

**Zellbiologische und genetische Untersuchungen an
Schwannzellen aus peripheren Nervenscheidentumoren
von NF1-Patienten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Silke Frahm
aus München

Hamburg 2004

Datum der Disputation: 02.07.2004

Gutachter: Prof. V. F. Mautner

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG **6**

1.1	Das Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ I (NF1)	6
1.1.1	Merkmale der NF1	6
1.1.1.1	Kutane und plexiforme Neurofibrome	7
1.1.1.2	Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST)	9
1.1.2	Therapiemöglichkeiten	10
1.1.2.1	Bisherige Behandlungsstrategien	10
1.1.2.2	Perspektiven durch neue anti-neoplastische Substanzen?	11
1.2	Genetik der Neurofibromatose Typ I	14
1.2.1	Das <i>NF1</i> -Gen	14
1.2.1.1	Struktur	14
1.2.1.2	Das <i>NF1</i> -Genprodukt - Neurofibromin	15
1.2.2	Mutationsspektrum	16
1.2.3	Rolle des <i>NF1</i> -Gens in der Pathogenese von Neurofibromen	18
1.3	Biologie der NF1-assoziierten Tumore	19
1.3.1	Neurofibrome	19
1.3.1.1	Neuronale Entwicklung und Differenzierung von Schwannzellen	19
1.3.1.2	Kultur von Schwannzellen	21
1.3.2	MPNSTs	21
1.3.2.1	Maligne Transformation	21
1.3.2.2	Die Tumorsuppressorgene <i>p16</i> und <i>p53</i>	22
1.4	Zielsetzung der Arbeit	25

2 MATERIALIEN UND METHODEN **27**

2.1	Chemikalien, Lösungen, Puffer und Medien	27
2.2	Materialien und Geräte	28
2.3	Patienten und Tumore	30
2.4	Zellkultur	30
2.4.1	Medien	30
2.4.2	Tumorpräparation	31
2.4.3	Kultur von Schwannzellen	32
2.4.4	Kultur von MPNST-Zellen und Fibroblasten	34

2.4.5	Bestimmung der Zellzahl	34
2.4.6	Einfrieren und Auftauen der Zellen	35
2.5	Immunzytochemie	36
2.5.1	S100-Färbung	37
2.5.2	Phalloidin-Färbung	37
2.5.3	Messung der Proliferation durch BrdU-Einbau	38
2.6	Messung der Zell-Vitalität	40
2.7	Messung des programmierten Zelltods (Apoptose)	40
2.7.1	Photometrische Quantifizierung	41
2.7.2	TUNEL- (TdT-mediated dUTP nick end labeling) Assay	42
2.7.3	Morphologische Änderungen	43
2.8	Messung der Tumor-Wachstumshemmung <i>in vivo</i>	43
2.9	Western Blot Analyse	44
2.9.1	Isolierung von Proteinen aus Zellen	44
2.9.2	Quantitative Proteinbestimmung	45
2.9.3	Affinitäts-Präzipitation von Ras-GTP	46
2.9.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.9.5	Transfer der Proteine	49
2.9.6	Antikörper-Bindung und Detektion	50
2.10	DNA-Isolierung	52
2.11	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	53
2.11.1	Primer	53
2.11.2	Amplifikation	55
2.11.3	Nachweis des PCR-Produktes im Agarosegel	56
2.12	Sequenzierung	57
2.12.1	Sequenzierungs-Ansatz	58
2.12.2	Aufreinigung	59
2.13	LOH-Analyse	60
2.13.1	Amplifikation	61
2.13.2	Gene Scan	61
2.14	Karyotypisierung	62
2.15	Statistische Auswertung	62

3 ERGEBNISSE

63

3.1	Untersuchungen an Tumorzellen aus gutartigen Neurofibromen	63
3.1.1	Patienten und Tumore	63
3.1.2	Zellkultur	64

Inhaltsverzeichnis	5
3.1.3 Morphologie	68
3.1.4 Proliferation	71
3.1.5 Genetische Untersuchungen	74
3.2 Untersuchungen an Tumorzellen aus MPNSTs	79
3.2.1 Patienten und Tumore	79
3.2.2 Zellkultur	81
3.2.3 Genetische Untersuchungen	82
3.2.4 Morphologie	91
3.2.5 Proliferation	93
3.2.6 Etablierung stabiler Zellkulturen	93
3.3 Expression Differenzierungs-relevanter Gene in neoplastischen Schwannzellen und MPNST-Zellen	95
3.3.1 Kultur unter wachstumsfördernden Bedingungen	95
3.3.2 Kultur unter Myelinisierungs-einleitenden Bedingungen	95
3.4 Medikamentöse Behandlung der MPNST-Zellen mit Sulindac Metaboliten	98
3.4.1 Hemmung der Zell-Proliferation	98
3.4.2 Apoptose-Einleitung	99
3.4.3 Herunterregulierung der Ras-Signaltransduktion	101
3.4.4 JNK und Kaspase-3 Aktivierung	104
3.4.5 Hemmung des Tumorwachstums im Maus-Modell	104
4 DISKUSSION	106
4.1 Schwannzellen aus kutanen und plexiformen Neurofibromen	106
4.2 Die Kultur von MPNST-Zellen	111
4.3 Die maligne Transformation	114
4.4 Medikamentöse Behandlung von MPNST-Zellen	119
5 ZUSAMMENFASSUNG	123
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	125
7 LITERATURVERZEICHNIS	128
8 ANHANG	140

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 1 (NF1)

Die Neurofibromatose Typ 1, vormals auch als Morbus Recklinghausen bekannt geworden, ist eine verbreitete genetische Erkrankung die autosomal dominant vererbt wird oder sporadisch auftritt, und durch Mutationen des *NF1*-Gens verursacht wird. Sie tritt mit einer Inzidenz von 1:3500 Lebendgeburten auf (Huson et al., 1989; Riccardi et al., 1992, Gutmann et al., 1997) und ist die häufigste ererbte Prädisposition für Tumorentstehungen des Nervensystems.

1.1.1 Merkmale der NF1

NF1-Patienten sind durch gutartige Tumorbildungen im peripheren Nervensystem, Abnormalitäten der Pigmentierung (café-au-lait-Flecken), sowie Fehlbildungen des Skeletts gekennzeichnet. Die diagnostischen Kriterien für NF1 wurden von den „National Institutes of Health“ festgelegt (NIH, 1988) und sind in Tabelle 1.1 aufgezählt.

Tabelle 1.1 Diagnostische Kriterien für NF1

Die NF1-Diagnose wird für Patienten gestellt, die mindestens zwei der folgenden Kriterien aufweisen:

1. Sechs oder mehr „café-au-lait“ Flecken
 2. Zwei oder mehr kutane Neurofibrome oder ein plexiformes Neurofibrom
 3. „Freckling“ in Achsel- und/oder Leistengegend
 4. optisches Gliom
 5. eine ausgeprägte Knochen-Läsion
 6. einen Verwandten ersten Grades mit NF1
-

NF1 ist progressiv, das Auftreten der meisten Symptome ist altersabhängig und deren variable Expressivität führt zu einem komplexen klinischen Bild. Der Phänotyp dieser Krankheit kann von einer milden Ausprägung bis zu sehr schwer betroffenen Fällen stark variieren. Neben den multiplen Neurofibromen, die das Hauptmerkmal der Erkrankung darstellen, können NF1-Patienten auch pilozytische Astrozytome (WHO-Grad I) und multiforme Glioblastome (WHO-Grad IV) entwickeln. Von besonderer klinischer Bedeutung sind die Sarkome (Maligne periphere Nervenscheidentumore, Triton-Tumore, Rhabdomyosarkome), da sie

meistens eine zum Tode führende Komplikation mit sich tragen. Neben dem Risiko für die Entwicklung von neuroendokrin aktiven Tumoren (Phäochromozytome und Karzinoidtumore) ist auch dasjenige für hämatopoietische Tumore, insbesondere der juvenilen chronischen myeloischen Leukämie, gegenüber der Normalbevölkerung erhöht. Weitere Manifestationen der NF1 sind knöcherne Auffälligkeiten (Skoliose, Makroenzephalie, eine geringe Körpergröße, Pseudoarthrosen, Sphenoiddysplasien), Beeinträchtigung des Nervensystems (intellektuelles Handicap, Persönlichkeitsveränderungen, Hydrozephalus bei Aquäduktstenose) und Gefäßmißbildungen wie die fibromuskuläre Hyperplasie. Etwa 40 bis 60 % der NF1-Patienten weisen eine erhebliche Lernschwäche im Zusammenhang mit einer Aufmerksamkeitsstörung auf (Ferner et al., 1994; Mautner et al., 2002). Die Häufigkeiten des Auftretens der Hauptsymptome bei NF1-Patienten sind in Tabelle 1.2 zusammengefaßt.

Tabelle 1.2 Häufigkeit der NF1-Hauptsymptome.

Symptom	Frequenz
Neurofibrome postpubertär	90 %
Davon neurologische Defizite verursachend	20 %
Kognitive und soziale Probleme	50 %
Plexiforme Neurofibrome	40 %
Skoliose	30 %
Pilozytische Astrozytome	15 %

1.1.1.1 Kutane und plexiforme Neurofibrome

Neurofibrome - das Hauptmerkmal der NF1 Krankheit - sind gutartige periphere Nervenscheidentumore. Sie bestehen aus unterschiedlichen Zelltypen, die in eine extrazelluläre, Kollagen-reiche Matrix eingebettet sind. Hierzu zählen vor allem Schwannzellen, die mit 60-80 % den Hauptteil der Zellpopulation in Neurofibromen bilden, sowie Fibroblasten, perineuriale Zellen, endothelartige Zellen, Lymphozyten und Mastzellen (Peltonen et al., 1988). Da diese Tumore von den Nervenscheiden ausgehen, sind intratumoral oft Nervenfaszikel aufzufinden. Unter dem Begriff Neurofibrom sind zwei verschiedene Typen von Tumoren zu verstehen, die als kutan und plexiform bezeichnet werden.

Kutane Neurofibrome (KNF) sind ein Hauptmerkmal der NF1 Erkrankung und sind bei 90 % der Patienten zu finden. Sie entwickeln sich als einzelne, abgrenzbare Läsionen, deren Wachstum lokal beschränkt bleibt. Sie können im topografischen Verlauf aller Nerven

auftreten, an Spinalnerven, am Grenzstrang und den Nerven der Eingeweide. Diese Art Neurofibrome entwickeln sich meist erst nach dem 6. Lebensjahr und sind bei fast allen NF1-Patienten nach Abschluß der Pubertät zu finden. Die Anzahl kutaner Neurofibrome kann sich im Laufe des Lebens erheblich steigern, nicht jedoch die Größe dieser Tumoren, die nur sehr langsam wachsen (Abb. 1.1 A). Dabei verursachen sie hauptsächlich kosmetische Probleme, die tiefer gelegenen kutanen Neurofibrome können jedoch zu neurologischen Symptomen führen, z.B. auf Druck auslösbare Schmerzen oder Funktionsausfälle der betroffenen Nerven, die durch Kompression oder Invasion derselben verursacht werden.

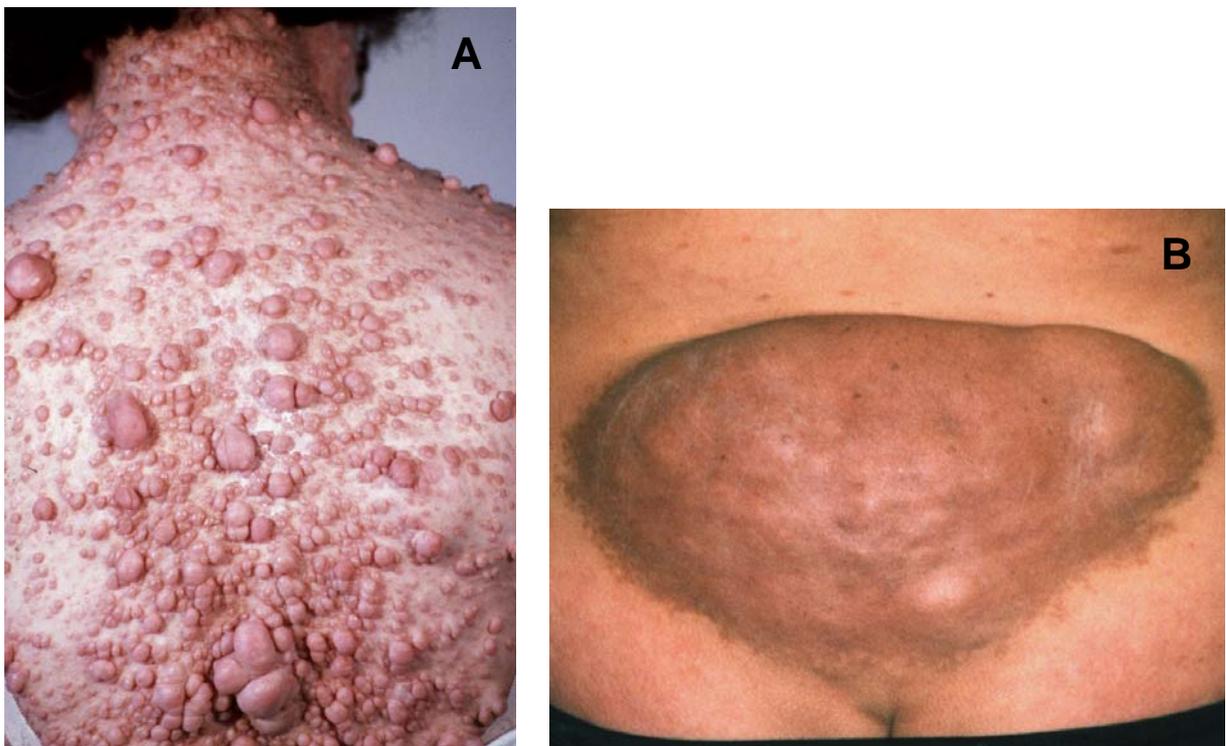


Abb. 1.1 NF1-Patienten mit multiplen kutanen Neurofibromen (A) und einem plexiformen Neurofibrom (B)

Plexiforme Neurofibrome (Abb. 1.1 B) werden bei etwa 30-40 % der NF1-Patienten beobachtet (Ferner und Gutmann, 2002) und führen typischerweise zu einer diffusen, oft strangförmigen Verbreiterung der betroffenen Nerven. Der Begriff plexiform lehnt sich an die histopathologische Nomenklatur an und bezeichnet hier den organübergreifenden Charakter dieses Tumors der ein netzartiges Wachstum aufweist, welches oft mit einer Infiltration angrenzenden Gewebes einhergeht. Plexiforme Neurofibrome (PNF) können in der Dermis oder tiefer gelegenen Körperschichten auftreten, werden nicht vom Perineurium begrenzt und oft sind lange Segmente großer Nerven wie dem Plexus brachialis oder lumbalis betroffen,

sowie paraspinale und kraniale Nerven, z.B. des Gesichts oder der Orbita. Oft sind PNF bereits zum Zeitpunkt der Geburt erkennbar. Für PNF des Gesichts gilt besonders, daß diese in der Regel im ersten Lebensjahr manifest werden und daher wahrscheinlich konatale Tumore sind (Huson and Huges, 1994). Das Tumorwachstum kann in der Kindheit über Jahre andauern und später spontan sistieren. Klinisch relevant werden diese Tumore durch das Auftreten neurologischer Defizite, Organkompressionen und -Invasionen, äußerer Entstellung und Malignisierung. Die Malignisierung von PNF ist der Hauptfaktor für die deutlich reduzierte Lebenserwartung von Patienten mit NF1 (Mittelwert = 59 Jahre), (Rasmussen et al., 2001; Evans et al., 2002). Tabelle 1.3 zeigt die charakteristischen Eigenschaften kutaner und plexiformer Neurofibrome im Vergleich.

Tabelle 1.3 Vergleichende Darstellung kutaner und plexiformer Neurofibrome

<i>Eigenschaften</i>	<i>Kutane Neurofibrome</i> <i>Abb. 1.1 A</i>	<i>Plexiforme Neurofibrome</i> <i>Abb. 1.1 B</i>
<i>Vorkommen</i>	bei ca. 90 % der Patienten	bei ca. 30 % der Patienten
<i>Zahl / Patient</i>	kleiner 10 - bis zu Tausenden	oft einzeln
<i>Größe</i>	i.d.R. bis 1 cm ³ , selten größer	größer als 1 cm ³ , bis zu ganzen Körper
<i>Lokalisation</i>	an jeder neuralen Struktur	meist an größeren Nerven
<i>Entstehungszeitpunkt</i>	meist ab Pubertät	häufig konatal
<i>Wachstum</i>	begrenzt	variabel
<i>Form</i>	rund	unregelmäßig
<i>Tiefe</i>	kutan	kutan/subkutan und invasiv
<i>Defizit</i>	kosmetisch, neurologische Symptome	neurologische Defizite, Organkompression und Invasion, Entstellung, Malignisierung
<i>Operation</i>	einfach, vollständig	schwierig
<i>Rezidivwachstum</i>	nein	ja, häufig nur inkomplette Resektion möglich

1.1.1.2 Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST)

MPNSTs, in der älteren Literatur auch als Neurofibrosarkome bezeichnet, sind Neoplasien die ihren Ursprung in einem peripheren Nerven haben und ungefähr 5 % aller malignen Tumoren des Weichgewebes ausmachen. Potentiell kann sarkomatöse Entartung von jeder neuralen Struktur ausgehen, wobei große und mittlere Nerven offenbar am häufigsten betroffen sind. Klinisch muß der Verdacht auf MPNST geäußert werden wenn eine vorbestehende Raumforderung ihre Wachstumseigenschaften plötzlich verändert, sich vergrößert, konstante atypische Schmerzen bedingt und mit neurologischen Defiziten einhergeht (Abb. 1.2).

MPNSTs gehören zu einem der aggressivsten Tumortypen und gelten als inkurabel, wenn diese nicht rechtzeitig erkannt, und nicht großzügig im Gesunden exzidiert werden können. Demzufolge überleben nur 21 % der betroffenen Patienten 5 Jahre nach Diagnosestellung (Rasmussen et al., 2001; Evans et al., 2002; Ferner und Gutmann, 2002; Mautner et al., 2003). Etwa die Hälfte aller MPNSTs treten bei Patienten mit NF1 auf und ca. 8-13 % aller NF1-Patienten entwickeln eine solche Neoplasie im Laufe ihres Lebens (Woodruff et al., 2000; Evans et al., 2002). Das Durchschnittsalter von Patienten mit NF1-assoziierten MPNSTs ist um ca. 30 Jahre niedriger (Median= 26 Jahre) als das in sporadischen Fällen (Median= 62 Jahre) (Evans et al., 2002).



Abb. 1.2 Großes MPNST im Gesäß eines NF1-Patienten

1.1.2 Therapiemöglichkeiten

1.1.2.1 Bisherige Behandlungsstrategien

Bis heute gibt es keine kausale Therapie der NF1. Derzeit richten sich eine Vielzahl ärztlicher Strategien darauf, mögliche Komplikationen rechtzeitig aufzudecken und zu verhindern. Beispielhaft sei die Förderung von Kindern mit einer Entwicklungsverzögerung oder die medikamentöse Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit einem Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom genannt. Noch immer ist die Neurofibromatose eine

Erkrankung bei der die chirurgische Behandlung einen großen Stellenwert einnimmt und die wesentliche Therapieoption darstellt.

Gutartige Tumoren wie kutane und plexiforme Neurofibrome werden entfernt wenn diese zu Schmerzen, kosmetischer Entstellung oder zu neurologischen Defiziten führen. Pilozytische Astrozytome sind der häufigste zentralnervöse Tumortyp bei NF1, wobei das Optikusgliom eine wesentliche Rolle spielt. Die Entscheidung über eine operative Intervention ist vom Einzelfall abhängig weil Topographie, Progreß und Symptomatik wesentliche Entscheidungskriterien darstellen.

Patienten mit MPNSTs haben vorliegenden Studien zu Folge eine deutlich verbesserte Prognose wenn die Operation des malignen Tumors radikal und im Gesunden erfolgt. Dagegen stellt die Chemo- und Strahlentherapie keine wirkliche Therapieoption dar. Diese Maßnahmen dienen zwar der lokalen Kontrolle des Tumors und der Verzögerung der Metastasenbildung, jedoch verlängert die Bestrahlung in der Regel nicht die geringe Lebenserwartung von Patienten mit MPNST (Ferner und Gutmann, 2002). In manchen Fällen werden die betroffenen Gliedmaßen komplett amputiert. Daher ist die Etablierung alternativer therapeutischer Ansätze von großer Bedeutung.

1.1.2.2 Perspektiven durch neue anti-neoplastische Substanzen?

Die Entwicklung neuer Medikamente und die Erforschung alternativer Therapieansätze besitzen wegen der geringen Lebensqualität und -erwartung von Patienten mit MPNSTs einen hohen Stellenwert.

Beide Metaboliten der nicht-steroidalen, anti-inflammatorischen Substanz (NSAID) Sulindac weisen vielversprechende anti-neoplastische Eigenschaften auf, die auf der Induktion von Apoptose beruhen, wie bereits an verschiedenen Krebszelllinien gezeigt werden konnte (Piazza et al., 1995; Han et al., 1998; Lim et al., 1999; Soriano et al., 1999). Sulindac ist eine Vorstufe, die *in vivo* in ein Sulfid und ein Sulfon Derivat metabolisiert wird. Mehrere Studien an Darm-, Brust- und Lungen-Krebs-Tiermodellen haben gezeigt, daß der Sulfon Metabolit (Exisulind[®]) die Entstehung von Tumoren verhindern kann (Piazza et al., 1997; Thompson et al., 1997; Malkinson et al., 1998). Auch in klinischen Studien zeigt Exisulind anti-neoplastische Effekte und wird von den meisten Kolorektal- und Prostata-Krebs Patienten gut vertragen (Goluboff, 2001; Van Stolk et al., 2000). Weiterhin bewirkt Exisulind in Kombination mit der semisynthetischen Substanz Docetaxel additive oder synergistische chemopräventive Eigenschaften in *in vitro* und *in vivo* Experimenten (Bunn et al., 2002; Chan et al., 2002). Außerdem beugt Sulindac Rezidivbildung bei Patienten mit familiärer

adenomatöser Polyposis vor und reduziert kolorektale Polypen in Zahl und Größe (Giardiello et al., 1993).

Die anti-inflammatorische Wirkung des Sulfid-Metaboliten wird über die Hemmung der Zyklooxygenase (COX) verursacht, die eine Reduktion der Prostaglandin-Synthese bewirkt (Piazza et al., 1997). Im Gegensatz dazu ist Sulindac Sulfon eine pro-apoptotische Substanz die das Tumorwachstum einschränkt, ohne einer Hemmung der COX und unabhängig von der Prostaglandin-Synthese, der *p53*-Induktion und dem Zellzyklus-Arrest (Piazza et al., 1995, 1997; Lim et al., 1999; Goluboff, 2001). Exisulind induziert die Einleitung von Apoptose in Darmkrebs-Zellen durch die Hemmung der cGMP-abhängigen Phosphodiesterase (PDE), die wiederum eine Erhöhung des cGMP-Levels und der Proteinkinase G (PKG) Aktivität bewirkt (Thompson et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die PKG den JNK (C-Jun-N-terminale Protein-Kinase) Signaltransduktionsweg über die Phosphorylierung der MEKK1 (Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase) bewirkt (Abb. 1.3; Soh et al., 2000, 2001).

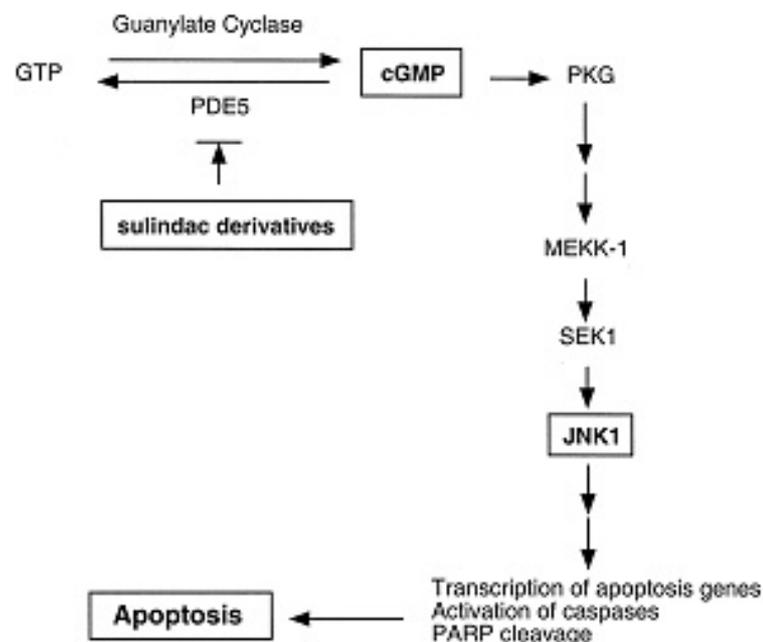


Abb. 1.3 Modell für die Wirkung der Sulindac-Metaboliten (aus Soh et al., 2000).

Die Aktivierung der JNK spielt bei der Einleitung von Apoptose eine entscheidende Rolle, üblicherweise sind Caspasen und PARP an diesem Prozeß beteiligt (Patel et al., 1996). Neue Studien deuten darauf hin, daß beide Sulindac Metaboliten den Ras-Signaltransduktionsweg inhibieren, indem reduzierte Mengen an aktiviertem ERK1/2 (Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1 und 2) nachgewiesen wurden (Herrmann et al., 1998, Rice et al., 2001). Dieses

Protein befindet sich in der Transduktionskaskade flussabwärts von Ras und reguliert indirekt Gene, die für erhöhte Zell-Proliferation und Differenzierung verantwortlich sind. Der genaue Mechanismus, durch den Exisulind und Sulindac Sulfid Apoptose einleiten, bleibt jedoch bis heute unklar.

1.2 Genetik der Neurofibromatose Typ I

1.2.1 Das *NF1*-Gen

Das *NF1*-Gen wurde 1990 durch positionelle Klonierung auf Chromosom 17q11.2 identifiziert (Shen, 1996). Die genetische Kartierung des *NF1*-Gens erfolgte über die Identifizierung benachbarter Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) -Marker, die gemeinsam mit dem Krankheits-Phänotyp innerhalb einer Familie vererbt werden. Zusätzlich lieferten zwei nicht verwandte NF1-Patienten einen weiteren Hinweis darauf, daß das *NF1*-Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert ist: der eine Patient wies eine Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 17 auf - t(1;17) (p34.3; q11.2) - der andere zwischen Chromosomen 17 und 22 - t(17;22) (q11.2; q11.2). Zwei der vorab identifizierten Marker auf Chromosom 17 ermöglichten die Aufklärung der Translokations-Bruchstellen (Abb. 1.4 A) was zu der Konstruktion einer Restriktions-Karte der *NF1* Region führte, die beide Schnittstellen enthielt. Mittels PFGE und Southern Blot Analysen wurden drei große Deletionen in der Kandidaten-Region gefunden (Viskochil et al., 1990). Mithilfe einer cDNA-Bibliothek wurden in einem weiteren Schritt verschiedene, sich überschneidende cDNA-Klone aus der Translokations-Bruchstellen Region identifiziert. Einer dieser cDNA Klone hybridisierte mit einer mRNA von ungefähr 11 kb Länge (Cawthon et al., 1990). Somit war das *NF1*-Gen anhand von zwei Translokationen, drei Deletionen und 6 kleinen *NF1* spezifischen Mutationen der kodierenden Sequenz identifiziert. Zeitgleich identifizierte eine weitere Arbeitsgruppe das Gen anhand anderer cDNA-Klone (Wallace et al., 1990).

1.2.1.1 Struktur

Das *NF1*-Gen ist groß, es umfaßt ungefähr 350 kb des Genoms und besteht aus 60 Exons (Abb. 1.4 A). Der offene Leserahmen des *NF1* Transkriptes hat 8457 Basenpaare (bp), welcher ein Protein aus 2818 Aminosäuren mit einem geschätzten Molekulargewicht von 327 kDa vorraussagt (Abb. 1.4 B). Auf Intron 27b befinden sich drei Gene, die in umgekehrter Leserichtung zum *NF1*-Gen transkribiert werden: OMGP, EVI2A und EVI2B (Abb. 1.4 A). Es wurden 4 alternativ gespleißte *NF1* Transkripte identifiziert, wovon das größte 11 bis 13 kb lang ist (Abb. 1.4 C). Die verschiedenen Isoformen sind Gewebe- und Zellspezifisch und werden in Neuronen und Gliazellen unterschiedlich exprimiert (Skuse und Cappione, 1997). Das *NF1*-Gen ist phylogenetisch hochkonserviert.

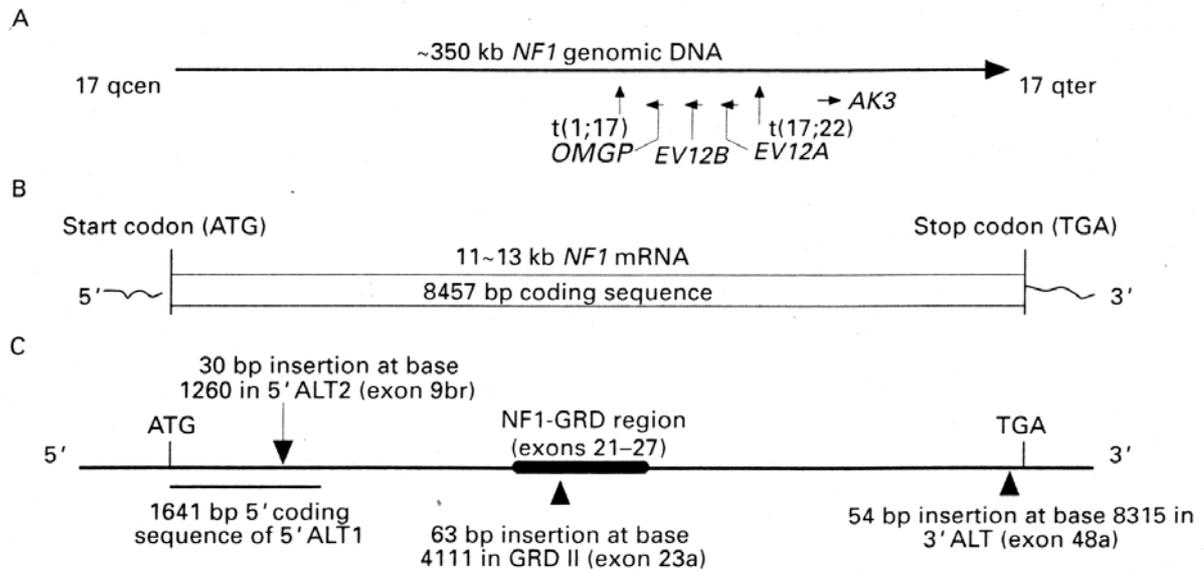


Abb. 1.4 Das *NF1*-Gen: Genom (A), mRNA (B) und 4 alternativ-gespleißte Transkripte mit der „GAP Related Domain“ (GRD) Region (C), (aus Shen et al., 1996)

1.2.1.2 Das *NF1*-Genprodukt - Neurofibromin

Das *NF1*-Genprodukt - Neurofibromin - ist ein zytoplasmatisches Protein, daß ubiquitär in den meisten Gewebetypen schwach exprimiert wird; höchste Konzentrationen des Proteins findet man in Neuronen, Oligodendrozyten und nicht-myelinisierenden Schwannzellen (Daston et al., 1992).

Die am besten untersuchte und einzige aufgeklärte Funktion von Neurofibromin ist die negative Regulierung der Ras Signaltransduktion (Viskochil et al., 1999). Dafür verantwortlich ist die GRD (GAP-related domain), eine Region, die 360 Aminosäuren kodiert und sich von Exon 21 bis 27a erstreckt (Abb. 1.4 C). Diese Sequenz weist eine hohe Homologie zur katalytischen Domäne anderer GTPase aktivierender Proteine (GAP) wie p120GAP, GAP1 von *Drosophila*, IRA 1 und IRA 2 von *Saccharomyces cerevisiae* usw. auf (Xu et al., 1990; Shen, 1996), und interagiert mit Ras p21 (Martin et al., 1990).

