo*

Aus den vorangegangenen Experimenten konnte mit Hilfe verschiedener Methoden ein pro-apoptotischer Effekt der dominant-negativen RET Mutanten RET<sup>51</sup>HSCR32 und RET<sup>51</sup>flag in TT-Zellen nachgewiesen werden. Pro-apoptotische Gene wurden bereits häufig mit Erfolg in der Tumor-Gentherapie eingesetzt (McCormick, 2001; Pützer *et al.*, 2000). Vor allen Dingen weisen dabei dominant-negative Onkogene, die zur Wiederherstellung apoptose-relevanter Mechanismen führen, ein hohes Potenzial für eine erfolgreiche Inhibition Tumor-assoziiertes Signaltransduktionswege auf, wie bereits am Beispiel der Met Rezeptor-Tyrosinkinase gezeigt werden konnte (Firon *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurden nun die anti-tumoralen Eigenschaften der dominant-negativen *RET* Proto-Onkogen Mutante RET<sup>51</sup>flag, exemplarisch für beide untersuchten dominant-negativen Mutanten, im Xenotransplantatmodell untersucht.

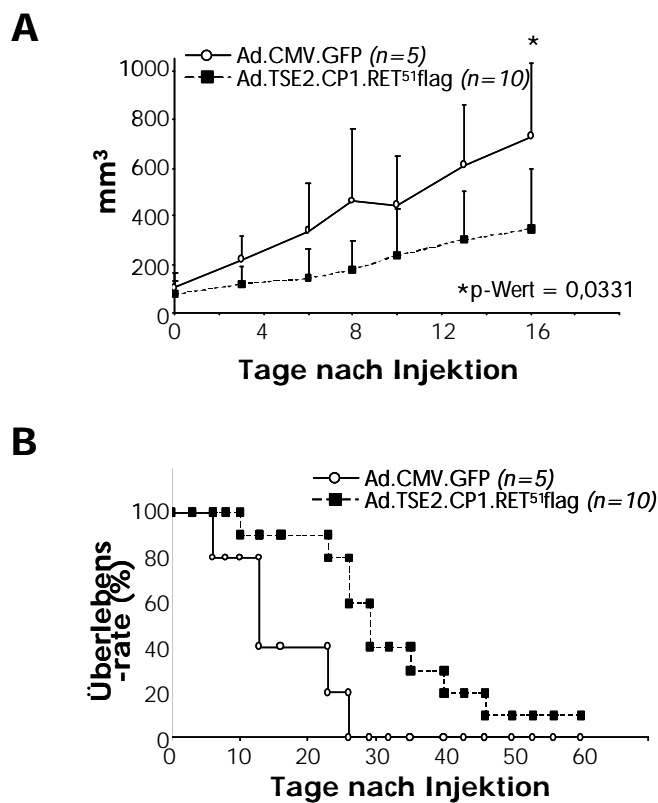
TT-Zellen bilden bei subkutaner Injektion in immunsupprimierte Nacktmäuse deutlich ausgeprägte Tumore aus. Um nun zu überprüfen, ob die Expression der dominant-negativen Mutante RET<sup>51</sup>flag tumorsupprimierende Eigenschaften aufweist, wurden jeweils  $5 \times 10^7$  TT-Zellen entweder mit Ad.CMV.GFP oder mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag infiziert. Die Zellen wurden 24 h nach Infektion subkutan in Nacktmäuse injiziert und die Mäuse auf Tumorwachstum hin beobachtet. Wie aus Tabelle 3.1 zu erkennen ist, bildeten 100 % aller Tiere (5 von 5), denen mit Ad.CMV.GFP-infizierte TT-Zellen transplantiert wurden, deutlich sichtbare Tumore mit einem durchschnittlichen Tumolvolumen von  $198,37 \pm 89,54 \text{ mm}^3$  innerhalb von 10 Tagen aus. Im Gegensatz dazu entwickelte kein Tier, dem mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag-infizierte Zellen injiziert wurde, im Vergleichszeitraum einen Tumor (0 von 15).

**Tabelle 3.1:** Tumorprotektion nach Injektion *ex vivo*-infizierter TT-Zellen. Erläuterungen siehe Text.

Behandlung	Anzahl verwendeter Tiere	Durchschnittliche Tumorumfängen ( $\text{mm}^3 \pm \text{Standardabw.}$ )	Tumorentwicklung nach 10 Tagen
Ad.CMV.GFP	5	198,37 $\pm$ 89,54	100 %
Ad.TSE2.CP1.RET <sup>51</sup> flag	15	0	0 %

Aus Tabelle 3.1 ist also eine signifikante Tumorprotektion nach Injektion RET<sup>51</sup>flag-exprimierender TT-Zellen in Nacktmäusen evident. Aus diesem Grund wurde nun versucht, einen therapeutischen Effekt *in vivo* zu bestätigen. Dazu wurden Nacktmäusen (NMRI/nude)  $1 \times 10^7$  TT-Zellen subkutan injiziert. Nach Auftreten deutlich sicht- und tastbarer Tumore erfolgte einmalig eine direkte intra-tumorale Injektion von  $1 \times 10^9$  pfu Ad.CMV.GFP (n=5) oder Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag (n=10). In Abbildung 3.13-A sind die daraus resultierenden durchschnittlichen Tumorumfängen über einen Zeitraum von 16 Tagen dargestellt. Am 8. Tag nach Injektion der adenoviralen Vektoren betrug die mittlere Tumorumfänge der Kontrollgruppe (Ad.CMV.GFP) 463,72  $\text{mm}^3$ . Die Applikation von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag führte dagegen zu einem deutlich geringeren Tumorumfängen im gleichen Zeitraum (179,93  $\text{mm}^3$ ). Nach 16 Tagen betrug die durchschnittliche Tumorumfänge bei Injektion von Ad.CMV.GFP dann 729,27  $\text{mm}^3$ . Im Gegensatz dazu entwickelten die Tiere, die eine Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag Injektion erhielten, nach 16 Tagen Tumore mit einem mittleren Volumen von 349,18  $\text{mm}^3$ . Der Unterschied zwischen den durchschnittlichen Tumorumfängen nach 16 Tagen ist statistisch signifikant, wie die Durchführung eines *Student'schen t-Tests* bestätigt ( $p=0,0331$ ). Aus der Anwendung von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag ergab sich darüber hinaus eine signifikante Lebensverlängerung im Vergleich zu Ad.CMV.GFP (Abb. 3.13-B). Die 50 %-Überlebensrate betrug nach Injektion von Ad.CMV.GFP 13 Tage. Nach Transduktion von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag konnte die Ausdehnung der 50 %-Überlebensrate auf 29 Tage beobachtet werden. Die Injektion von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag führte demnach zu einer Steigerung der 50 %-Überlebensrate um 16 Tage. Bereits 26 Tage nach Applikation von Ad.CMV.GFP mussten alle Kontrolltiere in Folge zu großer Tumorumfängen getötet werden. Dagegen kam es nach Behandlung mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag zu einer Überlebensrate von 60 % im gleichen Zeitraum. In einem Fall führte die intra-tumorale Injektion von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag zum vollständigen Rückgang des Tumors, so dass sich dieses Tier durch Langzeitüberleben auch über den 60. Tag hinaus auszeichnete (Abb. 3.13-B). Diese Ergebnisse

verdeutlichen also einen sichtbaren anti-tumoralen Effekt nach Expression von RET<sup>51</sup>flag im MTC-Nacktmausmodell.



**Abbildung 3.13: *In vivo*-Behandlung etablierter Tumore in Nacktmäusen mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag.** (A) Durchschnittliche Tumolvolumina bereits etablierter Tumore aus der subkutanen Injektion von  $1 \times 10^7$  TT-Zellen nach Applikation von je  $1 \times 10^9$  pfu Ad.CMV.GFP ( $n=5$ ) bzw. Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>flag ( $n=10$ ). (B) Langzeitüberlebenskurve der aus Abbildung 3.13-A behandelten Mäuse (Kaplan-Meier-Darstellung). Tiere mit einem individuellen Tumolvolumen von  $> 600 \text{ mm}^3$  wurden aus dem Experiment genommen.

### **3.3 Mechanismus der Apoptose-Induktion durch RET HSCR32**

Ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit sollte in der Aufklärung potenzieller zytotoxischer Mechanismen nach Bestätigung der dominant-negativen Eigenschaften von RET HSCR32 und RET flag liegen. Wie den beiden vorangegangenen Kapiteln zu entnehmen ist, führt die Expression dieser beschriebenen dominant-negativen Mutanten zur Induktion von Apoptose in TT-Zellen. Eine Erklärungsmöglichkeit für die Ursachen der Apoptose-Induktion besteht in der Hemmung von anti-apoptotischen Signaltransduktionswegen, so dass apoptotische Mechanismen in den Vordergrund treten. Auf der anderen Seite kann es in diesen Fällen jedoch näher liegen, alternative Apoptose-Mechanismen zu betrachten, da bereits in früheren Studien Zelltod durch Apoptose bei Akkumulation falsch gefalteter Proteine, zu denen auch RET HSCR32 und RET flag zählen, beobachtet wurde (Kaufman, 1999).

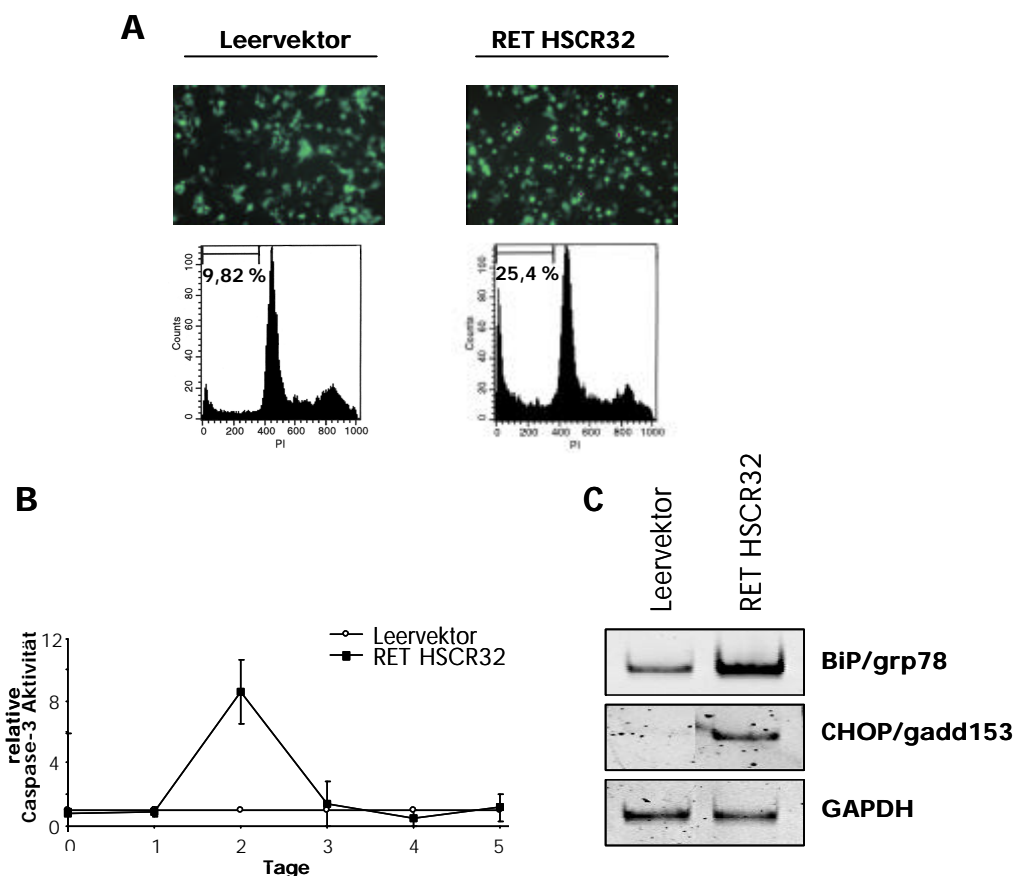
#### **3.3.1 Apoptose-Induktion nach RET HSCR32 Expression in 293-Zellen**

Um Einblicke in die Mechanismen der Apoptose-Induktion nach Expression der dominant-negativen RET Mutanten RET HSCR32 und RET flag zu bekommen, wurde zunächst überprüft, ob diese Apoptose-Induktion auf den dominant-negativen Mechanismus zurückzuführen ist, oder ob weitere, bisher nicht in Betracht gezogene Mechanismen daran beteiligt sind. Dazu wurde vorab untersucht, inwieweit die Expression der RET HSCR32 Mutante, exemplarisch für beide bisher eingesetzten dominant-negativen Mutanten, allein, d. h. in Abwesenheit von onkogenem RET in der Lage ist, zytotoxische Effekte hervorzurufen. Aus diesem Grund wurde ein Expressionsplasmid, das die RET HSCR32 Mutante unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert, in RET-negative 293-Zellen transfiziert. Um zunächst morphologische Kennzeichen von Zytotoxizität sichtbar zu machen, wurde die RET HSCR32 Mutante, bzw. ein Kontrollplasmid, in einem 10-fachen Überschuss zu einem GFP-exprimierenden Vektor mittels transients Transfektion in 293-Zellen eingebracht. Unter der Annahme, dass jede Zelle, die durch eine grüne Fluoreszenz gekennzeichnet ist, auch das RET HSCR32 Protein exprimiert, wurde die Morphologie der so behandelten Zellen unter Fluoreszenz-Anregung betrachtet. Wie in Abbildung 3.14-A erkennbar, weisen die 293-Zellen nach Kontrollvektorapplikation eine homogene Grünfluoreszenz ohne sichtbare Anzeichen einer Zytotoxizität auf. Im Gegensatz dazu ist bei Expression von RET HSCR32 ein Großteil der Zellen durch eine

veränderte Morphologie gekennzeichnet. Viele Zellen erscheinen abgerundet und sichtbar verkleinert, so dass allein die Anwesenheit von RET HSCR32 dafür verantwortlich gemacht werden kann. Um weiterhin zu untersuchen, ob die veränderte Morphologie auf Apoptose-Induktion zurückzuführen ist, wurde der Anteil an apoptotischen Zellen nach Kontrollvektorapplikation bzw. nach Transfektion von RET HSCR32 im Durchflusszytometer analysiert. Da im Gegensatz zur Transduktion mit adenoviralen Vektoren bei der transienten Transfektion von 293-Zellen selten 100 % der Zellen erreicht werden, wurde ein GFP-Spektrin (GFPS) exprimierendes Plasmid im Überschuss co-transfiziert und die Analyse des DNA-Gehaltes auf grün-fluoreszierende Zellen beschränkt. So ließ sich in Kontrollvektor-transfizierten Zellen ein sub-G1 Verhältnis von 9,82 % ausmachen (Abb. 3.14-A). Nach Transfektion von RET HSCR32 ist eine deutlich erhöhte Rate an sub-G1 Zellen erkennbar (25,4 %), die für eine signifikant gesteigerte Apoptoserate in diesen Zellen spricht. Um weitere Charakteristika einer Apoptose-Induktion bei RET HSCR32 Expression sichtbar zu machen, wurde anschließend die Caspase-3 Aktivierung untersucht. Wie aus Abbildung 3.14-B zu entnehmen ist, führt die Transfektion eines Kontrollvektors zu keiner sichtbaren Caspase-3 Aktivierung. Im Gegensatz dazu ist 48 h nach Transfektion von RET HSCR32 eine um den Faktor 8,58 erhöhte Caspase-3 Aktivität evident. Diesen Daten nach führt die Expression von RET HSCR32 auch unabhängig von zuvor gezeigten dominant-negativen Eigenschaften zur Apoptose-Induktion.

