

Julia Czech

Dr. med.

Somatische Mutationen im Codon 918 des *RET*-Protoonkogen beim sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinom

Geboren am 17.10.1972 in Karlsruhe

Reifeprüfung am 22.05.1992 in Karlsruhe

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/93 bis WS 1998/99

Physikum am 29.08.1994 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg und Schaffhausen (Schweiz)

Staatsexamen am 21.05.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. T. Schilling

Spezifische Keimbahnmutationen im *RET*-Protoonkogen sind verantwortlich für die verschiedenen Syndrome der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 und für einige Fälle von Morbus Hirschsprung. In sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen findet sich häufig somatisch diejenige Mutation, die als Keimbahnmutation die MEN 2B verursacht. Es handelt sich hierbei um eine Punktmutation im Exon 16, Codon 918. Einige Studien erbrachten Hinweise darauf, dass das Auftreten der Codon 918 Mutation beim sporadischen MTC mit einer höheren Tumorrezidivrate assoziiert ist. Außerdem zeigte sich, dass die Mutation heterogen in den Tumoren verteilt sein kann. Wir wollten nun in einer retrospektiven Studie die *RET* Codon 918 Mutation in sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen bestimmen und untersuchen, wie sie innerhalb eines Tumors verteilt ist und ob ein Zusammenhang zwischen ihrem Auftreten und einer schlechteren Prognose, insbesondere einer kürzeren Überlebenszeit besteht.

Hierzu isolierten wir Tumor-DNA aus paraffin-eingebettetem Gewebe und vervielfältigten anschließend mittels PCR das *RET* Exon 16. Dieses wurde einer weiteren, modifizierenden PCR unterworfen. Dabei wurde mittels eines speziellen Primers eine Punktmutation in den DNA-Abschnitt eingeführt, so dass sich in Anwesenheit der *RET* Codon 918 Mutation eine

Schnittstelle für das Restriktionsenzym Rsa I ergab. Die Nachweisgrenze für eine Mutation liegt hierbei bei 1 % betroffene Tumorzellen.

Wir konnten 250 Tumorproben von 47 Patienten untersuchen, darunter 56 Proben aus Primärtumoren, 191 Lymphknotenmetastasen und 3 Fernmetastasen. Die Codon 918 Mutation wurde in 40,4 % der Proben gefunden, bei 57,4 % der Patienten war die Mutation in mindestens einer Tumorprobe vorhanden. Es zeigte sich dabei, dass die Mutation innerhalb eines Tumors heterogen verteilt sein kann: Bei 36,8 % der Patienten war sie in allen untersuchten Proben vorhanden, bei 26,3 % nur in einem Teil. Weiterhin konnten wir zeigen, dass das Auftreten der Codon 918 Mutation mit einer schlechteren Prognose einhergeht: Patienten mit Mutation hatten signifikant höhere Calcitoninwerte, sie bekamen häufiger und früher Fernmetastasen und hatten verkürzte Überlebenszeiten. Zum Auftreten der Codon 918 Mutation im Krankheitsverlauf konnten wir zeigen, dass der Anteil an mutierten Proben in Lymphknotenmetastasen höher ist als in Primärtumoren, von den untersuchten Fernmetastasen wiesen sogar alle die Mutation auf. Gleiches ließ sich beobachten, wenn man statt der Tumorproben die Patienten mit Mutation in mindestens einer Probe in Beziehung setzte. Der intraindividuelle Verlauf kann jedoch unterschiedlich sein: Der Anteil der mutierten Tumorproben kann im Verlauf gleichbleiben, zunehmen oder abnehmen. Wir untersuchten weiterhin, ob der Nachweis der Codon 918 Mutation schon bei der Primäroperation eine Bedeutung für die Prognose hat. Auch hier zeigte sich eine häufigere Fernmetastasierung und ein kürzeres Überleben.

Die von uns bestimmte Häufigkeit der Codon 918 Mutation in sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen liegt im Rahmen der bisher vorliegenden Studien. Auch die Tatsache, dass die Mutation heterogen innerhalb eines Tumors auftreten kann, konnten wir bestätigen. Wir konnten die Codon 918 Mutation als prognostischen Faktor identifizieren und dies erstmals mit Überlebenszeiten belegen. Dabei ist bereits der Mutationsnachweis im Zeitfenster drei Monate nach Diagnosestellung mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Dass die Codon 918 Mutation im einzelnen Tumor heterogen verteilt ist und der Anteil der Tumorzellen mit Mutation im Verlauf des Tumorwachstums ansteigt, zeigt, dass sie in den meisten Fällen nicht das den Tumor auslösende Ereignis ist, sondern eine Alteration, die erst im späteren Verlauf auftritt und ein aggressiveres Tumorwachstum und eine schnellere Metastasierung bedingt.

Die *RET* Codon 918 Mutation ist also eine genetische Veränderung, die in etwa 60 % der medullären Schilddrüsenkarzinome auftritt und sich dort beschleunigend auf die

Tumorprogression auswirkt. Ihr Nachweis ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert und könnte langfristig ein diagnostisches Instrument werden, das die Behandlung der Patienten verbessern hilft.