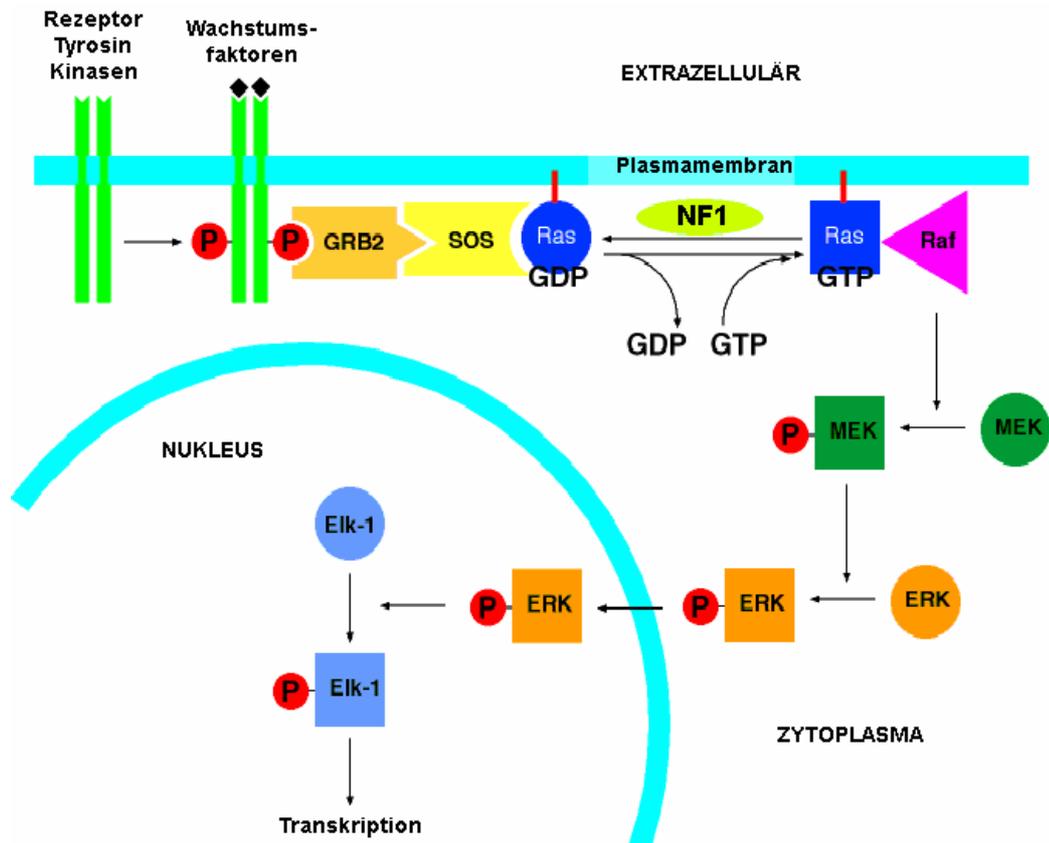


Abb. 1.5 Ras-Signaltransduktionsweg: Rolle des *NF1*-Genproduktes Neurofibromin (NF1), (aus <http://oregonstate.edu>).

Die GAP-Proteine sind in der Lage, durch Aktivierung der intrinsischen GTPase der Ras Proteine (N-, K- und H-Ras), die Hydrolyse von RasGTP zu RasGDP zu beschleunigen, welche eine Herabregulierung von aktivem (phosphoryliertem) Ras bewirkt (Abb. 1.5). Ras-GTP aktiviert die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signaltransduktions-Kaskade, welche eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellwachstums und der Differenzierung spielt. Inaktivierung von Neurofibromin kann so zur Aktivierung der Ras Genprodukte führen und damit zur Proliferation beitragen. Der pathologische Mechanismus, durch den eine Inaktivierung von Neurofibromin zur Tumorentstehung beiträgt, bleibt jedoch völlig unklar.

1.2.2 Mutationsspektrum

Mutationen des *NF1*-Gens in der Keimbahn sind die Ursache für die Erkrankung an NF1. Bisher wurden über 300 verschiedene Mutationen in diesem Gen gefunden (Thomson et al., 2002), jedoch gibt es keinen generellen Zusammenhang zwischen dem Mutations-Typ/-Lokalisation und dem klinischen Verlauf. Selbst eineiige Zwillinge und Familien mit NF1,

die die gleiche Mutation tragen, können unterschiedliche Krankheitsverläufe in Bezug auf den Typ und den Entstehungszeitpunkt der verschiedenen Tumoren und anderer klinischer Merkmale, die NF1 kennzeichnen, aufweisen (Riccardi et al., 1992, Shen, 1996). Die Ausnahme bilden Patienten mit Deletionen des gesamten *NF1*-Gens, die neben einer Neigung zu fazialer Dysmorphie und mentaler Retardierung meist von einer schwereren Ausprägung der Krankheit (größere Neigung zur Ausbildung von plexiformen Neurofibromen) gekennzeichnet sind (Kayes et al., 1994, Leppig et al., 1997, Tonsgard et al., 1997, Cnosson et al., 1997).

Etwa die Hälfte aller neu diagnostizierten Patienten haben keine Verwandten mit NF1 (Huson, 1989; Huson und Hughes, 1994), d.h. bei einer NF1-Inzidenz von 1:3500 entwickelt einer von 7000 Lebendgeburten eine neue *NF1*-Mutation. Bis heute ist nicht geklärt, warum die spontane Mutationsrate dieses Gens um das 10fache höher als bei den meisten anderen Krankheits-Genen, und um das 100fache höher als die durchschnittliche Mutationsrate per Generation und Locus ist. Die Größe des Gens und der Anteil an CpG Dinukleotiden - die eine hohe Mutationsrate im menschlichen Genom durch spontane Desaminierung von 5-Methylcytosin verursachen (Cooper et al., 1990) - sowie durch Pseudogene verursachte Genkonversion, tragen wahrscheinlich dazu bei (Shen, 1996). In der Regel handelt es sich bei den Keimbahnmutationen um Nonsense- oder Frameshift-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation und daher in ca. 80 % der Fälle zur Kodierung eines unvollständigen oder gar keines Proteins führen (Shen, 1996; Messiaen et al., 2000).

Die große Länge des Gens, das Fehlen einer „Hotspot“ Region auf der gehäuft Mutationen vorkommen (es wurden auf nahezu allen Exons Mutationen gefunden) und die Vielfalt der damit zusammenhängenden pathologischen Läsionen wie chromosomale Abnormalitäten, kleine Deletionen (einige 100 bis 1000 Basenpaare) sowie Punkt-Mutationen, machen die Mutationsanalyse des *NF1*-Gens problematisch (Messiaen et al., 2000; Thomson et al., 2002). Zusätzlich stören verschiedene *NF1*-Pseudogene im Genom die auf PCR basierende Analyse genomischer DNA, da sich die co-Amplifizierung der homologen Sequenzen von *NF1*-ähnlichen Loci auf anderen Chromosomen nicht vermeiden läßt (Purandare et al., 1995; Regnier et al., 1997). Außerdem handelt es sich bei 5-10 % der Mutationen um Deletionen, die das gesamte *NF1*-Gen umfassen und somit nicht durch standard PCR-Analysen erfaßt werden können. Derzeit werden anhand verschiedener Untersuchungen je nach Methode und Aufwand bei 50-95 % der NF1-Patienten Mutationen gefunden - die effektivsten Analysen sind dabei der Protein-Trunkierungs-Test (PTT), die Temperatur-Gradient Gel Elektrophorese

(TGGE) und die direkte genomische Sequenzierung aller Exons (Fahsold et al., 2000; Messiaen et al., 2000; Kluwe et al., 2002, 2003).

1.2.3 Rolle des *NF1*-Gens in der Pathogenese von Neurofibromen

Im Gegensatz zu dominanten Onkogenen, welche durch die Mutation nur eines von zwei Allelen normale Zellen in Tumorzellen verwandeln, tragen Tumorsuppressorgene durch den Verlust ihrer Funktion zur Tumorentstehung bei. Das *NF1*-Gen ist ein solches Tumorsuppressorgen. In der Regel kontrollieren Tumorsuppressorgene das zelluläre Wachstum - eine Inaktivierung dieser Gene kann den Verlust der negativen Regulation des Zellzyklus bedeuten, so daß Zellen in einen Zustand der uneingeschränkten Proliferation eintreten können. Entsprechend der von Knudson für das Retinoblastom aufgestellten Zweittreffer-Theorie, ist für die Manifestation des Tumors neben der Keimbahnmutation eines Allels, eine somatische Mutation des zweiten Wildtyp Allels erforderlich (Knudson et al., 1971). Alle Zellen im Körper eines NF1-Patienten tragen eine *NF1*-Mutation und erst der Funktionsverlust des intakten Allels führt zur Entstehung von kutanen und plexiformen Neurofibromen. Diese biallelische Inaktivierung konnte anhand von Heterozygotie-Verlusten und somatischen Mutationen des Gens bestätigt werden (Colman et al., 1995; Ottini et al., 1995; Sawada et al., 1996; Serra et al., 1997; Kluwe et al., 1999a). Dabei wurden unterschiedliche somatische Punktmutationen in einem Patienten gefunden, wodurch gezeigt wurde, daß die Entstehung von Neurofibromen über verschiedene Ereignisse auf dem *NF1*-Gen bedingt werden kann (Serra et al., 2001). Solche genetischen Änderungen wurden auch in MPNSTs von NF1-Patienten als auch in sporadischen MPNSTs nachgewiesen (Skuse et al., 1989; Menon et al., 1990; Glover et al., 1991; Legius et al., 1993; Lothe et al., 1993, 1995; Gutmann et al., 1994; Shannon et al., 1994; Metheny et al., 1995; Martinsson et al., 1997; Side et al., 1997; Rasmussen et al., 2000b; Woodruff et al., 2000; Perry et al., 2001).

1.3 Biologie der NF1-assoziierten Tumore

1.3.1 Neurofibrome

Wegen der zellulären Heterogenität von Neurofibromen - die aus Schwannzellen, Fibroblasten, perineurialen und endothelartigen Zellen, Lymphozyten und Mastzellen bestehen - war deren unizellulärer, neoplastischer Ursprung lange Zeit kontrovers. Erst seit wenigen Jahren ist es möglich, Schwannzellen aus Neurofibromen in Kultur zu nehmen und anzureichern. Seither konnte gezeigt werden, daß zytogenetische Änderungen (Wallace et al., 2000), Heterozygotieverluste und somatische Mutationen des *NF1*-Gens (Kluwe et al., 1999b; Serra et al., 2000), abnormale bis keine Expression von Neurofibromin (Rutkowski et al., 2000) sowie erhöhte Ras-GTP Werte (Sherman et al., 2000), nur in kultivierten Schwannzellen, nicht aber in den Fibroblasten vorkommen. All dies deutet auf eine klonale Expansion von genetisch veränderten Schwannzellen hin, wodurch deren Rolle als tumorigener Ursprungszelltyp in Neurofibromen bestätigt wird.

1.3.1.1 Neuronale Entwicklung und Differenzierung von Schwannzellen

Schwannzellen sind die Gliazellen im peripheren Nervensystem von Vertebraten. Sie üben verschiedene Funktionen aus, von denen die Fähigkeit zur Ausbildung der Myelinscheide, einer mehrlagigen Organelle, die dickere Axone umhüllt um die Leitfähigkeit von Aktionspotentialen zu erhöhen, essentiell ist. Nicht-myelinisierende Schwannzellen umwickeln mehrere langsam-leitende Axone in Nerven, ohne Myelinscheiden zu bilden.

Schwannzellen entstehen aus multipotenten Zellen der Neuralleiste. Schwannzell-Vorläufer migrieren während der Embryonalentwicklung entlang schon existierender axonaler Gänge, indem sie die Axonenbündel lose mit zytoplasmatischen Fortsätzen einwickeln (Abb. 1.6, Schwann cell- precursor). In ihrer weiteren Entwicklung werden die Bündel von premyelinisierenden Prozessen unterteilt und ein 1:1 Schwannzell:Axon Verhältnis wird vor der Myelinisierung hergestellt. In diesem Stadium der Differenzierung wird bereits das Schwannzell-spezifische, kalziumbindende S100-Protein exprimiert, sowie Adhäsionsmoleküle oder Rezeptoren (N-CAM, p75NGF-Rezeptor) die für die axonale Elongation eine wichtige Rolle spielen (Zorick und Lemke, 1996). Die SCIP (suppressed cAMP-inducible POU) Genexpression wird anfangs durch den axonalen Kontakt hochreguliert und zu Beginn der Myelinisierung gänzlich unterdrückt, und in dem gleichen Maße wie die SCIP-Expression abnimmt, nimmt die des Zink-Finger Proteins Krox-20,

welches essentiell für die Myelinisierung ist, zu (Topilko et al., 1994; Zorick et al., 1996). Promyelinisierende Schwannzellen treten aus dem Zellzyklus aus, synthetisieren eine Basalmembran und beginnen die Axone zu myelinisieren. Dabei werden Myelin-spezifische Gene wie P0 und MBP (myelin basic protein) stark exprimiert, während die Gene, die unreife Schwannzellen exprimieren, herunterreguliert werden. Im Gegensatz dazu exprimieren nicht-myelinisierende Schwannzellen weiterhin die charakteristischen Gene der unreifen Zellen.

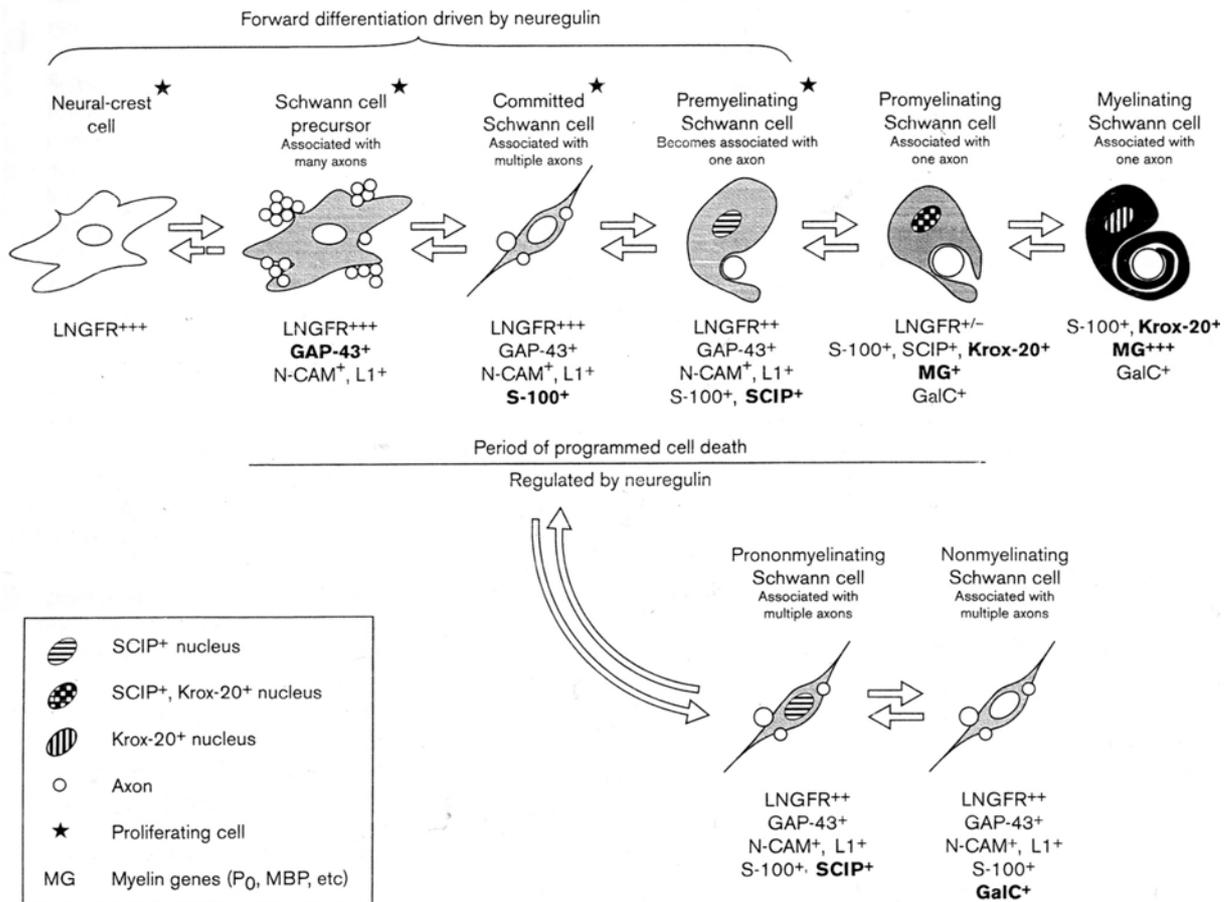


Abb. 1.6 Differenzierungsstadien der Schwannzell-Entwicklung (aus Zorick und Lemke, 1996).

Die Differenzierung von Schwannzell-Vorläufern zu myelinisierenden oder nicht-myelinisierenden Zellen ist reversibel und das Wachstum (bzw. die Differenzierung) sowie das Überleben wird durch Neureguline (β -Hereguline) reguliert (Zorick und Lemke, 1996). Die mitogenen Signale von Neuregulinen wirken über die Phosphorylierung von erbB2 oder erbB3 Rezeptoren (Gassmann und Lemke, 1997), deren Anzahl während der Myelinisierung herunterreguliert wird (Carroll et al., 1997). Das bedeutet, daß Schwannzellen entweder Proliferieren oder Myelinisieren. Hier beschriebene und bekannte Gene die in den

verschiedenen Differenzierungsstadien herauf- oder herunterreguliert werden, sind in Abbildung 1.6 dargestellt.

1.3.1.2 Kultur von Schwannzellen

In Neurofibromen werden Schwannzellen in Verbindung mit Axonen und in der extrazellulären Matrix des Tumors gefunden. Bisher ist sehr wenig über die Zellbiologie dieser Tumore bekannt, da lange Zeit kein *in vitro* System für die Erforschung der pathologischen Eigenschaften von Schwannzellen zur Verfügung stand. Die Kultur von humanen Schwannzellen wurde wegen zu geringem Wachstum und früher Seneszenz (Zellalterung) behindert. Durch die Identifizierung von β -Heregulinen als potentielle Mitogene von humanen Schwannzellen (Levi et al., 1995) und der Benutzung rekombinanter Hereguline für die Schwannzellkultur (Rutkowski et al., 1995) wurde es möglich, ein Zellkultursystem zu etablieren, welches die selektive Expansion von Schwannzellen erleichtert. Dieses System ermöglichte es fortan auch Schwannzellen aus Neurofibromen selektiv zu kultivieren.

1.3.2 MPNSTs

MPNSTs von NF1-Patienten entstehen in der Regel aus einem plexiformen Neurofibrom (Gutmann et al., 1995; Scheithauer et al., 1999; Topsakal et al., 2001; Mautner et al., 2003). Auf zellulärer Ebene ist der neoplastische Ursprung dieser Tumoren gänzlich ungeklärt. Wegen seiner Progression aus plexiformen Neurofibromen heraus liegt der Schluß nahe, daß auch hier Schwannzellen den neoplastischen Ursprungszelltyp darstellen. Jedoch exprimieren nur 50-70 % der MPNSTs das Schwannzell-spezifische Protein S100 (Weiss et al., 1983, Woodruff et al., 2000).

1.3.2.1 Maligne Transformation

Plexiforme Neurofibrome können nach jahrelangem Bestehen durch eine Transformation zu einem malignen Tumor übergehen. Bisher ist bekannt, daß neben dem *NF1*-Gen noch eine Vielzahl weiterer genetischer Änderungen, unter anderem auf den Chromosomen 1p, 5p, 7, 8q, 9p, 10q, 12q, 13q, 15q, 17q und 22q, sowie numerische Chromosomen-Anomalien (Polyploidie), eine Rolle bei dieser malignen Transformation spielen (Lothe et al., 1996; Mechttersheimer et al., 1999; Schmidt et al., 1999, 2000; Frank et al., 2003). Ursache für die Häufung von Mutationen, Allelverlusten und Chromosomen-Umstrukturierungen ist eine

genetische Instabilität, die ein wesentliches Merkmal von malignen Zellen ausmacht. Die Ursachen dieser Instabilität sind nicht bekannt. Eine wesentliche Hypothese der experimentellen Krebsforschung ist, daß der maligne Phänotyp sowohl von der Förderung der Zellproliferation durch das primär auslösende tumorigene Ereignis als auch gleichzeitig oder nachgeschaltet, von einer Inhibierung des Apoptoseweges bestimmt wird. Die Apoptoseverhinderung ist eng mit genomischer Instabilität verknüpft (Tlsty et al., 1997). Die genomische Instabilität charakterisiert die Tumorprogression und wird als Voraussetzung für die Malignität von Tumoren und das Metastasierungsvermögen angesehen (Lengauer et al., 1998). Nach einem allgemein akzeptierten Modell (Feron und Vogelstein, 1990) ist die Entwicklung eines malignen Tumors durch die Abfolge einer Reihe genetischer und epigenetischer Veränderungen im Sinne eines Mehrstufenprozesses gekennzeichnet.

1.3.2.2 Die Tumorsuppressorgene *p16* und *p53*

Neben anderen genetischen Alterationen finden sich gehäuft Mutationen oder Allelverluste der Tumorsuppressorgene TP53 (*p53*) und CDKN2A (*p16*) in MPNSTs von NF1-Patienten (Menon et al., 1990; Legius et al., 1994; Berner et al., 1999; Kourea et al., 1999; Nielson et al., 1999; Birindelli et al., 2001).

Unkontrollierte Zellproliferation ist das wesentliche Merkmal von Tumorzellen, die typischerweise einen Defekt in denjenigen Genen tragen, die den Zellzyklus regulieren. Am effektivsten wirken sich dabei Manipulationen von einzelnen Regulatoren auf die G₁-Phase aus. Während dieser Phase antworten Zellen extrazellulären Signalen, die sie entweder zu einer erneuten Teilung stimulieren oder in einen Ruhezustand versetzen (G₀-Phase). Die Entscheidung der Zelle sich zu teilen geschieht nach dem Überschreiten eines Kontrollpunktes in der späten G₁-Phase, wonach sie unempfindlich für extrazelluläre Wachstumssignale wird und statt dessen autonom durch den Prozeß der Zellteilung schreitet. Der Übergang des Restriktionspunktes und der Eintritt in die S-Phase werden von Cyklin-abhängigen Protein-Kinasen (CDK) reguliert. Diese Kinasen inaktivieren das Retinoblastom-Tumorsuppressor-Protein (RB), wodurch der Austritt aus der G₁-Phase ermöglicht wird (Ewen et al., 1993). Das *p16* Protein (CDKN2A: cyclin dependent kinase inhibitor) gehört zur Familie der INK4 Proteine (**IN**hibitors of **CDK**4 and CDK6) und hemmt die CDK-Aktivität, so daß es einen Arrest in der G₁-Phase provozieren kann (Serrano et al., 1993), (Abb. 1.7). Der Verlust der hemmenden Wirkung des *p16*^{INK4a} Proteins kann so den Übergang in die S-Phase induzieren, und die Tumorzelle kann unkontrolliert wachsen. Die Unterbrechung des

RB-Signaltransduktionsweges spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Krebsarten (Sherr et al., 1996).

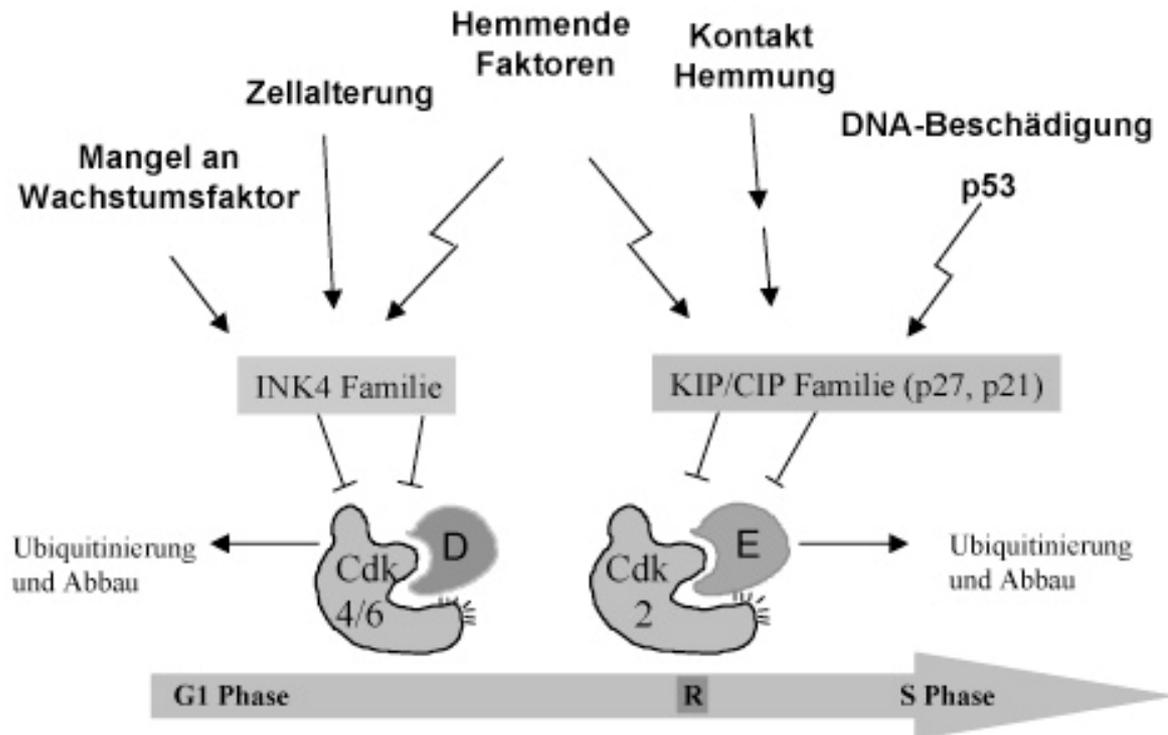


Abb. 1.7 Negative Regulierung des Zellzyklus: Die Inhibitoren der INK4 und KIP/CIP Familien regulieren die Aktivität der CDK-Cyclin (D+E) Komplexe (aus www.vetmed.unibe.ch).

Neben der INK4-Familie gibt es CDK-Inhibitor-Proteine (KIP/CIP) die mit dem Cyclin/CDK-Komplex assoziieren und das aktive Zentrum von CDK hemmen. Das *p53* Protein agiert als Transkriptionsfaktor und reguliert die Transkriptionsrate von Genen, die vorwiegend in die negative Regulation des Zellwachstums involviert sind, wie z.B. *p27* und *p21*, die zur KIP/CIP Familie gehören (Abb. 1.7). Die Rolle des *p53* Gens ist, als Antwort auf Faktoren wie zellulären Streß und DNA-Schäden, den Arrest in der G1-Phase zu bewirken, um die DNA-Reparatur einzuleiten, bevor diese repliziert wird (Kastan et al., 1991). Eine Überexpression von *p53* kann auch zur Einleitung des programmierten Zelltods führen (Yonish-Rouach et al., 1991), welche dafür sorgt, daß Zellen mit irreparablen DNA-Schäden sich nicht mehr teilen, sondern zugrunde gehen. Das *p53* Gen ist das häufigste mutierte Gen in sämtlichen menschlichen Krebsarten (Nigro et al., 1989). Zellen mit einem defektem oder fehlendem *p53* Protein gehen in die S-Phase des Zellzyklus über, ohne daß eine eventuell notwendige DNA-Reparatur durchgeführt werden kann, wodurch die Replikation

geschädigter DNA ermöglicht ist. Somit kann die Inaktivierung der *p53* Funktion eine unkontrollierte Gewebeproliferation bedingen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit besteht aus 4 komplementären Abschnitten:

1. Kultur und Charakterisierung von Schwannzellen.

Seit einigen Jahren ist bekannt, daß die Pathogenese von Neurofibromen mit genetisch veränderten Schwannzellen zusammenhängt. Die biologischen Eigenschaften der neoplastischen Schwannzellen sind bisher unzureichend untersucht worden, da erst kürzlich ein Kultursystem etabliert werden konnte, welches die Expansion dieser Zellen erlaubt. Außerdem birgt das Kultivieren von Schwannzellen trotz optimierter Wachstumsbedingungen weiterhin Probleme wie das Eintreten der Seneszenz nach einigen Passagen und die Kontamination mit Fibroblasten.

Die bisher größte Zahl (575) von kutanen und plexiformen Neurofibromen wurde *in vitro* angesetzt, die Kulturbedingungen nach den eigenen Bedürfnissen optimiert und die Problematik der Schwannzell-Züchtung beschrieben. Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war es, diese Zellen phänotypisch und genetisch zu charakterisieren.

2. Kultur und Charakterisierung von MPNST-Zellen.

Um die Pathogenese und Biologie der MPNSTs zu verstehen, ist ein *in vitro* System essentiell. Jedoch wurden nur vereinzelt MPNST-Zelllinien beschrieben (Basu et al., 1992; DeClue et al., 1992), bei denen weder klinische Daten zu den Patienten, von denen die Tumoren stammen, vorhanden waren, noch wurden diese Zellen genetisch untersucht (z.B. das *NF1*-Gen). Ziel dieser Arbeit war es, MPNSTs von klinisch und genetisch charakterisierten NF1-Patienten anzuzüchten und auf ihren klonalen Ursprung zu prüfen, indem Änderungen auf den *NF1*-, *p53*- und *p16*-Genen untersucht wurden. Für die Charakterisierung von verifizierten MPNST-Zellen wurden diese mit Schwannzellen aus kutanen und plexiformen Neurofibromen derselben Patienten phänotypisch sowie genetisch verglichen.

3. Proteinbiochemischer Vergleich von Schwannzellen und MPNST-Zellen.

Um der Frage nachzugehen, ob bei der malignen Transformation von plexiformen Neurofibromen in MPNSTs auch die Schwannzellen die neoplastischen Ursprungszellen sind, wurde die Proteinexpression beider Tumortypen miteinander verglichen. Die Proteine, die

Schwannzellen während ihrer (reversiblen) Entwicklung exprimieren, wurden untersucht. Dazu gehören die p75NGF- und erbB3- Rezeptoren, Krox20 und S100.

4. Medikamentöse Behandlung von MPNST-Zellen.

Der anti-neoplastische Effekt der Substanzen Exisulind und Sulindac Sulfid konnte bereits an verschiedenen Krebszelllinien gezeigt werden und Exisulind wurde mit großem Erfolg in einer klinischen Studie an FAP-Patienten ohne signifikante Nebenwirkungen eingesetzt. Um zu prüfen, ob dieser Effekt auch an MPNST-Zellen eintritt, sollen diese *in vitro* mit beiden Substanzen behandelt, und die Wachstumshemmung bzw. Apoptose-Einleitung gemessen werden. Zusätzlich wird die Wirkung der Substanzen auf die JNK- und Ras-Signaltransduktionswege geprüft.