Eine Reihe von Studien verdeutlichte in diesem Zusammenhang, dass die Akkumulation eines falsch gefalteten Proteins im ER bereits ein ausreichender Apoptose-Stimulus sein kann (Ferri und Kroemer, 2001; Kouroku *et al.*, 2002; Oyadomari *et al.*, 2002). Nimmt die Akkumulation eines falsch gefalteten Proteins im ER überhand, kann eine intrazelluläre Stresssituation entstehen, die zur Aktivierung spezifischer Signaltransduktionswege führt, die wiederum im Zelltod durch Apoptose münden. Die Mechanismen der „Unfolded Protein Response“ (UPR) und der „ER-Overload Response“ (EOR) sorgen dabei durch fein regulierte Sensor- und Effektorproteine für die Ausführung einer solchen Reaktion (Kaufman, 1999; Mori, 2000).

Charakteristisch für aktivierte ER-Stress assoziierte Signaltransduktionswege ist die Induktion des ER Chaperones BiP/grp78 (Kaufman *et al.*, 2002) und des Transkriptionsfaktors CHOP/gadd153 (Wang *et al.*, 1996) auf transkriptioneller Ebene. Das BiP-Protein liegt im nicht-aktivierten Zustand im Komplex mit einer Reihe von ER-Membran assoziierten Kinasen vor (z.B. ATF6, PERK, Ire1  $\alpha/\beta$ ) und reprimiert dadurch deren Aktivität (Bertolotti *et al.*, 2000).



**Abbildung 3.14: Apoptose-Induktion durch Expression von RET HSCR32 in 293-Zellen.** (A) Morphologische Unterschiede nach transienter Transfektion eines Kontrollplasmids (Leervektor) und eines RET HSCR32-exprimierenden Plasmids. Zu jeweils 4,5 µg der Expressionsvektoren wurden 0,5 µg eines GFP-exprimierenden Plasmids gegeben und die Morphologie der Zellen 72 h nach Transfektion im Fluoreszenzmikroskop untersucht (oben). Ein repräsentativer Bereich ist gezeigt. Die Bestimmung der sub-G1 Verhältnisse (unten) erfolgte ebenfalls 72 h nach Transfektion. Den jeweiligen Expressionsplasmiden (je 4,5 µg) wurden 0,5 µg eines GFP-Spektrin exprimierenden Plasmids beigefügt und die DNA-Profile der Zellen im Durchflusszytometer anhand ihrer GFP-Expression erfasst. (B) Bestimmung der relativen Caspase-3 Aktivität über einen Zeitraum von 5 Tagen nach transienter Transfektion eines Kontrollplasmids (5 µg) und eines RET HSCR32-exprimierenden Plasmids (5 µg). Die Caspase-3 Aktivität wurde im Rahmen eines dreifachen Ansatzes bestimmt. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken dargestellt. (C) Semiquantitative RT-PCR zur Überprüfung der mRNA-Spiegel von BiP/grp78 (oben), CHOP/gadd153 (Mitte) und GAPDH (unten) 24 h nach Transfektion eines Kontrollplasmids (5 µg) oder eines RET HSCR32-exprimierenden Vektors (5 µg).

Akkumuliert ein falsch gefaltetes Protein im ER, dissoziiert BiP aus den Komplexen um bei der korrekten Faltung zu assistieren. Dadurch werden die membranassoziierten Kinasen aktiviert und stimulieren ihrerseits die Translokation von Transkriptionsfaktoren wie ATF4, XBP oder der p50-Untereinheit von ATF6 in den Nukleus, wo diese Faktoren über ER-Stress responsive Elemente (ERSE) an verschiedene Promotoren binden und dadurch die Expression der entsprechenden Gene induzieren (Ma *et al.*, 2002; Mori, 2000). Unter diesen Genen befinden sich auch *BiP/grp78* und *CHOP/gadd153*, wobei der Transkriptionsfaktor CHOP auch direkt an der Ausführung der Apoptose beteiligt ist, wie durch *CHOP<sup>-/-</sup>*-Mäuse belegt werden konnte (Zinszner *et al.*, 1998).

Die mögliche Aktivierung dieser Signaltransduktionswege durch die Expression von RET HSCR32 wurde im Folgenden durch semi-quantitative RT-PCR anhand der transkriptionellen Induktion der Faktoren BiP und CHOP untersucht. Wie in Abbildung 3.14-C sichtbar, führt die Expression von RET HSCR32 im Gegensatz zu Kontrollvektor-behandelten Zellen zur deutlichen Steigerung der BiP mRNA-Spiegel. Darüber hinaus ist keine Induktion der CHOP mRNA nach Kontrollvektor-Transfektion zu erkennen. Nach Transfektion eines RET HSCR32 Expressionsplasmides kommt es jedoch zur ausgeprägten Hochregulation der CHOP mRNA. Diese Daten weisen also darauf hin, dass die mit der Hirschsprung-Erkrankung assoziierte RET Mutante RET HSCR32 in der Lage ist, ER-Stress spezifische Signaltransduktionswege, die zur Apoptose-Induktion führen, anzuschalten, und zwar unabhängig vom dominant-negativen Effekt in TT-Zellen.

### **3.3.2 Apoptose-Induktion nach Gentransfer von RET HSCR32 in TT-Zellen**

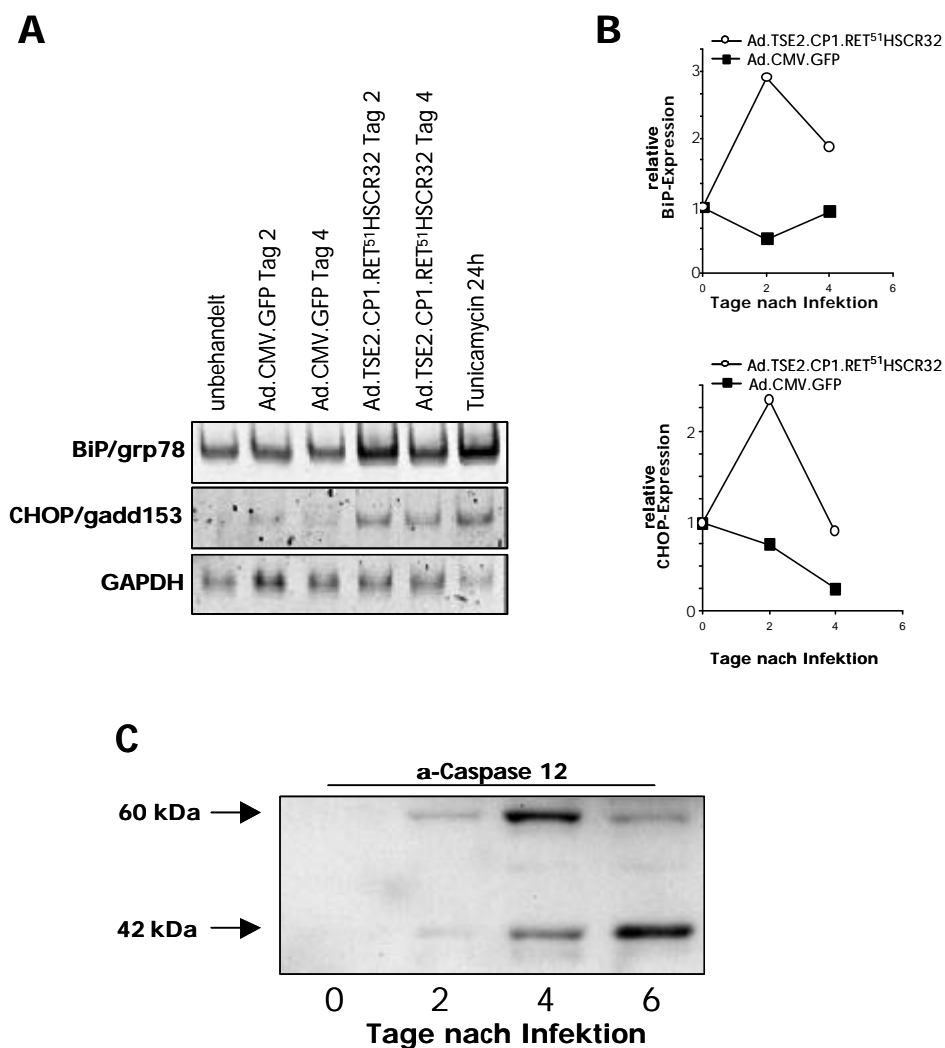
Um weiterhin zu überprüfen, ob eine Induktion der ER-Stress spezifischen Signaltransduktionswege auch bei adenoviral-vermittelter Transduktion der dominant-negativen RET Mutante RET HSCR32 zum Tragen kommt bzw. an der Apoptose-Induktion in RET-positiven Zellen beteiligt sein kann, wurden die Untersuchungen auf TT-Zellen ausgeweitet. Die mögliche Aktivierung dieser Signaltransduktionswege wurde im Folgenden ebenfalls anhand der transkriptionellen Induktion der spezifischen ER-Stress Marker *BiP/grp78* und *CHOP/gadd153* untersucht. Dazu wurden TT-Zellen mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 oder Ad.CMV.GFP infiziert. Als Positivkontrolle diente 1 µg/ml Tunicamycin, wodurch aufgrund der Hemmung intrazellulärer Glykosylierungsvorgänge die ER-Stress assoziierten Apoptosevorgänge ausgelöst werden. Unbehandelte TT-Zellen weisen eine konstante BiP-Expression auf, die nach Infektion mit Ad.CMV.GFP sowohl für 2 als auch für 4 Tage unbeeinflusst bleibt (Abb.

3.15-A und Abb. 3.15-B). Dagegen bringt die Transduktion von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32, insbesondere nach 48 h, eine deutliche Induktion der BiP-mRNA mit sich. Diese ist vergleichbar mit der BiP-Induktion durch Tunicamycin-Behandlung. Nach Infektion mit Ad.CMV.GFP kommt es weiterhin zu keiner sichtbaren Induktion der CHOP-mRNA, die auch in unbehandelten Zellen nicht nachweisbar ist (Abb. 3.15-A und Abb. 3.15-B). Im Gegensatz dazu ist eine signifikante Induktion dieser mRNA nach Transduktion von Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 sowie nach Tunicamycin-Behandlung evident. Die mRNA-Spiegel an BiP und CHOP sinken nach 4 Tagen auf ihr Ursprungslevel zurück (Abb. 3.15-B), so dass von einer reversiblen Aktivierung der Transkription gesprochen werden kann. Die Quantifizierung der relativen Expressionstärke wurde dabei durch Bezug auf die Expressionslevel des „house-keeping“-Gens GAPDH bestimmt.

Ein weiterer Mechanismus der ER-spezifischen Apoptose wurde mit der Induktion und Aktivierung von Caspase-12, einer nur im ER lokalisierten Caspase, beschrieben (Nakagawa *et al.*, 2000; Oyadomari *et al.*, 2002). Caspase-12 liegt im Normalzustand als inaktive Zymogenform vor (ca. 60 kDa). Sie wird nach Aktivierung zunächst in eine aktive ca. 42 kDa-Form gespalten und später weiter in ein ca. 24 kDa Enzym. Nach Infektion mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 ist eine deutliche Induktion der 60 kDa Caspase-12 Expression auf Proteinebene bis zum vierten Tag sichtbar (Abb. 3.15-C). Mit dem 6. Tag nehmen die Proteinlevel der Caspase-12 Zymogenform wieder ab, wobei gleichzeitig eine deutliche Zunahme des 42 kDa-Spaltproduktes bis hin zum 6. Tag nach Infektion zu erkennen ist. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass Caspase-12 erst auf Proteinebene induziert und später durch Spaltung aktiviert wird (Abb. 3.15-C).

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten weisen darauf hin, dass allein die Expression der dominant-negativen RET Mutante RET HSCR32 die Ursache für die Apoptose-Induktion in TT-Zellen sein kann. Die Tatsache, dass 293-Zellen bei RET HSCR32 Expression ebenfalls in die Apoptose eintreten, unterstreicht diese Vorstellung. Als zugrundeliegender Mechanismus scheinen ER-Stress spezifische Apoptosevorgänge eine wichtige Rolle zu spielen.





**Abbildung 3.15: Aktivierung von ER-Stress spezifischen Signaltransduktionswegen durch Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32.** (A) Semi-quantitative RT-PCR zur Verdeutlichung der Expression von ER-Stress spezifischen Markern (BiP/grp78 und CHOP/gadd153), sowie GAPDH als Kontrollgen. TT-Zellen wurden dazu einmal unbeeinflusst gelassen, mit Ad.CMV.GFP oder mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 infiziert, sowie mit 1µg/ml Tunicamycin inkubiert. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese mit Hilfe von zufälligen Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben, bevor die Expression der genannten Gene mit sequenzspezifischen Primern untersucht wurde. (B) Darstellung der relativen Expressionslevel von BiP (oben) und CHOP (unten). Die relative Expression der Gene BiP und CHOP (siehe A) wurde mit dem TINA-Programm (Version 2.09g; raytest Isotopenmessgeräte GmbH) quantifiziert und ist als Verhältnis zur jeweiligen GAPDH-Expression für Ad.CMV.GFP- und Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32-infizierte TT-Zellen nach zwei bzw. vier Tagen dargestellt. (C) Western Blot zur Veranschaulichung der Caspase-12 Expression. TT-Zellen wurden hier mit Ad.TSE2.CP1.RET<sup>51</sup>HSCR32 infiziert und die Caspase-12 Proteinspiegel in Intervallen von je 48 h mit Hilfe eines Caspase-12 spezifischen Antikörpers verifiziert.

### 3.4 Wachstums-inhibitorische Mechanismen der dominant-negativen RET Proto-Onkogen Mutante RET DTK

Aus den vorangegangenen Kapiteln wurde offensichtlich, dass die ektopische Expression der bereits bekannten dominant-negativen RET Mutanten RET HSCR32 und RET flag das Wachstum von TT-Zellen durch Apoptose-Induktion unterbindet. Diese Apoptose-Induktion scheint allerdings unabhängig vom zuvor demonstrierten dominant-negativen Effekt zu sein. Aus diesem Grund kommen beide Mutanten nicht für Untersuchungen bezüglich der RET-induzierten Tumorigenese in Frage. In diesem Kapitel wurde daher eine weitere dominant-negative Mutante des *RET* Proto-Onkogens auf ihre anti-tumoralen Eigenschaften im MTC-Modell charakterisiert, um spezifische Reaktionen auf die Inhibition von onkogenem RET in TT-Zellen aufklären zu können.

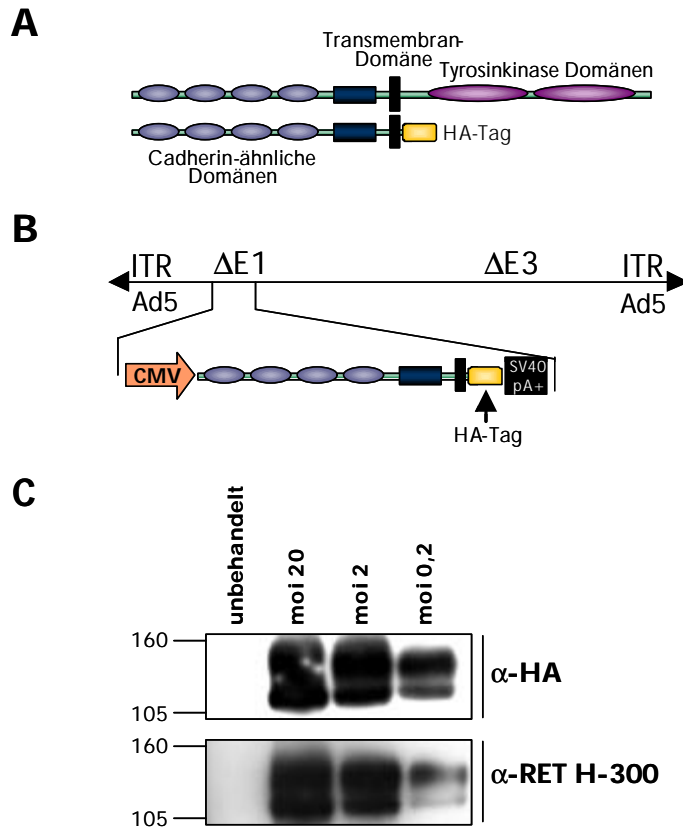
In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde demonstriert, dass GDNF-Stimulation einer neuronalen Vorläuferzelllinie über RET-vermittelte Signaltransduktion zur Inhibition von Proliferation und schließlich zu terminaler Differenzierung führt (Baldassarre *et al.*, 2002). Dieser Effekt konnte durch eine dominant-negative RET Mutante, die eine trunke Tyrosinkinase-Domäne aufweist, wieder aufgehoben werden. Diese RET Mutante dimerisiert mit aktiviertem RET an der Zelloberfläche, verhindert dadurch die RET *trans*-Autophosphorylierung und unterbindet schließlich RET-vermittelte Signaltransduktion. Im Weiteren sollte nun überprüft werden, ob die Expression dieser Tyrosinkinase-deletierten RET-Mutante (RET  $\Delta$ TK) in der Lage ist, das Wachstum von TT-Zellen zu inhibieren und zu untersuchen, welchen Mechanismen die potenzielle Inhibition unterliegt.