Forschungslabore

Diese Arbeit wurde in folgenden Laboren durchgeführt:

- Labor für Hirntumorbiologie der Neurochirurgischen Klinik am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg (Leitung: Prof. M. Westphal)
- Labor der neurochirurgischen Abteilung am Massachusetts General Hospital in Boston (Leitung: Prof. R. Martuza)
- Labor für Tumorbiologie der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (MKG/ZMK) am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg (Leitung: Prof. R. Schmelzle)

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer und Medien

3-iso-Butyl-L-Methylxanthine (IBMX), (Sigma, Steinheim)

Aceton (Merck, Darmstadt)

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (BioRad, München)

Agarose (Eurogentec, Belgien)

Ammoniumpersulfat (BioRad, München)

Basic FGF (Promega, Mannheim)

BrdU (Sigma, Steinheim)

Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)

BSA (Sigma, Steinheim)

Collagenase/Dispase (Roche, Mannheim)

DMEM, 4,5 g/l Glucose (Gibco BRL, Karlsruhe)

DMSO (Sigma, Steinheim)

DTT (BioRad, München)

EGF (Invitrogen, Karlsruhe)

Eisessig (Merck, Darmstadt)

Ethanol (Merck, Darmstadt)

Ethidiumbromid (Fluka, Neu-Ulm)

FBS (Gibco BRL, Karlsruhe)

Forskolin (Sigma, Steinheim)

Glycerol (Merck, Darmstadt)

Glycin (Sigma, Steinheim)

HBSS (Gibco BRL, Karlsruhe)

HCl (Merck, Darmstadt)

Insulin (Sigma, Steinheim)

Isopropanol (Merck, Darmstadt)

L-Glutamin (Gibco BRL, Karlsruhe)

LiChrosolv Wasser (Merck, Darmstadt)

Matrigel (BD Biosciences, Freiburg)

Milchpulver fettarm (Roth, Karlsruhe)

Natrium Azid (Sigma, Steinheim)
Natriumchlorid (Sigma, Steinheim)
Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt)
Natural Mouse Laminin (Invitrogen, Karlsruhe)
Paraformaldehyd (Sigma, Steinheim)
PBS-Puffer (Gibco BRL, Karlsruhe)
PMSF (Roth, Karlsruhe)
Propidium-Jodid (Molecular Probes, Leiden)
Recombinant Human HRG- β 1 EGF domain (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt)
SDS (BioRad, München)
Streptomycin/ Penicillin (Gibco BRL, Karlsruhe)
Sulindac Sulfid und Sulfon (Calbiochem, San Diego)
SuperSignal West Pico Chemilumineszent Substrate (Pierce, Rockford)
TEMED (BioRad, München)
Tris Base (Sigma, Steinheim)
Tris HCl (Sigma, Steinheim)
Triton X-100 (Merck, Darmstadt)
Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL, Karlsruhe)

2.2 Sonstige Materialien und Geräte

0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße (Nerbe)
12 mm Glasplättchen (Assistent)
15 ml und 50 ml Reaktionsgefäße (Falcon)
24 well-Zellkulturschale (Nunc)
250 ml Kulturflasche (Falcon)
50 ml Kulturflasche (Falcon)
6 cm Kulturschalen (Nunc)
10 cm Kulturschalen (Nunc)
6-well-Zellkulturschale (Nunc)
96-well-Filtrationsplatte (Millipore)
96-well-Mikrotiterplatte (Nunc)
96-well-PCR-Platte (Biozym)

96-well-Zellkulturschale (Costar)
Autoklav (Getinge L20419)
Brutschrank (Heraeus, Function-Line)
Digitalkamera (Nikon)
Drehrad (Reis)
Elisa-Reader Elx808 (BioTek Instruments, Inc.)
Filterpapier 3MM (BioRad)
Kryoröhrchen (Nunc)
Kühlzentrifuge (Eppendorf)
Magnetic-Partikel-Concentrator 1 (DynaL)
Magnetrührer (Kamag, RCG)
Mikroskop (Zeiss)
Mikrowelle (AEG)
Milli-Q Reinstwassersystem (Millipore)
Mini-Gel-Elektrophorese-Kammer (BioRad)
Mini-Rocker MR-1 (PeqLab)
Multikanalpipette (Rainin)
MultiScreen-Column Loader (Millipore)
Neubauer-Zählkammer (Assistent)
Nitrozellulosemembran 0,45 µm (Biorad)
Objektträger (Assistent)
Petrischalen (Nunc)
Röntgenfilm (Fuji)
Röntgen-Kassete (Agfa)
Schüttler (PeqLab)
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Falcon)
Spritzenvorsatzfilter 0, 22µm (Millipore)
Suspensions-Kulturschalen (Corning)
Thermocycler (Biometra)
UV-Leuchttisch (Vilber-Lurmat)
VakuPack Schweißgerät (Krupps)
Wasserbad (GFL)
Zellkulturbank (Heraeus Instruments)
Zellschaber (TPP, Schweiz)

Zentrifuge (Heraeus Instruments)

2.3 Patienten und Tumore

Alle Patienten wurden nach den NF1-Kriterien der National Institutes of Health (NIH) diagnostiziert. Die Tumoren wurden direkt nach der chirurgischen Entfernung in Röhrchen mit Hanks gepufferter Salzlösung (HBSS) aufbewahrt und ins Labor gebracht. Ein Teil der Tumoren wurde in der Neuropathologie immunhistologisch untersucht, ein weiterer Teil bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Das restliche Gewebe wurde für die Zellkultur verwendet.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Medien für die Zellkultur

Standard-Medium

10 % FBS

1 mM Natrium-Pyruvat

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin/Streptomycin

in DMEM

bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu 3 Wochen lagern

Schwanzzell-Medium

0,5 mM IBMX (gelöst in 50 % Ethanol)

2 nM β 1-Heregulin (gelöst in PBS mit 0,1 % BSA)

0,5 μ M Forskolin (gelöst in DMSO)

2,5 μ M Insulin (gelöst in PBS)

in Standard-Medium

steril filtrieren

bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu 2 Wochen lagern

2.4.2 Tumorpräparation

Medium für die Tumorgewebe-Disaggregation

0,5 mg/ml Collagenase/Dispase (= 0,05 U/ml Collagenase und 0,4 U/ml Dispase)

in Standard-Medium

steril filtrieren

Beschichtung der Kulturflaschen mit Laminin

4 µg Laminin/ml PBS (bei 4 °C lagern)

In die 50 ml Kulturflaschen wurden 2 ml der Lamininlösung pipettiert und entweder über Nacht bei 4 °C oder eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Vor der Zell-Aussat wurde die Lösung abgesaugt und die Kulturflasche einmal mit PBS gewaschen.

Alle Tumoren wurden immunhistologisch von Neuropathologen des UKE verifiziert. Die Tumoren wurden sofort nach der chirurgischen Entfernung mit Skalpell und Pinzette von Haut und Fettgewebe befreit. Ein Teil des Gewebes wurde in Alufolie verpackt und bei -80 °C gelagert für die spätere DNA-Isolierung. Der restliche Tumor wurde in kleinere Stücke zerschnitten, so daß diese in einer 6 cm oder 10 cm Suspensions-Kulturschale vollständig mit Standard-Medium bedeckt waren. In dieser Form wurden die Gewebestücke bei 37 °C und 5 % CO₂ in Luft für ein bis drei Tage inkubiert.

Für die Isolierung einzelner Zellen mußte die extrazelluläre Matrix schonend aufgelöst werden, ohne die zellulären Strukturen zu beschädigen. Für die Gewebe-Disaggregation wurde daher eine Kombination proteolytischer Enzyme verwendet. Dafür wurden die Tumorstücke weiter mit einer Schere zerkleinert (bis 1 mm³) und für 16-24 Stunden in Medium für die Tumorgewebe-Disaggregation bei 37 °C und 10 % CO₂ in Luft inkubiert. Als nächstes wurde die Suspension mit einer serologischen Pipette auf und ab gesaugt, um eine mechanische Dissoziation des restlichen Gewebes zu bewirken, in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den proteolytischen Enzymen wurde abgesaugt, das Gewebe-Pellet in Schwanzzell-Medium resuspendiert und in eine mit Laminin beschichtete 50 ml Kulturflasche gegeben und bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Handelte es sich bei dem Tumor um ein MPNST, wurden ein Teil davon in Schwanzzell-Medium und ein anderer in Standard-Medium resuspendiert und ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um die nicht angewachsenen Zellen und schwimmenden Gewebeteilchen zu entfernen.

2.4.3 Kultur von Schwannzellen

Schwannzellen wurden in 50 ml Kulturflaschen mit 6 ml Schwannzell-Medium in einem begasbaren Brutschrank bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Gewebekulturbank durchgeführt. Medien und Trypsin wurden bei 4 °C aufbewahrt und vor Gebrauch auf 37 °C in einem Wasserbad erwärmt. Das Medium wurde zweimal die Woche gewechselt.

Selektive Schwannzell-Anreicherungsverfahren

Die Zellpopulation war in der Regel heterogen, neben Schwannzellen befanden sich hauptsächlich Fibroblasten in Kultur. Sobald einer der beiden Zelltypen konfluent gewachsen war (es handelte sich meistens um die Fibroblasten), wurde die Kultur mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Es wurden drei verschiedene Methoden der Trypsinierung angewendet:

(a) Anheftung von Fibroblasten

Zellen wurden mit 1,5 ml Trypsin für 2 min im Brutschrank inkubiert. Hatten sich die Zellen gelöst, wurden sie in 5 ml Standard-Medium aufgenommen und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 6 ml Schwannzell-Medium resuspendiert, in eine 6 cm Kulturschale ohne Laminin-Beschichtung ausgesät und 15 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit können sich die Fibroblasten absetzen und an der Oberfläche anwachsen, die Schwannzellen finden jedoch keine Verankerungsmöglichkeit durch das fehlende Laminin und schwimmen daher weiterhin im Medium. Danach wurde die Zellsuspension abgenommen und in ein/zwei Kulturflaschen mit Laminin überführt, je nachdem wie groß der Schwannzell-Anteil war. Mit dieser Methode können auch Fibroblasten selektiv weitergezüchtet werden, z.B. für die DNA-Isolierung oder für Zell-Lysate.

(b) Milde Trypsinierung

Nach dem Waschen mit PBS wurden 3 ml PBS, 3 Tropfen Medium (einer 5 ml Pipette) und 1 ml Trypsin in die Kultur gegeben und für 2 min bei 37 °C inkubiert. Das Medium inaktiviert mit den im Serum enthaltenden Inhibitoren die weitere Aktivität des Trypsins. Die 3 Tropfen Medium mildern die Wirkung des Trypsins ab, inaktivieren es aber nicht vollständig. Dadurch wurde erreicht, daß sich erst die schwächer verankerten Schwannzellen von der Kulturoberfläche bzw. von den darunterliegenden Fibroblasten ablösen. Durch das zusätzliche Klopfen der Kulturflasche auf dem Tisch konnten die meisten Schwannzellen gelöst werden, während die überwiegenden Fibroblasten noch fest am Boden verankert

waren. Die Lösung wurde abgenommen, in ein Röhrchen mit 3 ml Medium pipettiert und wie oben zentrifugiert. Das resuspendierte Pellet wurde in eine Lamininbeschichtete Kulturflasche gegeben und in den Brutschrank gestellt.

(c) Isolierung von Fibroblasten mit Anti-Fibroblasten-Antikörper

Wasch-Puffer

0,1 % BSA

in PBS

Dynabeads

Pan Mouse IgG (Dynal, Hamburg)

Anti-Fibroblasten-Antikörper

Anti-human CD90 (Thy-1) monoklonal

(Dianova, Hamburg)

Dynabeads Pan Maus IgG sind supermagnetische „Beads“ an denen ein monoklonaler Maus-IgG Antikörper gebunden ist, die für Zell-Isolierungen verwendet werden. In einem direkten Verfahren wird zuerst der primäre Maus-Antikörper (in diesem Fall ein anti-Fibroblasten Antikörper) an die Dynabeads gebunden und daraufhin mit der Zell-Suspension inkubiert. Mit einer magnetischen Apparatur konnten die gebundenen Zellen aus der Lösung isoliert werden (Abb. 2.1). Das Antigen sollte ein Oberflächenrezeptor sein, da die Zellen weder fixiert noch permeabilisiert sind. Für die Zell-Isolierung wurden 2×10^7 Dynabeads/ml der Probe verwendet. Die Dynabeads-Lösung mit gebundenem Antikörper kann zwei Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

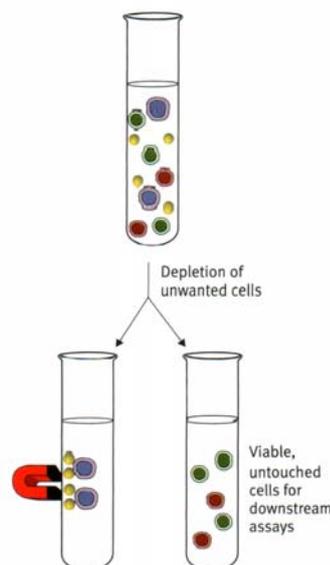


Abb. 2.1 Prinzip der Isolierung von Zellen gebunden an Dynabeads mit Hilfe einer magnetischen Apparatur (aus dem Dynal-Katalog)

Vor der Benutzung wurden die Dynabeads mit Wasch-Puffer gewaschen: 50 μl (2×10^7) Dynabeads wurden in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen gegeben und mit 2 ml Wasch-Puffer resuspendiert. Das Röhrchen wurde für 1min in den Magnethalter geklemmt und der Überstand abgenommen (die Beads sammeln sich am Rand des Röhrchens). Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Die Beads wurden in 50 μl Waschpuffer resuspendiert und in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 μl Fibroblasten-Antikörper für 30 min bei 4 °C in einem Rotations-Mixer gemischt. Das Gefäß wurde kurz anzentrifugiert (2 s) um die Beads aus dem Deckel zu lösen und in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt. In dem Magnethalter wurde der Überstand abgenommen, die Beads mit 2 ml Wasch-Puffer 4-5 mal gewaschen und in 50 μl Puffer gelöst.

Zellen wurden mit 1,5 ml Trypsin für 2 min im Brutschrank inkubiert. Hatten sich die Zellen gelöst, wurden sie in 5ml Standard-Medium aufgenommen und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Wasch-Puffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktions-Gefäß mit den 50 μl Beads mit gebundenem Antikörper gegeben und für 30 min bei 4 °C in einem Rotations-Mixer gemischt. Die Lösung wird nach Überführung in ein 15 ml Röhrchen für 3 min in den Magnethalter geklemmt, der Überstand abgenommen und in einem frischen Röhrchen mit Standard-Medium resuspendiert, bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert, mit Schwanzzellmedium resuspendiert und ausgesät. Die Beads sind für den einmaligen Gebrauch gedacht und werden entsorgt.

2.4.4 Kultur von MPNST-Zellen und Fibroblasten

MPNST-Zellen und Fibroblasten wurden in Standard-Medium unter denselben Bedingungen wie Schwanzzellen kultiviert (siehe 2.4.3). Anfänglich wurden MPNST-Zellen in Schwanzzell-Medium kultiviert, da so jedoch keine Tumorzellen kultiviert werden konnten, wurde auf die Benutzung von Standard-Medium gewechselt. In den ersten Passagen wurde bei MPNST-Zellen die milde Trypsinierung angewendet, um selektiv neoplastische Zellen anzureichern (Fibroblasten lösen sich erst später von der Kulturoberfläche als MPNST-Zellen). Nachdem die Kultur rein war, wurden sowohl MPNST-Zellen als auch Fibroblasten nach der gängigen Methode passagiert.

2.4.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 μl Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Der Abstand zwischen der Unterseite des Deckgläschens und der Oberfläche des Objektträgers beträgt genau 0,1 mm und die Fläche

eines Quadrates 1 mm^2 , so daß das Volumen $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 (= 0,1 \text{ }\mu\text{l})$ umfaßt. Gezählt wurde die Zellzahl aus 4 Quadraten. Die Zellkonzentration je Milliliter berechnet sich aus folgender Formel:

$$\text{Anzahl der Zellen pro Quadrat} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Möchte man z.B. 5 ml einer Suspension mit 1×10^5 Zellen/ml ansetzen, errechnet sich das aus folgender Formel:

$$\frac{1 \times 10^5 \text{ Zellen/ml} \times 5 \text{ ml}}{\text{Anzahl der Zellen/Quadrat} \times 10^4} = \text{Volumen mit } 5 \times 10^5 \text{ Zellen (ml)}$$

Das errechnete Volumen wurde aus der bekannten Zellsuspension entnommen und in diesem Beispiel auf 5 ml mit Medium aufgefüllt.

2.4.6 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Einfrier-Medium

10 % DMSO

in Standard-Medium

Bis zu einer Woche bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ lagern, vor Gebrauch auf Eis kühlen

Zum Einfrieren wurden die Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, trypsiniert (siehe 2.4.3 und 2.4.4), in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Medium überführt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1,8 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Zellen wurden in einer Styropor-Schachtel (für den langsamen Temperaturabfall) bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren (für einige Monate) und für die Langzeit-Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Aufgetaut wurden die Zellen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad. Die Zellen wurden sofort in 8 ml Medium gegeben und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT), um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde dann in 6 ml des jeweiligen Mediums (Schwanzzell- oder Standard-Medium) resuspendiert und in eine 50 ml Flasche pipettiert. Am nächsten Tag

wurde das Medium gewechselt, um die durch das Einfrieren und Auftauen abgestorbenen Zellen und das restliche DMSO zu entfernen.

2.5 Immunzytochemie

Beschichtung der Glasplättchen

Runde 12 mm Glasplättchen wurden in ein Becherglas mit Aceton getunkt und dann in Bechergläsern mit Wasser zweimal gewaschen. Die Behandlung von Glas mit Aceton bewirkt eine Aufrauung der Oberfläche, so daß das Laminin darauf haften bleiben kann. Die Plättchen wurden in die Vertiefungen einer 24-well-Platte gegeben und nach dem Trocknen mit 4 µg Laminin/ml PBS für eine Stunde im Brutschrank inkubiert und dann mit PBS gewaschen. Die Plättchen konnten in PBS bei 4 °C einige Tage aufbewahrt werden. Vor der Benutzung wurde das PBS abgesaugt.

4 % Paraformaldehyd (PFA)

8 g Paraformaldehyd bei 70 °C in 100 ml Wasser lösen
mit NaOH titrieren bis Lösung farblos wird
auf 200 ml mit zweifach-konzentriertem PBS auffüllen
aliquotieren und bei -20 °C lagern

FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)

Derivat des Fluoreszeins
Absorptionswellenlänge: 495 nm (Filter blau)
Emissionswellenlänge: 528 nm (leuchtet grün)

Nachfixierungs-Lösung

5 % Eisessig in Ethanol

Einbettungs-Medium

25 % Glycerin in PBS (Citifluor)

Texas Rot

Derivat von Sulfonyl Chlorid des Sulforhodamin
Absorptionswellenlänge: 595 nm (Filter grün)
Emissionswellenlänge: 620 nm (leuchtet rot)

Tabelle 2.1 Primäre und sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen

Antikörper	Verdünnung	Klonalität	Herkunft/ Konjugation	Hersteller
primäre Antikörper				
Anti-S100 Protein	1:500	polyklonal	Kaninchen	DAKO (Kopenhagen)
Anti-BrdU	1:10	monoklonal	FITC	DAKO (Kopenhagen)
sekundäre Antikörper				
Anti-Kaninchen	1:100	polyklonal	FITC	DAKO (Kopenhagen)
Anti-Kaninchen	1:100	polyklonal	Texas-Rot	Amersham (Freiburg)

Zur Immunfärbung von Zellen wurden ca. 20.000 Zellen pro Plättchen ausgesät (MPNST-Zellen benötigten keine Laminin-Beschichtung der Plättchen) und im entsprechenden

Medium kultiviert. Die Zellen wurden im subkonfluenten bis konfluenten Zustand mit PBS gewaschen und in 4 % Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert.

2.5.1 S100-Färbung

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen für 3-5 min in -20 °C kaltem Methanol permeabilisiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit serumhaltigem Medium gewaschen. Hierauf folgte eine 30 minütige Inkubation in einer feuchten Kammer mit dem ersten Antikörper S100 (in Medium verdünnt) bei 37 °C. Das serumhaltige Medium ersetzt eine zusätzliche Blockierung. Anschließend wurde dreimal mit Medium gewaschen und für 30 min bei 37 °C mit einem FITC-konjugiertem zweiten Antikörper inkubiert. Schließlich wurden die Plättchen für die Kernfärbung nach 3maligem Waschen in Medium für 15 min bei RT mit Propidiumjodid (Verdünnung 1:2500 in Medium) inkubiert. Die Zellen wurden dreimal in Medium gewaschen, in 5 % Eisessig nachfixiert, zweimal mit Wasser gewaschen, auf einem Objektträger in 7 µl Einbettungs-Medium eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Wenn der Nagellack getrocknet war, konnten die Zellen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop mit dem entsprechenden Filter betrachtet und fotografiert werden. Der Prozentsatz an Schwannzellen in Kultur wurde berechnet, indem die Anzahl von S100-positiven Zellen (grüner Zellkörper) durch die Anzahl der gesamten Zellen in Kultur (rote Kerne) geteilt wurde.

2.5.2 Phalloidin-Färbung

Phalloidin

Phallotoxin für F-Aktin

Peptid aus *Amanita phalloides* (Pilz)

Konjugation: Alexa Fluor 488

(Molecular Probes, Leiden)

Permeabilisierungs-Lösung

0,1 % TritonX-100

in PBS

Alexa Fluor 488

grünes Fluorophor

Absorptionswellenlänge: 495 nm (Filter blau)

Emissionswellenlänge: 518 nm (leuchtet grün)

Blockierungs-Lösung

1 % BSA

in PBS

Zellen wurden 3-5 min bei RT mit der Permeabilisierungs-Lösung inkubiert, zweimal in PBS gewaschen und mit der Phalloidin-Lösung (1:5 verdünnt in Blockierungs-Lösung) für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 7 µl Einbettungs-Medium auf einem Objektträger platziert und mit Nagellack versiegelt.

2.5.3 Messung der Proliferation durch BrdU-Einbau

Proliferations-Medium

30 μ M BrdU (5-Brom-2'-Desoxy-Uridin)

in Standard- bzw. Schwannzell-Medium

Bei BrdU handelt es sich um ein Thymidin-Analogon, daß statt der Methyl-Gruppe des Thymidins ein Brom-Atom enthält. Es kann mit Adenin eine Basenpaarung eingehen und wird bei der DNA-Duplikation während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut (Abb. 2.2). Mit dem FITC-konjugierten anti-BrdU-Antikörper kann der Einbau von BrdU in den Zellen nachgewiesen werden.

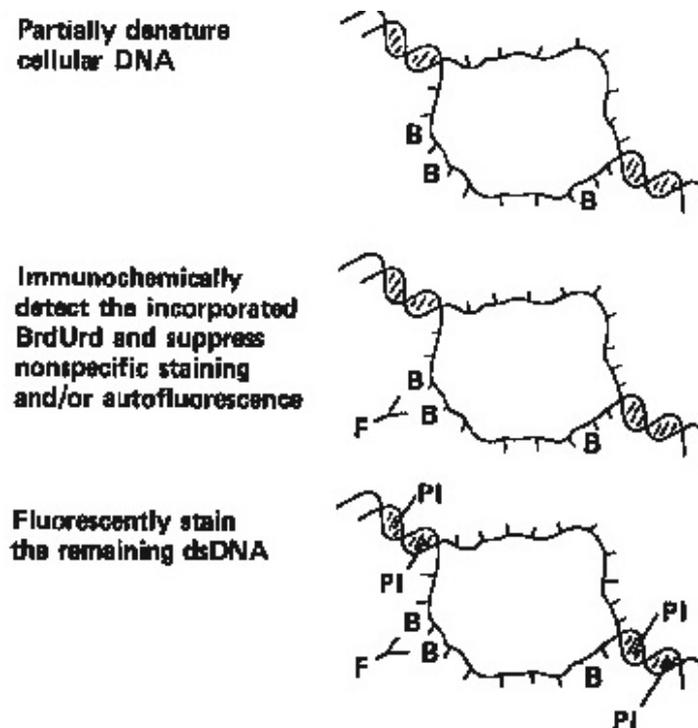


Abb. 2.2 Einbau von BrdU (B) anstelle von Thymidin in der S-Phase des Zellzyklus. Detektion mit FITC-konjugiertem Anti-BrdU-Antikörper (F) und unspezifische DNA-Färbung mit Propidiumjodid (PI).

Es wurden 15.000 Zellen/well in eine 24-well-Platte mit Glasplättchen ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch das jeweilige Proliferations-Medium ersetzt.

(a) *Färbung von MPNST-Zellen*

Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert, mit eiskaltem Methanol 3 min permeabilisiert und für 10 min bei 37 °C mit 2 N HCl zur DNA-Denaturierung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und Medium wurden die Plättchen für eine Stunde bei 37 °C mit dem anti-BrdU-Antikörper inkubiert und wie oben mit Propidiumjodid gefärbt und eingebettet. Unter einem Fluoreszenz-Mikroskop wurden zweimal 500 Zellen ausgezählt. Die Wachstums-Rate ist die Anzahl von grünen Kernen (proliferierende Zellen) durch die Gesamtzahl von Zellen (grüne und rote Kerne).

(b) *Färbung von Schwannzellen*

Schwannzellen wurden in 4 % PFA fixiert und permeabilisiert wie oben beschrieben und mit dem primären S100-Antikörper und folgend mit dem Texas-Rot-konjugierten zweiten Antikörper inkubiert (wie in 2.5.1 beschrieben). Daraufhin wurden die Zellen mit HCl und dem anti-BrdU-Antikörper wie beschrieben inkubiert. Nur S100-positive Zellen (rot) wurden bei der Bestimmung der Proliferations-Rate in die Zählung einbezogen.

(c) *Messung der Wachstums-Hemmung nach Behandlung mit Sulindac-Metaboliten*

Stammlösungen

Exisulind: 250 mM in DMSO

Sulindac Sulfid: 100 mM in DMSO

Einen Tag nach der Aussaat der MPNST-Zellen wurden 100, 250 und 500 μ M Exisulind oder 50, 100 und 125 μ M Sulindac Sulfid oder 0,2 % DMSO (Kontrolle) dem Standard-Medium in Triplikaten beigelegt. Einer Reihe von Zellen wurde gleichzeitig BrdU zugelegt, diese wurden nach 48 Stunden fixiert. Ein anderer Teil wurde erst 48 Stunden nach Behandlungsbeginn mit BrdU versetzt und weitere 48 Stunden später mit 4 % PFA fixiert. Die Färbung mit anti-BrdU-Antikörper erfolgte wie oben beschrieben. Es wurden jeweils dreimal 500 Zellen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop gezählt. Die IC_{50} -Werte (Dosis einer Substanz bei der das Wachstum um die Hälfte reduziert wird) der Wachstums-Hemmung wurden in Microsoft Excel 2000 ausgerechnet. Die hier verwendete DMSO Konzentration überschreitet nicht 0,2 % und hatte keinen Effekt auf das Zell-Wachstum.

2.6 Messung der Zell-Vitalität

XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate) in RPMI 1640 (1 mg/ml)

PMS (N-methyl dibezopyrazin methyl sulfate) in PBS (0,383 mg/ml)

Mischungs-Verhältnis XTT: PMS = 50:1

Metabolisch aktive Zellen reduzieren das gelbe Tetrazolium-Salz XTT zu einem orangen, wasserlöslichen Formazan-Salz. Dieses kann spektralphotometrisch in einem Plate-Reader quantifiziert werden und ist somit ein Maß für die Vitalität der Zellen.

Um die Wirkung der Sulindac Metaboliten auf MPNST-Zellen zu untersuchen, wurde die Vitalität der Zellen nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden gemessen. Dazu wurden 10.000 MPNST-Zellen/well in 100 µl Kulturmedium auf eine Mikrotiter-Platte (96-well) ausgesät und am nächsten Tag in Triplikaten der oben genannten Konzentrationen von Sulindac Sulfid, Exisulind und DMSO behandelt. Nach 48 Stunden wurden 50 µl von der XTT-PMS Mischung in jedes well hinzugefügt und die Zellen 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Absorption der Proben wurde in einem Elisa-Reader bei 450 nm (Referenz 650 nm) gemessen. Die Vitalität der Zellen wurde als Prozentsatz der DMSO-behandelten Kontrollgruppe berechnet, die als 100 % vital festgelegt wurde (diese Kontrollgruppe unterschied sich nicht von unbehandelten Zellen).

2.7 Messung des programmierten Zelltods (Apoptose)

Durchläuft eine Zelle den programmierten Zelltod, schrumpft der Zellkörper mit dem Kern und verdichtet sich. In einem späteren Schritt werden Endonukleasen aktiviert, die die hochgeordnete Chromatinstruktur in 300 kb große Fragmente und anschließend in kleinere DNA-Stücke von ungefähr 50 kb Länge degradiert. Die Kernhülle löst sich auf, die DNA-Fragmente werden jedoch noch von der Zellmembran eingehüllt - im Gegensatz zur Nekrose, bei der die Zellen schwellen und platzen. Die Fragmentierung der DNA wurde auf verschiedene Weise untersucht:

2.7.1 Photometrische Quantifizierung

Mit dem cell death detection elisa^{plus} Kit (Roche, Mannheim)

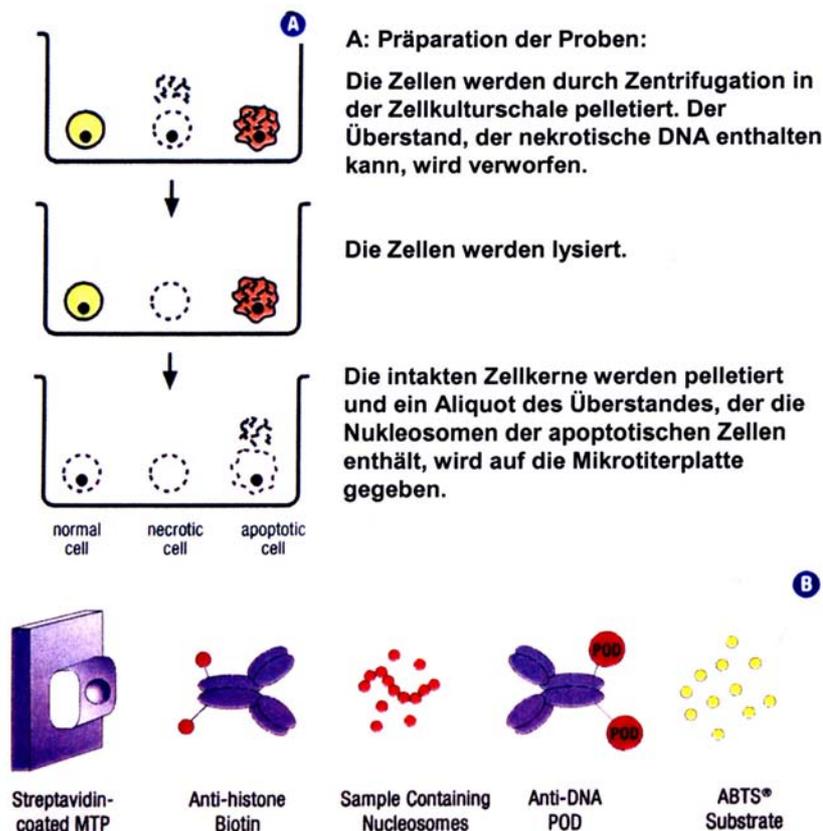


Abb. 2.3 Schematische Darstellung der Funktionsweise des cell death detection elisa^{plus} assays (aus dem Anleitungsheft des Herstellers).

Mit dem *cell death detection elisa^{plus}* assay wird die fragmentierte DNA apoptotischer Zellen mit einem photometrischen Enzym-Immuno-Assay gemessen. Das Zellysate (siehe Abb. 2.3) wird auf eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte (MTP) gegeben und mit einer anti-Histon-Biotin und einer anti-DNA-POD-Lösung inkubiert. Die anti-Histon-Antikörper binden an die Histon-Komponenten der Nucleosome und gleichzeitig an die Streptavidin beschichtete MTP. Hierfür ist die Biotinylierung des anti-Histon-Antikörpers verantwortlich. Anschließend kann hieran der anti-DNA-POD-Antikörper binden. Nach dem Waschen der ungebundenen Komponenten wird durch das Substrat für POD (Peroxidase) eine Farbumsetzung photometrisch bestimmt.

In eine 96-well-Kulturplatte wurden 10.000 MPNST-Zellen/well in Triplikaten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit den unter 2.5.3 angegebenen Konzentrationen von Sulindac Sulfid, Exisulind oder DMSO für 48 Stunden behandelt.

Entsprechend dem oben beschriebenen Prinzip wurde nach der Anleitung des Herstellers fortgefahren. Die Absorption der MTP wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenz 492 nm) in einem Elisa-Reader gemessen. Die Daten wurden mit dem Microsoft-Programm Excel weiter bearbeitet. Der durchschnittliche Absorptionswert der DMSO-behandelten bzw. unbehandelten Proben (Negativ-Kontrollen) wurde von den Sulindac-behandelten Proben abgezogen (normalisiert). Die maximale Absorption der positiv-Kontrolle des Herstellers (ein DNA-Histon-Komplex) wurde als 100 % apoptotisch festgelegt.

2.7.2 TUNEL- (TdT-mediated dUTP nick end labeling) Assay

Mit dem APO-BrdUTM Kit (BD Biosciences)

Der TUNEL-Assay ist eine weitere Methode, um fragmentierte DNA zu detektieren. In dem APO-BrdUTM assay katalysiert eine exogene terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT) den Einbau von Bromo-deoxyuridin Triphosphaten (Br-dUTP) an die 3'OH-Enden von doppel- oder einzel-strängiger DNA. In einem zweiten Schritt werden die DNA-Bruchstellen durch einen FITC-markierten anti-BrdU-Antikörper erkannt und Durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 2.4).