#### 3.4.1 Konstruktion und Überprüfung der RET DTK-Expression des Ad-Vektors Ad.CMV.RET DTK

Für die Expression der dominant-negativen Mutante RET  $\Delta$ TK wurden aus den zuvor genannten Gründen erneut Adenovirus-Vektoren verwendet. Um eine starke Inhibition der onkogenen RET Proteine in der TT-Zelllinie zu gewährleisten, wurde die Expression von RET  $\Delta$ TK unter die Kontrolle eines starken viralen (CMV) Promotors gestellt. Mit Hilfe dieses Promotors können äußerst hohe Transgen-Expressionsspiegel erreicht werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob potenzielle zytotoxische Effekte auf die TT-Zelllinie beschränkt sind.

Dazu wurde der extrazytoplasmatische Teil des *RET* Proto-Onkogens gemeinsam mit der Transmembran-Domäne mittels PCR aus der Wildtyp *RET* cDNA amplifiziert, wobei der

dominant-negativen Mutante RET  $\Delta$ TK zur Differenzierung von endogenem RET ein Hemagglutinin (HA)-Tag angehängt wurde (Abb. 3.16-A).



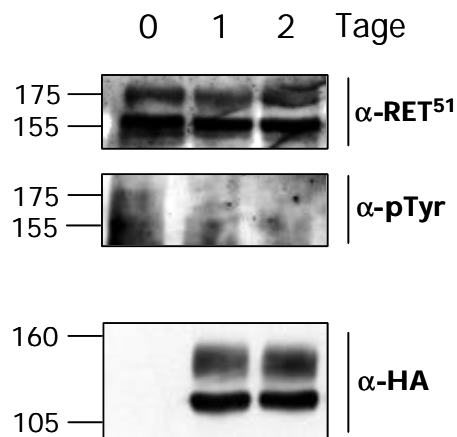
**Abbildung 3.16: Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK-vermittelte RET  $\Delta$ TK-Expression in H1299-Zellen.**

(A) Schematische Darstellung der dominant-negativen RET Proto-Onkogen Mutante RET  $\Delta$ TK. Das Wildtyp-RET Protein enthält 4 Cadherin-ähnliche Domänen im extrazellulären Bereich (oben). Neben der Cystein-reichen Region (grün) befindet sich die Transmembran-Domäne (schwarz). Im intrazellulären Bereich liegt eine interkalierte Tyrosinkinase Domäne vor. Die Mutante RET  $\Delta$ TK (unten) entspricht der Wildtyp RET-Form, mit Ausnahme der intrazellulären Region, in der sich ein Hemagglutinin-Tag (gelb) befindet. (B) Schematische Darstellung des Vektors Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK. Die RET  $\Delta$ TK cDNA wird unter der Kontrolle des CMV Promotors exprimiert und die Expression durch das SV40 Polyadenylierungssignal terminiert. Die Expressionskassette befindet sich in der deletierten E1-Region eines adenoviralen Vektors der ersten Generation (Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK). (C) Western Blot zur Überprüfung der viral-vermittelten Expression von RET  $\Delta$ TK in H1299 Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Infektionsmultiplizitäten (moi) infiziert, bzw. unbehandelt belassen, und die RET  $\Delta$ TK Expression mit Hilfe eines HA-Antikörpers (oben) und eines RET Antikörpers, der ein extrazelluläres Epitop erkennt (RET H-300; unten), sichtbar gemacht.

Diese cDNA (RET  $\Delta$ TK-HA) wurde zunächst in das adenovirale Shuttle-Plasmid pAdTrack.CMV kloniert. Anschließend wurde durch homologe Rekombination mit pAdEasy1 der adenovirale Vektor Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK erzeugt (Abb. 3.16-B). Zur Verifizierung der Ad Vektor-vermittelten RET  $\Delta$ TK-Expression wurden H1299-Zellen, die kein endogenes RET exprimieren, mit unterschiedlichen Infektionsmultiplizitäten (moi) des Vektors Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK infiziert und die RET  $\Delta$ TK Proteinspiegel 3 Tage nach Infektion durch Western Blot Analyse untersucht. Wie in Abbildung 3.16-C erkennbar, ist die dominant-negative Mutante in unbehandelten Zellen nicht nachweisbar. Durch Verwendung eines Antikörpers gegen den HA-Tag wird die Expression von RET  $\Delta$ TK nach Infektion der Zellen mit Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK als Doppelbande von ca. 135 bzw. 115 kDa sichtbar. Dabei führen steigende Verhältnisse von Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK in H1299-Zellen zu erheblich verstärkten 135 und 115 kDa-Banden. Mittels eines Antikörpers gegen ein extrazelluläres RET Epitop ( $\alpha$ -RET H-300) ergibt sich ein äquivalentes Bild im Western Blot (Abb. 3.16-C).

### 3.4.2 Dominant-negativer Effekt von Ad.CMV.RET $\Delta$ TK in TT-Zellen

In der Studie von Baldassarre *et al.* (2002) wurde demonstriert, dass die Co-Expression der dominant-negativen Mutante RET  $\Delta$ TK zur vollständigen Hemmung RET-bedingter Signaltransduktion durch Inhibition der *trans*-Autophosphorylierung führt. Mit Hilfe des im Zuge dieser Arbeit generierten Ad Vektors Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK sollte nun überprüft werden, ob ein solcher Effekt auch für das konstitutiv aktive onkogene RET in der TT-Zelllinie erzielt werden kann. Da TT-Zellen eine MEN2A-assoziierte Mutation des Codons 634 der Cystein-reichen Region tragen und demzufolge eine konstitutive Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne vorliegt, bestünde ein potenzieller Angriffspunkt zur Verhinderung onkogener Signaltransduktion durch viral-vermittelte Expression der dominant-negativen Mutante RET  $\Delta$ TK und der dadurch bedingten Reduktion der RET *trans*-Autophosphorylierung in TT-Zellen. Um zu überprüfen, inwieweit die RET *trans*-Autophosphorylierung durch Gentransfer von RET  $\Delta$ TK inhibiert werden kann, wurden TT-Zellen mit Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK infiziert und der zeitliche Verlauf des endogenen RET Phosphorylierungsstatus untersucht. Wie aus Abbildung 3.17 zu erkennen ist, bleibt die endogene RET Expression, hier dargestellt durch die Isoform RET<sup>51</sup>, in dieser Zeitspanne unverändert.



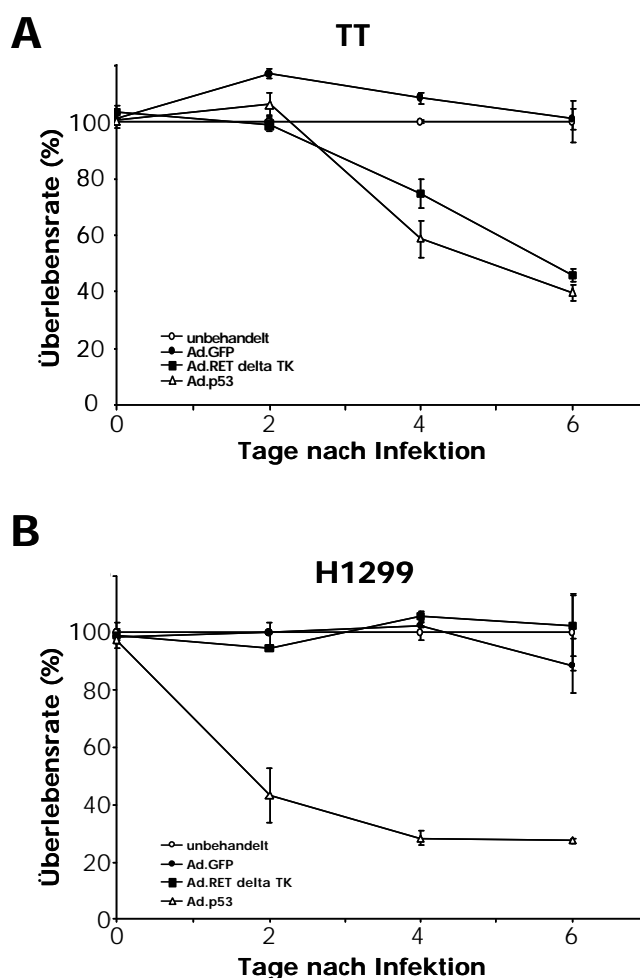
**Abbildung 3.17: Dominant-negativer Effekt von RET  $\Delta$ TK.** TT-Zellen wurden mit Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK infiziert und der Phosphorylierungsstatus endogener RET Proteine über einen Zeitraum von drei Tagen mittels Western Blot untersucht. Die Expressionsspiegel der endogenen Isoform RET<sup>51</sup> sind im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Der Tyrosin-Phosphorylierungsstatus dieser endogenen RET Proteine wurde mit Hilfe eines Phosphotyrosin (pTyr)-spezifischen Antikörpers sichtbar gemacht (Mitte). Weiterhin wurde die Expression der dominant-negativen Mutante durch einen HA-spezifischen Antikörper verifiziert (unten). Es wurden jeweils gleiche Mengen (75  $\mu$ g) an Gesamtproteinextrakt aufgetragen.

Durch Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch phosphorylierte Tyrosinreste in Proteinen erkennt, kann der Phosphorylierungsstatus der endogenen RET Proteine analysiert werden (Baldassarre *et al.*, 2002; Cosma *et al.*, 1998). In unbehandelten TT-Zellen ist damit eine Doppelbande bei 175 bzw. 155 kDa sichtbar, die den phosphorylierten RET Proteinen von 175 bzw. 155 kDa entspricht. 24 h bzw. 48 h nach Infektion mit Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK ist dagegen keine Phosphorylierung zu erkennen. Durch Verwendung eines HA-spezifischen Antikörpers wird ersichtlich, dass die dominant-negative Mutante RET  $\Delta$ TK zu diesem Zeitpunkt bereits stark exprimiert wird. Somit wird die endogene RET *trans*-Autophosphorylierung durch Expression der dominant-negativen RET Proto-Onkogen Mutante RET  $\Delta$ TK in TT-Zellen vollständig unterbunden.

### 3.4.3 Zytotoxische Eigenschaften von Ad.CMV.RET DTK

Da aus den vorangegangenen Untersuchungen ein hemmender Effekt auf das *trans*-Autophosphorylierungspotenzial endogener RET Proteine nach Gentransfer der dominant-negativen Mutante RET  $\Delta$ TK in TT-Zellen beobachtet wurde, zielten die weiteren Untersuchungen nun auf die Analyse des anti-proliferativen Potenzials dieser Mutante in Zellkultur. Dazu wurden TT-Zellen zunächst mit Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK infiziert und der Einfluss der RET  $\Delta$ TK-Expression auf die Vitalität der Zellen im MTT-Assay untersucht. Als Negativkontrolle diente auch hier Ad.CMV.GFP, um Virus-bedingte Nebeneffekte auszuschließen. Die Transduktion eines Ad-Vektors, der humanes Wildtyp-p53 Protein exprimiert, diente in diesem Fall als Positivkontrolle, da der zytotoxische Effekt dieses Proteins bereits in einer Reihe von Zelllinien und Tumormodellen nachgewiesen werden konnte (Pützer *et al.*, 1998). Wie aus Abbildung 3.18-A zu erkennen ist, weist keiner der eingesetzten Vektoren einen zytotoxischen Effekt innerhalb der ersten 48 h auf. Danach jedoch sinkt die Überlebensrate der mit Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK-behandelten TT-Zellen auf 74,68 % (Tag 4) bzw. 45,97 % (Tag 6). Die Applikation von Ad.CMV.p53 als Positivkontrolle führt ebenfalls zu deutlicher Toxizität (58,84 % Überleben nach 4 Tagen bzw. 39,84 % nach 6 Tagen). Die Transduktion von Ad.CMV.GFP hat keinen Einfluss auf die Vitalität von TT-Zellen.

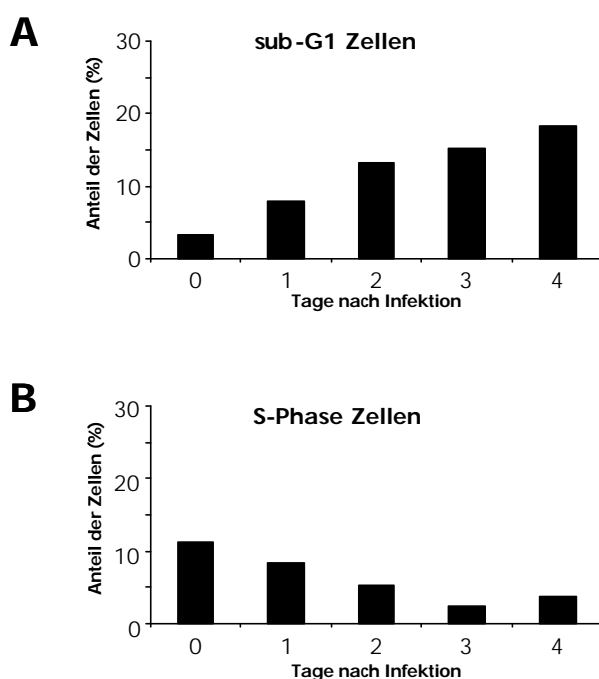
Um im Weiteren zu überprüfen, ob die Expression von RET  $\Delta$ TK, aufgrund des vorher gezeigten dominant-negativen Effektes, selektiv in MTC-Zellen, die onkogenes RET exprimieren, zu zytotoxischen Erscheinungen führt, wurden die Untersuchungen nun auf RET-negative H1299-Zellen ausgeweitet. In Übereinstimmung zu TT-Zellen hat die Infektion mit Ad.CMV.GFP keinerlei Auswirkungen auf das Überleben von H1299-Zellen (Abb. 3.18-B). Dagegen führt die Applikation von Ad.CMV.p53 zur rapiden Reduktion metabolisch aktiver Zellen: Nach 2 Tagen ist der Anteil an vitalen Zellen deutlich reduziert (43,28 %). Nach 4 Tagen sind schließlich nur noch 28,27 % metabolisch aktive Zellen vorhanden. Die Ad Vektor-vermittelte Expression von RET  $\Delta$ TK hat keinen Einfluss auf die Vitalität von H1299-Zellen (Abb. 3.18-B).



**Abbildung 3.18: Zytotoxische Eigenschaften der Applikation von Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK in TT-Zellen.** Die relative Zellvitalität von TT-Zellen (A) und H1299-Zellen (B) wurde in Intervallen von je 48 h mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Dargestellt sind die Auswirkungen nach Infektion mit Ad.CMV.GFP, Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK und Ad.CMV.p53 im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Allein die Inhibition der RET *trans*-Autophosphorylierung durch die dominant-negative Mutante RET  $\Delta$ TK führt demnach zu signifikantem Zelltod. Wie zuvor beschrieben (3.1.5 und 3.2.3), beruht ein wesentliches Merkmal der durch onkogenes RET aktivierten Signaltransduktionswege auf einer aktiven Hemmung apoptotischer Signale. Dabei steht vor allem die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges im Vordergrund (Segouffin-Cariou und Billaud, 2000). Des Weiteren spielt die Aktivierung mitogener Signaltransduktionswege in der neoplastischen Zelltransformation durch onkogene RET-Varianten eine wichtige Rolle (Takahashi, 2001). Im Folgenden wurden daher die der Toxizität zugrundeliegenden Mechanismen, insbesondere im Hinblick auf

eine mögliche Apoptose-Induktion bzw. Proliferationsreduktion, untersucht. Dazu wurden TT-Zellen mit Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK infiziert und das Verhältnis an Zellen in der sub-G1 Phase als Charakteristikum für Apoptose über einen Zeitraum von vier Tagen bestimmt (siehe 3.1.5). Parallel wurden die Zellen in der S-Phase durch Messung der BrdU-Inkorporation als Marker für Proliferation untersucht (Abb. 3.19-A und 3.19-B).



**Abbildung 3.19: Zellzyklusverteilung von TT-Zellen nach Infektion mit Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK.** TT-Zellen wurden mit Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK infiziert und der prozentuale Anteil an Zellen in der sub-G1-Phase (A) bzw. in der S-Phase (B) durch durchflusszytometrische Messung über einen Zeitraum von vier Tagen bestimmt. Die Charakterisierung der sub-G1 Proportion erfolgte durch Propidiumiodidfärbung, und die Zellen in der SPhase wurden durch BrdU-Inkorporation analysiert.



Unbehandelte Zellen wiesen dabei einen Anteil an sub-G1 Zellen von 3,37 % auf. Dieses Verhältnis stieg nach Infektion mit Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK kontinuierlich an (7,87 % nach 24 h und 13,27 % nach 48 h). Nach 3 bzw. 4 Tagen erhöhte sich der prozentuale Anteil an sub-G1 Zellen weiter auf 15,18 % bzw. 18,32 %. Diesen Ergebnissen nach kann also eine erhöhte Apoptoserate mit der beobachteten Zytotoxizität in Verbindung gebracht werden (Abb. 3.18-A).

Auf der anderen Seite befinden sich 11,32 % der unbehandelten TT-Zellen nach Bestimmung der BrdU-Inkorporation als Marker für aktiv proliferierende Zellen in der S-Phase (Abb. 3.18-B). Nach Infektion mit Ad.CMV.RET  $\Delta$ TK sinkt dieses Verhältnis bis zum 3. Tag auf 2,28 % , wonach es nahezu unverändert bleibt (3,55 % nach 4 Tagen). Somit scheint auch die Inhibition der Proliferation von TT-Zellen an der Reduktion der Zellvitalität beteiligt zu sein.

Die dominant-negative RET Mutante RET  $\Delta$ TK inhibiert demnach spezifisch die RET *trans*-Autophosphorylierung in TT-Zellen, wobei dadurch nicht nur eine erhöhte Apoptoserate, sondern auch eine Reduktion von aktiv proliferierenden Zellpopulationen auftritt. Diese toxischen Eigenschaften sind anhand dieser Ergebnisse selektiv auf die Inhibition von onkogenem RET in TT-Zellen zurückzuführen.

## 4 Diskussion

Durch das zunehmende Verständnis der molekularen Grundlagen von Tumorerkrankungen bietet die Technik der Gentherapie ein enormes Potenzial zur erfolgreichen Bekämpfung von Tumoren. Dabei liegen die Schwerpunkte auf der Entwicklung neuer Strategien, die das selektive Abtöten von Tumorzellen bewirken sollen oder zumindest eine Wachstumsarretierung herbeiführen. Zur Zeit zielen die meisten gentherapeutischen Ansätze (54 %) auf eine Steigerung der Immunantwort gegen Tumorantigene. Daneben beschäftigen sich eine wachsende Zahl vielversprechender Ansätze mit der selektiven Reduktion von Tumorzellen durch Transfer von Tumorsuppressorgenen (23 %) oder sogenannten Suizid-Genen (8 %) (McCormick, 2001). Aber nicht nur die Reaktivierung von Tumorsuppressionsmechanismen, sondern insbesondere auch das Blockieren von aktivierten Onkogenen verspricht in diesem Zusammenhang ein sinnvoller Ansatz in der Tumorthherapie zu sein.

Grundlegende Untersuchungen über die molekularen Ursachen von Tumorerkrankungen führten zu der Erkenntnis, dass durch Mutationen aktivierte Proto-Onkogene in besonderem Maße zur Tumorpherprogression beitragen können (Hanahan und Weinberg, 2000). Daraus folgt die logische Schlussfolgerung, dass die Inaktivierung eben dieser Onkogene mit Hilfe der Technik der Gentherapie ein lohnendes Ziel zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen sein kann. Wie erfolgreich diese Art der Tumor-Gentherapie in der Zukunft sein kann, zeigen eine Reihe von modellhaften Beispielen:

- (1) In Melanomen, die durch das Vorhandensein von onkogenem H-Ras entstanden sind, führt die Inhibition dieses Onkogens zu vollständigem Tumorrückgang durch Induktion apoptotischer Vorgänge innerhalb des Tumorgewebes (Chin *et al.*, 1999). Weiterhin konnte durch Verwendung eines H-Ras-spezifischen Ribozyms eine ausgeprägte Wachstumsinhibition sowie ein daraus resultierender Tumorrückgang in einem Blasenkrebs-Modell erzielt werden (Irie *et al.*, 1999). Durch Gentransfer einer dominant-negativen H-Ras-Mutante (N116Y) in verschiedene pankreatische Tumorzelllinien wurde ebenfalls eine signifikante Wachstumsinhibition bei gleichzeitiger Erhöhung der Apoptoserate beobachtet (Takeuchi *et al.*, 2000).
- (2) Zwei kürzlich veröffentlichte Studien demonstrierten darüber hinaus, dass die Verwendung von dominant-negativen Mutanten des *c-Met* Proto-Onkogens, das als Tyrosinkinase den Rezeptor für HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor) darstellt und in Ras-transformierten Zellen signifikant hochreguliert ist, zu

einer ausgeprägten Tumor-Wachstumshemmung und deutlicher Verminderung der Metastasierung in verschiedenen Tumormodellen führt (Firon *et al.*, 2000; Furge *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte ein sichtbarer Antitumoreffekt durch Inhibition der onkogenen Met-Variante M1268T, die homolog zur onkogenen RET Mutation M918T beim MEN2B-Syndrom und einer Reihe von sporadischen MTC-Fällen ist, durch Gentransfer von dominant-negativem Src erzielt werden (Nakaigawa *et al.*, 2000).

- (3) Die Inhibition onkogener Varianten der Rezeptor-Tyrosinkinasen ERBB2, das den Rezeptor für EGF (epidermal growth factor) darstellt, und ERBB4, als Rezeptor für Neuregulin, durch entsprechende Ribozyme, führt zur deutlichen Reduktion von Zellproliferation und erheblicher Hemmung des Tumorwachstums von Ovarial- und Mammakarzinom-Zelllinien (Lui *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 1999).

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Antitumorpotenzial von verschiedenen dominant-negativen Mutanten des *RET* Proto-Onkogens in einem Modell des medullären Schilddrüsenkarzinoms untersucht. Zum effizienten Transfer aller hier verwendeten dominant-negativen RET Mutanten (RET HSCR32, RET flag und RET  $\Delta$ TK) wurde daher auf adenovirale Vektoren der ersten Generation zurückgegriffen. Dabei wurde die Verfügbarkeit eines C-Zell selektiven Promotors genutzt, der die Transgen-Expression auf die Zielzellen beschränkt.

#### 4.1 Konstruktion C-Zell selektiver adenoviraler Vektoren

Adenovirale Vektoren stellen das derzeit effizienteste Gentransfersystem *in vivo* dar. Darüber hinaus weisen sie einige Charakteristika auf, die für die vorliegenden Untersuchungen notwendig bzw. von Vorteil waren: (1) Sie infizieren ein weites Spektrum an Zielzellen und -geweben; (2) sie lassen sich in außerordentlich hohen Titern vermehren; (3) die gentechnische Manipulation des adenoviralen Genoms ist vergleichsweise einfach; und (4) adenoviral-vermittelte Genexpression ist transient, da ihr Genom im Zuge einer Infektion als Episom in der Zelle persistiert (Benihoud *et al.*, 1999; Kay *et al.*, 2001; Vorbürger und Hunt, 2002).

Zur Regulation der Genexpression wurde auch im Hinblick auf eine spätere *in vivo* Anwendung der dominant-negativen RET Mutanten RET HSCR32 und RET flag ein C-Zell selektiver Promotor verwendet. Dieser Promotor (TSE2.CP1) besteht aus zwei hintereinander generierten Wiederholungen des gewebespezifischen Enhancers (TSE) in Kombination mit einem verkürzten CT/CGRP-(Calcitonin/Calcitonin-gene related

peptide) Promotor (Messina *et al.*, 2000). In transienten Reporteranalysen wurde damit eine deutlich erhöhte Aktivität sowie eine sichtbare Steigerung der Gewebespezifität im Vergleich zum natürlichen Calcitonin-Promotor offensichtlich, was besonders auch für die TT-Zelllinie als wichtigstem Modell des medullären Schilddrüsenkarzinoms gilt (Messina *et al.*, 2000).

In einer Reihe von Studien ist allerdings bereits im Vorfeld demonstriert worden, dass sowohl die Lage im adenoviralen Genom, als auch die genetische Beschaffenheit des Genom-Rückgrates die Selektivität und Expressionsstärke exogener Promotoren beeinflussen kann (Benihoud *et al.*, 1999). Speziell der E1A Enhancer, der besonders bei Erstgenerationsvektoren, die Transgene in der zuvor deletierten E1-Region beinhalten, zum Tragen kommt, sowie weitere regulatorische Sequenzen innerhalb des Ad-Genoms (u. a. die E4-Region) können starke Einflüsse auf die Spezifität von Promotoren ausüben (Armentano *et al.*, 1997; Rubinchik *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde die Spezifität des TSE2.CP1 Promotors im adenoviralen Kontext durch Reporteranalysen überprüft. Mit Hilfe eines zu diesem Zweck generierten Vektors (Ad.TSE2.CP1.GFP-LUC) zeigte sich hier zwar eine reduzierte Expressionsstärke im Vergleich zu transienten Studien (Messina *et al.*, 2000), aber die Spezifität blieb weiterhin gewährleistet. Dabei spiegeln die beobachteten Luciferase-Expressionslevel in diesem Zusammenhang nicht direkt die GFP-Expressionslevel wider (8,61 % gegenüber 23,17 % der CMV-Promotoraktivität). Da beide Proteine allerdings aus einer mRNA mit Hilfe der internen Ribosomeneingangssequenz (IRES) des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) generiert werden, steht dieser Sachverhalt im Einklang mit früheren Untersuchungen, die verdeutlichen, dass die mRNA stromabwärts der IRES mit geringerer Effizienz translatiert wird (Mizuguchi *et al.*, 2000). Prinzipiell veranschaulichen diese Ergebnisse jedoch, dass der TSE2.CP1 Promotor nur eine minimale Aktivität in den beiden Kontroll-Zelllinien aufweist, wohingegen deutliche Reporteraktivitäten in der TT-Zelllinie zu beobachten sind. Daraus kann die Schlussfolgerung abgeleitet werden, dass die Zielzell-Selektivität des TSE2.CP1-Promotors im Kontext des adenoviralen Genoms erhalten bleibt und der Einsatz dieses Promotors einen wichtigen Beitrag zur Sicherheit gentherapeutischer Ansätze in der MTC-Behandlung leisten kann.

Vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Spezifität konnten Yamazaki *et al.* (2002) erzielen. In dieser Studie wurde die Stärke des TSE2.CP1 Promotors nach Integration in das Adenovirus-Genom mit ca. 140 % der CMV Promotoraktivität in TT-Zellen beziffert. Eine derart hohe Promotorstärke konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden (23,17 % der CMV-Promotoraktivität in TT-Zellen). Diese Diskrepanz kann möglicherweise durch die erhöhte Virusdosis (100 moi) bei Yamazaki *et al.* (2002) erklärt werden. Bei Infektionsmultiplizitäten von > 10 moi wurde in eigenen

Beobachtungen eine ausgeprägte Virus-bedingte Toxizität sichtbar (nicht gezeigt), so dass für Transduktionen in TT-Zellen stets Infektionsmultiplizitäten von 6 moi gewählt wurden. Darüber hinaus wurden auf diese Weise Transduktionsraten von 100 % erreicht (nicht gezeigt).

#### **4.2 Dominant-negative Eigenschaften von RET HSCR32 und RET flag im MTC-Modell**

Der Gentransfer der dominant-negativen RET Mutanten RET HSCR32 und RET flag in TT-Zellen führte zur effizienten Retention onkogener RET Proteine im ER. Darüber hinaus wurde eine ausgeprägte Wachstumsinhibition von TT-Zellen beobachtet, die auf Apoptose-Induktion beruhte. Auch im MTC-Tiermodell konnte damit ein signifikanter anti-tumoraler Effekt erzielt werden.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Verifizierung des dominant-negativen Effekts der beschriebenen dominant-negativen RET Mutanten RET HSCR32 und RET flag in TT-Zellen. Cosma *et al.* (1998) demonstrierten, dass diese Mutanten aufgrund von Änderungen in der Aminosäureabfolge der Cadherin-ähnlichen Domäne 1 nicht glykosyliert werden können und in Folge dessen im ER verbleiben. Da diese Modifikationen der Aminosäureabfolge höchstwahrscheinlich, wie durch molekulare Modellierungsstudien der extrazellulären RET Domänen gezeigt werden konnte (Anders *et al.*, 2001), die Konformation der extrazellulären Region verändern, lassen ER-Qualitätskontrollmechanismen keinen Transport zur Zelloberfläche zu. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diesen Sachverhalt. Sowohl RET HSCR32 als auch RET flag sind nach adenoviralem Transfer in TT-Zellen nur intrazellulär nachzuweisen. Die dominant-negativen Eigenschaften dieser Mutanten beruhen nach Cosma *et al.* (1998) auf ihrer Fähigkeit, im ER mit onkogenen RET Mutanten zu dimerisieren und dadurch den Transport onkogener Proteine zur Zelloberfläche zu unterbinden. Der Gentransfer von RET HSCR32 und RET flag führte, wie erwartet, zum Ausbleiben onkogener RET Expression an der Zelloberfläche von TT-Zellen. Diese Resultate verdeutlichen, dass die subzelluläre Lokalisation von endogen exprimiertem onkogenen RET in TT-Zellen durch den Einsatz dominant-negativer RET Mutanten beeinflusst werden kann. Die daraus entstehenden funktionellen Konsequenzen wurden hier durch Bestimmung der intrinsischen RET Kinaseaktivität bestätigt. Nach Gentransfer von RET flag in TT-Zellen konnte keine intrinsische Kinaseaktivität detektiert werden, so dass die Retention von onkogenem RET im ER dafür verantwortlich gemacht werden kann. Auch Cosma *et al.* (1998) konnten zeigen, dass die Expression an der Zelloberfläche essentiell für die

Signaltransduktion MTC-assoziiertes RET Mutanten ist. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass onkogene Zelloberflächenrezeptoren nur bei Lokalisation in der Zellmembran in der Lage sind, nachfolgende Signaltransduktionskaskaden effektiv zu stimulieren, da viele Adapter- und Effektorproteine mit der Zellmembran verankert sind (Blume-Jensen und Hunter, 2001; Hunter, 1997; Porter und Vaillancourt, 1998; Schlessinger, 2000).

### **4.3 Stresssignale aus dem ER als Ursache der Apoptose-Induktion durch RET HSCR32: Implikationen zur Entstehung der Hirschsprung-Erkrankung**

Nach Gentransfer der dominant-negativen RET Mutanten RET HSCR32 und RET flag in TT-Zellen konnte in dieser Arbeit weiterhin eine deutliche Steigerung der Apoptoserate beobachtet werden. Dabei scheinen die bekannten Signaltransduktionswege, die durch onkogenes RET aktiviert werden, eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Segouffin-Cariou und Billaud (2000) konnten zwar zeigen, dass das onkogene Potenzial MTC-assoziiertes RET Mutanten mit der konstitutiven Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges, der für die Transduktion anti-apoptotischer bzw. Überlebensstimulierender Signale bekannt ist (Vivanco und Sawyers, 2002), einhergeht. Die in dieser Arbeit erzielten Resultate weisen aber auf einen alternativen Apoptose-Mechanismus hin, da, wie am Beispiel der RET HSCR32 Mutante verdeutlicht, die ektope Expression auch unabhängig vom zuvor demonstrierten dominant-negativen Effekt zur Apoptose-Induktion führt.