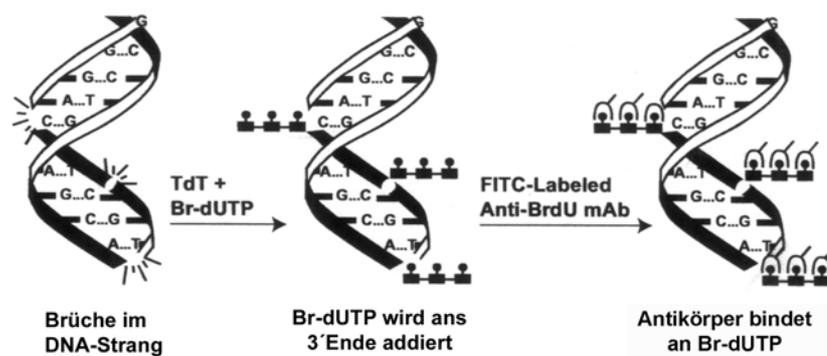


Abb. 2.4 Schematische Darstellung des APO-BrdUTM assays (aus dem Anleitungsheft des Herstellers)

Es wurden $7,5 \times 10^5$ MPNST-Zellen in 6 cm Kulturschalen ausgesät und 24 Stunden später mit 500 μ M Exisulind, 125 μ M Sulindac Sulfid oder 0,2 % DMSO behandelt. Nach 24 Stunden und 48 Stunden wurden die Zellen trypsiniert und in 1 % Paraformaldehyd (in Lösung) fixiert. Weiterhin wurde das oben beschriebene Prinzip nach den Angaben des Herstellers mit denen im Kit beigefügten Chemikalien durchgeführt. Die Menge der gesamten zellulären DNA wurde durch eine Kernfärbung mit Propidiumjodid bestimmt. Die durchflußzytometrische Messung wurde von einer Firma des MGH in Boston durchgeführt.

Die analysierten Diagramme bilden die gesamt-DNA-Menge in rot auf der X-Achse, und die Kerne mit eingebautem FITC-BrdU in grün auf der Y-Achse ab. Das Verhältnis zwischen grünen und roten Kernen ergibt den Prozentsatz an apoptotischen Zellen in der jeweiligen Kultur.

2.7.3 Morphologische Änderungen

Änderungen der Zellkern-Morphologie infolge der Apoptose wurden nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden mit 500 μM Exisulind oder 125 μM Sulindac Sulfide an Propidiumjodid gefärbten Zellen (siehe 2.5.3) unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet und fotografiert.

2.8 Tumor-Wachstumshemmung *in vivo*

Dieser Versuch wurde im Tierstall des MGH in Boston durchgeführt.

Sechs-Wochen alten athymischen Nacktmäusen (Stamm: Balb-c) wurden subkutan 1×10^7 primäre MPNST-Zellen (S805) injiziert. Dafür wurde ein zuvor trypsiniertes Zellpellet aus 6×10^7 Zellen in 600 μl Matrigel und 50 ng/ml bFGF resuspendiert, und 100 μl der Suspension wurden intraperitoneal pro Maus gespritzt. Bei der Zubereitung der Zellsuspension mußte darauf geachtet werden, daß das Matrigel eisgekühlt bleibt, da es bei RT dickflüssig wird. Sobald die Suspension mit den Tumorzellen in die Maus gespritzt und demzufolge auf 37 °C erwärmt wurde, erhärtete sich das Matrigel und die Zellen blieben als Klumpen zusammen. Alle 6 Mäuse haben innerhalb einer Woche einen Tumor entwickelt. Daraufhin wurde mit der Exisulind Behandlung begonnen. Die Mäuse wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen aus je 3 Mäusen eingeteilt und täglich intraperitoneal mit einer Dosis von entweder 100 μl PBS (n=3) oder 250 μg Exisulind (in DMSO)/100 μl PBS (n=3) 14 Tage lang behandelt. Die Tumorgröße wurde täglich zweidimensional gemessen und die Daten wurden statistisch mit dem gepaarten T-Test in Excel (Windows XP) analysiert.

2.9 Western Blot Analyse

2.9.1 Isolierung von Proteinen aus Zellen

Für alle Puffer wurde entmineralisiertes Wasser verwendet.

(a) Lysis von Schwannzellen und MPNST-Zellen zur Untersuchung der Expression Differenzierungs-relevanter Gene

Lysis Puffer	Medium zur Einleitung der Myelinisierung
50 mM TrisCl (pH 8,0)	30 mg/ml BSA
150 mM NaCl	10 µM Forskolin
0,02 % Natrium Azid	in DMEM
1 % Triton X-100	
100 µg/ml PMSF (gelöst in Isopropanol, gelagert bei -20 °C)	

Reine Schwannzellen und MPNST-Zellen wurden in 6-well-Platten (je 2 wells) unter der jeweiligen Bedingung kultiviert (Schwannzell-Bedingung/Standard-Bedingung). Schwannzell-Kulturen aus zwei Akustikusneurinomen (AKN) von NF2-Patienten wurden zum Vergleich auf die gleiche Weise wie aus Neurofibromen erhalten und verwendet. Hatten die Zellen ca. 80 % Konfluenz erreicht, wurden diese mit PBS gewaschen, und je ein well mit Medium zur Einleitung der Myelinisierung und das andere einheitlich mit Schwannzell-Medium inkubiert - um die Expression beider Zelltypen miteinander vergleichen zu können, wurden beide 48 Stunden vor der Lyse unter den gleichen Bedingungen gehalten. Nach 48 Stunden wurden alle Zellen fotografiert. Darauf folgend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, dann 200 µl Lysis Puffer in jede Kulturschale pipettiert, die Zellen von der Kulturoberfläche mit einem Zellschaber abgekratzt, durch mehrmaliges Herauf- und Herunter-Pipettieren in der Pipettenspitze geschert und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß sofort auf Eis gestellt, dann bei -80 °C gelagert. Der Protease-Inhibitor PMSF wurde erst kurz vor der Benutzung dem Lysis Puffer beigemischt, da es bei RT instabil ist.

(b) Lysis von MPNST-Zellen nach medikamentöser Behandlung

Für die Detektion von Ras, Erk1/2 und AKT:

Mg²⁺-haltiger Lysis/ Wasch Puffer (MLB)
aus dem Ras Activation Assay Kit (Upstate)

Es wurden $7,5 \times 10^5$ MPNST-Zellen in 6 cm Schalen ausgesät und 24 Stunden später mit 500 μM Exisulind, 125 μM Sulindac Sufide oder 0,2 % DMSO behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in PBS gewaschen, von der Kulturoberfläche gekratzt und in 400 μl MLB resuspendiert, gesichert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen 24 Stunden nach der Aussaat in Serum-freien DMEM über Nacht kultiviert und am nächsten Tag mit 500 μM Exisulind oder 75 μM Sulindac Sulfid (in Medium mit 0,1 % Serum) inkubiert. Nach 24 Stunden wurden 20 ng/ml EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) hinzugefügt, bevor die Zellen nach 15 min oder 5 Stunden wie oben lysiert wurden.

Für die Detektion der JNK und Kaspase-3:

Chaps Zell-Extraktions Puffer

Chaps aus dem Kaspase-3 Antikörper Kit (Cell Signaling)

5 mM DTT

1 mM PMSF

Docosahexaenoic acid (DHA) und eine Maus-MPNST-Zelllinie wurden freundlicherweise von Andreas Kurtz (MGH, Boston) zur Verfügung gestellt.

Zellen wurden wie oben ausgesät und am nächsten Tag mit 500 μM Exisulind, 125 μM Sulindac Sulfid, 0,2 % DMSO oder 30 μM DHA behandelt. Zellen wurden nach 24 Stunden oder 48 Stunden mit PBS gewaschen, von der Kulturoberfläche gekratzt, in 400 μl Chaps-Zell-Extraktions Puffer resuspendiert, gesichert und schockgefroren. Dieser Puffer lysiert die Zellen unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Als Positivkontrolle für den Kaspase-3 Nachweis diente eine Maus-MPNST-Zelllinie, die 24 Stunden mit 30 μM DHA behandelt wurde, da Maus-MPNST-Zellen die Apoptose nach einer solchen Behandlung einleiten (Beobachtung von Andreas Kurtz).

2.9.2 Quantitative Proteinbestimmung

BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford):

Proteinstandard: 2 mg/ml BSA

Arbeitslösung: Mischungsverhältnis Reagenz A:B = 50:1

Die Gesamt-Proteinkonzentrationen wurden unter der Verwendung des BCA-Tests bestimmt. Proteine bilden mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischen Lösungen einen Komplex (Biuret-Reaktion). Dabei werden die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden.

Eine Protein-Standardreihe mit BSA wurde in folgenden Konzentrationen mit Lysis Puffer verdünnt: 2000 $\mu\text{g/ml}$, 1500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 750 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ und 25 $\mu\text{g/ml}$. Von diesen Lösungen sowie von den unbekannt Proben wurden 10 μl pro well einer 96-well-Platte gegeben und mit 200 μl Arbeitslösung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Erkalten der Lösungen bei RT wurde die Absorption der Proben in einem Elisa-Reader bei 562 nm gemessen. Nach Übertrag der gemessenen Werte in das Excel Programm von Microsoft konnte eine Standardkurve angelegt werden, anhand derer die unbekannt Proteinkonzentrationen errechnet wurden.

2.9.3 Affinitäts-Präzipitation von Ras-GTP

Gluthation Sepharose 4B (Pharmacia LKB)

Raf-1 RBD Agarose (Ras Activation Assay Kit, Upstate)

Gluthation-S Transferase (GST) Fusionsprotein, entspricht der humanen Ras Binding Domain (RBD) von Raf-1, gebunden an Gluthation-Agarose beads. Bindet an Ras-GTP.

2x Laemmli Puffer

120 mM Tris-HCl, pH 6,6

4 % SDS

20 % Glycerol

0,02 % Bromphenolblau

200 mM DTT (Lagerung bei -20 °C, Zugabe erst kurz vor Benutzung)

Bei der Affinitäts-Präzipitation wird mit Hilfe von Gluthation-Agarose Beads ein Protein-Protein-Komplex aus dem gesamten Zelllysate präzipitiert.

Die Gesamtproteinmenge aller Proben wurde durch Verdünnung mit einer entsprechenden Menge an Mg^{2+} -Lysis Puffer gleichgesetzt. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden zu 100 μl Lysat 10 μl Gluthation Sepharose Beads gegeben und für 10 min bei 4 °C auf einem Drehrad rotiert. So werden alle unspezifischen Proteine gebunden (pre-clearing). Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Gefäß gegeben, 5 μl Raf-1 Beads hinzugefügt und 30 min bei 4 °C auf einem Drehrad rotiert. Der Überstand wird nach Zentrifugation (1 min bei 14000 rpm) abgenommen und für die Detektion von Erk1/2 oder

AKT aufbewahrt. Das Pellet mit dem gebundenem Ras-GTP wird zweimal in 100 µl MLB gewaschen und nach der letzten Zentrifugation in 20 µl MLB resuspendiert.

Dazu wurden 20 µl Laemmli-Puffer (2x) gegeben und die Proben für 5 min in kochendem Wasser erhitzt (mit Verschlusskappe). Dies bewirkt die Trennung der Beads von dem Protein-Komplex und die Denaturierung der Proteine. Die Beads wurden auf den Gefäßboden herunterzentrifugiert und nur der Überstand wurde weiterverarbeitet.

2.9.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(a) *Probenvorbereitung*

4x Laemmli Puffer

240 mM Tris-HCl (pH 6,6)

8 % SDS

40 % Glycerol

0,04 % Bromphenolblau

400 mM DTT

Von jeder Probe wurden entsprechend 25 µg Gesamt-Proteinmenge (gelöst in Lysis Puffer) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Lysis Puffer auf 30 µl aufgefüllt. Hinzu kamen 10 µl Laemmli Puffer (4x) und daraufhin wurden die Proben 5 min in kochendem Wasser denaturiert. Die Denaturierung mit DTT löst die Disulfid-Brückenbindungen und somit die Sekundärstruktur der Proteine weitgehend auf.

(b) *Gießen der Gele*

10 % APS

1 g Ammoniumpersulfat (BioRad)

10 ml Wasser

1 M Tris (pH 6,8)

60,5 g Tris

mit HCl auf pH 6,8 justieren

auf 500 ml Wasser

10 % SDS

1 g Sodium Dodecyl Sulfat (BioRad)

10 ml Wasser

1,5 M Tris (pH 8,8)

91 g Tris

mit HCl auf pH 8,8 justieren

auf 500 ml Wasser

Die Benutzung von Tris HCl wird bei der Zubereitung von Polyacrylamid-Gelen nicht empfohlen, da die Salzkonzentration der Puffer zu hoch wäre und die Polypeptide nicht geradlinig durch das Gel wandern würden.

Tabelle 2.2 Gießschema für SDS-Polyacrylamid-Gele (für jeweils 2 Gele)

	Trenngel			Sammelgel
Proteingröße (kDa)	50-200	16-68	12-43	4
Acrylamid Anteil (%)	6	10	15	
Wasser (ml)	5,3	4	2,3	3,4
30 % Acrylamid-Mix (ml)	2	3,3	5	0,83
1,5 M Tris, pH 8,8 (ml)	2,5	2,5	2,5	0,63
1 M Tris, pH 6,8 (ml)				
10 % SDS (µl)	100	100	100	50
10 % APS (µl)	100	100	100	50
TEMED (µl)	8	4	4	5

Die Proteine werden in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt. Je größer die Proteine sind, desto niedriger wird die Acrylamid-Konzentration gewählt. Durch das Detergens SDS werden die Proteine mit einer negativen Ladung umgeben. In einem elektrischen Feld laufen diese nun ihrer Größe nach (kleine Proteine laufen schneller) in die Richtung der Anode.

Das Polyacrylamid-Gel wurde in einer Mini-Gel-Gießvorrichtung (10x10 cm) nach dem Schema aus Tabelle 2.2 gegossen, je nachdem wie groß das Protein war, das später detektiert werden sollte. Zwischen zwei Glasplatten mit seitlich angebrachten, 1 mm dicken Trennstäben (gleiche Dicke des Kammes) wurde zuerst das jeweilige Trenngel bis ungefähr $\frac{3}{4}$ der Höhe der Glasplatten gegossen. Auf das noch nicht polymerisierte Gel wurde zum Luftabschluß Wasser pipettiert. Nachdem das Trenngel polymerisiert war (ca. 20 min), wurde das Wasser vorsichtig abgegossen und mit Filterpapier getrocknet. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel gegossen (Tab.2 2), in das der Kamm mit 10 Taschen gesteckt wurde.

(c) *Größen-Auftrennung der Proteine*

Elektrophorese Puffer

25 mM Tris (pH 8,3)

192 mM Glycin

0,1 % SDS

Molekulargewicht-Marker

Precision Plus Protein Standards

Dual Color (BioRad)

Nach der Polymerisierung des Sammelgels wurden die Gele aus der Gießkammer genommen und die Kämme vorsichtig herausgezogen. Die Glasplatten mit den Gelen wurden in der

Gelelektrophoresekammer mit einer Klammervorrichtung befestigt. Die gesamte Gelkammer wurde mit ca. 900 ml Elektrophorese Puffer gefüllt. Die Kammern wurden unter Zuhilfenahme einer Spritze mit dem Puffer ausgespült, um restliche Gelstücke zu entfernen. Das gesamte Probenvolumen (40 µl) wurde vorsichtig mit einer 100 µl Hamilton-Spritze in die Taschen geladen und 10 µl des Molekulargewicht-Markers wurden in eine Tasche pro Gel aufgetragen. Zum Einlaufen (Sammeln) der Proteine in das Sammelgel wurde eine Spannung von 120 Volt gewählt. Nachdem die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 200 Volt erhöht. Die Auftrennung der Proteine wurde so lange durchgeführt, bis der Laemmli-Puffer die unterste Kante des Gels erreicht hatte (ca. 45 min).

2.9.5 Transfer der Proteine

Transfer Puffer

25 mM Tris (pH 8,3)

192 mM Glycin

20 % Methanol

Zuerst wurden 4 Glasfibernatten, 8 Lagen Whatman-Filterpapier und zwei Nitrocellulose-Membranen (0,45 µm) für 5 min in den Transfer Puffer gelegt. Die Gele wurden aus den Kammern genommen und eine Glasplatte wurde vorsichtig entfernt. Mit einem Skalpell wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel wurde in den Transfer Puffer überführt. Das Gel wurde nach der „Sandwich“ Methode in einer Halterung eingebettet: auf eine Glasfibernatte kamen zwei Lagen Filterpapier, darauf das Gel und auf dieses die Membran, dann wieder Filterpapier und Matten. Nach dem Auflegen jeder Lage werden mögliche Luftbläschen durch das Überstreichen mit einer Pasteur-Pipette entfernt (das Sandwich sollte mit Puffer bedeckt sein). Die Halterungen wurden in die Transfer-Kammer mit Transfer Puffer gesteckt, so daß die Membran zwischen der Anode und dem Gel lag (Abb. 2.5). Die Proteine bilden mit dem SDS einen negativ geladenen SDS-Protein-Komplex mit konstantem Ladung- zu Masse-Verhältnis. Dieser negativ geladene Komplex wandert im elektrischen Feld zur Anode, bis zum Erreichen der Membran, an der die Proteine haften bleiben. Dieser Transfer wurde bei 120 Volt für 90 min durchgeführt, wobei die gesamte Blotkammer auf Eis gekühlt wurde und auf einem Magnetrührer stand, wodurch der Puffer permanent gemischt wurde.

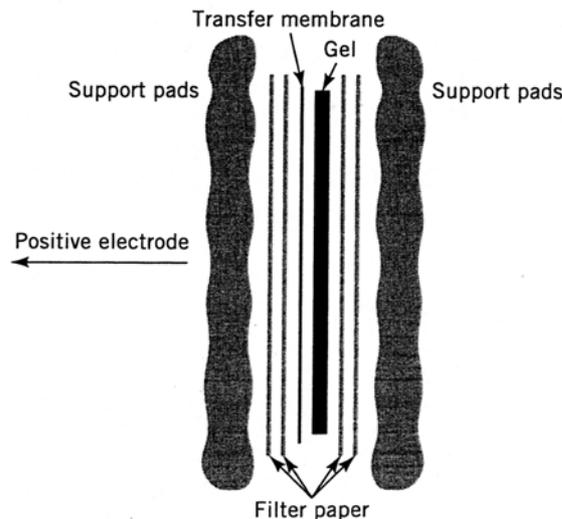


Abb. 2.5 Sandwich für den Transfer von Proteinen vom Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (aus Harlow und Lane, 1999)

2.9.6 Antikörper-Bindung und Detektion

Tris gepufferte Salzlösung (TBS)

20 mM Tris (mit HCl auf pH 7,6 justieren)

0,8 % NaCl

Blockierungs-Puffer mit Milch

5 % Milch in TBS/T (w/v)

Antikörper Verdünnungs-Puffer

3 % Milch in TBS/T (w/v)

TBS/Tween20 (TBS/T)

0,1 % Tween-20 in TBS

Blockierungs-Puffer mit BSA

3 % BSA in TBS (w/v)

Die Nitrocellulose-Membran wurde in eine kleine Schale mit Blockierungs-Puffer mit Milch gegeben und für 30-60 min bei RT auf einem Schüttler blockiert, um unspezifische Protein-Bindungen des Antikörpers zu verhindern (für die Detektion von phospho-Erk1/2 und Erk1/2 wurde mit BSA über Nacht bei 4 °C blockiert). Anschließend wurden die jeweiligen primären Antikörper in 3 ml Verdünnungs Puffer entsprechend verdünnt (siehe Tab. 2.3) und zusammen mit der Membran in ein Plastiktasche gegeben, mit einem Schweißgerät versiegelt und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nur phospho-Erk1/2 und Erk1/2 wurden in Blockierungs Puffer mit BSA verdünnt und 2 Stunden bei RT inkubiert.

Tabelle 2.3 Primäre und sekundäre Antikörper für Western Blot

Antikörper Anti-	Klonalität	Herkunft/ Konjugation	Verdünnung	Größe des detektierten Proteins (kDa)	Hersteller
Primäre Antikörper					
ErbB3	polyklonal	Kaninchen	1:1000	200	Santa Cruz
p75-LNGFR	polyklonal	Kaninchen	1:1000	75	Promega
α -Tubulin	monoklonal	Maus	1:5000	53	Oncogene
Krox20	polyklonal	Kaninchen	1:100	48	Covance
phospho- Erk1/2	polyklonal	Kaninchen	1:1000	44/42	Upstate
Erk1/2	polyklonal	Kaninchen	1:1000	44/42	
Ras	monoklonal	Maus	1:1000	21	
phospho- Akt1/PKB α	polyklonal	Kaninchen	1:1000	60	
Phospho- SAPK/JNK	polyklonal	Kaninchen	1:1000	54/46	Cell Signaling
Cleaved Kaspase-3	polyklonal	Kaninchen	1:1000	17/19	
Sekundäre Antikörper					
Kaninchen	polyklonal	HRP	1:2000	-	Santa Cruz
Maus	polyklonal	HRP	1:2000	-	

Als nächstes wurde die Membran dreimal für 15 min mit TBS/T gewaschen und anschließend für eine Stunde bei RT mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Tab. 2.3) auf die selbe Weise inkubiert. Daraufhin wird die Membran wieder dreimal je 15 min mit TBS/T gespült. Das chemilumineszente Substrat für die Horseradish-Peroxidase (HRP) befand sich in der ECL-Lösung (SuperSignal West Pico). Für zwei Membranen wurde jeweils 1 ml der ECL-Lösungen A und B zusammen pipettiert und für 1 min bei RT auf der Membran inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgetropft (oder mit Tüchern getrocknet) und in einer Röntgen-Kassette zwischen 2 transparente Folien gelegt. In einer Dunkelkammer wurde für unterschiedliche Zeitintervalle (15 s bis 2 min) ein Röntgenfilm auf der Membran exponiert, der an den chemilumineszenten Bereichen der Membran (dort wo der Antikörper gebunden

ist) belichtet wurde. Der belichtete Film wurde in einem automatischen Filmentwickler entwickelt.

Stripping

Zur Entfernung der gebundenen Antikörper auf einem Western Blot wurde dieser für 5 min in Wasser auf einem Schüttler gewaschen, dann für 5 min bei RT in 0,2 M NaOH geschüttelt und wieder 5 min in Wasser gewaschen. Daraufhin wurde die Membran erneut blockiert und mit dem nächsten primären Antikörper inkubiert (siehe oben).

2.10 DNA-Isolierung

mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit und dem QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden)

Soweit nicht anders bezeichnet wurde LiChrosolv Wasser für alle molekularbiologischen Ansätze verwendet.

(a) DNA aus Blut

Mit dem DNA Blood Mini Kit können ca. 6 µg genomische DNA (durchschnittliche Fragmentgröße: 20-30 kb) aus 200 µl Blut (in EDTA) extrahiert werden. Die Extraktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Kurzbeschreibung: Blut-Lymphozyten werden in Lysis-Puffer mit Protease bei 56 °C für 10 min lysiert. Die DNA in der salzhaltigen Lösung wird mit Ethanol gefällt und in einer „Spin-Column“ zentrifugiert. Dabei wird die gefällte DNA an die Silika-Gel Membran in der Säule gebunden, wobei Proteine und andere störende Moleküle durch die Membran zentrifugiert werden. Die an die Membran gebundene DNA wird in zwei weiteren Schritten mit Ethanol-haltigen Waschpuffern gereinigt. Die gereinigte DNA wird in 200 µl Wasser gelöst und in ein frisches Röhrchen hineinzentrifugiert. Für die PCR wird eine fünf-fache Verdünnung dieser DNA-Stammlösung verwendet.

(b) DNA aus Tumorzellen

Zellen in Kultur wurden trypsiniert (siehe 2.4.3). Das Zellpellet aus etwa 5×10^6 Zellen wurde in 200 µl PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Weiterhin wurde wie in *DNA aus Blut* fortgefahren. Aus 5×10^6 Zellen wurden ca. 50 µg genomische DNA isoliert.

(c) DNA aus Tumorgewebe

Von dem gefrorenen Tumorstück wurden mit einem Skalpell ca. 25 mg Gewebe abgeschabt (am besten von dem noch gefrorenen Tumor) und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben.

Dazu wurden 180 µl Gewebe-Lysis-Puffer und 20 µl Proteinase K gegeben. Das Gewebe in der Lösung wird über Nacht bei 56 °C in einem Schüttler lysiert. Als nächstes wird das zersetzte Gewebe mit zusätzlich 200 µl Lysis Puffer für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von Ethanol wird wie unter *DNA aus Blut* fortgeföhren. Ein Milligramm Gewebe ergab ca. 0,2-1,2 µg DNA.

2.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.11.1 Primer

Die Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Diese wurden als lyophilisiertes Pellet geliefert und die Stammlösung mit Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/ml eingestellt. Außerdem wurde eine Arbeitslösung mit 10 pmol/ml für jeden einzelnen Primer hergestellt.

Für die Sequenzierung der *p53* Exons 4 bis 8 (Mutations-Hotspot) wurden die Primer aus Tabelle 2.4 verwendet.

Für die LOH-Analyse des *NF1*-, *p53*- und *p16*-Gens wurden 13 Primer verwendet, wobei einer der beiden Primer eines Paares am 5'Ende mit einem der Fluoreszenz-Farbstoffe 6-FAM, TAMRA, HEX oder JOE markiert war (Tab. 2.5; farbliche und fettgedruckte Sequenz).

Tabelle 2.4 Primer-Sequenzen für die Sequenzierung der Exons 4-8 des *p53* Gens.

Primer	Sequenz (5' - 3')	Fragment Größe (bp)
	SENSE ANTISENSE	
Exon 4	CGTTCTGGTAAGGACAAGGGT AAGAAATGCAGGGGGATACGG	446
Exon 5	CTGTTCACTTGTGCCCTGAC AACCAGCCCTGTCGTCTCTC	272
Exon 6	GCTGGAGAGACGACAGGGCT CAACCACCCTTAACCCCTCC	229
Exon 7	CTTGCCACAGGTCTCCCAA AGGGGTCAGCGGCAAGCAGA	237
Exon 8	TTCTTACTGCCTCTTGCTT AGGCATAACTGCACCCTTGG	231

Tabelle 2.5 Die *NFI*, *p53* und *p16* Mikrosatelliten-Marker

Primer	Sequenz (5' - 3')	Labeling	Fragment- Längen- Bereich (bp)	Annealing- Temperatur
	sense antisense			
<i>NFI</i> Marker				
M98509	TGAGAGGCCAAGGTGAGAGAATTG CCTCCCAAATGCTGGGATTACAG	6-FAM	235-266	60
IVS27AAAT2.1	CAAGAAAAGCTAATATCGGC GGAACCTTAAGTTCACCTAG	6-FAM	395-411	55
IVS27TG24.8	CTGAAGCAGGAGAATTGC CTAAAGATGTCTATAACAGGT	TAMRA	270-292	50
IVS27CA28.4	GTTCTCAACTTAAATGTAAGT GAACATTAACAACAAGTACC	TAMRA	207-219	50
IVS27AC33.1	CCCATACCTAGTTCTTAAAGTCTG TAACAATTGTGGAAGTGCAGCAATTATT	6-FAM	184-216	55
IVS38GT53.0	CAGAGCAAGACCCTGTCT CTCCTAACATTTATTAACCTTA	TAMRA	171-187	50
NFI-3'-1	CTTCCATGGCTGCTAACATC CCCTGTGGTGTAGTTCAACA	HEX	233-249	55
<i>p53</i> Marker				
D17S520	GGAGAAAGTGATACAAGGGA TAGTTAGATTAATACCCACC	JOE	130-144	55
D17S796	CAATGGAACCAAATGTGGTC AGTCCGATAATGCCAGGATG	TAMRA	144-174	55
D17S804	GCCTGTGCTGCTGATAACC CACTGTGATGAGATGTCATTCC	JOE	156-170	55
<i>p16</i> Marker				
D9S157	AGCAAGGCAAGCCACATTTTC TGGGGATGCCAGATAACTATATC	6-FAM	120-135	55
D9S168	GGTTTGTGGTCTTTGTAAGG TGGTTTGTGGTATAACTATCATTG	TAMRA	227-247	55
D9S171	AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT	6-FAM	157-179	55

2.11.2 Amplifikation

100 mM dNTP Set (Invitrogen, Karlsruhe)

AmpliTaq Gold (Roche, Mannheim)

10xPCR-Puffer mit MgCl₂ (Roche, Mannheim)

Chill-Out Liquid Wax (RJ Research, Boston)

Je PCR wurden 8 µl MasterMix angesetzt:

Wasser	4 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
10x Puffer mit 15 mM MgCl ₂	1 µl
Primer sense (10 pmol/ml)	1 µl
Primer antisense (10 pmol/ml)	1 µl
AmpliTaq Gold TM (5 U/µl)	0,05 µl

In 96-well-PCR-Platten wurden 2 µl Wasser (eine Negativ-Kontrolle/Primer) oder 2 µl DNA-Probe vorgelegt und 8 µl MasterMix dazupipettiert. Zur Verhinderung der Verdunstung wurden 10 µl Öl auf jede Probe gegeben. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach dem Programm in Tabelle 2.6. Die Annealing-Temperatur der Primer variierte und wurde entsprechend eingestellt (siehe Tab. 2.5). Die AmpliTaq Gold Polymerase ist durch eine spezielle Modifikation bei RT inaktiv und muß erst durch 15 minütiges Erhitzen auf 94 °C aktiviert werden. So wurden unspezifische Reaktionen beim Ansetzen der PCR vermieden.

Tabelle 2.6 PCR-Programm für die DNA-Amplifikation

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen
94	15 min	1
94	30 s	35
50/ 55/ 60	30 s	
72	1 min	
72	10 min	1

2.11.3 Nachweis des PCR-Produktes im Agarosegel

10x TBE Puffer (Invitrogen)

1 M Tris

0,9 M Borsäure

0,01 M EDTA

Ladepuffer

DNA Gel loading buffer, 10x (Eppendorf, Hamburg)

Größenmarker

DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1 kbp (Roche, Mannheim)

Vor der Weiterverarbeitung wurde das PCR-Produkt auf einem Agarosegel aufgetrennt, um zu überprüfen, ob die gewünschten DNA-Fragmente erfolgreich amplifiziert wurden. Die nachzuweisenden Fragmentgrößen bewegten sich unter 500 bp, daher wurde ein 2 %iges Agarosegel verwendet. Dazu wurde die Agarose in 0,5x TBE Puffer gelöst, indem sie in der Mikrowelle aufgekocht wurde. Die abgekühlte Agarose (ca. 50 °C) wurde in Gelkammern gegossen und ein Kamm in die noch flüssige Agarose gesteckt. Nach Erhärten der Gele (ca. eine Stunde) wurden sie in eine Gelkammer mit 0,5x TBE bedeckt. Pro Tasche wurden 3 µl PCR-Produkt gemischt mit 1 µl Ladepuffer (5x) pipettiert, in eine der Taschen wurden 5 µl Größenmarker gegeben. Die Fragmente wurden ca. 30 min bei einer Spannung von 100 Volt aufgetrennt. Die negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld zu der positiven Elektrode (Anode). Dabei wandern die kleineren DNA-Fragmente schneller durch das Gel.

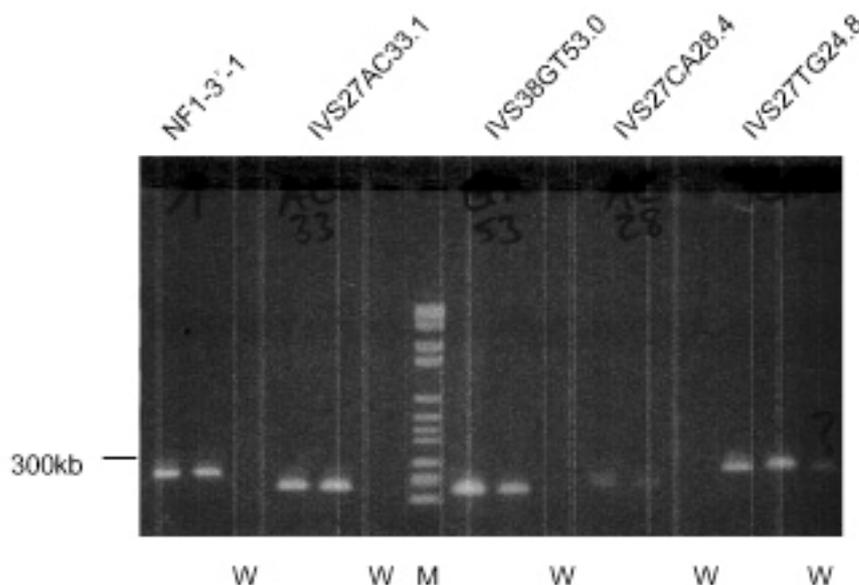


Abb. 2.6 Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR am Beispiel von zwei DNA-Proben und 5 *NFI* Mikrosatelliten-Markern. W: Wasserprobe (Negativ-Kontrolle), M: Größenmarker

In einem Ethidiumbromidbad (100 µg/ml) wurden die Gele für 20 min inkubiert und überschüssiges Ethidiumbromid wurde mit Wasser abgespült. Unter UV-Licht wurden die Fragmente sichtbar gemacht und mit einer Kamera dokumentiert (Abb. 2.6).