Die eigenen und die von Cosma *et al.* (1998) erzielten Daten weisen darauf hin, dass sowohl RET HSCR32 als auch RET flag im ER akkumulieren. Diese Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen im ER kann dabei prinzipiell bereits ein ausreichender Apoptose-Stimulus sein. Dieses Phänomen scheint vor allem bei der Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten zunehmende Bedeutung zu gewinnen. Syndrome wie  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Defizienz, Alzheimer-Erkrankung, Zystische Fibrose, von-Willebrand-Erkrankung, Chorea Huntington oder auch Diabetes insipidus können das Resultat einer Proteinakkumulation im ER und daraus entstehender Apoptose-Induktion sein (Kaufman, 1999; Kouroku *et al.*, 2002; Oyadomari *et al.*, 2002; Pahl, 1999; Rutishauser und Spiess, 2002).

Dabei induzieren die falsch gefalteten Proteine Stressantworten wie die „Unfolded Protein Response“ (UPR) und die „ER-Overload Response“ (EOR). Zunächst werden dabei ER Chaperone wie beispielsweise BiP/grp78 aktiviert und hochreguliert, um die korrekte Faltung der akkumulierenden Proteine einzuleiten. Die transkriptionelle

Induktion von BiP/grp78 wird dabei als spezifische Reaktion auf zunehmenden ER Stress gewertet (Kaufman *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 1997). Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, kommt es auch nach Expression von RET HSCR32 sowohl in TT-Zellen als auch in 293-Zellen zu einer BiP mRNA-Hochregulation. Weiterhin kann die Induktion einer ER Stressreaktion zur direkten Induktion von Apoptose führen. Daran kann zum einen die Aktivierung des JNK/SAPK-Signaltransduktionsweges beteiligt sein (Urano *et al.*, 2000). Zum anderen wird im Rahmen der ER Stress-spezifischen Apoptose die Hochregulation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors CHOP/gadd153 beobachtet. Die zielgerichtete Deletion dieses Faktors impliziert dabei eine direkte Beteiligung an der ER Stress-bedingten Apoptose (Wang *et al.*, 1996; Zinszner *et al.*, 1998). Auch die ektope Expression von RET HSCR32 führt den Ergebnissen dieser Arbeit nach zur CHOP/gadd153 Induktion auf Transkriptionsebene. Schließlich konnten Nakagawa *et al.* (2000) zeigen, dass die ER Stress-bedingte Apoptose, zumindest in murinen Zellsystemen, über die Aktivierung der im ER befindlichen Caspase-12 verläuft. Nach Expression von RET HSCR32 in TT-Zellen kann in diesem Zusammenhang eine Caspase-12 Induktion auf Proteinebene sowie die proteolytische Aktivierung beobachtet werden. Dennoch bleibt es zweifelhaft, ob die entsprechende humane Homologe der Caspase-12 eine ähnliche Funktion besitzt, da Fischer *et al.* (2002) kürzlich zeigen konnten, dass die humane Caspase-12 durch mehrere erworbene Mutationen nicht funktionell sein kann. Nichtsdestotrotz können die Beobachtungen als weiterer spezifischer Hinweis auf eine ER Stressinduktion gedeutet werden.

Da die *RET* Proto-Onkogen Mutation S32L natürlicherweise mit der Hirschsprung-Erkrankung assoziiert ist, liegt ein Zusammenhang zwischen der Apoptose-Induktion durch RET HSCR32 Expression und dem Phänotyp der Hirschsprung-Erkrankung nahe. Die Hirschsprung-Erkrankung ist u.a. durch das Fehlen von intrinsischen Ganglienzellen im Bereich des Kolons charakterisiert (Amiel und Lyonnet, 2001; Parisi und Kapur, 2000), so dass der Apoptose-Induktion durch RET HSCR32 möglicherweise eine völlig neue Bedeutung beikommt. Darüber hinaus beobachteten Bordeaux *et al.* (2000) ebenfalls gesteigerte Zytotoxizitätsraten nach Expression verschiedener anderer Hirschsprung-assoziiierter RET Mutanten in 293-Zellen. Möglicherweise kann daher ein bisher nicht in Betracht gezogener Mechanismus (aktive Apoptose-Induktion) zur Entstehung der Hirschsprung-Erkrankung beitragen. Ohne weiterführende Analysen kann diese Frage jedoch nicht abschließend beantwortet werden.

#### 4.4 Antitumor-Potenzial der dominant-negativen RET Mutante RET flag

Die einzige zur Zeit praktikable Therapie des medullären Schilddrüsenkarzinoms liegt in der chirurgischen Entfernung des neoplastischen Gewebes (Orlandi *et al.*, 2001). Gängige Krebstherapieförmlichkeiten wie z. B. Bestrahlung oder Chemotherapie haben sich in der Vergangenheit als nahezu unwirksam erwiesen (Vitale *et al.*, 2001). Daher können aus einer Vielzahl von Gründen insbesondere gentherapeutische Ansätze zu einer alternativen Behandlung werden (DeGroot und Zhang, 2001; Schmutzler und Koehle, 2000).

Obwohl die Apoptose-Induktion bei RET HSCR32 oder RET flag Expression den Ergebnissen dieser Arbeit nach nicht direkt auf eine Inhibition von onkogenem RET in TT-Zellen zurückzuführen war, konnte die Expression der Mutanten dennoch einen anti-tumoralen Effekt haben. Ein Ziel des vorliegenden Projektes war es demnach, das Antitumor-Potenzial der Mutante RET flag, exemplarisch für beide von Cosma *et al.* (1998) beschriebenen Mutanten, zu untersuchen.

Die Daten der *ex vivo*-Experimente verdeutlichten dabei, dass die Expression von RET flag in TT-Zellen zur Protektion vor Tumorwachstum führt. Aufgrund der zuvor beobachteten pro-apoptotischen Eigenschaften von RET flag sind *ex vivo*-infizierte Zellen, wie erwartet, nicht in der Lage, einen Tumor auszubilden. In Folge dessen wurde das Antitumor-Potenzial dieser Mutante in einem *in vivo*-Ansatz untersucht. Dabei wurde ein signifikanter Wachstums-inhibierender bzw. lebensverlängernder Effekt sichtbar. Eine vollständige Reduktion des Tumorgewebes konnte allerdings nur in 10 % aller Fälle erreicht werden. Dies kann mit einer niedrigen *in vivo*-Transduktionseffizienz erklärt werden, da durch die intratumorale Applikation des Vektors höchstwahrscheinlich nur ein geringer Teil der Zellen im soliden Tumorgewebe angesprochen wurde. Die Distribution der viralen Partikel innerhalb des soliden Tumorgewebes stellt somit einen limitierenden Faktor für Gentherapieansätze dar, die auf Apoptose-Induktion in Tumorzellen zielen. Offensichtlich führt der Gentransfer von RET flag nicht zum Auftreten sogenannter Bystander Effekte. Im Gegensatz dazu konnten Minemura *et al.* (2000) einen sichtbaren Bystander Effekt nach Gentransfer der Herpes simplex-Virus Thymidinkinase (HSV-TK) mit begleitender Applikation von Ganciclovir in einem Ratten MTC-Modell beobachten. In diesem Fall beruht der Bystander Effekt auf interzellulärer Kommunikation durch „gap junctions“ (Yang *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde ebenfalls ein Bystander Effekt, der auf Produktion und intratumoraler Verteilung von NO zurückzuführen ist, nach Gentransfer der NO-Synthase II (iNOS) im MTC-Modell sichtbar (Soler *et al.*, 2000). Dem stehen bei der Behandlung von MTCs eine Reihe von gentherapeutischen Ansätzen gegenüber, die auf eine Stimulation der Immunantwort



gegen Tumorantigene durch Gentransfer von Interleukin-2 oder Interleukin-12 beruhen und vielversprechende Resultate zeigen (Lausson *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 1998; Zhang und DeGroot, 2000). Die Kombination aus immunstimulatorischen Ansätzen und dem Gentransfer von Suizid-Genen verspricht dabei auch eine sinnvolle Alternative zu sein (Soler *et al.*, 1999).

Zur Zeit scheinen solche Ansätze Vorteile gegenüber dem Gentransfer von proapoptischen Genen zu besitzen, da es bei Transfer Apoptose-induzierender Gene von großer Wichtigkeit ist, eine hohe *in vivo*-Transduktionsrate zu erreichen, solange kein begleitender Bystander Effekt auftritt. Um das Problem einer niedrigen Transduktionseffizienz und damit einer geringen Tumorreduktionsrate zu umgehen, könnten zukünftig sogenannte „Re-Targeting“-Ansätze erfolgversprechend sein, wobei Zielzell-selektive Effekte nicht nur über spezifische Promotoren, sondern insbesondere über Modifikationen der Vektor-Beschaffenheit, die die selektive Transduktion der Zielzellen verbessern (z. B. Modifikation des Fiber-Proteins), erreicht werden sollen (Wickham, 2000). Dies würde die Erhöhung der Vektordosis bei einmaliger Applikation erlauben, so dass die Transduktionsrate, auch bei systemischer Verabreichung des Vektors, deutlich gesteigert werden könnte. Weiterhin wäre dies auch ein wichtiger Schritt in Richtung einer Reduktion von Virus-bedingter Toxizität in Organen wie z. B. der Leber, die im Rahmen einer systemischen Applikation adenoviraler Vektoren vermehrt betroffen sind (Benihoud *et al.*, 1999; Kay *et al.*, 2001; Vorburger und Hunt, 2002).

#### **4.5 TT-Zellwachstum ist abhängig von der konstitutiven Aktivität onkogener RET Mutanten**

Zuvor wurde gezeigt, dass onkogenes RET in TT-Zellen erfolgreich durch die Expression der dominant-negativen Mutanten RET HSCR32 und RET flag inhibiert werden konnte. Die darüber hinaus zu beobachtende Toxizität der beiden Mutanten ließ jedoch keine Rückschlüsse auf direkte Folgen der RET Inhibition zu, da die Mutanten eine vom dominant-negativen Effekt unabhängige pro-apoptische Wirkung aufwiesen. Aus diesem Grund wurde im vorliegenden Projekt eine weitere dominant-negative RET Mutante (RET  $\Delta$ TK) auf ihre anti-tumorale Wirkung im MTC-Modell hin untersucht. Da Baldassarre *et al.* (2002) in der Lage waren, stabile RET  $\Delta$ TK-exprimierende Zellklone zu generieren, bestand die begründete Annahme, dass die ektopische Expression von RET  $\Delta$ TK nicht zu einer vom dominant-negativen Effekt unabhängigen proapoptischen Wirkung führt. Darüber hinaus weist diese Mutante keine Änderung in

der Aminosäureabfolge der extrazellulären Region auf, so dass ER Stress-bedingte Nebeneffekte auszuschließen waren. Nach Baldassarre *et al.* (2002) dimerisiert die dominant-negative Mutante RET  $\Delta$ TK, die eine Deletion der gesamten intrazellulären Tyrosinkinase Domäne aufweist, mit onkogenen RET Mutanten in der Zellmembran und verhindert somit nicht nur die RET Autophosphorylierung sondern im Wesentlichen auch die Aktivierung nachfolgender Signaltransduktionskaskaden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, wie auch die von Baldassarre *et al.* (2002) erzielten Resultate, legen dar, dass das Autophosphorylierungspotenzial onkogener RET Mutanten durch Co-Expression von RET  $\Delta$ TK vollständig unterdrückt werden kann. Dieses Potenzial ist jedoch von essentieller Notwendigkeit für die onkogene Signaltransduktion MTC-assoziiierter RET Mutanten (Blume-Jensen und Hunter, 2001; Takahashi, 2001; Van Weering und Bos, 1998). Der Gentransfer von RET  $\Delta$ TK erlaubt somit, direkte Auswirkungen nach Inhibition von onkogenem RET zu beobachten. Wie hier verdeutlicht werden konnte, führt die Inhibition der onkogenen RET *trans*-Autophosphorylierung zu signifikant reduziertem Wachstum von TT-Zellen. Da keine Wachstumsreduktion bzw. Toxizität nach Gentransfer von RET  $\Delta$ TK in RET-negative H1299-Zellen sichtbar war, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Reaktion in TT-Zellen die Folge einer spezifischen RET Inhibition ist. In diesem Zusammenhang konnten Cohen *et al.* (2002) zeigen, dass die Inhibition der RET *trans*-Autophosphorylierung durch niedermolekulare Kinase-Inhibitoren (STI571, Genistein) ebenfalls mit einer ausgeprägten Inhibition des Zellwachstums in TT-Zellen einhergeht. Vergleichbare Resultate lieferte die Verwendung von ZD6474, einem oral applizierbaren Tyrosinkinase-Inhibitor, sowohl in medullären als auch in papillären Schilddrüsenkarzinommodellen (Carlomagno *et al.*, 2002). Parthasarathy *et al.* (1999) demonstrierten weiterhin, dass ein gegen onkogenes RET (C634R Mutation) gerichtetes Ribozym spezifisch das Koloniewachstum von RET C634R-transformierten NIH3T3-Fibroblasten hemmt. Durch zwei kürzlich veröffentlichte Studien wird die Bedeutung der RET *trans*-Autophosphorylierung für die Aktivierung onkogener Signaltransduktionswege weiter unterstrichen: (1) Durch Co-Transfektion der Protein-Tyrosinphosphatase SHP1 wird nicht nur das Autophosphorylierungspotenzial onkogener RET Mutanten aufgehoben, sondern auch die nachfolgende Stimulation der Ras/ERK- und PI3K/Akt-Signaltransduktionswege signifikant unterdrückt (Hennige *et al.*, 2001). (2) Nach Expression der Protein-Tyrosinphosphatase LAR (Leukocyte Common Antigen) kommt es zu deutlich verminderter Akt Phosphorylierung durch Inhibition der RET *trans*-Autophosphorylierung von MEN2A-abgeleiteten RET Mutanten (Qiao *et al.*, 2001).

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die zu beobachtende Zytotoxizität nach Inhibition der onkogenen RET *trans*-Autophosphorylierung in erster Linie auf eine signifikant erhöhte Apoptoserate zurückzuführen war. Daneben war

zusätzlich eine leichte Reduktion der Proliferationsrate offensichtlich. Diese Resultate verdeutlichen in Übereinstimmung mit Segouffin-Cariou und Billaud (2000), dass hauptsächlich anti-apoptotische Signale für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps durch onkogen aktiviertes RET verantwortlich sind. Diese anti-apoptotischen Signale werden dabei durch den PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg vermittelt, dessen Aktivierung essentiell für die Zelltransformation durch onkogenes RET ist (Segouffin-Cariou und Billaud, 2000). Einige bekannte anti-apoptotische Ziele, die durch die Serin/Threonin-Kinase Akt aktiviert werden, liegen in der Phosphorylierung von Bad (Datta *et al.*, 1997), der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FKHR (Brunet *et al.*, 1999), der Stabilisierung von NF- $\kappa$ B (Romashkova und Makarov, 1999) oder auch der Destabilisierung von p53 (Mayo und Donner, 2001). Auch die beobachtete Reduktion der Proliferationsrate kann durch die Inhibition des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges erklärt werden. So kann Akt beispielsweise den Abbau von Cyclin D1, das eine wichtige Rolle beim G1/S-Phasenübergang spielt, verhindern (Diehl *et al.*, 1998) oder auch Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren wie p27 (KIP1) oder p21 (WAF1/CIP1) negativ beeinflussen (Graff *et al.*, 2000).

Die im vorliegenden Projekt erhobenen Daten weisen zusammenfassend darauf hin, dass der Einsatz der dominant-negativen RET Mutante RET  $\Delta$ TK einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der RET-induzierten Tumorigenese leisten kann, da nach Gentransfer in onkogenes RET-exprimierende Zellen Auswirkungen auf die selektive Inhibition von onkogenem RET offensichtlich werden. Im Zellkulturmodell ist dies allein schon ausreichend, um Tumorzellwachstum erfolgreich zu inhibieren, so dass der Inhibition von onkogen aktiviertem RET in der Zukunft eine große Bedeutung beikommen kann. Insbesondere bei Verbesserung der zuvor angesprochenen *in vivo*-Transduktionsraten kann der Gentransfer dominant-negativer *RET* Proto-Onkogen Mutanten eine wichtige Alternative zur gegenwärtigen Standardbehandlung beim MTC, der Thyroidektomie (Vitale *et al.*, 2001), werden.

#### 4.6 Ausblick: Perspektiven und Anwendungspotenziale dominant-negativer *RET* Proto-Onkogen Mutanten

Die Inhibition von onkogen aktiviertem RET durch dominant-negative Mutanten bringt eine Reihe zukünftiger Perspektiven mit sich:

- (1) Dass dominant-negative *RET* Proto-Onkogen Mutanten das Potenzial aufweisen, in der Zukunft eine sinnvolle Alternative zur aktuellen Standardtherapie des medullären Schilddrüsenkarzinoms, dem chirurgischen Eingriff (Vitale *et al.*, 2001), darstellen könnten, wurde in dieser Arbeit demonstriert. Um allerdings ausgeprägtere Antitumor-Wirkungen zu entfalten, müsste die *in vivo* Transduktionseffizienz verbessert werden, da nur in erfolgreich transduzierten Zellen onkogene RET Proteine inhibiert werden können, so dass es zur Apoptose-Induktion kommt. Die bisher vielversprechendsten Ansätze zur Erhöhung der *in vivo*-Transduktionseffizienz stellen dabei Modifikationen des Virus-Tropismus dar (Wickham, 2000). So könnten die Zielzellen, wie hier die C-Zellen der Schilddrüse, selektiv transduziert werden. Daneben bietet der Einsatz des C-Zell-selektiven Promotors TSE2.CP1 weitere Möglichkeiten zur Reduktion Virus-bedingter Toxizität.
- (2) Dominant-negative *RET* Proto-Onkogen Mutanten beinhalten weiterhin das Potenzial, nicht nur einen Beitrag zur Therapie des medullären Schilddrüsenkarzinoms zu leisten, sondern darüber hinaus ihr Wirkungsspektrum auch auf das papilläre Schilddrüsenkarzinom auszuweiten, da dieses ebenfalls durch onkogene RET Mutationen (RET/PTC) gekennzeichnet ist. Da die RET/PTC Onkogene gleichermaßen intrazellulär dimerisieren und ihre Wirkung unabhängig von einer Expression an der Zelloberfläche entfalten können (Jhiang, 2000), versprechen insbesondere diejenigen dominant-negativen Mutanten ein entsprechendes Resultat, die die Expression von onkogenem RET durch Dimerisierung im ER unterbinden können. Ein solcher Ansatz wurde bisher noch nie verfolgt, könnte aber nach eingehenden *in vitro* Untersuchungen erfolgversprechend sein.
- (3) Einen besonders wichtigen Beitrag können dominant-negative *RET* Proto-Onkogen Mutanten jedoch für das weitere Verständnis der molekularen Grundlagen der Tumorigenese des medullären Schilddrüsenkarzinoms leisten. Besonders da über 95 % aller medullären Schilddrüsenkarzinome onkogene RET Mutationen aufweisen, kann die Inhibition von konstitutiv aktiviertem RET

weiteres Licht in die zentralen Mechanismen der RET-induzierten Tumorigenese bringen.

- (4) Durch weitere Untersuchungen bezüglich der Apoptose-Induktion nach Expression HSCR-assoziiierter RET Mutanten kann u. U. ein Beitrag zu Etablierung eines neuen Mechanismus der Hirschsprung-Erkrankung geleistet werden. Der Funktionsverlust HSCR-assoziiierter RET Mutationen ist hinlänglich bekannt (Pasini *et al.*, 1995). Eine aktive Apoptose-Induktion durch falsch gefaltete Proteine, wie sie auch bei einer Reihe anderer Erkrankungen beobachtet wurde (z. B.  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Defizienz, Alzheimer-Erkrankung, Zystische Fibrose, von-Willebrand-Erkrankung, Chorea Huntington oder auch Diabetes insipidus), wurde bislang für die Hirschsprung-Erkrankung noch nicht in Betracht gezogen.

## 5 Zusammenfassung

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 zur konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinase, was hier eine entscheidende Bedeutung für die Tumorentstehung hat.

Die Inhibition onkogener *RET* Mutanten kann daher eine alternative Strategie in der MTC-Therapie darstellen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es demnach, das Antitumor-Potenzial verschiedener dominant-negativer Mutanten des *RET* Proto-Onkogens in einem humanen MTC-Modell zu untersuchen. Zum effizienten Gentransfer wurde auf adenovirale Vektoren zurückgegriffen. Um die Expression der dominant-negativen Mutanten auf die Zielzellen zu beschränken, wurde ein synthetischer Calcitonin-Promotor (TSE2.CP1) verwendet. 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. Dies konnte durch Western Blot Analysen und Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. 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. Dabei konnte hier erstmals demonstriert werden, dass dieser pro-apoptotische Effekt unabhängig vom zuvor bestätigten dominant-negativen Effekt war, denn allein die Expression von *RET* HSCR32 und *RET* flag genügte als Apoptose-Stimulus. Schließlich konnte mit ER-Stress spezifischen Signalen die Ursache für die aktive Apoptose-Induktion identifiziert werden. Aufgrund der extrazytoplasmatischen Mutationen akkumulieren diese Mutanten im ER und aktivieren dadurch Apoptose-relevante Mechanismen.

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. Zunächst wurde

dabei gezeigt, dass RET flag-exprimierende TT-Zellen (*ex vivo* infiziert) bei subkutaner Injektion in Nacktmäuse nicht zu Tumoren auswuchsen. Daraufhin wurde untersucht, inwieweit eine einzelne Injektion RET flag-kodierender Ad-Vektoren in etablierte Tumore eine Therapie für MTCs darstellen kann. 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 unabhängig von ihren dominant-negativen Eigenschaften war, wurde abschließend das Antitumor-Potenzial einer Tyrosinkinase-deletierten RET Mutante (RET  $\Delta$ 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  $\Delta$ 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.

## 6 Literatur

- Acton, D.S., Velthuyzen, D., Lips, C.J.M. und Höppener, J.W.M. (2000).** Multiple endocrine neoplasia type 2B mutation in human RET proto-oncogene induces medullary thyroid carcinoma in transgenic mice. *Oncogene* **19**, 3121-3125.
- Airaksinen, M.S. und Saarma, M. (2002).** The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* **3**, 383-394.
- Airaksinen, M.S., Titievsky, A., and Saarma, M. (1999).** GDNF family neurotrophic factor signalling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* **13**, 313-325.
- Alberti, L., Borrello, M.G., Ghizzoni, S., Torriti, F., Rizzetti, M.G. und Pierotti, M.A. (1998).** Grb2 binding to the different isoforms of Ret tyrosine kinase. *Oncogene* **17**, 1079-1087.
- Amiel, J. und Lyonnet, S. (2001).** Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J Med Genet* **38**, 729-739.
- Anders, J., Kjaer, S. und 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**, 35808-35817.
- Arighi, E., Alberti, L., Torriti, F., Ghizzoni, S., Rizzetti, M.G., Pelicci, G., Pasini, B., Bongarzone, I., Piutti, C., Pierotti, M.A. und Borrello, M.G. (1997).** Identification of Shc docking site on Ret tyrosine kinase. *Oncogene* **14**, 773-782.
- Armentano, D., Zabner, J., Sacks, C., Sookdeo, C.C., Smith, M.P., St George, J.A., Wadsworth, S.C., Smith, A.E. und Gregory, R.J. (1997).** Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors. *J Virol* **71**, 2408-2416.
- Asai, N., Iwashita, T., Matsuyama, M. und Takahashi, M. (1995).** Mechanism of activation of ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutation. *Mol Cell Biol* **15**, 1613-1619.
- Asai, N., Murakami, H., Iwashita, T. und Takahashi, M. (1996).** A mutation at tyrosine 1062 in MEN2A-Ret and MEN2B-Ret impairs their transforming activity and association with Shc adapter proteins. *J Biol Chem* **271**, 17644-17649.
- Bachelot, A., Lombardo, F., Baudin, E., Bidart, J.M. und Schlumberger, M. (2002).** Inheritable forms of medullary thyroid carcinoma. *Biochimie* **84**, 61-66.
- Baldassarre, G., Bruni, P., Boccia, A., Salvatore, G., Melillo, R.M., Motti, M.L., Napolitano, M., Belletti, B., Fusco, A., Santoro, M. und Viglietto, G. (2002).** Glial cell line-derived neurotrophic factor induces proliferative inhibition of NT2/D1 cells through RET-mediated up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *Oncogene* **21**, 1739-1749.



- Benihoud, K., Yeh, P. und Perricaudet, M. (1999).** Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 440-447.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. und Ron, D. (2000).** Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326-332.
- Blume-Jensen, P. und Hunter, T. (2001).** Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355-365.
- Bocciardi, R., Mograbi, B., Pasini, B., Borrello, M.G., Pierotti, M.A., Bourget, I., Fischer, S., Romeo, G. und Rossi, B. (1997).** The multiple endocrine neoplasia type 2B point mutation switches the specificity of the Ret tyrosine kinase towards cellular substrates that are susceptible to interact with Crk and Nck. *Oncogene* **15**, 2257-2265.
- Bockhorn, M., Frilling, A., Kalinin, V., Schroder, S. und Broelsch, C.E. (2000).** Absence of H- and K-Ras oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **108**, 49-53.
- Bordeaux, M.C., Forcet, C., Granger, L., Corset, V., Bidaud, C., Billaud, M., Bredesen, D.E., Ederly, P. und Mehlen, P. (2000).** The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J* **19**, 4056-4063.
- Borrello, M.G., Pelicci, G., Arighi, E., DeFillipis, L., Greco, A., Bongarzone, I., Rizzetti, M.G., Pelicci, P.G. und Pierotti, M.A. (1994).** The oncogenic versions of the ret and trk tyrosine kinases bind Shc and Grb2 adapter proteins. *Oncogene* **9**, 1661-1668.
- Borrello, M.G., Smith, D.P., Pasini, B., Bongarzone, I., Greco, A., Lorenzo, M.J., Arighi, E., Miranda, C., Eng, C., Alberti, L., Bocciardi, R., Mondellini, P., Scopsi, L., Romeo, G., Ponder, B.A.J. und Pierotti, M.A. (1995).** RET activation by germline MEN2A and MEN2B mutations. *Oncogene* **11**, 2419-2427.
- 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. und Pierotti, M.A. (1996).** The full oncogenic activity of Ret/ptc2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase *Cy*. *Mol Cell Biol* **16**, 2151-2163.
- Borrello, M.G., Mercalli, E., Perego, C., Degl'Innocenti, D., Ghizzoni, S., Arighi, E., Eroini, B., Rizzetti, M.G. und Pierotti, M.A. (2002).** Differential interaction of Enigma protein with the two RET isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 515-522.
- Brockmann, D., Schäfer, D., Kirch, H.C. und Esche, H. (1996).** Repression of c-Jun-induced mouse major histocompatibility class I promoter (H-2K<sup>b</sup>) activity by the Adenovirus type 12-unique 52R E1A protein. *Oncogene* **12**, 1715-1725.

- Brunet, A., Bonni, A., Zigmund, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. und Greenberg, M.E. (1999).** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868.
- Capes-Davis, A. und Robinson, B.G. (1999).** Return of the native: deducing the normal function of the RET proto-oncogene. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* **6**, 61-69.
- Carlomagno, F., Salvatore, D., Santoro, M., de Franciscis, V., Quadro, L., Panariello, L., Colantuoni, V. und Fusco, A. (1995).** Point mutation of the RET proto-oncogene in the TT human medullary thyroid carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 1022-1028.
- Carlomagno, F., De Vita, G., Berlingieri, M.T., de Franciscis, V., Melillo, R.M., Colantuoni, V., Kraus, M.H., Di Fiore, P.P., Fusco, A., und Santoro, M. (1996).** Molecular heterogeneity of RET loss of function in Hirschsprung's disease. *EMBO J* **15**, 2717-2725.
- Carlomagno, F., Salvatore, G., Cirafici, A.M., De Vita, G., Melillo, R.M., de Franciscis, V., Billaud, M., Fusco, A. und Santoro, M. (1997).** The different RET-activating capability of mutations of cysteine 620 or cysteine 634 correlates with multiple endocrine neoplasia type 2 disease phenotype. *Cancer Res* **57**, 391-395.
- Carlomagno, F., Vitagliano, D., Guida, T., Ciardiello, F., Tortora, G., Vecchio, G., Ryan, A.J., Fontanini, G., Fusco, A. und Santoro, M. (2002b).** ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. *Cancer Res* **62**, 7284-7290.
- Carrasquillo, M.M., McCallion, A.S., Puffenberger, E.G., Kashuk, C.S., Nouri, N. und Chakravarti, A. (2002).** Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nat Genet* **32**, 237-244.
- Carter, M.T., Yome, J.L., Marcil, M.N., Martin, C.A., Vanhorne, J.B. und Mulligan, L.M. (2001).** Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function. *Cytogenet Cell Genet* **95**, 169-176.
- Chappuis-Flament, S., Pasini, A., De Vita, G., Segouffin-Cariou, C., Fusco, A., Attie, T., Lenoir, G.M., Santoro, M. und Billaud, M. (1998).** Dual effect on the RET receptor of MEN2A mutations affecting specific extracytoplasmic cysteines. *Oncogene* **17**, 2851-2861.
- Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., Horner, J.W., Cordon-Cardo, C., Yancopoulos, G.D. und DePinho, R.A. (1999).** Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* **400**, 468-472.

- Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veljuona, M.A. und Hardwick, J.M. (1998).** Modulation of cell death by Bcl-xL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 554-559.
- Cohen, M.S., Hussain, H.B. und Moley, J.F. (2002).** Inhibition of medullary thyroid carcinoma cell proliferation and RET phosphorylation by tyrosine kinase inhibitors. *Surgery* **132**, 960-967.
- Cory, S. und Adams, J.M. (2002).** The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-656.
- Cosma, M.P., Panariello, L., Quadro, L., Dathan, N.A., Fattoruso, O. und Colantuoni, V. (1996).** A mutation in the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease affects the tyrosine kinase activity associated with multiple endocrine neoplasia type 2A and 2B. *Biochem J* **314**, 397-400.
- Cosma, M.P., Cardone, M., Carlomagno, F. und Colantuoni, V. (1998).** Mutations in the extracellular domain cause RET loss of function by a dominant-negative mechanism. *Mol Cell Biol* **18**, 3321-3329.
- Coulpier, M., Anders, J. und Ibanez, C. (2002).** Coordinated activation of autophosphorylation sites in the RET receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* **277**, 1991-1999.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. und Greenberg, M. (1997).** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241.
- Decker, R.A. und Peacock, M.L. (1997).** Update on the profile of multiple endocrine neoplasia type 2a RET mutations. *Cancer* **80**, 557-568.
- DeGroot, L.J. und Zhang, R. (2001).** Clinical review 131. Gene therapy for thyroid cancer: Where do we stand? *J Clin Endocrinol Metabol* **86**, 2923-2928.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. und Sherr, C.J. (1998).** Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**, 3499-3511.
- Don, H.P., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. und Mattick, J.S. (1991).** 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* **19**, 4008.
- Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K.M., Toshima, K., Lairmore, T.C., Howe, J.R., Moley, J.F., Goodfellow, P. und Wells Jr, S.A. (1993).** Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN2A and FMTC. *Hum Mol Genet* **2**, 851-856.
- Ederly, P., Lyonnet, S., Mulligan, L., Pelet, A., Dow, E., Abel, L., Holder, S., Nihoul-Fekete, C., Ponder, B.A.J. und Munnich, A. (1993).** Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* **367**, 378-380.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Katsuya, O., Iwamatsu, A. und Nagata, S. (1998).** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50.