2.12 Sequenzierung

Die Untersuchung der *NF1* und *p53* Gensequenzen erfolgte mittels automatisierter fluoreszenter Sequenzierung in einem „Automated Genetic Analyser“.

In einem ersten Schritt wurden die einzelnen Exons aus der jeweiligen DNA (Blut/Tumor/Zellen) mittels PCR amplifiziert. Bei der Elongation wird eine Phosphodiester-Brückenbindung zwischen der 3'OH-Gruppe des Primers und der 5'Phosphatgruppe des angehängten Desoxinukleotids gebildet. Wird statt einem Desoxynukleotid ein Didesoxynukleotid eingebaut, ist die Elongation gestoppt, da dieses Nukleotid keine freie OH-Gruppe besitzt. Bei einer Sequenzierung mit Dye-Terminatoren ist jedes der 4 verschiedenen Didesoxy Terminatoren (ddNTPs) mit einem anderen Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Bei einem Sequenzierungs-Ansatz wird nur ein Primer verwendet (sense oder antisense) und die wachsende Kette wird beim Einbau eines ddNTPs beendet und gleichzeitig mit dem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, der dieser Base entspricht (Abb. 2.7).

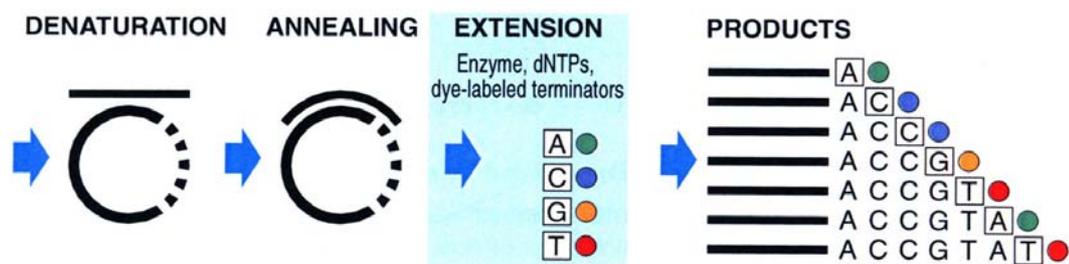


Abb. 2.7 Zyklus einer Sequenzierung (aus dem ABI-Prism Benutzerhandbuch)

Bei der Analyse im „Automated Genetic Analyser“ wandert die Probe beim Anlegen von Strom elektrophoretisch durch eine Polymer-gefüllte Kapillare. Erreicht das DNA-Fragment ein Detektionsfenster, wird der gebundene Fluoreszenz-Farbstoff durch einen Laser angeregt und die emittierte Wellenlänge wird in ein digitales Signal umgeschrieben, das von einer Software analysiert wird (Abb. 2.8).

Tabelle 2.7 Sequenzierungs-Programm

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen
Sequenzierung		
96	10 s	24
55	5 s	
60	4 min	

2.12.2 Aufreinigung

Sephadex[®] G50 (Sigma, Steinheim)

Zur Entfernung der überschüssigen BigDye-Terminatoren wird der Sequenzierungs-Ansatz mittels Gel-Filtration aufgereinigt.



Abb. 2.9 Für das gleichmäßige Aufladen des Sephadex-Pulvers in eine 96-well-Platte wird der MultiScreen Column Loader verwendet (A). Die so entstandenen Mini-Säulen reinigen die Farbstoff-markierten Sequenzierungsprodukte mittels Gel-Filtration auf (B), (aus dem Anleitungsheft des Herstellers).

Mit dem MultiScreen Column Loader (Abb. 2.9 A) wurde das Sephadex-Pulver in eine 96-well-Filtrationsplatte geladen, wodurch 96 Mini-Säulen entstanden. Zu dem Sephadex-Pulver wurden 300 µl Wasser in jedes well der Filtrationsplatte mit einer Multi-Channel-Pipette zugegeben und das Gemisch für 3 Stunden bei RT zum Quellen stehen gelassen. Daraufhin wurden die Platten in einer Zentrifuge mit einer Platten-Rotor-Vorrichtung für 5 min bei 2100 rpm zentrifugiert (das Wasser wurde in einer 96-well-Mikrotiter-Platte

aufgefangen). Es wurden erneut 150 µl Wasser dazupipettiert und zentrifugiert. Zu den 5 µl Sequenzierungs-Proben wurden 30 µl Wasser hinzugegeben und der gesamte Ansatz auf die Filtrationsplatte übertragen. Diese wurde wie oben zentrifugiert und in einer 96-well-PCR-Platte aufgefangen. Die überschüssigen Farbstoffe bleiben im Gel hängen und die DNA-Fragmente wandern in die untere Platte (Abb. 2.9 B). Die aufgefangene Lösung mit den DNA-Fragmenten wurde ein weiteres Mal mit einer neuen Filtrationsplatte gereinigt. Zu den zweimal gefilterten Proben (ca. 40 µl) wurden 40 µl Wasser gegeben, die Platte in den „Automated Genetic Analyser“ gestellt und sequenziert.

Die *NFI*-Mutationsanalyse wurde nach dem gleichen Schema durch direkte Sequenzierung der 57 Exons im Labor routinemäßig durchgeführt (Kluwe et al., 2003).

2.13 LOH-Analyse

Die „loss of heterozygosity“ (LOH)-Analyse basiert auf der Untersuchung von polymorphen genetischen Markern des menschlichen Genoms. Es werden vor allem sogenannte Mikrosatelliten-Polymorphismen, bei dem sich die Allele durch die Anzahl kurzer repetitiver Sequenzen unterscheiden, verwendet. Hat ein Patient verschiedene Allele von seiner Mutter und seinem Vater geerbt, d.h. im Falle der Heterozygotie, kann durch den Vergleich beider Allele in Tumor- und Normal DNA eines Individuums eine Deletion entsprechend dem sogenannten Heterozygotie-Verlust (LOH) festgestellt werden.

Abschnitte auf der DNA, die sehr kurz sind und sich mehrfach wiederholen (zB. „ACACAC.“), werden, wenn sie eine Größe zwischen 4-12 bp haben, als Mikrosatelliten bezeichnet. Sie liegen in der Regel in nicht-kodierenden DNA-Regionen: zwischen zwei Genen oder innerhalb einzelner Gene (Introns). Treten Mutationen in nicht-codierenden Bereichen der DNA auf, so wird das Überleben eines Organismus nicht betroffen. Daher bleiben alle diese Veränderungen erhalten und werden weitervererbt, wodurch eine große Heterogenität erzeugt wird. Die Zahl der Wiederholungen von jedem Mikrosatellit ist deshalb von Mensch zu Mensch sehr unterschiedlich.

In den Introns des *NFI* Gens sind mehrere solche Mikrosatelliten die als Marker verwendet werden können. Wird in der Tumor-DNA nur ein Allel detektiert (Homozygot), obwohl die DNA aus dem Blut des entsprechenden Patienten zwei verschieden lange Allele aufweist

(Heterozygot), spricht man von einem Verlust der Heterozygotie (LOH) im Tumor (Abb. 2.10).

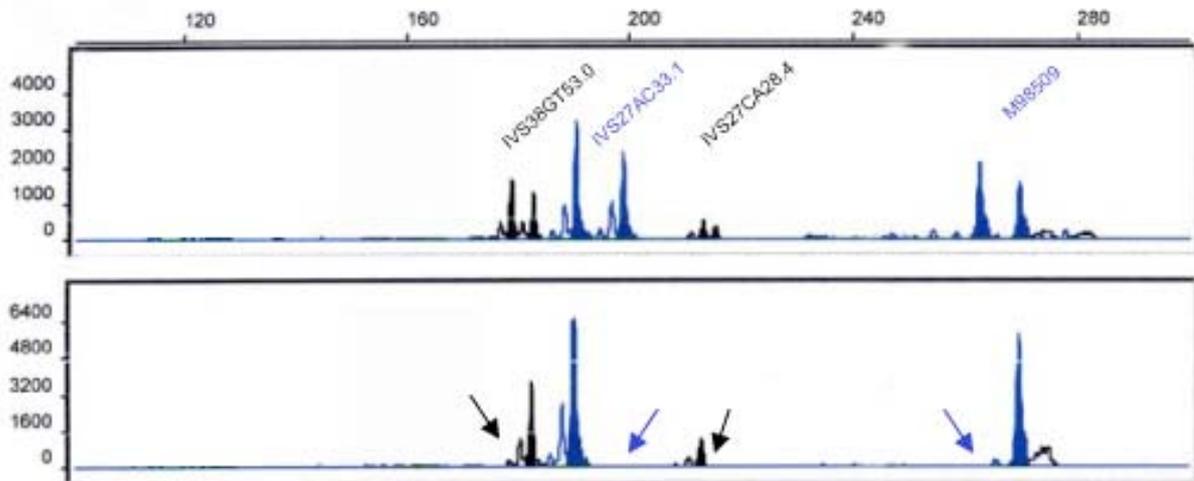


Abb. 2.10 Beispiel von LOH: im Blut eines NF1-Patienten (oben) sind die abgebildeten *NFI*-Mikrosatelliten-Marker heterozygot (zwei Signale), im Tumor (unten) ist ein Signal (Pfeile) bzw. Allel verloren gegangen (Loss of Heterozygosity).

2.13.1 Amplifikation

Die Methode der Wahl zur Analyse mit Mikrosatelliten ist die PCR. Man vermehrt mit dieser Methode kurze DNA-Abschnitte, die die Wiederholungs-Sequenzen enthalten, um die DNA des interessierenden Locus in ausreichender Menge für die Größen-Analyse zur Verfügung zu haben. Die so erzeugten DNA-Abschnitte unterscheiden sich geringfügig in der Länge ihrer DNA-Sequenz, weswegen sie bei der GenScan-Analyse zwei unterschiedliche Signale erzeugen. Die hierfür verwendeten Primer und PCR-Techniken sind in Abschnitt 2.11 beschrieben.

2.13.2 Gene Scan

Formamid/ ROX Mischung

30 µl Formamid (Applied Biosystems)

0,2 µl GENESCAN-500 ROX (Applied Biosystems)

Das fluoreszente ROX-500 (rot) stellt einen definierten Größenstandard für DNA-Fragmente von 35 bis 500 bp Größe dar. In jedes well einer 96-well-Platte wurden 30 µl der Formamid/ROX Mischung gegeben. In ein well wurden 0,5 µl der PCR-Produkte aller 7 *NFI*-

Marker und gegebenenfalls der drei *p53* Marker von einer Probe (Blut **oder** Tumor) pipettiert. Dies war möglich, da Marker mit ähnlichen Fragment-Längenbereichen mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert waren. Die *p16* Marker wurden getrennt geladen, da sich die Fragmentgrößen mit den *p53* Markern überlappen. Danach wurden die Proben für 2 min bei 94 °C im Thermocycler denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die Proben wurden in einem „Automated Genetic Analyser“ nach einem ähnlichem Prinzip wie bei der Sequenzierung gemessen und ausgewertet.

Waren alle 7 *NFI* Marker im Blut eines Patienten homozygot (ein Signal), handelte es sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % um eine Deletion des gesamten *NFI* Gens (Kluwe et al., 2003). In diesem Fall wurde zur Bestätigung von einer Arbeitsgruppe in Ulm (Dr. Kehrer-Sawatzki) eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) durchgeführt (bei einer Deletion wird ein monosomisches Signal des Fluoreszenz-markierten *NFI* Gens detektiert).

2.14 Karyotypisierung

Für die Karyotypisierung von MPNST-Zellen wurde eine Gewebeprobe des jeweiligen Tumors zu einer belgischen Arbeitsgruppe (Dr. Legius) gesendet. Die Zellen aus den Tumoren wurden in Medium ohne Stimulierung der Zellteilung gehalten und spontane Mitosen wurden nach G-Bänderung karyotypisiert.

2.15 Statistische Auswertung

Für die Korrelation zweier Gruppen wurde der Chi-Quadrat-Test durchgeführt (<http://www.unc.edu/~preacher/chisq/chisq.htm>) und der Unterschied zwischen den Gruppen wurde bei $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen an Tumorzellen aus gutartigen Neurofibromen

3.1.1 Patienten und Tumore

Von 181 NF1-Patienten, die sich aus medizinischen Gründen einer operativen Intervention unterzogen, wurden insgesamt 575 gutartige Tumore erhalten - 240 kutane Neurofibrome (KNF) und 335 plexiforme Neurofibrome (PNF) (Abb. 3.1.1). Alle Patienten haben die Kriterien der „National Institutes of Health“ für die NF1-Diagnose erfüllt und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Untersuchungen an den resezierten Tumoren. Die Patienten ließen sich in 4 Gruppen einteilen: 1. Patienten von denen ein KNF oder ein PNF erhalten wurde; 2. Patienten mit multiplen KNF; 3. Patienten mit KNF und PNF sowie 4. Patienten mit multiplen PNF. Die zahlenmäßige Verteilung zwischen den Gruppen ist in Abbildung 3.1.1 dargestellt.

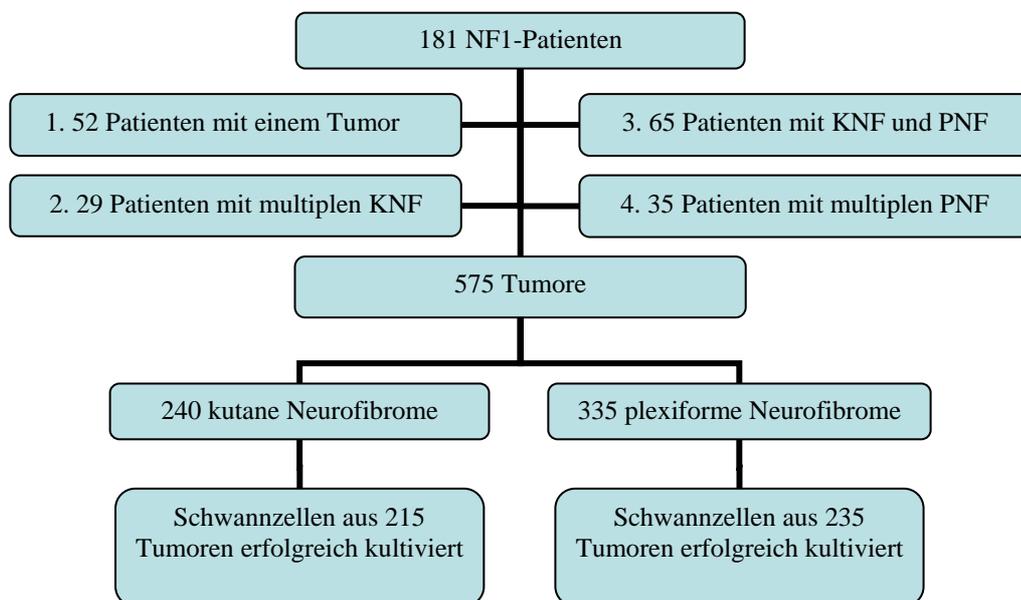


Abb. 3.1.1 Verteilung aller in Kultur angesetzten Neurofibrome

Während KNF in der Regel nicht größer als 1 cm^3 waren, wiesen PNF eine durchschnittliche Größe von $3\text{-}7 \text{ cm}^3$ auf, die unter anderem durch erheblich höhere Mengen an Bindegewebe bedingt war, welches oft eine verhärtete Konsistenz zeigte. Die KNF waren grundsätzlich in einer Hautkapsel eingeschlossen, von der sie gänzlich getrennt werden konnten. Dagegen

mußten PNF nicht nur von der angrenzenden äußeren Haut sondern oft auch von infiltriertem Gewebe, sowie von Fett und Subkutis-Schichten befreit werden. In 95 % der Fälle sind nach der Tumorpräparation vitale Zellen in den Primärkulturen aus kutanen und plexiformen Neurofibromen angewachsen. Schwanzzellen konnten in Kultur aus 215 KNF und 235 PNF gewonnen werden (Abb. 3.1.1).

3.1.2 Zellkultur

Alle 575 Tumoren wurden nach Zerkleinerung enzymatisch verdaut, die Zellen vereinzelt und ausgesät. In den ersten zwei Passagen nach der Aussaat, in denen sich teilweise noch kleine „Tumor-Klumpen“ befanden, konnte die Ausbildung von größeren, kreisförmigen Zell-Aggregaten („Kulturtumore“) beobachtet werden, aus denen sternförmig Zellen herauswuchsen (Abb. 3.1.2 A).

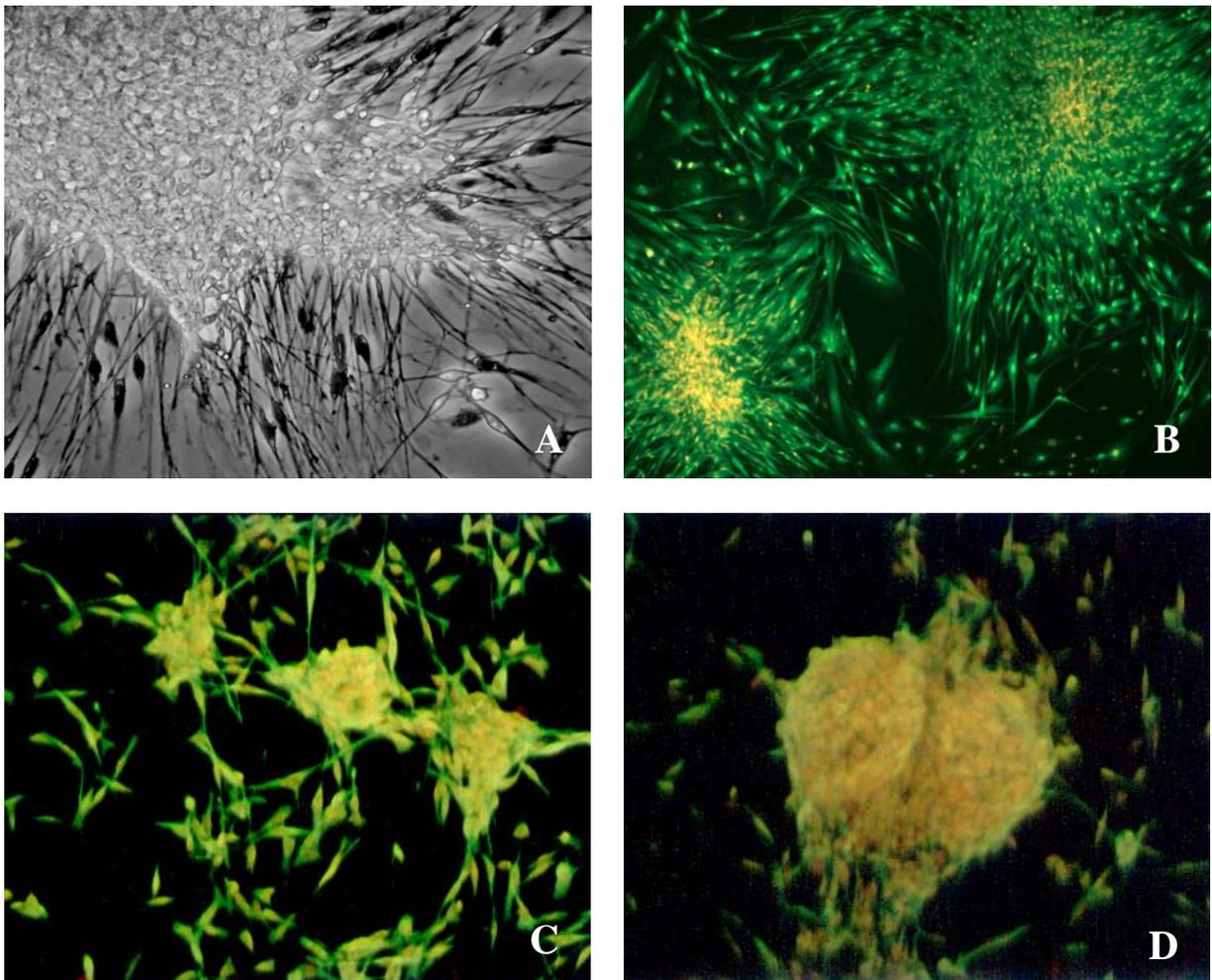


Abb. 3.1.2 In den ersten Passagen bilden sich oft sogenannte „Kulturtumore“ (A: Phasenkontrast, Vergrößerung: 100x), aus denen S100-positive Schwanzzellen (grün) herauswachsen (B-D: Immunfluoreszenz, Vergrößerung: 100x)

Es handelte es sich in der Regel um Schwannzellen, was durch Immunfärbung mit dem Schwannzell-spezifischen S100-Protein nachgewiesen wurde (Abb. 3.1.2 B). Durch häufiges Trypsinieren lösten sich diese Aggregate in Einzelzellen auf. Dieses Phänomen wurde verstärkt in KNF und vereinzelt in PNF festgestellt.

Nach der Aussaat entstanden heterogene Mischkulturen, die hauptsächlich aus Schwannzellen und Fibroblasten bestanden. Da bekannt ist, daß Schwannzellen die einzigen neoplastischen Zellen in Neurofibromen sind, wurde über mehrere Passagen hinweg versucht, diese unter Verwendung eines speziell auf Schwannzellen ausgerichteten Nähr-Mediums und mit Hilfe selektiver Trypsinisierungs-Methoden anzureichern. Dafür wurden drei verschiedene Methoden angewendet, bei denen die Trennung von Schwannzellen und Fibroblasten im Vordergrund stand. Die Effizienz der Methoden unterschied sich in zweierlei Hinsicht:

1. *Homogenität*: Erhöhung der Schwannzell-Reinheit in der Subkultur durch Trennung von Fibroblasten
2. *Verlust*: Anzahl der Schwannzellen die durch das selektive Passagieren verloren gehen

Unter Berücksichtigung beider Kriterien war die milde Trypsinierung die effektivste Methode, bei der oftmals ein relativ hoher Anteil an Schwannzellen gewonnen werden konnte, mit einem geringen Verlust an Zellen. Tabelle 3.1.1 stellt die Vorteile der jeweiligen Methoden im Vergleich dar. Die Depletion mit einem Anti-Fibroblasten-Antikörper ergab reine Schwannzellkulturen, jedoch gingen viele Zellen dabei verloren. Dies war weiterhin ein Hinweis darauf, daß es sich bei den „kontaminierenden“ Zellen in Kultur tatsächlich um Fibroblasten handelte.

Tabelle 3.1.1 Effizienz der Schwannzell Anreicherungs-Methoden

	Milde Trypsinierung	Selektive Anheftung	Isolierung mit Antikörper
<i>Homogenität</i>	+++	+	+++
<i>Verlust</i>	+	++	+++

Es war nicht möglich, aus jedem angesetzten Tumor Schwannzellen zu isolieren. Deren Anteil wurde durch S100-Immunfärbung ermittelt, wobei zusätzlich alle in Kultur vorhandenen Kerne unspezifisch mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt wurden (Abb. 3.1.3 A,B). Dabei fiel auf, daß die Anheftung und Verbreitung der Schwannzellen aus den einzelnen

Tumoren erheblich schwankte, sowohl innerhalb einer Subtypen-Gruppe (kutane oder plexiforme) als auch zwischen diesen Gruppen. Aus KNF wuchsen in 30 % der Kulturansätze gar keine Schwanzzellen an, bei PNF geschah dies sogar in 50 % der Fälle. In etwa 20 % der KNF-Kulturen ließen sich selbst nach Anwendung selektiver Methoden nur 10-50 % Schwanzzellen zählen, in PNF waren es 25 %. Aus 50 % aller KNF konnten 50-100 %ige Reinkulturen gewonnen werden, was bei PNF in nur 25 % der Tumor-Ansätze möglich war (Abb. 3.1.3).

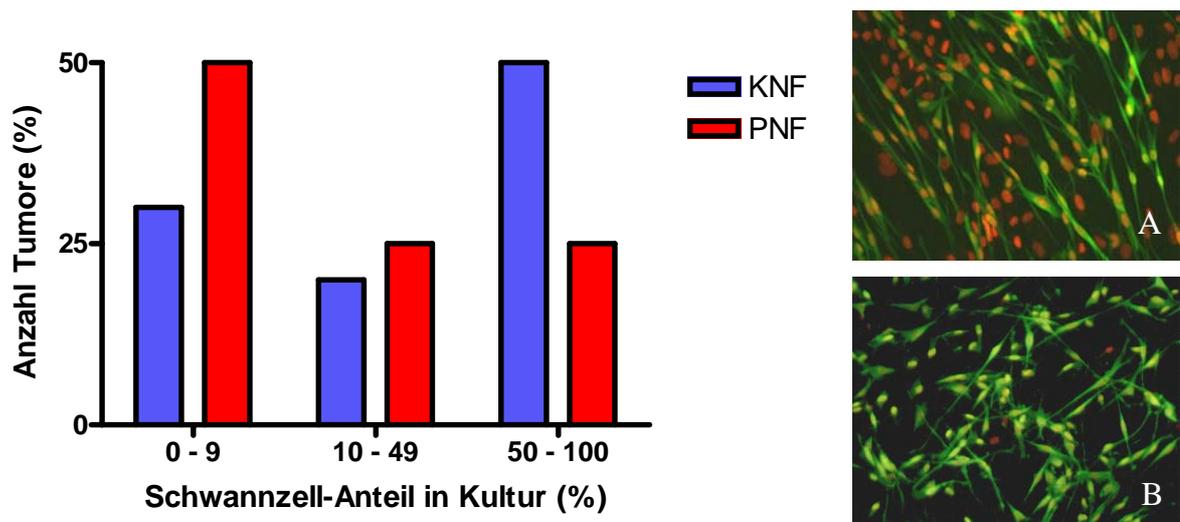


Abb. 3.1.3 Anteil der in Kultur angewachsenen Schwanzzellen aus KNF und PNF. S100-Färbung (grün) erlaubt die Quantifizierung von Schwanzzellen und Klassifizierung als Mischkulturen (A, rot = PJ) und Reinkulturen (B)

Weiterhin unterschieden sich beide Gruppen durch den anfänglichen Gehalt an Schwanzzellen und der darauf folgenden Anreicherung über mehrere Passagen hinweg. Es wurden Kulturen aus 40 KNF und 50 PNF berücksichtigt, bei denen der Schwanzzell-Anteil im Laufe der Passagen über 50 % anstieg. Während KNF üblicherweise in den niedrigen Passagen einen hohen Schwanzzell-Anteil (ca. 90 %) aufzeigten, der durch häufiges Passagieren niedriger wurde, verhielten sich Schwanzzellen aus PNF genau entgegengesetzt, hier wurden in der Regel anfangs nur wenige S100-positive Zellen in Kultur nachgewiesen (ca. 10 %), erst nach Anreicherung in 2-4 Passagen stieg deren Gehalt an (bis zu 98 %), um daraufhin wieder stark zu sinken (durch Fibroblasten-Überwucherung), (Abb. 3.1.4).

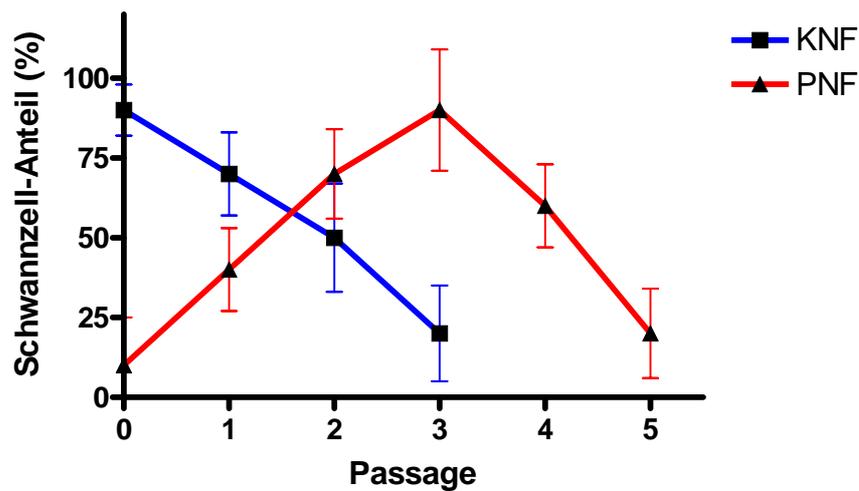


Abb. 3.1.4 Passagen-abhängige Schwannzell-Anteile in Kulturen aus 40 KNF und 50 PNF

Die Dauer einer Passage bis zum Übergang in eine Subkultur war davon abhängig, wie schnell die Schwannzellen konfluent wuchsen. Da der Schwannzell-Anteil in KNF in den ersten Passagen hoch war, dauerte es üblicherweise nur einige Tage bis die Kultur passagiert werden mußte. Dies wurde an 10 Kulturen gemessen (Abb. 3.1.5 A). Nach der ersten Passage wurde der zeitliche Abstand bereits größer. In den 15 untersuchten PNF Kulturen dauerte es dagegen anfangs lange, bis die wenigen angewachsenen Zellen sich ausreichend vermehrten (Abb.3.1.5 B). Waren die Kulturen erst einmal annähernd homogen, verringerte sich die Dauer der Passagen, erst ab der 3.Passage wuchsen die Schwannzellen wieder langsamer. Insgesamt betrug die durchschnittliche Lebensdauer von Schwannzellen einer KNF-Kultur nur 20-30 Tage, und von einer PNF-Kultur 40-50 Tage.

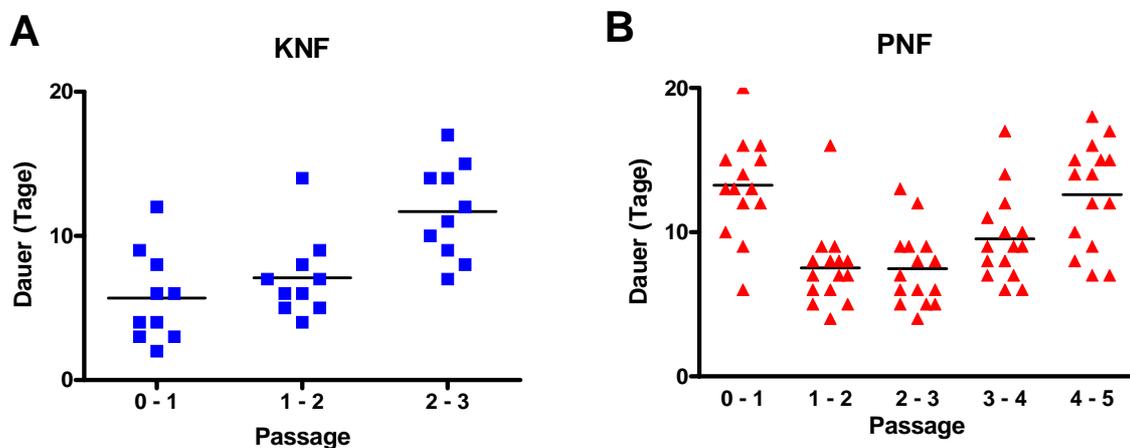


Abb. 3.1.5 Dauer der Passagen bei KNF (A) und PNF (B)

Die Lebensdauer von Schwanzzellen aus KNF und PNF hängt nicht nur von der Passagenanzahl, sondern auch vom Eintritt des Wachstums-Stillstands ab. Es wurden 40 KNF-Kulturen und 50 PNF-Kulturen hinsichtlich ihrer Vitalität verglichen. Als vital wurden solche Kulturen eingestuft, in der sich die Schwanzzellen ausreichend vermehrten um eine weitere Subkultur anzulegen. In den meisten Fällen hörten Schwanzzellen aus KNF bereits nach 3-5 Passagen auf zu wachsen, bei PNF stellten die Zellen das Wachstum nach 4-8 Passagen ein (Abb. 3.1.6). Eine Erklärung hierfür wäre, daß die Zellen nicht mehr den Zellzyklus passieren und sich mitotisch teilen, sondern in der G₁-Phase arretiert bleiben, da sie über einige Wochen hinweg nicht starben, sondern sich lediglich nicht mehr teilten. Dieses Phänomen wird als zelluläre Seneszenz (Zellalterung) bezeichnet und ist irreversibel.