- Eng, C. (1999).** RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol* **17**, 380-393.
- Ferri, K.H. und Kroemer, G. (2001).** Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **3**, E255-E263.
- Firon, M., Shaharabany, M., Altstock, R.T., Horev, J., Abramovici, A., Resau, J.H., Vande Woude, G.F. und Tsarfaty, I. (2000).** Dominant-negative Met reduces tumorigenicity-metastasis and increases tubule formation in mammary cells. *Oncogene* **19**, 2386-2397.
- Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L. und Tschachler, E. (2002).** Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 722-726.
- Furge, K.A., Kiewlich, D., Le, P., Vo, M.N., Faure, M., Howlett, A.R., Lipson, K.E., Vande Woude, G.F., and Webb, C.P. (2001).** Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10722-10727.
- Geneste, O., Bidaud, C., De Vita, G., Hofstra, R.M.W., Tartare-Deckert, S., Buys, C.H.C.M., Lenoir, G.M., Santoro, M. und Billaud, M. (1999).** Two distinct mutations of the RET receptor causing Hirschsprung's disease impair the binding of signalling effectors to a multifunctional docking site. *Hum Mol Genet* **8**, 1989-1999.
- Gimm, O. (2001).** Thyroid cancer. *Cancer Lett* **163**, 143-156.
- Gluzman, Y. (1981).** SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182.
- Graff, J.R., Konicek, B.W., McNulty, A.M., Wang, Z., Houck, K., Allen, S., Paul, J.D., Hbaisu, A., Goode, R.G., Sandusky, G.E., Vassella, R.L. und Neubauer, B.L. (2000).** Increased Akt activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem* **275**, 24500-24505.
- Graham, F.L. und Prevec, L. (1991).** Manipulation of adenovirus vectors. In *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols*. E.J. Murray ed. (The Humana Press, Inc., Clifton, N.J.)Vol. 7, 109-128
- Graham, F.L., Smiley, J., Russel, W.C., and Nairn, R. (1977).** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-72.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000).** The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. und Hunter, T. (1988).** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.
- Hansford, D. und Mulligan, L.M. (2000).** Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* **37**, 817-827.

- Hayashi, H., Ichihara, M., Iwashita, T., Murakami, H., Shimono, Y., Kawai, K., Kurokawa, K., Murakumo, Y., Imai, T., Funahashi, H., Nakao, A. und Takahashi, M. (2000).** Characterisation of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oncogene* **19**, 4469-4475.
- Hazard, J.B. (1977).** The C-cells (parafollicular cells) of the thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. *J Pathol* **88**, 213-250.
- He, T.C., Zhou, S., Da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1998).** A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2509-2514.
- Heldin, C.H. (1995).** Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**, 213-223.
- Hennige, A.M., Lammers, R., Höppner, W., Arlt, D., Strack, V., Teichmann, R., Machicao, F., Ullrich, A., Häring, H.U. und Kellerer, M. (2001).** Inhibition of Ret oncogene activity by the protein tyrosine phosphatase SHP1. *Endocrinology* **143**, 4441-4447.
- Herfarth, K.K.F., Wick, M.R., Marshall, H.N., Gartner, E., Lum, S. und Moley, J.F. (1997).** Absence of TP53 alterations in pheochromocytomas and medullary thyroid carcinomas. *Genes Chromosom Cancer* **20**, 24-29.
- Hitt, M.M., Bett, A.J., Prevec, L. und Graham, F.L. (1994).** Construction and propagation of human adenovirus vectors. In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. J.E. Celis, ed. (Academic Press, San Diego) 479-490.
- Hitt, M.M., Addison, C.L. und Graham, F.L. (1997).** Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. In *Advances in Pharmacology*. T. August, ed. (Academic Press, San Diego) 40, 137-206.
- Hitt, M.M. und Graham, F.L. (2000).** Adenovirus vectors for human gene therapy. *Adv Virus Res* **55**, 479-505.
- Hoff, A.O., Cote, G.J und Gagel, R.F. (2000).** Multiple endocrine neoplasias. *Annu Rev Physiol* **62**, 377-411.
- Hofstra, R.M.W., Landsvater, R.M., Ceccherini, I., Stulp, R.P., Stelwagen, T., Luo, Y., Pasini, B., Höppener, J.W.M., van Amstel, H.K., Romeo, G., Lips, C.J. und Buys, C.H. (1994).** A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* **367**, 375-376.
- Hundahl, S.A., Fleming, I.D., Fremgen, A.M. und Menck, H.R (1998).** A national cancer data base report on 53856 cases of thyroid carcinoma treated in the US 1985-1995. *Cancer* **83**, 2638-2648.
- Hunter, T. (1997).** Oncoprotein networks. *Cell* **88**, 333-346.
- Igney, F.H. und Krammer, P.H. (2002).** Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**, 277-288.

- Irie, A., Anderegg, B., Kashani-Sabet, M., Ohkwawa, T., Suzuki, T., Halks-Miller, M., Curiel, D.T. und Scanlon, K.J. (1999). Therapeutic efficacy of an adenovirus-mediated anti-H-Ras ribozyme in experimental bladder cancer. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**, 341-349.
- Ishizaka, Y., Itoh, F., Tahira, T., Ikeda, I., Sugimura, T., Tucker, J., Fertitta, A., Carrano, A.V. und Nagao, M. (1989). Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene* **4**, 1519-1521.
- Ito, S., Iwashita, T., Asai, N., Murakami, H., Iwata, Y., Sobue, G. und Takahashi, M. (1997). Biological properties of Ret with cysteine mutations correlate with multiple endocrine neoplasia type 2A, familial medullary thyroid carcinoma, and Hirschsprung's disease phenotype. *Cancer Res* **57**, 2870-2872.
- Iwashita, T., Asai, N., Murakami, H., Matsuyama, M. und Takahashi, M. (1996a). Identification of tyrosine residues that are essential for transforming activity of the ret proto-oncogene with MEN2A or MEN2B mutation. *Oncogene* **12**, 481-487.
- Iwashita, T., Murakami, H., Asai, N. und Takahashi, M. (1996b). Mechanism of Ret dysfunction by Hirschsprung mutations affecting its extracellular domain. *Hum Mol Genet* **5**, 1577-1580.
- Iwashita, T., Kurokawa, K., Qiao, S., Murakami, H., Asai, N., Kawai, K., Hashimoto, M., Watanabe, T., Ichihara, M. und Takahashi, M. (2001). Functional analysis of RET with Hirschsprung mutations affecting its kinase domain. *Gastroenterology* **121**, 24-33.
- Jarpe, M.B., Widmann, C., Knall, C., Schlesinger, T.K., Gibson, S., Yujiri, T., Fanger, G.F., Gelfand, E.W. und Johnson, G.L. (1998). Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: Checkpoints and stop signs along the road to death. *Oncogene* **17**, 1475-1482.
- Jarvis, W.D., Turner, A.J., Povirk, L.F., Traylor, R.S. und Grant, S. (1994). Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res* **54**, 1707-1714.
- Jhiang, S.M. (2000). The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* **19**, 5590-5597.
- Kalejta, R.F., Shenk, T. und Beavis, A.J. (1997). Use of a membrane-localized green fluorescent protein allows simultaneous identification of transfected cells and cell cycle analysis by flow cytometry. *Cytometry* **29**, 286-291.
- Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational control. *Genes Dev* **13**, 1211-1233.
- Kaufman, R.J., Scheuner, D., Schröder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C.Y. und Arnold, S.M. (2002). The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 411-421.

- Kawai, K., Iwashita, T., Murakami, H., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Kusakabe, M., Ono, K., Iida, K., Nakayama, A. und Takahashi, M. (2000).** Tissue-specific carcinogenesis in transgenic mice expressing the RET proto-oncogene with a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Cancer Res* **60**, 5254-5260.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C. und Naldini, L. (2001).** Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* **7**, 33-40.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Jimbo, A., Kikuchi, T., Yamagata, T., Momoi, M.Y., Kominami, E., Kuida, K., Sakamaki, K., Yonehara, S. und Momoi, T. (2002).** Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. *Hum Mol Genet* **11**, 1505-1515.
- Kumar, S. (1999).** Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1060-1066.
- Kurokawa, K., Iwashita, T., Murakami, H., Hayashi, H., Kawai, K. und Takahashi, M. (2001).** Identification of SNT/FRS2 docking site on RET receptor tyrosine kinase and its role for signal transduction. *Oncogene* **20**, 1929-1938.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landsvater, R.M., Mathew, C.G., Smith, B.A., Marcus, E.M., te Meerman, G.J., Lips, C.J., Geerdink, R.A., Nakamura, Y., Ponder, B.A. und Buys, C.H. (1989).** Development of multiple endocrine neoplasia type 2A does not involve substantial deletions of chromosome 10. *Genomics* **4**, 246-250.
- Lausson, S., Volle, G.E., Bourges, M., Pidoux, E., Borrel, C., Milhaud, G., Moukhtar, M.S., Jullienne, A. und Treilhou-Lahille, F. (1995).** Calcitonin secretion, C cell differentiation and proliferation during spontaneous development of murine medullary thyroid carcinoma. *Virchows Arch* **426**, 611-617.
- Lausson, S., Fournes, B., Borrel, C., Milhaud, G. und Treilhou-Lahille, F. (1996).** Immune response against medullary thyroid carcinoma (MTC) induced by parental and/or interleukin-2-secreting MTC cells in a rat model of human medullary thyroid carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* **43**, 116-123.
- Lee, D.C.W., Chan, K.W. und Chan, S.Y. (2002).** RET receptor tyrosine kinase isoforms in kidney function and disease. *Oncogene* **21**, 5582-5592.
- Leone, S.S., Horoszewicz, J.S., Shimaoka, K., Friedman, M., Kawinski, E., Song, M.J., Zeigel, R, Chu, T.M., Baylin, S. und Mirand, E.A. (1981).** A new cell line for study of human medullary thyroid carcinoma. In *Advances in thyroid neoplasia*. Andreoli, M., Monaco, F., Robbins, J., eds. Rome: Field Educational Italia, 95-108.
- Liu, X., Vega, Q.C., Decker, R.A., Pandey, A., Worby, C.A. und Dixon, J.E. (1996).** Oncogenic RET receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities. *J Biol Chem* **271**, 5309-5312.
- Lui, V.W., He, Y. und Huang, L. (2001).** Specific down-regulation of HER-2/neu mediated by a chimeric U6 hammerhead ribozyme results in growth inhibition of human ovarian carcinoma. *Mol Ther* **3**, 169-177.

- Ma, Y., Brewer, J.W., Diehl, J.A. und Hendershot, L.M. (2002).** Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* **318**, 1351-1365.
- Manie, S., Santoro, M., Fusco, A. und Billaud, M. (2001).** The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet* **17**, 580-589.
- Marshall, G.M., Peaston, A.E., Hocker, J.E., Smith, S.A., Hansford, L.M., Tobias, V., Norris, M.D., Haber, M., Smith, D.P., Lorenzo, M.J., Ponder, B.A.J. und Hancock, J.F. (1997).** Expression of multiple endocrine neoplasia 2B RET in neuroblastoma cells alters cell adhesion in vitro, enhances metastatic behaviour in vivo and activates Jun kinase. *Cancer Res* **57**, 5399-5405.
- Mathew, C.G.P., Chin, K.S., Easton, D.F., Thorpe, K., Carter, C., Liou, G.I., Fong, S.L., Bridges, C.D.B., Haak, H., Nieuwenhuijzen, A.C., Kruseman, S., Schifter, S., Hansen, H.H., Telenius, H., Telenius-Berg, M und Ponder, B.A.J. (1987).** A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature* **328**, 527-528.
- Mayo, L.D. und Donner, D.B. (2001).** A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 11598-11603.
- McCormick, F. (2001).** Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer* **1**, 130-141.
- Melillo, R.M., Carlomagno, F., De Vita, G., Formisano, P., Vecchio, G., Fusco, A., Billaud, M. und Santoro, M. (2001a).** The insulin receptor substrate (IRS)-1 recruits phosphatidylinositol 3-kinase to Ret: evidence for a competition between Shc and IRS-1 for binding to Ret. *Oncogene* **20**, 209-218.
- Melillo, R.M., Santoro, M., Ong, S.H., Billaud, M., Fusco, A., Hadari, Y.R., Schlessinger, J. und Lax, I. (2001b).** 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**, 4177-4187.
- Messina, M., Yu, D.M.T., Learoyd, D.L., Both, G.W., Molloy, P.L. und Robinson, B.G. (2000).** High level, tissue-specific expression of a modified calcitonin/calcitonin gene-related peptide promoter in a human medullary thyroid carcinoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* **164**, 219-224.
- Michiels, F.M., Chappuis, S., Caillou, B., Pasini, A., Talbot, M., Monier, R., Lenoir, G.M., Feunteun, J. und Billaud, M. (1997).** Development of medullary thyroid carcinoma in transgenic mice expressing the RET proto-oncogene altered by a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 3330-3335.
- Minemura, K., Takeda, T., Minemura, K., Nagasawa, T., Zhang, R., Leopardi, R. und DeGroot, L.J. (2000).** Cell-specific induction of sensitivity to ganciclovir in medullary thyroid carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase. *Endocrinology* **141**, 1814-1822.



- Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E. und Hayakawa, T. (2000).** IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* **1**, 376-382.
- Mori, K. (2000).** Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**, 451-454.
- Morris, J.A., Dorner, A.J., Edwards, C.A., Hendershot, L.M. und Kaufman, R.J. (1997).** Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J Biol Chem* **272**, 4327-4334.
- Mulligan, L.M., Kwok, J.B.J., Healey, C.S., Elsdon, M.J., Eng, C., Gardner, E., Love, D.R., Mole, S.E., Moore, J.K., Papi, L., Ponder, M.A., Telenius, H., Tunnacliffe, A. und Ponder, B.A.J. (1993).** Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* **363**, 548-560.
- Mulligan, L.M., Eng, C., Healey, C.S., Clayton, D., Kwok, J.B., Gardner, E., Ponder, M.A., Frillingh, A., Jackson, C.E., Lehnert, H., Neumann, H.P.H., Thibodeau, S.N. und Ponder, B.A.J. (1994).** Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN2A and FMTC. *Nat Genet* **6**, 70-74.
- Mullis, K., Falcoona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* : The polymerase chain reaction. *Quant Biol* **51**, 263-273.
- Murakami, H., Iwashita, T., Asai, N., Iwata, Y., Narumiya, S. und Takahashi, M. (1999).** Rho-dependent and -independent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin and p130<sup>Cas</sup> mediated by Ret kinase. *Oncogene* **18**, 1975-1982.
- Murakami, H., Yamamura, Y., Shimono, Y., Kawai, K., Kurokawa, K. und Takahashi, M. (2002).** Role of Dok1 in cell signaling mediated by RET tyrosine kinase. *J Biol Chem* **277**, 32781-32790.
- Myers, S.M., Eng, C., Ponder, B.A.J. und Mulligan, L.M. (1995).** Characterisation of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C terminus for RET. *Oncogene* **11**, 2039-2045.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. und Yuan, J. (2000).** Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature* **403**, 98-103.
- Nakaigawa, N., Weirich, G., Schmidt, L. und Zbar, B. (2000).** Tumorigenesis mediated by MET mutant M1268T is inhibited by dominant-negative Src. *Oncogene* **19**, 2996-3002.
- Nelkin, B.D., Nakamura, Y., White, R.W., de Bustros, A.C., Herman, J., Wells Jr, S.A. und Baylin, S.B. (1989).** Low incidence of loss of chromosome 10 in sporadic and hereditary human medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* **49**, 114-119.