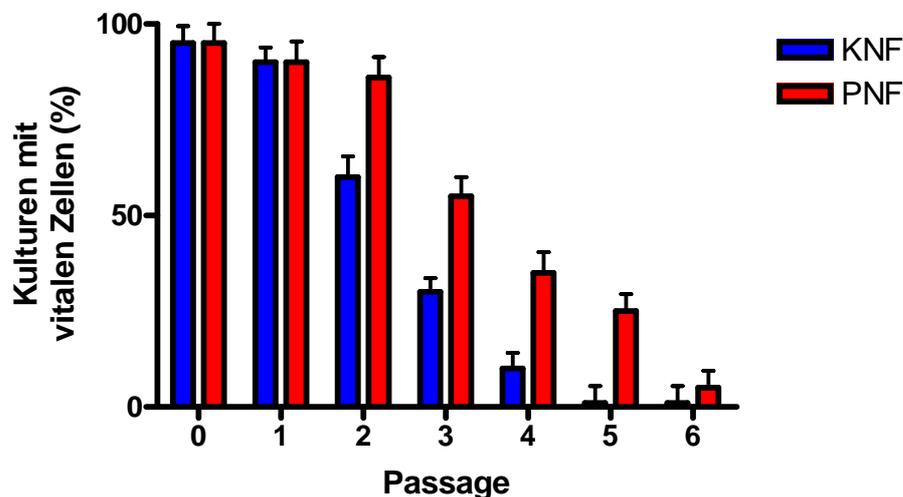


Abb. 3.1.6 Abnahme der Zell-Vitalität bei zunehmendem Alter der Schwanzzellen

3.1.3 Morphologie

(a) Gemeinsame Eigenschaften von normalen und Tumor- Schwanzzellen

Genauso wie normale humane Schwanzzellen (aus einem gesunden peripheren Nerven) zeichnen sich *NFI*^{-/-} Schwanzzellen (aus kutanen und plexiformen Neurofibromen) in Kultur in der Regel durch eine charakteristische Spindelform mit bipolaren Fortsätzen aus (Abb. 3.1.7 A), wie sowohl durch S100-Färbung des Zell-Zytoplasmas als auch durch Phalloidin-Färbung des Zytoskeletts deutlich sichtbar wurde (Abb. 3.1.7 B-C). Im konfluenten Zustand richteten sich diese Zellen parallel zueinander aus und bildeten ein lineares Muster (Abb. 3.1.7 D-F). Die schmalen Zellkörper lagen dabei meistens nicht direkt sondern etwas versetzt zueinander (Abb. 3.1.7 E).

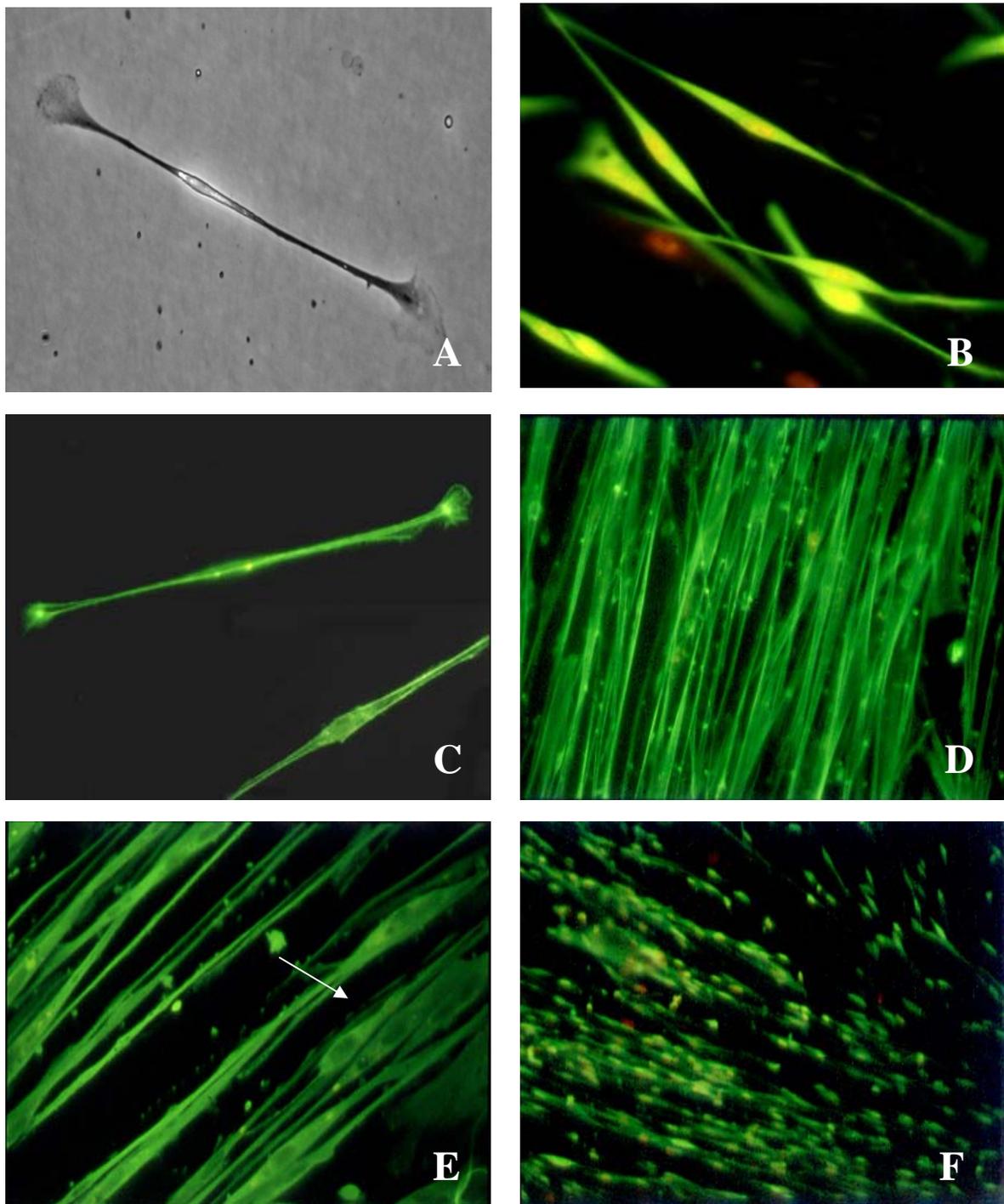


Abb. 3.1.7 Schwannzell-Morphologie: die charakteristische bipolare Spindelform (A: Phasenkontrast) der S100-positiven Schwannzelle wird sichtbar durch S100-Färbung (B,F) und Phalloidin-Färbung des Zytoskeletts (C-E). Im Zustand der Konfluenz ordneten sich die Zellen parallel an (D-F), wobei die Zellkörper versetzt zueinander lagen (E, Pfeil); (Vergrößerung: A-E: x400, F: x100)

(b) Eigenschaften von Tumor- Schwannzellen

Neoplastische Schwannzellen aus KNF und PNF formten in einem subkonfluenten Zustand ein ungeordnetes Muster in denen die Fortsätze nicht linear zueinander ausgerichtet waren

(Abb. 3.1.8 A). Schwanzzellen aus KNF zeigten dabei die gleiche bipolare Spindelform von normalen Schwanzzellen. Schwanzzellen aus PNF wiesen jedoch neben der klassischen Spindelform auch Varianten mit einer eher polygonalen Erscheinungsform auf (Abb. 3.1.8 B,C). Trotzdem lagerten sich die Zellen parallel nebeneinander an, als sie konfluent wuchsen und wechselten dabei von der polygonalen zur spindelartigen Form, was an verschiedenen Stellen der gleichen Kultur gesehen wurde (Abb. 3.1.8 C,D).

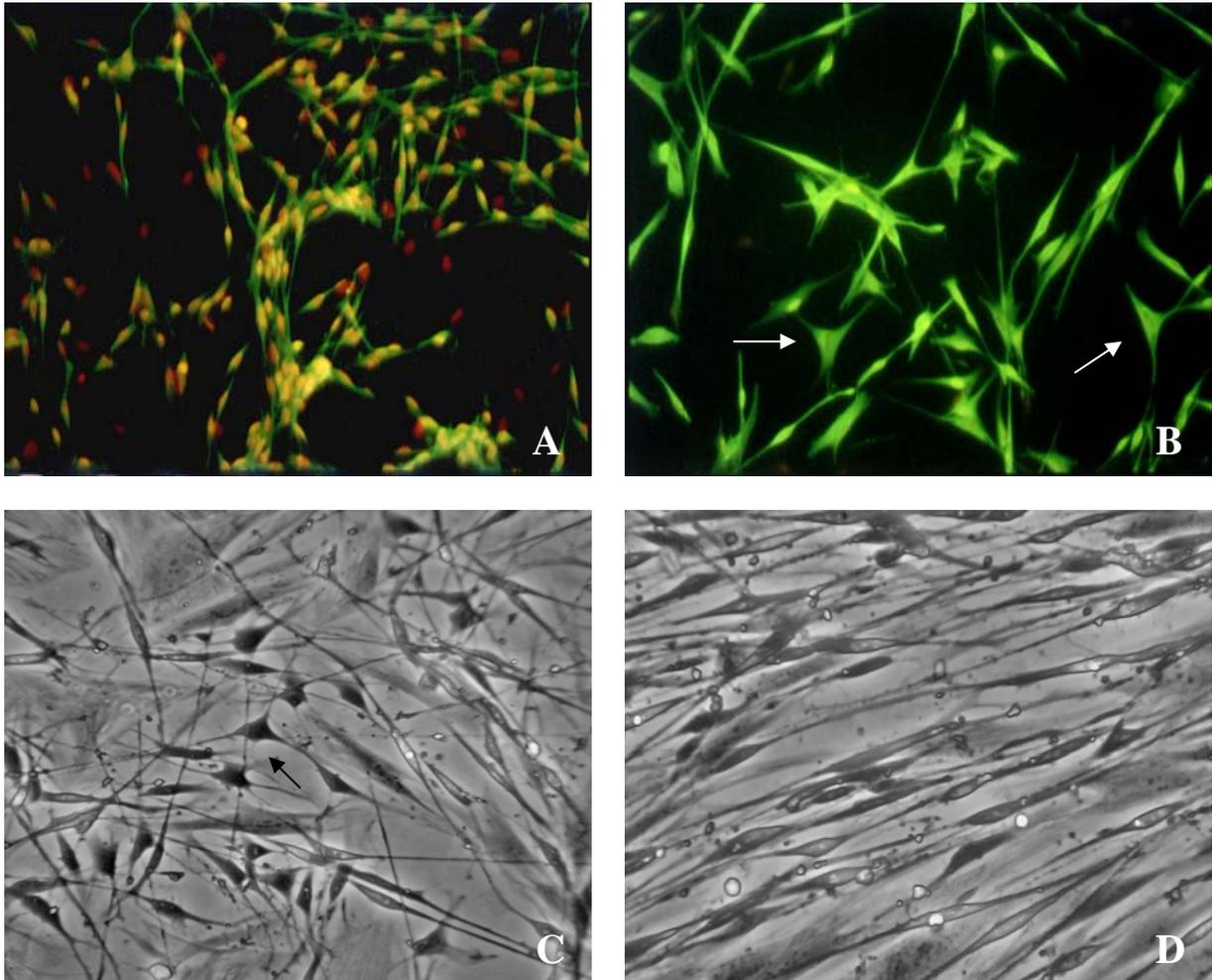


Abb. 3.1.8 Anordnung der Zellkörper und Fortsätze: die ungeordnete Anordnung von Schwanzzellen im subkonfluenten Zustand (A) und ihre polygonale Form (B,C; Pfeile) gehen oftmals in eine parallele Ausrichtung mit Spindelform über (D). A,B: S100-Färbung; C,D: Phasenkontrast-Aufnahmen zeigen unterschiedliche Konfluenz-Stadien in der gleichen Kultur (Vergrößerung: A: x100, B-D: x400)

Unter den Schwanzzellen aus PNF konnten zusätzlich noch weitere morphologische Auffälligkeiten beobachtet werden: manche wiesen einen bauchigeren, breiteren Zellkörper auf (Abb. 3.1.9 A), andere hatten zusätzlich dazu verbreiterte Fortsätze (Abb. 3.1.9 B). Wieder andere nahmen eine flächigere, größere Form an, bei denen die Zellkörper den

dreidimensionalen Charakter der Spindel-Variante verloren (Abb. 3.1.9 C), wobei es in seltenen Extremfällen zur kompletten Entstellung der ursprünglichen Schwanzzell-Morphologie kam (Abb. 3.1.9 D).

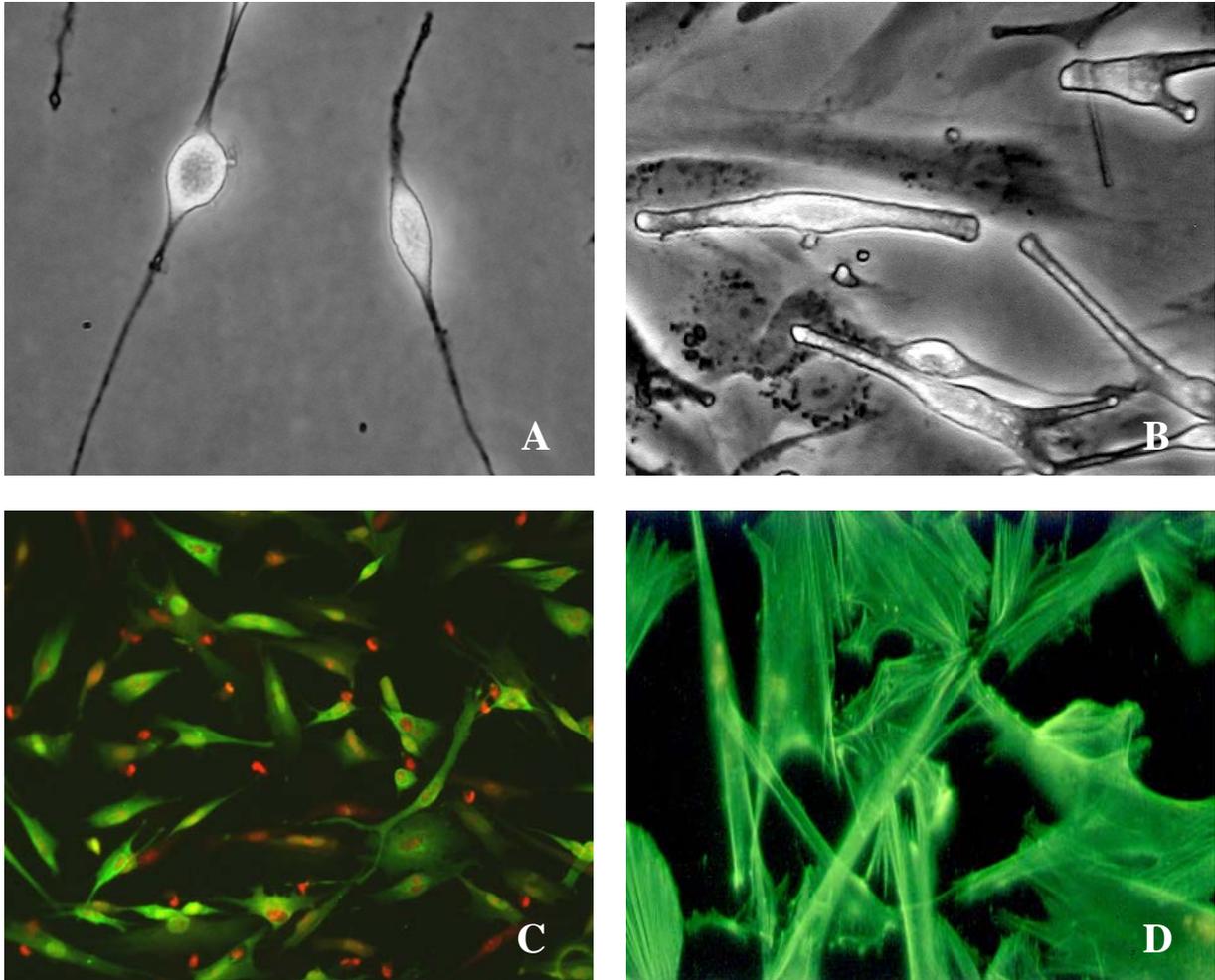


Abb. 3.1.9 Varianten der Schwanzzell-Morphologie bei PNF: bauchige, breite Zellkörper (A) und zusätzlich verbreiterte Fortsätze (B), flächige Schwanzzellen (C: S100-Färbung) und komplette Ausbreitung des Zytoskeletts (D: Phalloidin-Färbung); (Vergrößerung: A,B,D: x400; C: x200)

3.1.4 Proliferation

Alle angewachsenen Schwanzzellen zeigten im Vergleich zu Fibroblasten ein sehr geringes Proliferations-Potential, welches in höheren Passagen (3-8) in einem kompletten Wachstums-Stillstand kulminierte. Dadurch erhöhte sich zwangsläufig wieder der Fibroblasten-Anteil in den Kulturen. Da oft keine homogenen Schwanzzell-Kulturen entstanden, konnte die Proliferation nicht mit herkömmlichen Wachstums-Assays gemessen werden. Um ausschließlich die Vermehrung von Schwanzzellen zu untersuchen, wurde der Einbau von BrdU in den Zellkern bei der Zellteilung nur in den S100-positiven Zellen gezählt. Dabei

wurde schnell deutlich, daß das Schwannzellwachstum innerhalb der BrdU-Einbauzeit von 48 Stunden extrem gering war und von vielen externen Faktoren wie Passagenzahl, Fibroblastenanteil, Oberflächenbeschichtung und anfänglicher Zellzahl abhing. Die dadurch bedingten extremen Schwankungen und die laufend verschiedenen Umstände ließen keine genaue und sinnvolle Wachstumsbestimmung zu (Abb. 3.1.10 A-D). Oftmals war bei Schwannzellen keinerlei Zellteilung zu sehen, sowohl in subkonfluenten als auch in fast konfluenten Kulturen (Abb. 3.1.10 C,D).

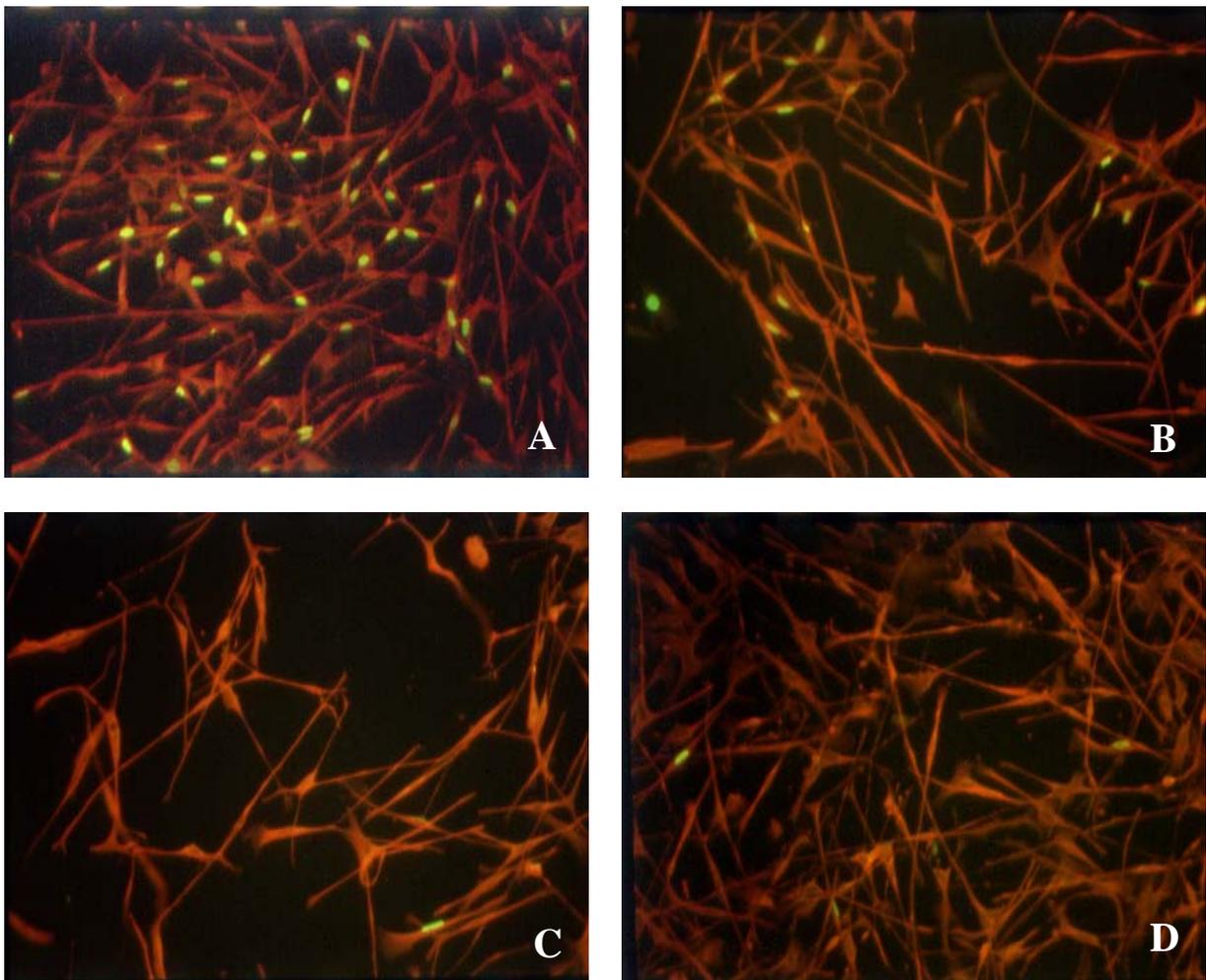


Abb. 3.1.10 Schwannzellwachstum: der durch die Zellteilung bedingte BrdU-Einbau (grüner Kern) folgte in S100-positiven Schwannzellen (rot) keinem bestimmten Muster (Vergrößerung: x200)

In mehr als der Hälfte von 22 untersuchten PNF Kulturen lag die gemessene Proliferationsrate unter 10 % (Abb. 3.1.11). In lediglich einer Kultur proliferierten ca. 40 % der Zellen und in einer weiteren stieg die Wachstumsrate bis zu 50 %.

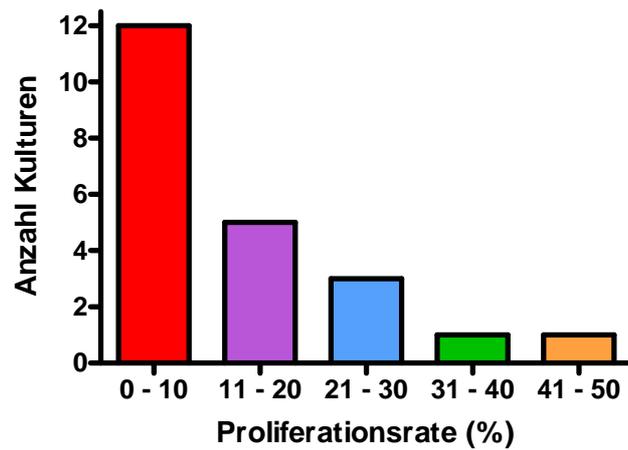


Abb. 3.1.11 Proliferationsraten von 22 Schwanzzellkulturen aus PNF

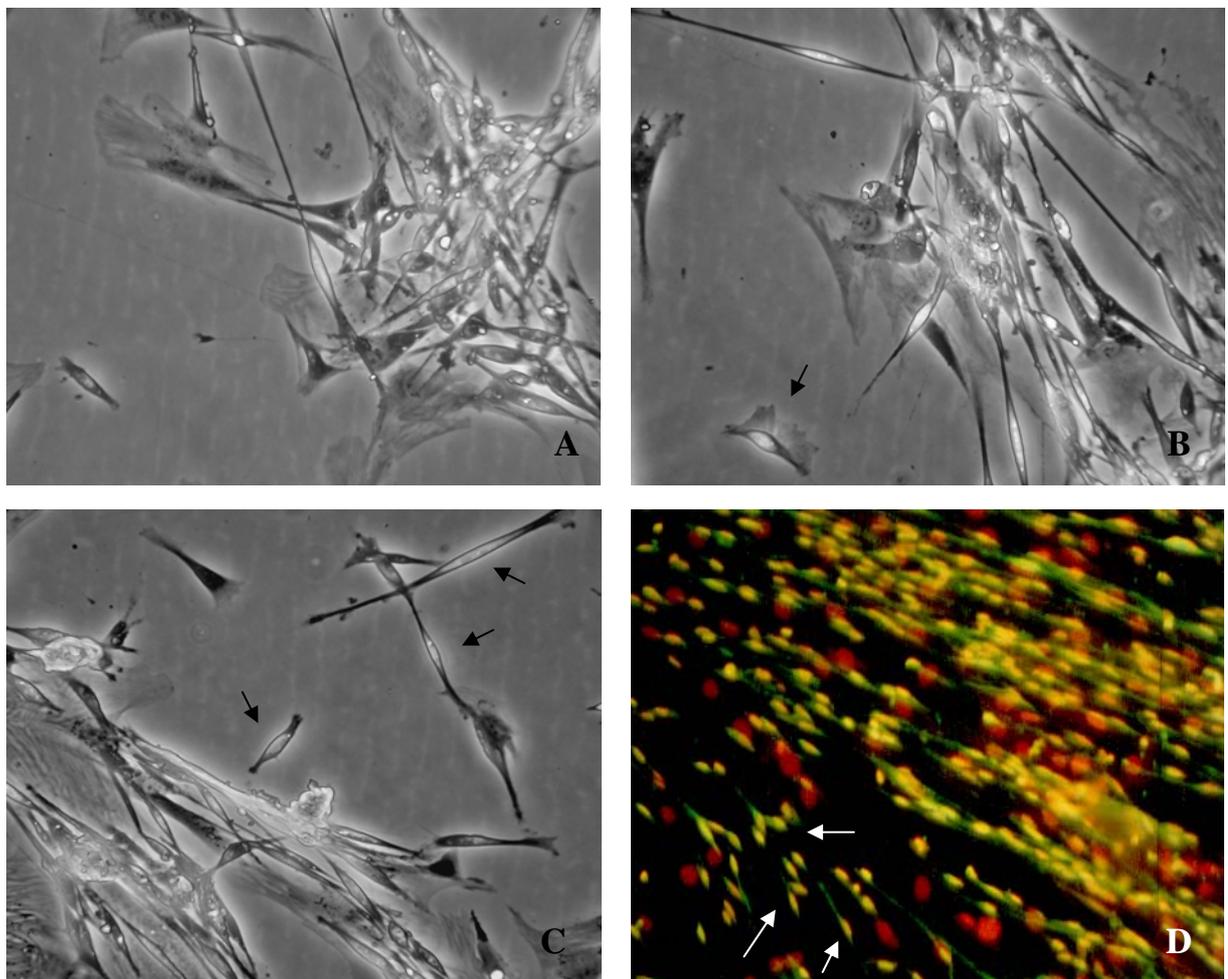


Abb. 3.1.12 Anheftung auf verschiedenen Oberflächen: oftmals wuchsen Schwanzzellen präferenziell auf Fibroblasten-Inseln (A-D) und auf einzelnen Fibroblasten (B, Pfeil). Auf diesen Fibroblasten-Inseln (D: rote Kerne) vermehrten sich S100-positive Zellen (D, grün), während daneben vereinzelte Schwanzzellen auf Laminin wuchsen (C,D; Pfeile); (Vergrößerung: x100)

Merklichen Einfluß auf das Schwannzell-Wachstum hatten Fibroblasten, deren Abwesenheit zeitgleich einen Rückgang der Proliferation bewirkte. Oft wuchsen die Schwannzellen präferenziell auf Fibroblasten-„Inseln“, wo sie sich stärker vermehrten als auf benachbarten Regionen der Kulturoberfläche, die mit Laminin beschichtet waren (Abb. 3.1.12).

Zusammenfassung der zellbiologischen Eigenschaften

In Tabelle 3.1.2 sind alle untersuchten Eigenschaften von gesunden humanen Schwannzellen und Schwannzellen aus kutanen und plexiformen Neurofibromen vergleichend dargestellt.

Tabelle 3.1.2 Eigenschaften von gesunden und neoplastischen Schwannzellen im Vergleich

Zellbiologische Eigenschaft	Schwannzellen aus:		
	gesunder Nerv	kutane Neurofibrome	plexiforme Neurofibrome
Zell-Aggregationen	-	++	+
Fibroblasten-Inseln	-	-	++
veränderte Morphologie	-	-	++
Proliferation	+	+	+
irreguläres Netzwerk	-	++	++
Reinkulturen	++	++	+
Spindelform	++	++	+
Überleben in Kultur	++	+	++

3.1.5 Genetische Untersuchungen

(a) NF1-LOH in Tumoren

Der Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity - LOH) des *NF1* Gens ist häufig die zweite und damit direkte Ursache für die Entstehung von kutanen und plexiformen Neurofibromen. Mit Hilfe von 7 *NF1* Mikrosatelliten Markern, konnten längenpolymorphe Wiederholungssequenzen (Tandemrepeats) in der DNA aus dem Blut und den Tumoren des entsprechenden Patienten detektiert werden.

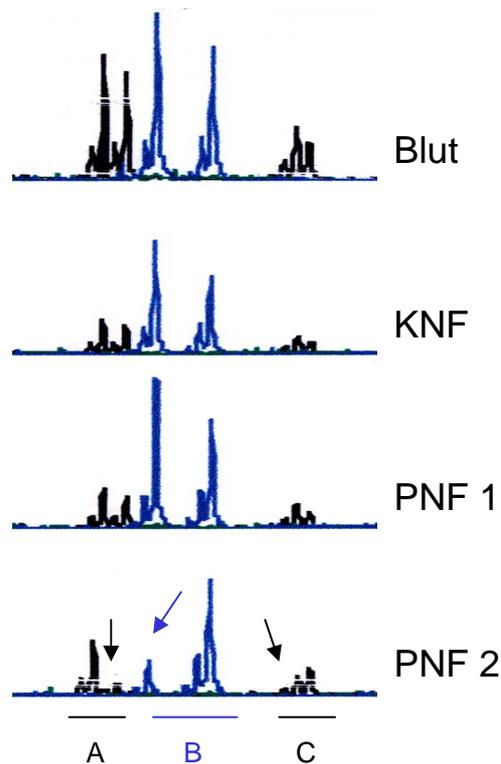


Abb. 3.1.13 *NFI* LOH-Marker in DNA aus Blut (oben) und Tumoren (unten): nur eines der PNF dieses Patienten wies einen LOH auf (PNF 2). Alle 3 Marker (A= IVS38GT53.0; B= IVS27AC33.1; C= IVS27CA28.4) sind informativ (heterozygot), die Pfeile zeigen den Allelverlust im Tumor an

Ist ein Marker heterozygot (informativ), ergeben sich daraus zwei Signale die in Form von „Peaks“ erscheinen. Ein Beispiel ist in Abbildung 3.1.13 dargestellt: Marker A, B und C zeigen zwei Peaks in der Blut-DNA eines Patienten, ebenso in der DNA aus einem kutanen und einem plexiformen Neurofibrom. Dem zweiten PNF fehlt jedoch ein Signal, da es nur einen Peak zeigt - der Marker ist homozygot und weist auf den Verlust eines *NFI* Allels hin (LOH). Von den 6 intragen lokalisierten *NFI* Markern würde bereits ein informativer Marker ausreichen, um einen *NFI* Allelverlust zu überprüfen.

Von den 20 untersuchten KNF und 33 PNF aus insgesamt 19 Patienten wurden in respektive 4 und 11 Tumoren ein LOH gefunden. Entsprechend wiesen 20 % der KNF und 33 % der PNF *NFI* Allelverluste auf (Tab. 3.1.3). Bei einem zusätzlichen Patienten waren alle 7 getesteten *NFI*-Marker im Blut homozygot, wodurch eine LOH-Analyse der drei PNF dieses Patienten nicht möglich war. Von den 19 Patienten mit insgesamt 53 getesteten kutanen und plexiformen Neurofibromen besaß nur einer mehr als einen Tumor mit LOH.

Schwierigkeiten bei der Erfassung der Allelverluste in den Tumoren ergaben sich durch die Zellheterogenität in Neurofibromen. Wird die zu untersuchende DNA direkt aus dem Tumor gewonnen, kann neben der DNA aus Schwannzellen auch die aller anderen umliegenden Zellen mit isoliert werden, die keine genetischen Änderungen tragen. Die Co-Amplifizierung „normaler“ DNA erzeugte ein Signal, wodurch nur ein etwas verkürzter Peak erscheint, aber kein kompletter Verlust des Signals zu sehen ist. Daher war ein LOH im Tumor oft maskiert und nur schwer zu erkennen (Abb. 3.1.14).