- Orlandi, F., Caraci, P., Mussa, A., Saggiorato, E., Pancani, G. und Angeli, A. (2001).** Treatment of medullary thyroid carcinoma: an update. *Endocr Relat Cancer* **8**, 135-147.
- Ormerod, M.G. (1998).** The study of apoptotic cells by flow cytometry. *Leukemia* **12**, 1013-1025.
- Oyadomari, S., Araki, E. und Mori, M. (2002).** Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells. *Apoptosis* **7**, 335-345.
- Pahl, H.L. (1999).** Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol Rev* **79**, 683-701.
- Pandey, A., Duan, H., Di Fiore, P.P. und Dixit, V.M. (1995).** The Ret receptor tyrosine kinase associates with the SH2-containing adapter protein Grb10. *J Biol Chem* **270**, 21461-21463.
- Pandey, A., Liu, X., Dixon, J.E., Di Fiore, P.P. und 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**, 10607-10610.
- Parisi, M.A. und Kapur, R.P. (2000).** Genetics of Hirschsprung disease. *Curr Opin Pediatr* **12**, 610-617.
- Parthasarathy, R., Cote, G.J. und Gagel, R.F. (1999).** Hammerhead ribozyme-mediated inactivation of mutant RET in medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* **59**, 3911-3914.
- Pasini, B., Borrello, M.G., Greco, A., Bongarzone, I., Luo, Y., Mondellini, P., Alberti, L., Miranda, C., Arighi, E., Bocciardi, R., Seri, M., Barone, V., Radice, M.T., Romeo, G. und Pierotti, M.A. (1995).** Loss of function effect of RET mutations causing Hirschsprung disease. *Nat Genet* **10**, 35-40.
- Pelet, A., Geneste, O., Edery, P., Pasini, A., Chappuis, S., Attie, T., Munnich, A., Lenoir, G., Lyonnet, S. und Billaud, M. (1998).** Various mechanisms cause RET-mediated defects in Hirschsprung disease. *J Clin Invest* **101**, 1415-1423.
- Ponder, B.A. und Smith, D. (1996).** The MEN II syndromes and the role of the ret proto-oncogene. *Adv Cancer Res* **70**, 179-222.
- Porter, A.C. und Vaillancourt, R.R. (1998).** Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* **17**, 1343-1352.
- Pützer, B.M., Hitt, M., Muller, W.J., Emtage, P., Gauldie, J. und Graham, F.L. (1997).** Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10889-10894.
- Pützer, B.M., Bramson, J.L., Addison, C.L., Hitt, M., Siegel, P.M., Muller, W.J. und Graham, F.L. (1998).** Combination therapy with interleukin-2 and wild-type p53 expressed by adenoviral vectors potentiates tumor regression in a murine model of breast cancer. *Hum Gene Ther* **9**, 707-718.
- Pützer, B.M., Stiewe, T., Crespo, F. und Esche, H. (2000).** Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. *Gene Ther* **7**, 1317-1325.

- Qiao, S., Iwashita, T., Furukawa, T., Yamamoto, M., Sobue, G. und Takahashi, M. (2001).** Differential effects of leukocyte common antigen-related protein on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant proteins. *J Biol Chem* **276**, 9460-9467.
- Randolph, G.W., und Maniar, D. (2000).** Medullary carcinoma of the thyroid. *Cancer Control* **7**, 253-261.
- Reynolds, L., Jones, K., Winton, D.J., Cranston, A., Houghton, C., Howard, L., Ponder, B.A.J. und Smith, D.P. (2001).** C-cell and thyroid epithelial tumors and altered follicular development in transgenic mice expressing the long isoform of MEN 2A RET. *Oncogene* **20**, 3986-3994.
- Robinson, D.R., Wu, Y.M. und Lin, S.F. (2000).** The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548-5557.
- Romashkova, J.A. und Makarov, S.S. (1999).** NF- $\kappa$ B is a target of Akt in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**, 86-90.
- Rubinchik, S., Lowe, S., Jia, Z., Norris, J. und Dong, J. (2001).** Creation of a new transgene cloning site near the right ITR of Ad5 results in reduced enhancer interference with tissue-specific and regulatable promoters. *Gene Ther* **8**, 247-253.
- Rutishauser, J. und Spiess, M. (2002).** Endoplasmic reticulum storage diseases. *Swiss Med Wkly* **132**, 211-222.
- Sakahira, H., Enari, M. und Nagata, S. (1998).** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Santoro, M., Carlomagno, F., Romano, A., Bottaro, D.P., Dathan, N.A., Grieco, M., Fusco, A., Vecchio, G., Matoskova, B., Kraus, M.H. und Di Fiore, P.P. (1995).** Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* **267**, 381-383.
- Salvatore, D., Melillo, R.M., Monaco, C., Visconti, R., Fenzi, G., Vecchio, G., Fucso, A. und Santoro, M. (2001).** Increased in vivo phosphorylation of Ret tyrosine 1062 is a potential pathogenic mechanism of multiple endocrine neoplasia type 2B. *Cancer Res* **61**, 1426-1431.
- Schlessinger, J. (2000).** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.
- Schmutzler, C. und Koehrle, J. (2000).** Innovative strategies for the treatment of thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* **143**, 15-24.
- Schuchardt, A.; D'Agati, V.; Larsson-Blomberg, L.; Costantini, F.; und Pachnis, V. (1994).** Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* **367**, 380-383.

- Segouffin-Cariou, C. und Billaud, M. (2000).** Transforming ability of MEN2A-RET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway. *J Biol Chem* **275**, 3568-3576.
- Sherr, C.J. (2001).** The INK4a/ARF network in tumor suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 731-737.
- Simpson, N.E., Kidd, K.K., Goodfellow, P.J., McDermid, H., Myers, S und Kidd, J.R. (1987).** Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature* **328**, 528-530.
- Smith-Hicks, C.L., Sizer, K.C., Powers, J.F., Tischler, A.S. und Costantini, F. (2000).** C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. *EMBO J* **19**, 612-622.
- Soler, M.N., Milhaud, G., Lekmine, F., Treilhou-Lahille, F., Klatzmann, D. und Lausson, S. (1999).** Treatment of medullary thyroid carcinoma by combined expression of suicide and interleukin-2 genes. *Cancer Immunol Immunother* **48**, 91-99.
- Soler, M.N., Bobe, P., Benihoud, K., Lemaire, G., Roos, B.A. und Lausson, S. (2000).** Gene therapy of rat medullary thyroid cancer by naked nitric oxide synthase II DNA injection. *J Gene Med* **2**, 344-352.
- Suzuki, T., Anderegg, B., Ohkawa, T., Irie, A., Engebraaten, O., Halks-Miller, M., Holm, P.S., Holm, P.S., Curiel, D.T., Kashani-Sabet, M. und Scanlon, K.J. (2000).** Adenovirus-mediated ribozyme targeting HER-2/neu inhibits in vivo growth of breast cancer cells. *Gene Ther* **7**, 241-248.
- Tahira, T., Ishizaka, Y., Itoh, F., Sugimura, T. und Nagao, M. (1990).** Characterisation 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. und Cooper, G.M. (1985).** Activation of a novel transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* **42**, 581-588.
- Takahashi, M. und Cooper, G.M. (1987).** Ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **7**, 1378-1385.
- Takahashi, M., Buma, Y., Iwamoto, T., Inahuna, Y., Ikeda, H. und Hiai, H. (1988).** Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* **3**, 571-578.
- Takahashi, M., Buma, Y und Hiai, H. (1990).** Isolation of ret proto-oncogene cDNA with an amino-terminal signal sequence. *Oncogene* **4**, 805-806.
- Takahashi, M., Buma, Y. und Taniguchi, M. (1991).** Identification of the ret proto-oncogene products in neuroblastoma and leukemia cells. *Oncogene* **6**, 297-301.
- Takahashi, M., Iwashita, T., Santoro, M., Lyonnet, S., Lenoir, G.M. und Billaud, M. (1999).** Co-segregation of MEN2A and Hirschsprung's disease: the same mutation of RET with both gain and loss-of-function? *Hum Mutat* **13**, 331-336.
- Takahashi, M. (2001).** The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 361-373.

- Takeuchi, M., Shichinohe, T., Senmaru, N., Miyamoto, M., Fujita, H., Takimoto, M., Kondo, S., Katoh, H. und Kuzumaki, N. (2000).** The dominant negative H-ras mutant, N116Y, suppresses growth of metastatic human pancreatic cancer cells in the liver of nude mice. *Gene Ther* **7**, 518-526.
- Tang, C.K., Concepcion, X.Z., Milan, M., Gong, X., Montgomery, E. und Lippman, M.E. (1999).** Ribozyme-mediated down-regulation of ErbB-4 in estrogen receptor-positive breast cancer cells inhibits proliferation both in vitro and in vivo. *Cancer Res* **59**, 5315-5322.
- Tsui-Pierchala, B.A., Ahrens, R.C., Crowder, R.J., Milbrandt, J. und Johnson, E.M., Jr. (2002).** The long and short isoform of ret function as independent signaling complexes. *J Biol Chem* **277**, 34618-34625.
- Urano, F., Wang, X.Z., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P. und Ron, D. (2000).** Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**, 664-666.
- van den Hoff, M.J., Moorman, A.F. und Lamers, W.H. (1992).** Electroporation in intracellular buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Res* **20**, 2902.
- van Weering, D.H.J. und Bos, J.L. (1998).** Signal transduction by the receptor tyrosine kinase RET. *Rec Res Canc Res* **154**, 271-281.
- van Weering, D.H.J., Moen, T., Braakman, I., Baas, P.D. und Bos, J.L. (1998).** Expression of the receptor tyrosine kinase Ret on the plasma membrane is dependent on calcium. *J Biol Chem* **273**, 12077-12081.
- Vitale, G., Caraglia, M., Ciccarelli, A., Lupoli, G., Abbruzzese, A., Tagliaferri, P. und Lupoli, G. (2001).** Current approaches and perspectives in the therapy of medullary thyroid carcinoma. *Cancer* **91**, 1797-1808.
- Vivanco, I. und Sawyers, C.L. (2002).** The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489-501.
- Vorburger, S.A. und Hunt, K.K. (2002).** Adenoviral Gene Therapy. *Oncologist* **7**, 46-59.
- Wang, X.Z., Lawson, B., Brewer, J.W., Zinszner, H., Sanjay, A., Mi, L.J., Boorstein, R., Kreibich, G., Hendershot, L.M. und Ron, D. (1996).** Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol* **16**, 4273-4280.
- Wickham, T.J. (2000).** Targeting adenovirus. *Gene Ther* **7**, 110-114.
- Worby, C.A., Vega, Q.C., Zhao, Y., Chao, H.H.J., Seasholtz, A.F. und 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**, 23619-23622.
- Yane, K., Konishi, N., Kitahori, Y., Naito, H., Koaichi, K., Ohnishi, T., Miyahara, H., Matsunaga, T. und Hiasa, Y. (1996).** Lack of p16/CKDN2 alterations in thyroid carcinomas. *Cancer Lett* **101**, 85-92.

- Yang, L., Chiang, Y., Lenz, H.J., Danenberg, K.D., Spears, C.P., Gordon, E.M., Anderson, W.F. und Parekh, D. (1998).** Intercellular communication mediated the bystander effect during herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir-based gene therapy of human gastrointestinal tumor cells. *Human Gene Ther* **9**, 719-728.
- Yamazaki, M., Zhang, R., Straus, F.H., Messina, M., Robinson, B.G., Hashizume, K. und DeGroot, L.J. (2002).** Effective gene therapy for medullary thyroid carcinoma using recombinant adenovirus inducing tumor-specific expression of interleukin-12. *Gene Ther* **9**, 64-74.
- Zabel, M. und Grzeszkowiak, J. (1997).** Characterization of thyroid medullary carcinoma TT cell line. *Histol Histopathol* **12**, 283-289.
- Zhang, R., Baunoch, D. und DeGroot, L.J. (1998).** Genetic immunotherapy for medullary thyroid carcinoma: destruction of tumors in mice by in vivo delivery of adenoviral vector transducing the murine interleukin-2 gene. *Thyroid* **12**, 1137-1146.
- Zhang, R. und DeGroot, L.J. (2000).** Genetic immunotherapy of established tumours with adenoviral vectors transducing murine interleukin-12 (mIL12) subunits in a rat medullary thyroid carcinoma model. *Clin Endocrinol* **52**, 687-694.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X.Z., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L. und Ron, D. (1998).** CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic retikulum. *Genes Dev* **12**, 982-995.

## Danksagungen

Ich danke an erster Stelle Frau Priv.-Doz. Dr. Dr. Brigitte Pützer für die Überlassung des Themas, ihre sachliche Diskussionsbereitschaft, ihr großes Interesse am Fortgang der Arbeit und der Möglichkeit, viele eigene Ideen in das Projekt mit einzubringen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Esche für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Darüber hinaus danke ich Dr. Thorsten Stiewe für die hilfreichen Tipps gerade zu Beginn dieser Arbeit. Für die nette Zusammenarbeit in Raum 37 in den letzten Jahren möchte ich mich bei Dr. Susanne Rega, Michael Lowak, Dr. Florian Rödicker, Jens Stanelle, Dae-In Chang, Andreas Tulipan und Miriam Böckmann bedanken. Für ihre Unterstützung bei vielen alltäglichen Arbeiten danke ich unseren ehemaligen und jetzigen technischen Mitarbeitern Sonja Zimmermann, Gabi Hessler, Carmen Theseling und Bärbel Pollmeier.

Herrn Klaus Lennartz danke ich für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie und Herrn Peter Babioch für seine Unterstützung bei der Laser-Scanning-Mikroskopie.

Weiterhin danke ich Silvia Davis für alle administrativen Dinge während der Promotion sowie allen weiteren Mitgliedern des Instituts für Molekularbiologie, die in irgendeiner Form zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen haben. Auch der AG III des Instituts für Zellbiologie sei für die gelegentliche Nutzung einiger Geräte gedankt.

Mein Dank gilt insbesondere auch Frau Prof. Dr. A. Frilling für ihre Kooperation und ihr Interesse an der Arbeit.

Schließlich danke ich noch Patricia Rodríguez López, Jan Pohle, Thomas Domroese sowie nicht zuletzt auch meinen Eltern für ihre hilfreiche Unterstützung.

---

## Lebenslauf

<b>Persönliche Daten</b>	Matthias Drost Braunschweiger Str. 21 45145 Essen geboren am 27.07.1973 in Recklinghausen ledig
<b>Schulbildung</b>	1980 – 1984 Westerbach-Grundschule in Oer-Erkenschwick 1984 – 1993 Städt. Gymnasium in Oer-Erkenschwick, Abitur
<b>Studium</b>	1993 – 1999 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität- Bochum Studienabschluss: Diplom Thema der Diplomarbeit: „Identifizierung aquatischer Bakterien durch 16S rDNA Sequenzierung und Herstellung von art- spezifischen 16S rDNA-Sonden.“ seit 1999 Dissertation am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen
<b>Berufliche Tätigkeit</b>	1998 – 1999 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen der Ruhr- Universität Bochum 1999 – 2000 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen seit 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen



## Publikationen

**M. Drosten**, A. Frilling, T. Stiewe, und B. M. Pützer. (2002). A new therapeutic approach in MTC treatment: Inhibition of oncogenic RET signalling by Ad vector-mediated expression of a dominant-negative RET mutant. *Surgery* **132** (6), 991-997.

**M. Drosten**, T. Stiewe, und B. M. Pützer. Antitumor Capacity of a Dominant-Negative *RET* Proto-Oncogene Mutant in a Medullary Thyroid Carcinoma Model. *Human Gene Ther*, im Druck.

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Gentherapeutische Intervention beim medullären Schilddrüsenkarzinom durch adenoviral vermittelte Expression dominant-negativer *RET* Proto-Onkogen Mutanten“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Matthias Drostens befürworte.

Essen, den 10.02.2003

Priv.-Doz. Dr. Dr. B. Pützer

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 10.02.2003

Matthias Drostens

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 10.02.2003

Matthias Drostens