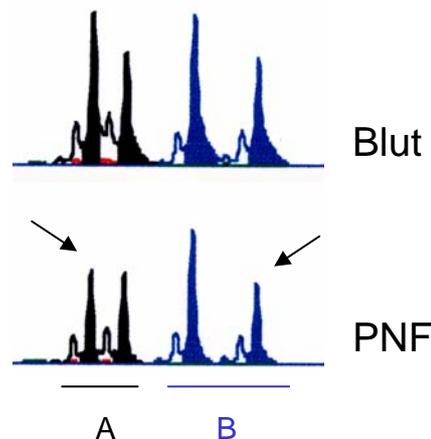


Abb. 3.1.14 Maskierter LOH: das Signal ist nur etwas verkürzt (Pfeile), da auch normale Zellen im Tumor vorhanden sind. A= IVS38GT53.0; B= IVS27AC33.1

(b) *NF1*-LOH in Zellen

Untersucht wurden 5 Kulturen mit einem Schwannzell-Anteil von über 95 %, die in den ursprünglichen Neurofibromen einen LOH aufwiesen. Dabei zeigten alle einen vollständigen Allelverlust der entsprechenden Marker - das Signal des zweiten „Peaks“ war komplett verloren (Abb. 3.1.15) - was bedeutet, daß

1. Schwannzellen die Tumorzellen in Neurofibromen sind;
2. das beobachtete Signal der Allel-Reduktion bzw. des Verlustes einem echten LOH entspricht und nicht durch allelisches Ungleichgewicht verursacht wird;
3. keine nicht-neoplastischen Zellen mehr in der Kultur vorhanden waren.

Die Untersuchung von kultivierten Fibroblasten aus dem gleichen Neurofibrom unterstützte dieses Ergebnis, da hier kein LOH gefunden wurde (*NF1*^{+/-} Zellen). Somit konnte gezeigt werden, daß die gezüchteten Schwannzellen die genetischen Änderungen der Tumoren in der Kultur beibehalten und die „echten“ *NF1*^{-/-} Zellen (konstitutionelle und somatische Änderung des Gens) expandiert wurden.

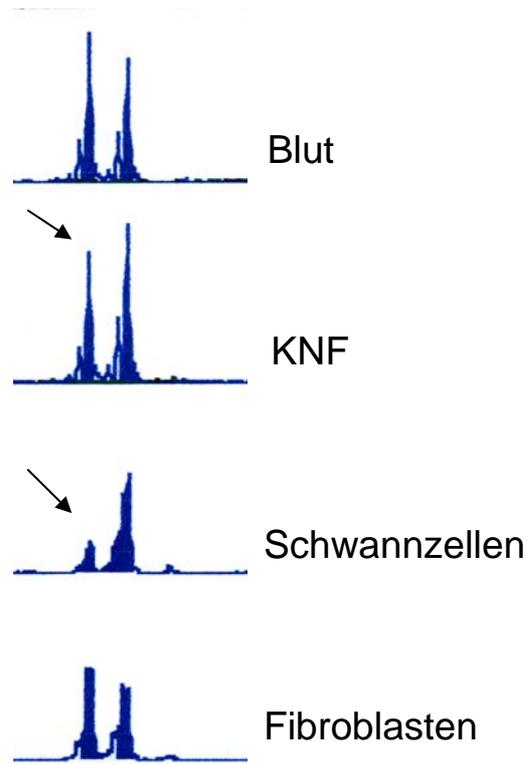


Abb. 3.1.15 LOH in Schwanzzellen und nicht in Fibroblasten: im KNF ist der *NFI* LOH nur angedeutet (Pfeil), dagegen kann ein vollständiger Allelverlust in den kultivierten Schwanzzellen aus diesem Tumor gesehen werden (Pfeil), nicht aber in den kultivierten Fibroblasten aus dem gleichen Tumor (Marker: IVS27AC33.1).

Weiterhin wurde untersucht ob Schwanzzellen, die durch einen *NFI* Allelverlust gekennzeichnet sind, einen Wachstumsvorteil gegenüber solchen ohne LOH aufweisen. Dafür wurden die 20 KNF- und 33 PNF-Kulturen in je 3 Gruppen eingeteilt: die erste umfaßt Kulturen in denen keine Schwanzzellen angewachsen sind (=geringes Wachstum), die zweite solche mit niedrigem Schwanzzell-Anteil (<50 %) und die dritte welche mit hohem Schwanzzell-Anteil (>50 % =hohes Wachstum). Diese Gruppen wurden auf *NFI* Allelverluste geprüft (Tab. 3.1.3). Es stellte sich heraus, daß es keinen Unterschied zwischen der LOH-Verteilung in den 3 Gruppen gab, d.h. es gab keinen Zusammenhang zwischen dem Wachstum der Zellen und einem somatischen Allelverlust.

Tabelle 3.1.3 Gruppeneinteilung des Schwanzzell-Wachstums in Kultur mit LOH

	keine SZ in Kultur	< 50% SZ in Kultur	> 50% SZ in Kultur	Gesamt
	LOH/Kulturen (%)	LOH/Kulturen (%)	LOH/Kulturen (%)	LOH/Kulturen (%)
KNF	2/3 (67)	0/0 (0)	2/17 (12)	4/20 (20)
PNF	4/11 (36)	3/10 (30)	4/12 (33)	11/ 33 (33)

Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der LOH-Rate in PNF (33 % gegenüber 20 % in KNF) und den auffälligen morphologischen Änderungen der Zellen dieser Tumoren besteht, wurden die angewachsenen Schwanzzellen aus 22 PNF in 4 morphologisch unterschiedliche Gruppen eingeteilt - normale Spindelform, polygonaler Zellkörper, bauchiger Zellkörper und bauchiger Zellkörper mit breiten Fortsätzen - und mittels LOH-Analyse überprüft (Tab. 3.1.4). Auch hier wurde eine gleichmäßige Verteilung der LOH-Fälle auf alle Gruppen festgestellt, d.h. es konnte kein Zusammenhang zwischen einem *NF1*-Allelverlust und der veränderten Morphologie von PNF gefunden werden.

Tabelle 3.1.4 Gruppeneinteilung der Schwanzzell-Morphologie von PNF in Kultur mit LOH

normal	polygonal	bauchig	breite Fortsätze
LOH/Kulturen (%)	LOH/Kulturen (%)	LOH/Kulturen (%)	LOH/Kulturen (%)
2/8 (25)	1/2 (50)	3/8 (37)	1/4 (25)

(c) p53-LOH in Tumoren mit NF1-LOH

Der *p53*-Locus liegt auf dem gleichen Chromosom wie das *NF1*-Gen (siehe Abb. 3.2.2). Der Verlust eines *NF1*-Allels kann möglicherweise bedeuten, daß auch benachbarte Abschnitte zu dem Gen oder sogar ein großer Teil des Chromosoms von diesem Verlust betroffen ist. Hier wurden alle 15 Neurofibrome, die einen *NF1*-LOH aufwiesen, auch auf *p53*-LOH getestet. Keines der hier untersuchten Neurofibrome wies einen *p53*-Allelverlust auf.

3.2 Untersuchungen an Tumorzellen aus MPNSTs

3.2.1 Patienten und Tumore

Zwölf MPNSTs wurden aus 4 männlichen und 6 weiblichen NF1-Patienten erhalten, die alle die diagnostischen Kriterien des NIH erfüllen (Gutmann et al., 1997). Die NF1 Krankheit trat in 7 Fällen sporadisch auf und wurde in drei Fällen familiär vererbt. Das Durchschnittsalter beim Eintritt der MPNST-Diagnose betrug 21 ± 9 Jahre, wobei das 2-jährige Kind eine seltene Ausnahme bildete (Tab. 3.2.1). Bei allen 10 Patienten wurden *NF1* Mutationen mittels Sequenzierung aller 57 konstitutiven *NF1* Exons untersucht. In 6 Fällen wurden *NF1* Keimbahn-Mutationen gefunden, das Spektrum belief sich dabei auf 5 Nonsense- und eine Frameshift-Mutation. Drei Patienten waren von Deletionen des gesamten *NF1* Gens betroffen, die durch Mikrosatelliten oder FISH identifiziert wurden. Auffällig war der Krankheitsverlauf von Patientin #8, die eine sporadische *NF1*-Mutation trug und im Gegensatz zu ihrer eineiigen Zwillingsschwester (mit der gleichen Mutation) ein MPNST entwickelt hat.

Tabelle 3.2.1 Klinische und genetische Daten der NF1-Patienten mit MPNST

Patient	<i>NF1</i> Vererbung	Geschlecht	Alter bei MPNST- Diagnose (Jahre)	Überleben seit Diagnose (Jahre)	Keimbahn <i>NF1</i> -Mutation (in DNA aus Leukozyten)	Mutationstyp
1	sporadisch	Männlich	23	<1 (gestorben)	Deletion	Verlust eines <i>NF1</i> -Allels
2	sporadisch	Männlich	35	<2 (gestorben)	Exon 10a: 1318C>T	Nonsense
3	familiär	Weiblich	30	<2 (gestorben)	Exon 27: 4537C>T	Nonsense
4	familiär	Weiblich	20	<2 (gestorben)	keine	-
5	sporadisch	Männlich	24	<2 (gestorben)	Exon 20: 3456-3460del4bpt	Frameshift
6	familiär	Weiblich	19	<2	Exon 37: 6792C>A	Nonsense
7	sporadisch	Weiblich	26	<1 (gestorben)	Deletion	Verlust eines <i>NF1</i> -Allels
8	sporadisch	Weiblich	15	<1	Exon 29: 5234C>G	Nonsense
9	sporadisch	Weiblich	14	<1	Deletion	Verlust eines <i>NF1</i> -Allels
10	sporadisch	Männlich	2	<1	Exon 16: 2446C>T	Nonsense

Tabelle 3.2.2 MPNSTs und daraus gewonnene primäre Zellen

Patient	MALIGNE TUMORE					TUMOR-ZELLEN				
	Tumor	WHO Klassifizierung (Grad)	Tumor Lokalisation	S100 Immun- histologie	LOH in Tumoren	Zell Wachstum / S100 in Zellen*		Karyotyp	LOH in Zellen ^b	Identifizierung neoplastischer Zellen
						Standard	SZB			
1	MPNST 411	III	Abdomen	+(fokal)	Nein	Ja / -	Nein	normal	NU	unsicher
2	MPNST 520	IV	Schulter	-	<i>NF1, p53, p16</i>	Ja / -	Nein	NU	<i>NF1, p53, p16</i>	Ja
3	MPNST 450-3	III	Gesäß	++	Nein	Ja / -	Nein	abnormal	NU	Ja
4	MPNST 454-1	III	Lunge	-	Nein	Ja / -	Nein	abnormal	NU	Ja
5	MPNST 456-2	III	Abdomen	-	<i>NF1, p53, p16</i>	Ja / -	Nein	normal	Nein	Nein
	Rezidiv 517				<i>NF1, p53, p16</i>	Ja / -	Nein	NU	<i>NF1, p53, p16</i>	Ja
6	MPNST 462	IV	Oberschenkel	- (++) ^c	<i>NF1, p53, p16</i>	Ja / -	Ja / 10%+	abnormal	<i>NF1, p53, p16</i>	Ja
	Rezidiv 502-3				<i>NF1, p53, p16</i>	Ja / -	Nein	NU	Nein	Nein
7	MPNST 805	III	Bauch	-	<i>p16</i>	Ja / -	Nein	abnormal	<i>p16</i>	Ja
8	MPNST 811	IV	Hals	-	<i>NF1, p53, p16</i>	Ja / -	Nein	NU	Nein	Nein
9	MPNST 979-1	III	Oberschenkel	+	<i>p53, p16</i>	Ja / -	Nein	normal	<i>p53, p16</i>	Ja
10	MPNST 981-2	IV	Oberschenkel	++	<i>NF1, p53</i>	Ja / -	Nein	NU	Nein	Nein

* Standard = unter Standard Kulturbedingungen; SZB = unter Schwammzell Kulturbedingungen; -, negativ; +, positiv

* NU = nicht untersucht

* (++) = Positiv in Neurofibrom-Anteil im MPNST

Sechs der 10 Patienten (#1,#2,#3,#4,#5,#7) sind seit dem Beginn der Arbeit vor 3 Jahren bereits an den Folgen der MPNSTs verstorben (Tab. 3.2.1). In zwei Fällen (#5 und #6) wurden lokale Rezidive der MPNSTs nach respektive 3 und 5 Monaten erneut herausoperiert und für die Zellkultur verwendet. Entsprechend der WHO Klassifizierung werden 6 der 10 primären MPNSTs als Grad III eingestuft und 4 als Grad IV. Immunhistologische Untersuchungen der 10 MPNSTs zeigten, daß 5 von ihnen S100-negativ waren, während die restlichen 5 S100-positive Komponenten aufwiesen (Tab. 3.2.2).

Von Patient #5 war ein kutanes Neurofibrom, und von Patienten #6, #9 und #10 waren insgesamt 4 PNF zusätzlich für die zellbiologischen Studien verfügbar (Tab. 3.2.3).

Tabelle 3.2.3 Gutartige Neurofibrome von NF1 Patienten mit MPNST und daraus gewonnene Zellen

GUTARTIGE TUMORE				TUMOR-ZELLEN		
Patient	Tumor	Tumor Lokalisation	LOH im Tumor	Schwanzzell-Wachstum/ S100-Expression ^a	LOH in Zellen	Identifizierung neoplastischer Zellen
5	KNF 513-1	Unterarm	NF1	Ja/ 95%+	NF1	Ja
6	PNF 457-3	Oberschenkel	Nein	Ja/ 40%+	Nein	Wahrscheinlich
	PNF 486	Flanke	Nein	Ja/ 98%+	Nein	Wahrscheinlich
9	PNF 979-2	Oberschenkel	Nein	Nein/ 5%	-	-
10	PNF 982-1	Thorax	Nein	Nein/ 5%	-	-

^aS100-Expression: + = S100-positiv

3.2.2 Zellkultur

Aus allen 10 primären MPNSTs, zwei Rezidiven und 5 gutartigen PNF sind vitale Zellen in Kultur angewachsen. Die Zellen eines MPNSTs (#4) hörten in der zweiten Passage auf zu wachsen und alle Zellen aus den 5 PNF-Kulturen wurden nach 4-8 Passagen seneszent. Neun MPNST Kulturen (#1,#2,#3,#4,#5,#7,#8,#9,#10) und beide Rezidive (#5 und #6) wuchsen nur unter standardisierten Kulturbedingungen, nicht aber unter der Bedingung, die das Schwanzzellwachstum anregt (SZ-Bedingung). Dementsprechend exprimierten diese Zellen auch kein S100-Protein. Zellen eines MPNST (#6) wuchsen unter beiden Kulturbedingungen und es konnten jeweils S100-positive und -negative Zellen gefunden werden. Das immunhistologische Ergebnis, welches eine S100-positive Neurofibrom-Komponente in dem betroffenen MPNST beschreibt, deutet darauf hin, daß es sich bei dieser Schwanzzell-Subpopulation in Kultur um Zellen aus dem gutartigen Neurofibrom-Anteil im MPNST handelt. Jedoch war es nicht möglich, diese Schwanzzellen unter der SZ-Bedingung zu

expandieren, da diese nach 2-3 Passagen von S100-negativen MPNST-Zellen überwuchert wurden (Abb. 3.2.1 A).

Schwanzzell-Reinkulturen konnten aus nur zwei der 5 Neurofibrome (S513-1, S486) gewonnen werden (Abb. 3.2.1 B), aus den übrigen drei ließen sich zwischen 5-40 % S100-positive Zellen anreichern (Tab. 3.2.3).

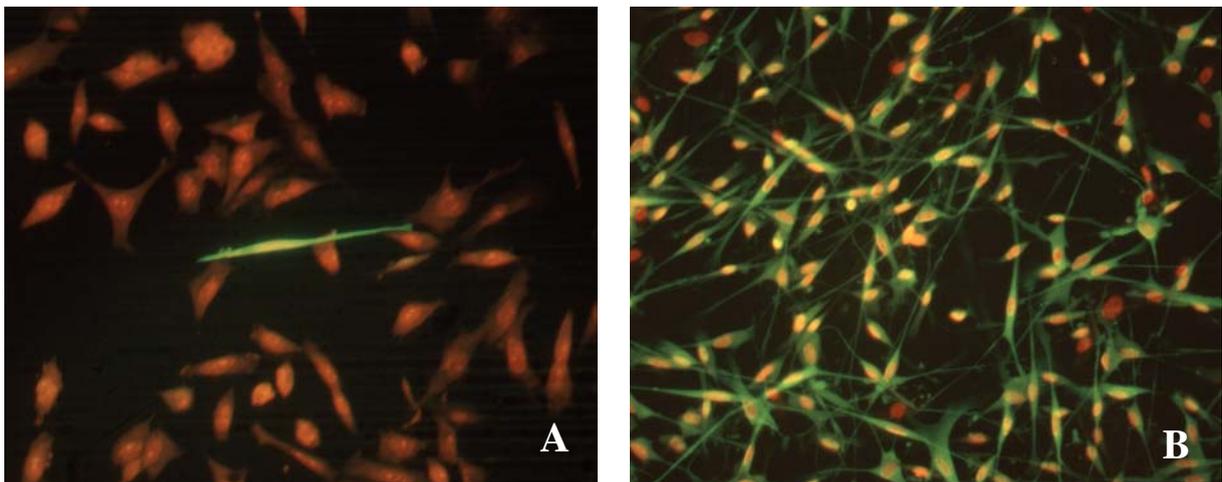


Abb. 3.2.1 Vergleich der S100 Expression (grün) in MPNST (A) und PNF (B); (Vergrößerung: x100)

3.2.3 Genetische Untersuchungen

(a) LOH in Tumoren

Der Verlust der Heterozygotie (LOH) des *NF1* Gens konnte mit Hilfe von einem extragenen und 6 intragenen *NF1* Markern (Abb. 3.2.2) in 5 aus 10 primären MPNSTs (50 %) und in beiden Rezidiven gefunden werden (Tab. 3.2.2). Bei den drei Patienten mit einer Deletion des *NF1* Gens (#1,#7,#9) konnte keine *NF1*-LOH-Analyse mittels Mikrosatelliten durchgeführt werden, da bereits im Blut nur ein Allel vorhanden war.

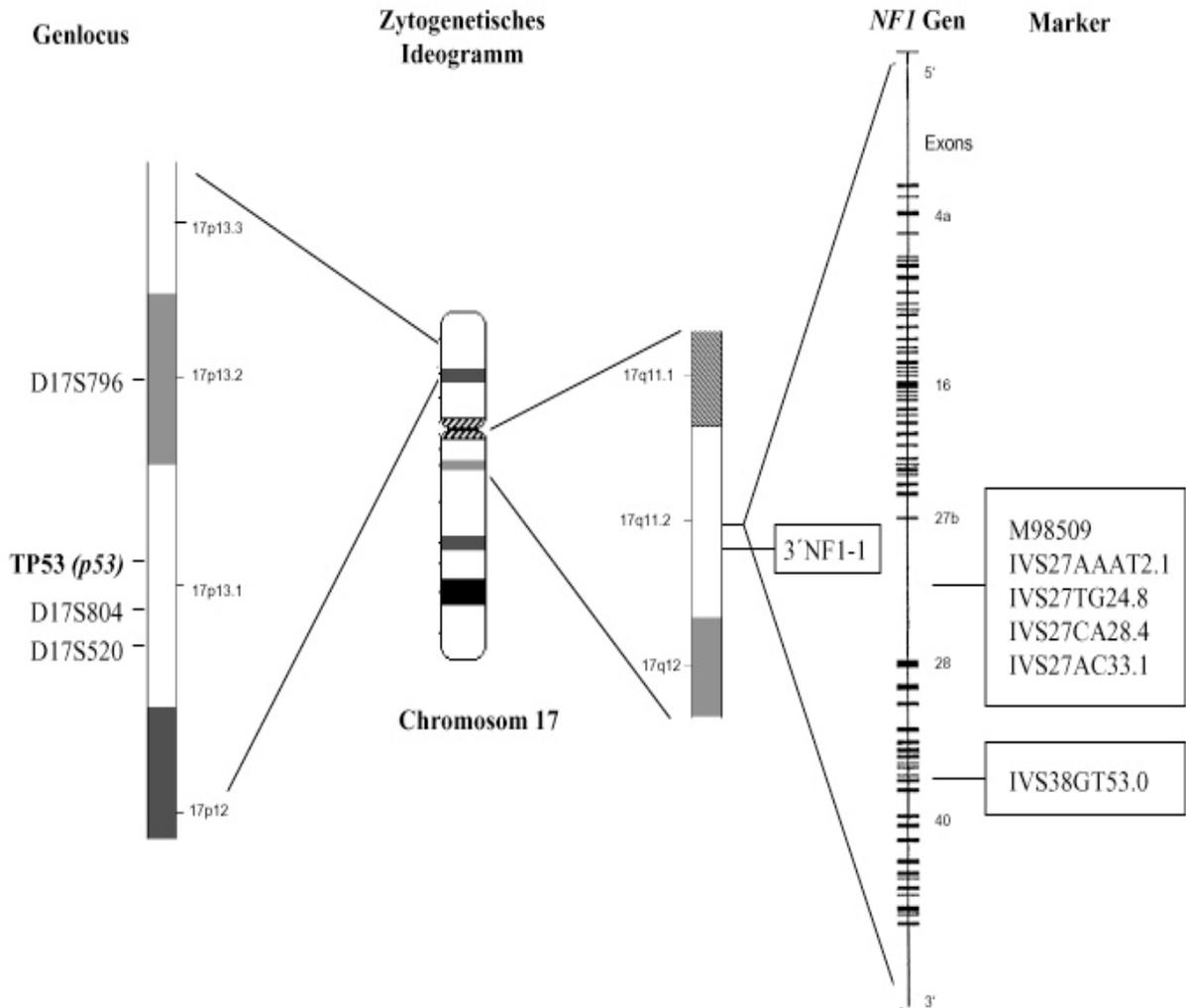


Abb. 3.2.2 Kartierung des Chromosoms 17

Sechs der MPNSTs von NF1 Patienten (60 %) wiesen außerdem einen LOH auf dem Chromosomenband 17p13 auf, wo das Tumorsuppressorgen *p53* lokalisiert ist (Tab. 3.2.2). Für die *NF1* und *p53* LOH Fälle gilt, daß alle getesteten, informativen Marker von diesem Verlust betroffen waren (Tab. 3.2.4), wodurch deutlich wurde, daß die gesamte von den Markern umfaßte Gen-Region verloren gegangen ist. Im Fall von Tumor #456-1 waren beide Marker auf dem Chromosomenband 17p13.1 (D17S520 und D17S804), wo sich auch der TP53 (*p53*) Locus befindet, nicht informativ (Abb. 3.2.2). Da der weiter distal gelegene Marker D17S796 (17p13.2) jedoch einen LOH zeigte, ist die Wahrscheinlichkeit des Verlustes des flankierenden TP53 Locus sehr hoch.

Tabelle 3.2.4 LOH-Verteilung der einzelnen Marker. NI: nicht informativ, NEIN: kein LOH

Gen	Marker	Locus	T456-1	T462	T520	T805	T811	T979-1	T981-2	T949
<i>NF1</i>	M98509	17q11.2	LOH	LOH	LOH	Dele- tion	NI	Dele- tion	LOH	NEIN
	IVS38GT53.0		NI	LOH	LOH		NI		LOH	
	IVS27CA28.4		NI	LOH	NI		LOH		NI	
	IVS27TG24.8		NI	LOH	NI		NI		NI	
	IVS27AAAT2.1		NI	LOH	NI		NI		LOH	
	IVS27AC33.1		NI	LOH	LOH		NI		LOH	
<i>p53</i>	D17S520	17p13.1	NI	LOH	LOH	NEIN	LOH	LOH	LOH	LOH
	D17S796	17p13.2	LOH	LOH	LOH	NI	NI	LOH	LOH	NI
	D17S804	17p13.1	NI	LOH	LOH	NEIN	LOH	NI	NI	LOH
<i>p16</i>	D9S157	9p22.1	LOH	LOH	LOH	LOH	NEIN	LOH	NEIN	NI
	D9S168	9p23	NI	LOH	LOH	NI	NEIN	NI	NEIN	LOH
	D9S171	9p21.2	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NEIN	NI

Weiterhin wurden drei benachbarte Loci des CDKN2A-Gens (*p16*) auf Chromosom 9 untersucht. Der Marker D9S171 flankiert das *p16* Gen telomerisch, die Marker D9S157 und D9S168 sind weiter distal positioniert (Abb. 3.2.3). Sechs von 10 MPNSTs (60 %) zeigten einen LOH auf dem Chromosomenband 9p21-23 von mindestens einem der getesteten Marker (Tab. 3.2.4). Lediglich im Fall von Tumor #811 wies nur Marker D9S171, der die kürzeste Entfernung zum *p16* Gen hat, einen Allelverlust auf - die beiden distaler gelegenen Marker jedoch nicht. In den restlichen *p16* LOH-Fällen sind alle informativen Marker von dem Verlust betroffen (Tab. 3.2.4).

Untersuchungen an einem sporadischen MPNST (T949) zeigten, daß dieser ebenfalls *p53* und *p16* LOH, nicht aber *NF1* LOH aufwies (Tab. 3.2.4).

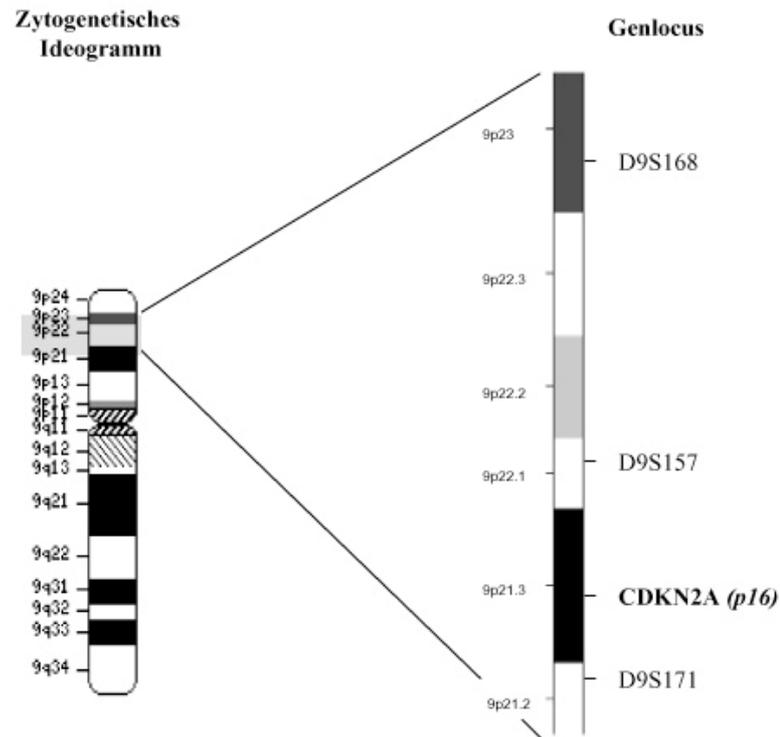


Abb. 3.2.3 Kartierung des Chromosoms 9.

Während das MPNST von Patient #6 LOH aller drei untersuchten Gen-Regionen zeigte, konnten keine Allelverluste in seinen beiden PNF gefunden werden, wohingegen das KNF von Patient #5 einen LOH des *NF1* Gens verzeichnete (Tab. 3.2.3; Abb. 3.2.4). In keinem der Neurofibrome wurde ein Allelverlust der *p53* und *p16* Gene nachgewiesen.

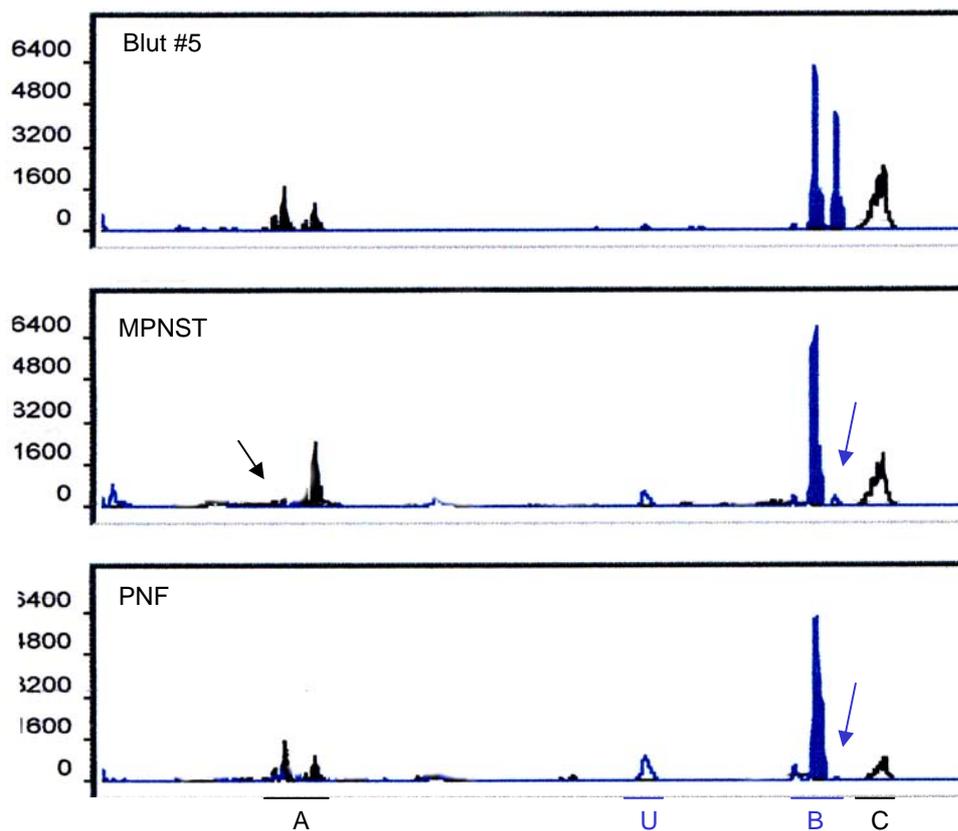


Abb. 3.2.4 Gutartige und bösartige Tumoren eines Patienten unterscheiden sich genetisch: *NFI* LOH (Marker B, Pfeile) in MPNST (mitte) und PNF (unten) von Patient #5, *p53* LOH (Marker A, Pfeil) nur im MPNST; A= D17S796, B= M98509, C= IVS27TG24.8 (nicht informativ), U= unspezifisches Signal

(b) LOH in Tumor-Zellen

Bei 4 primären MPNSTs (#2,#6,#7,#9) und einem Rezidiv (#5) wurde der ursprünglich in den Tumoren gefundene LOH auch in der DNA der entsprechenden Zellen nachgewiesen, wodurch die Möglichkeit gegeben war, diese als neoplastische Zellen zu identifizieren (Tab. 3.2.2). In 4 weiteren Fällen (#5,#8,#10 und das Rezidiv des Patienten #6) wurde der ursprüngliche LOH nicht in den gewonnenen Zellen wiedergefunden (Abb. 3.2.5), was darauf hinweist, daß es sich in diesen Fällen nicht um neoplastische, klonale Tumorzellen handelt (Tab. 3.2.2).

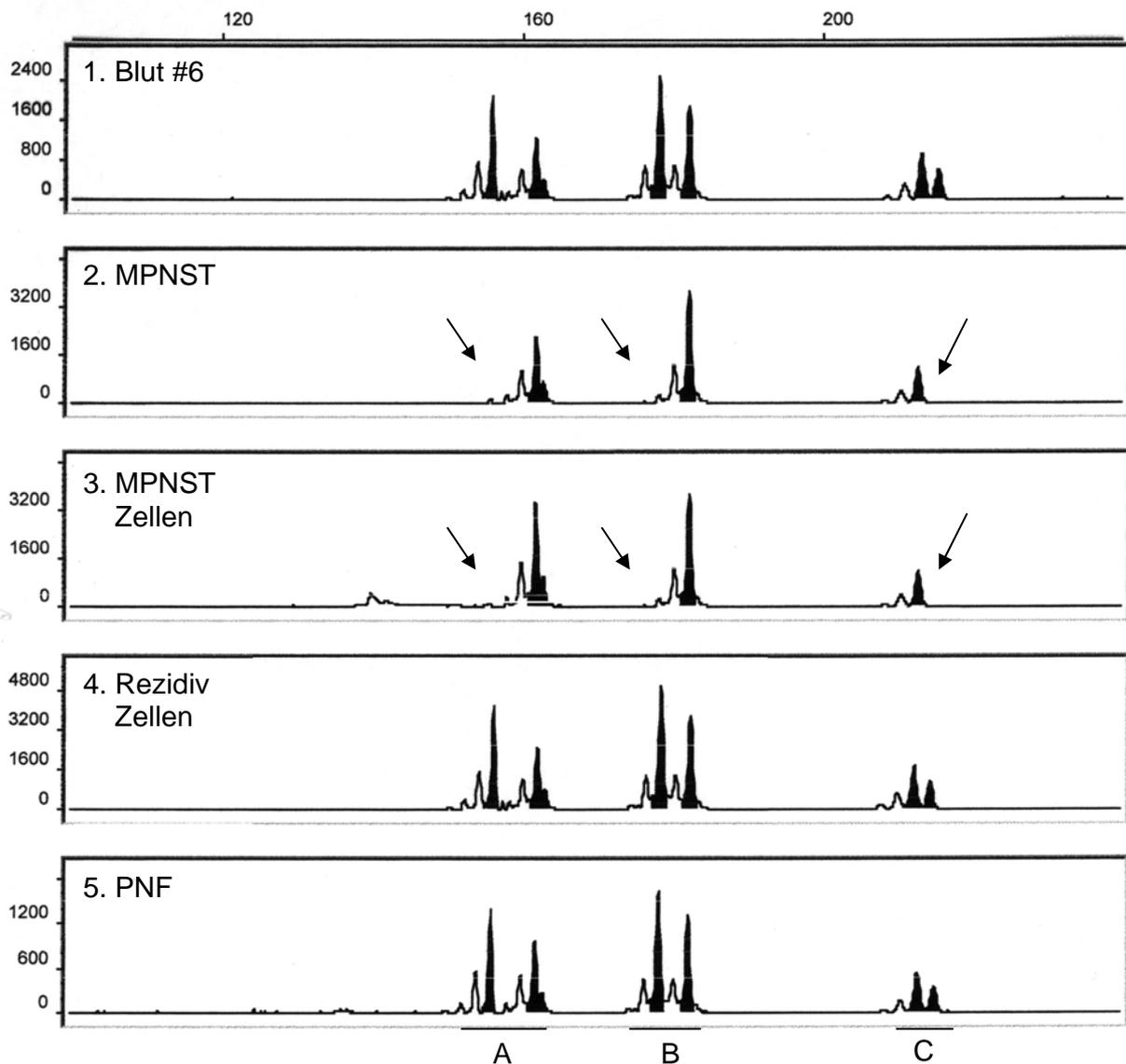


Abb. 3.2.5 Überprüfung von Allelverlusten in gewonnenen Tumorzellen: *P53* (Marker A) und *NF1* (Marker B und C) LOH im Tumor (Bild 2, Pfeile) und in Zellen des primären Tumors (Bild 3, Pfeile), nicht aber in Zellen aus dem Rezidiv (Bild 4). Das PNF (Bild 5) desselben Patienten (#6) wies weder *NF1* noch *p53* LOH auf. A= D17S796, B= IVS38GT53.0, C= IVS27CA28.4

In einigen originalen MPNSTs und in frühen Passagen der angesetzten Tumor-Zellkulturen wurden oft Spuren des verlorenen Allels beobachtet (Abb. 3.2.6). Die vorhandene jedoch geringe Amplifikation dieses Allels läßt sich durch das Vorhandensein von Fibroblasten und anderen nicht-neoplastischen Zellen im Tumor bzw. in der Kultur erklären. In 5 Fällen wurde der LOH durch die klonale Expansion der neoplastischen Zellen mit jeder Passage vollständiger, d.h. die Homogenität der Zellkulturen wurde höher (Abb. 3.2.6). Dies wurde in manchen Fällen durch die Anwendung der milden Trypsinierung erreicht, da sich MPNST-Zellen eher vom Kulturboden lösten als Fibroblasten.

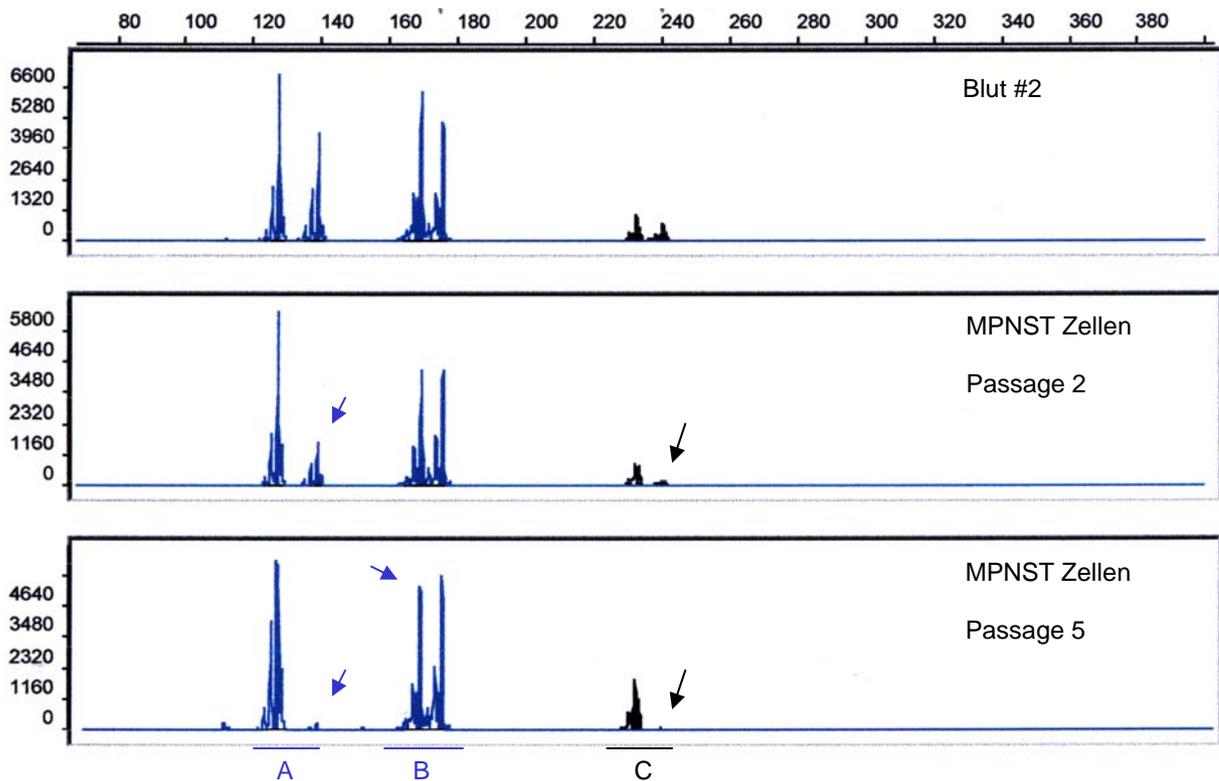


Abb. 3.2.6 Erhöhung der Zellhomogenität von MPNST-Kulturen nach wenigen Passagen: während in der 2. Passage der MPNST Kultur noch Spuren des zweiten *p16* Allels vorhanden sind, ist das Vorliegen des LOH in der 5. Passage eindeutig erkennbar (Marker A und C); Marker B zeigt jedoch nur einen angedeuteten Allelverlust; A= D9S157, B= D9S171, C= D9S168

Bei einigen Tumoren und Tumorzellen fiel auf, daß zwei der *p16* Marker einen vollständigen Allelverlust verzeichneten, während der Dritte nur einen angedeuteten Allelverlust zeigte (Abb. 3.2.6, Marker B). Ein Grund dafür könnte die Entwicklung einer Subpopulation in dem MPNST sein, was bedeuten würde, daß diese Tumoren nicht aus einem einzigen malignen Klon bestehen.

Eine weitere Unregelmäßigkeit tauchte in MPNST Kulturen späterer Passagen auf. Manche dieser Zellen zeigten Alterationen in der Länge der repetitiven Nukleotid-Sequenzen, eine Erscheinung, die Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) bezeichnet wird und ein Zeichen für die Malignität in verschiedenen Tumoren darstellt. Abbildung 3.2.7 zeigt ein Beispiel für MSI, die Position der Marker hat sich in Zellen der höheren Passage verschoben, d.h. die Länge des amplifizierten Fragments, bzw. die Anzahl der Tandem-Repeats hat sich verändert.

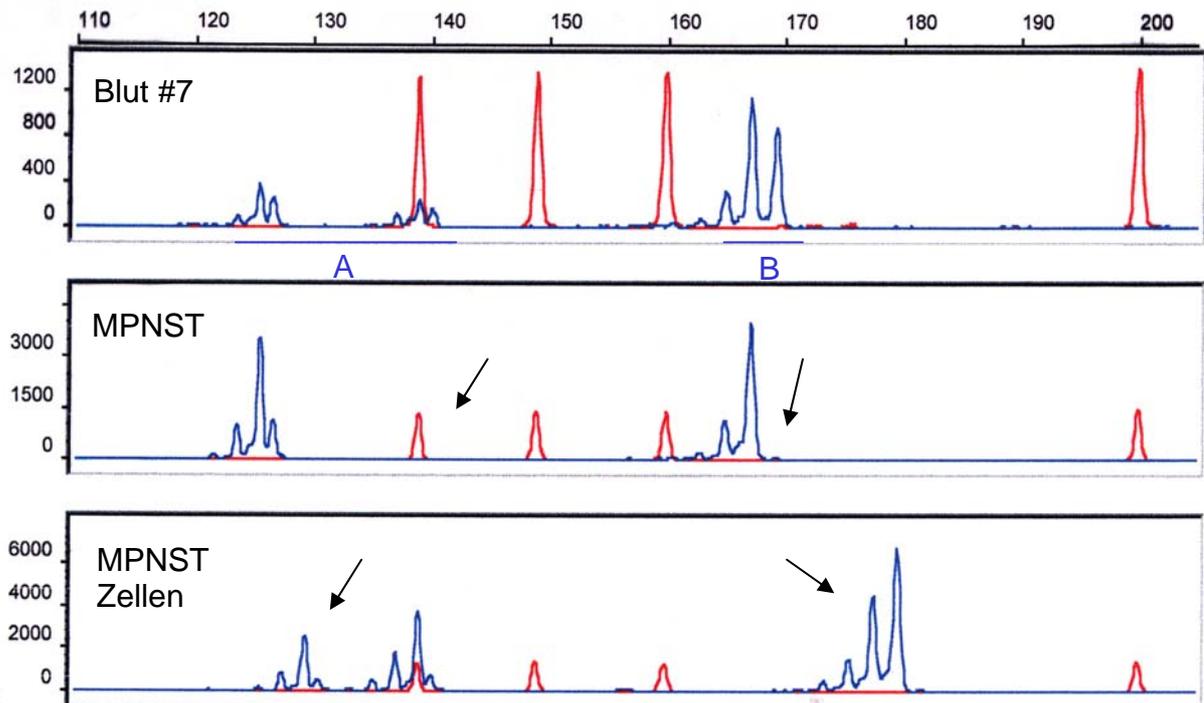


Abb. 3.2.7 Mikrosatelliten-Instabilität von MPNST-Zellen höherer Passagen: der MPNST (Mitte) zeigt *p16* LOH: Marker A (D9S157) und B (D9S171) haben je ein Signal verloren (Pfeile). In den Zellen einer hohen Passage dieses Tumors (Unten) ist die Position der Marker verschoben (Pfeile). Die roten Peaks stellen den Größenstandard dar (139, 149, 160 und 200 kB).

NF1 LOH wurde in den Schwanzzellen des KNF aus Patient #5 gefunden, jedoch nicht in den S100-negativen Zellen dieses Tumors, welche höchstwahrscheinlich Fibroblasten darstellen (Tab. 3.2.3).

(c) Karyotyp von MPNST-Zellen

Von den 7 karyotypisierten MPNST-Zellen wurde in 4 Kulturen ein abnormaler Karotyp gefunden. Bei den Zellen mit normalen Karyotyp handelt es sich vermutlich um Fibroblasten oder andere nicht-neoplastische Zellen aus dem Tumor. Die Karyotypisierung ermöglichte in zwei weiteren Fällen die Identifizierung von neoplastischen Zellen, in denen die LOH-Analyse nicht angewendet werden konnte, da die ursprünglichen Tumoren aus denen sie stammen, keinen Allelverlust des *NF1*, *p53* oder *p16* Gens aufwiesen. Viele der Chromosomen waren neben einer triploiden Anzahl auch von Inversionen, Deletionen, Additionen und Duplikationen betroffen, unter anderem auf den Chromosomen 1, 2, 3, 4, 8, 11, 12, 16 und 18. Aus dieser Untersuchung wurde klar, daß die chromosomalen Veränderungen in den MPNSTs extrem komplex sind. Außerdem wurden in zwei aus 4 MPNSTs mit abnormalen Karyotyp verschiedene Klone innerhalb eines Tumors gefunden,

die sich in der Menge an Abnormalitäten unterschieden - manche zeigten nicht in jeder Metaphase alle Veränderungen und andere hatten noch zusätzliche Abberationen.

(d) NF1 Mutationen in Tumoren und Zellen

Die *NF1* Keimbahnmutationen der 5 Patienten, die *NF1* LOH in den entsprechenden MPNSTs aufwiesen (#2,#5,#6,#8,#10), konnten homozygotisch in den Tumoren bestätigt werden (Abb. 3.2.8). Dadurch wird die Tumorsuppressorthese bestätigt, da es sich bei den verlorenen Allelen um die Wildtyp (gesunden) Allele handelte, und damit um den zweiten „Hit“. Das gleiche galt für die Tumorzellen mit LOH (S462, S517 und S520), wodurch noch mal gezeigt werden konnte, daß die primären Zellen die identischen genetischen Änderungen der MPNSTs tragen.

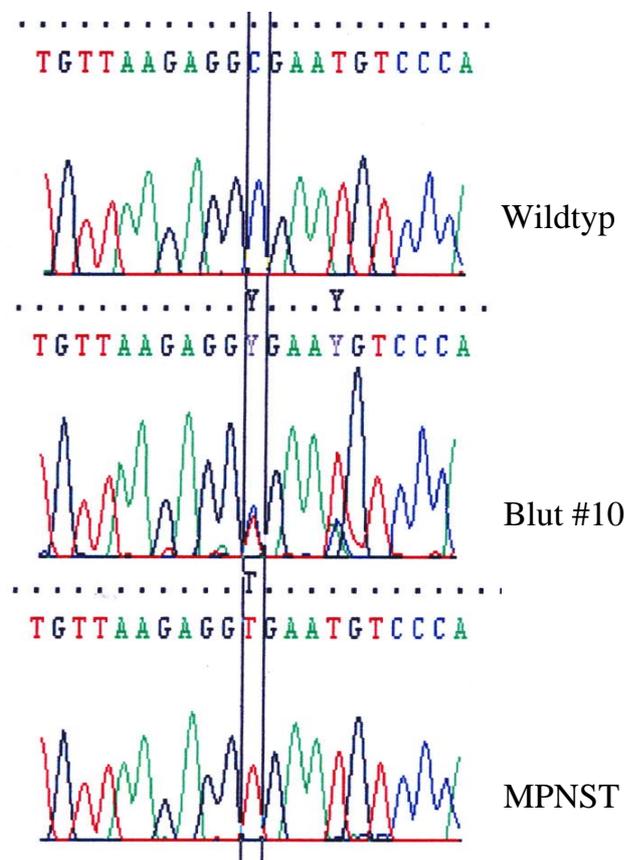


Abb. 3.2.8 Nonsense Mutation auf Exon 16: 2446 C>T: Im Blut des Patienten ist das Wildtyp Allel und das mutierte Allel überlappend zu sehen, im Tumor dagegen ist durch den Verlust des Wildtyp Allels (LOH) nur das mutierte Allel nachweisbar.

(e) p53-Mutationen in Tumoren

Die Exons 4-8 des *p53* Gens wurden bei allen MPNSTs (#1 bis #10) mittels direkter Sequenzierung untersucht. Diese Exons umfassen den Mutations- „Hotspot“. Lediglich einer

der 10 untersuchten Tumoren (T462) wies eine Missense-Mutation auf Exon 4 des *p53*-Gens auf (329G>C, Arg>Pro; Abb. 3.2.9). Dieses MPNST hatte gleichzeitig auch einen *p53*-LOH, d.h. beide *p53*-Allele sind in diesem Fall inaktiviert (homozygotische Deletion). Weiterhin wurde in vier anderen MPNSTs (T411, T805, T979-1, T981-2) ein verbreiteter *p53*-Polymorphismus gefunden (Kodon 72: 215G>C, Arg>Pro).

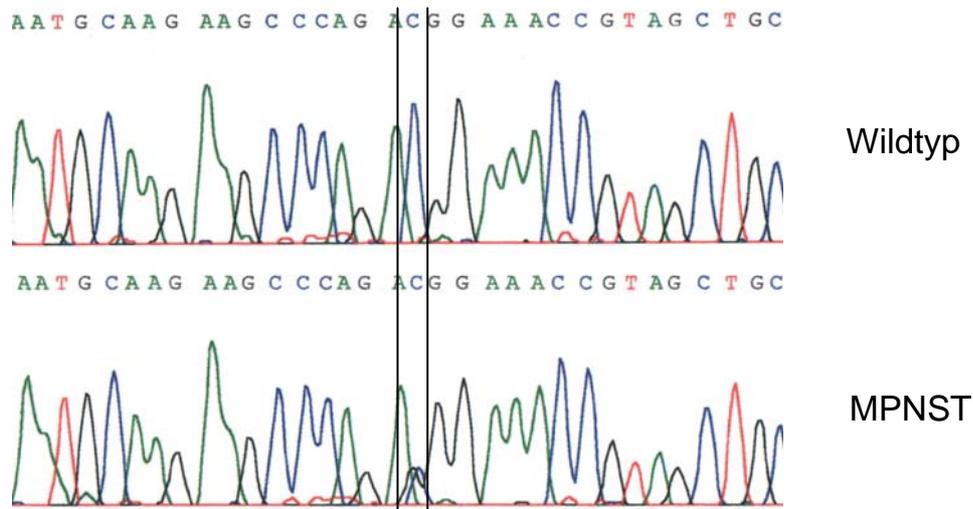


Abb. 3.2.9 Punktmutation auf Exon 4 des *p53* Gens (Antisense-Sequenzierung) in MPNST T462. Der normale Zellanteil in der Tumor-DNA erzeugt das zweite Signal.

3.2.4 Morphologie

Die als neoplastisch identifizierten Zellen aus MPNSTs hatten einen ausgeprägten polygonalen Zellkörper mit hohem Zytoplasma-Anteil und keine langen Fortsätze (Abb. 3.2.10 A-E). Einzelne Zellen wiesen zwar die typische Spindel-Form der Schwannzellen aus PNF auf, jedoch waren diese S100-negativ (Abb. 3.2.10 C,E Pfeile). Kulturen aus verschiedenen MPNSTs zeigten unterschiedliche zelluläre Morphologien untereinander (Abb. 3.2.10 A-E), wodurch eine Erkennung neoplastischer Zellen anhand gemeinsamer morphologischer Eigenschaften nicht möglich war.

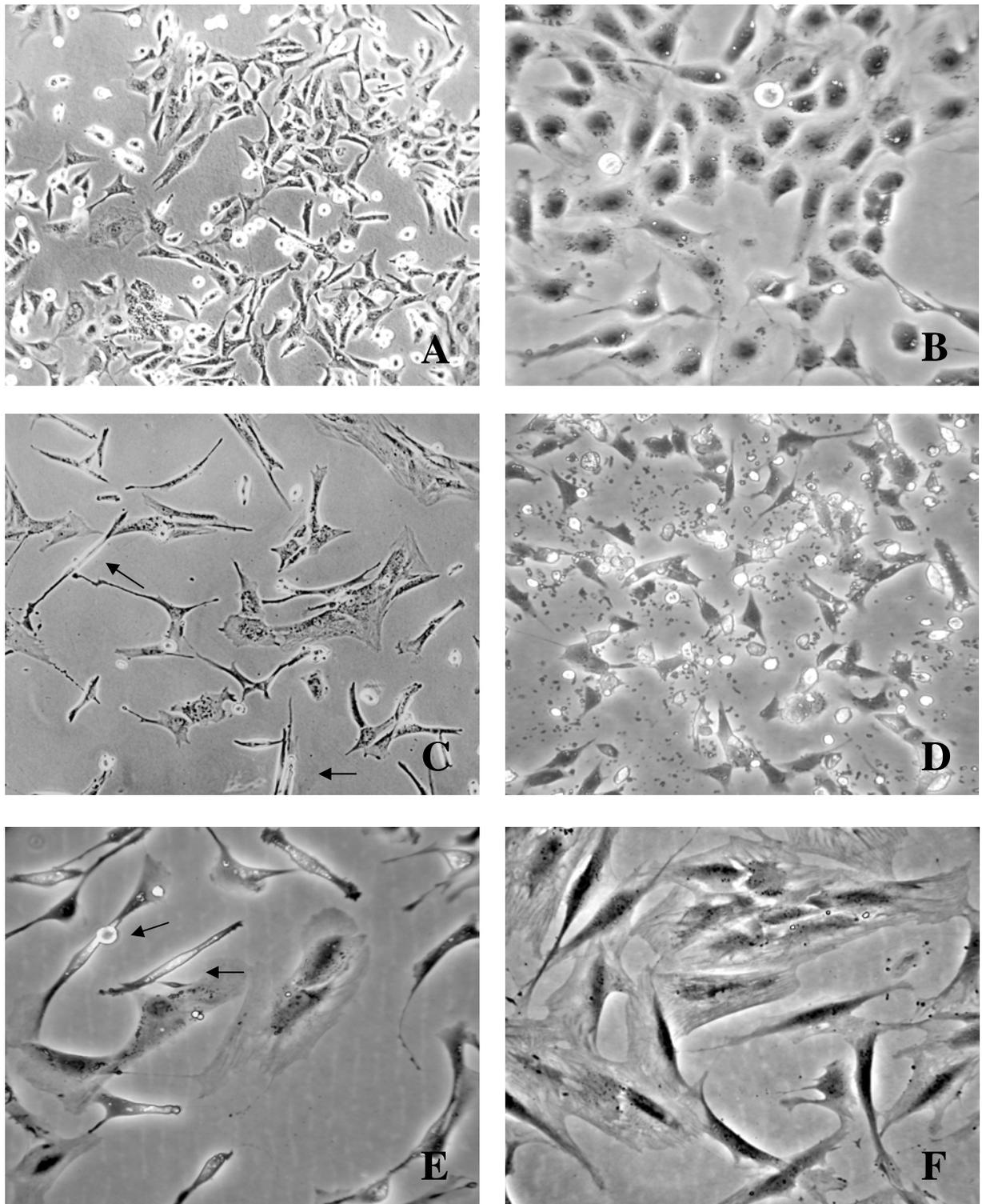


Abb. 3.2.10 Morphologische Unterschiede von Tumorzellen aus MPNSTs: die neoplastischen Zellen (mit LOH) von verschiedenen Patienten unterscheiden sich untereinander (A-E) und von nicht-neoplastischen Zellen (F). Einige Kulturen (C,E) beinhalteten wenige spindelförmige Zellen (Pfeile), die jedoch S100-negativ waren; (Phasenkontrast, Vergrößerung: A,C: x100 und B,D-F: x200)

Zellen aus MPNSTs, die im Gegensatz zu den Ursprungstumoren keinen LOH zeigten, unterschieden sich von den meisten Zellen mit LOH, da die nicht-neoplastischen Zellen eine flachere und Fibroblasten-artigere Morphologie aufwiesen (Abb. 3.2.10 F). Eine eindeutige Identifizierung von „echten“ MPNST-Zellen konnte jedoch erst nach genetischer Verifizierung erfolgen.

3.2.5 Proliferation

Das Wachstum der identifizierten MPNST Zellen von drei Patienten (#2,#5,#6) und der zwei gutartigen PNF von Patient #6 wurde zwischen der 4. und 8. Passage gemessen (Abb. 3.2.11). Die S100-negativen Tumorzellen der drei MPNSTs zeigten Proliferations-Raten von 68 % (#2,#5) und 99 % (#6). Im Vergleich dazu proliferierten nur 34-50 % der Schwanzzellen aus den beiden PNF (#6).

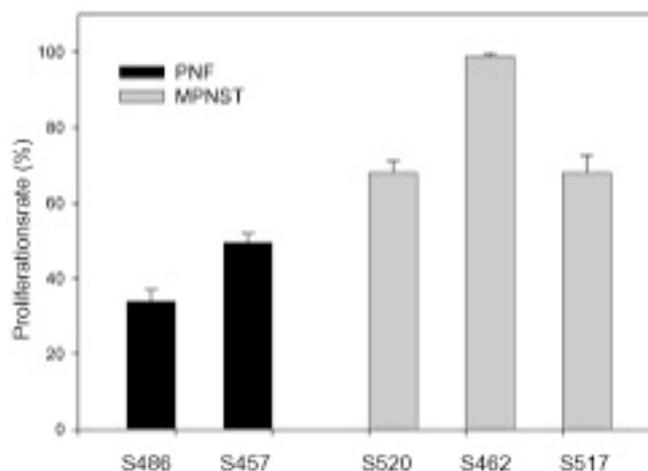


Abb. 3.2.11 Vergleich der Proliferation von Schwanzzellen und MPNST Zellen

Die Zellen von MPNST #520 verhielten sich nach der 25. Passage auffällig, die Proliferationsrate hatte sich verdoppelt bis verdreifacht und die Zellen tendierten zur Ausbildung von Syncytium-artigen Zellkontakten. Bei einer erneuten DNA Mikrosatelliten-Analyse stellte sich heraus, daß die Zellen eine Mikrosatelliten-Instabilität aufwiesen.

3.2.6 Etablierung stabiler MPNST-Zellkulturen

Nicht alle der MPNST-Kulturen, bei denen in den ersten Passagen (5-10) neoplastische Zellen identifiziert worden sind, haben sich als beständige Kulturen ausgezeichnet. Diejenigen, die

für die Karyotypisierung zu der belgischen Arbeitsgruppe geschickt worden sind und abnormale Veränderungen aufzeigten, verloren ihre Vitalität nach ca. 3 Passagen. Von den 5 Kulturen mit LOH der *NF1*, *p53* oder *p16* Gene wurden in einer Kultur, wie sich durch eine Wiederholung der LOH-Analyse herausstellte, MPNST Zellen von nicht neoplastischen Zellen noch nachträglich überwuchert. Die genetische Kontrolle der Zellen wurde deshalb standardmäßig alle 10 Passagen wiederholt. Es wurden insgesamt 4 stabile MPNST Kulturen etabliert.

3.3 Expression Differenzierungs-relevanter Gene in neoplastischen Schwannzellen und MPNST-Zellen

3.3.1 Kultur unter wachstumsfördernden Bedingungen

Es wurde bereits immunzytochemisch festgestellt, daß MPNST-Zellen im Gegensatz zu Schwannzellen nicht das Kalzium-bindende S100-Protein exprimieren. Weitere Gene, die in der Differenzierung von Schwannzellen eine Rolle spielen, wurden an beiden Zelltypen im Western-Blot untersucht, um zur Aufklärung des neoplastischen Ursprungszelltyps von MPNSTs beizutragen. Um alle Zellen unter denselben Bedingungen zu kultivieren, wurden auch die MPNST-Zellen 48 Stunden vor dem Lysieren in Schwannzell-Medium gehalten. Unter diesen wachstumsfördernden Bedingungen exprimierten die meisten Schwannzellen aus kutanen und plexiformen Neurofibromen sowohl den Neuregulin-Rezeptor ErbB3, als auch den low-affinity NGF-Rezeptor (LNGFRp75). Schwannzellen aus einem normalen Nerven (NS) zeigten eine schwache Expression des ErbB3-Rezeptors, jedoch große Mengen an *p75*, vergleichbar mit der in Schwannzellen aus Neurofibromen. Die 3 getesteten MPNST-Zellen exprimierten diese Rezeptoren in sehr geringem Maße (Abb. 3.3.1).

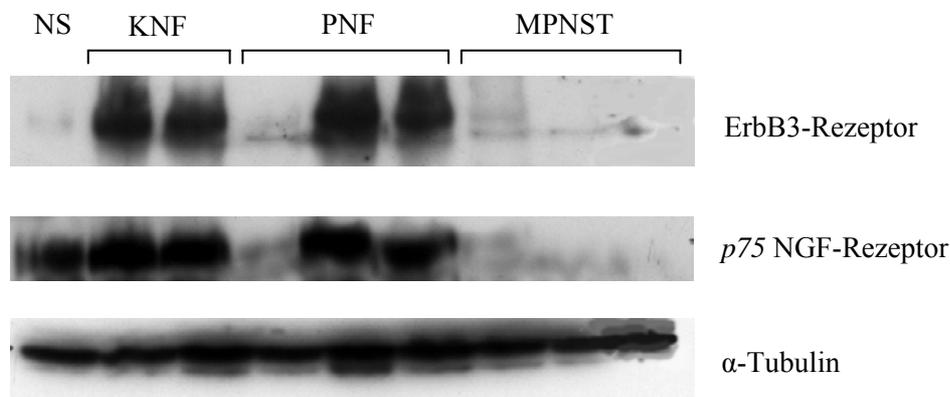


Abb. 3.3.1 Expression der ErbB3- und *p75*-Rezeptoren in normalen Schwannzellen (NS), verschiedenen Neurofibromen (KNF und PNF) und MPNST-Zellen (Western Blot).

3.3.2 Kultur unter Myelinisierungs-einleitenden Bedingungen

Der Prozeß der Myelinisierung kann *in vitro* durch die Stimulierung mit cAMP-erhöhenden Substanzen bei gleichzeitigem Serum-Entzug angeregt werden (Zorick und Lemke, 1996; Monuki et al., 1990; Morgan et al., 1991). Forskolin ist eine solche Substanz und wurde für

48 Stunden dem Medium in einer Konzentration von 10 μM zugefügt, und das fötale Kälberserum durch BSA (bovine serum albumin) ersetzt. Die Zellkörper und Fortsätze der Schwannzellen aus Neurofibromen sahen nach dieser Behandlung flacher aus (Abb. 3.3.2), während bei MPNST-Zellen nach dieser Prozedur kein Unterschied in der Morphologie sichtbar wurde. Bei beiden Zelltypen haben sich einige Zellen vom Kulturboden gelöst.

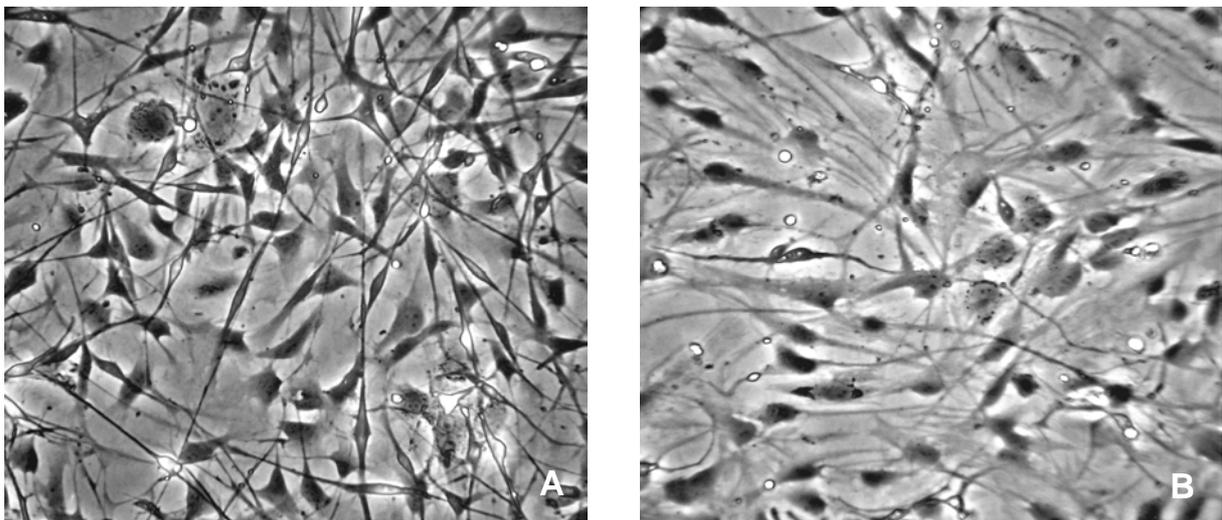


Abb. 3.3.2 Kultur von Schwannzellen in Schwannzell-Medium (A) und Serum-freien Medium mit hoher Forskolin-Konzentration (B); (Phasenkontrast; Vergrößerung: x100)

Als nächstes wurde die Expression des Zink-Finger-Proteins Krox20 untersucht, welches bei der Differenzierung von Schwannzellen nur von solchen Zellen exprimiert wird, die sich am Anfang des Myelinisierungs-Prozesses befinden (Zorick und Lemke, 1996). Dabei stellte sich heraus, daß sowohl in Schwannzellen aus Neurofibromen und aus Akustikusneurinomen von NF2-Patienten (AKN), als auch in MPNST-Zellen die Expression dieses Proteins induziert werden kann.

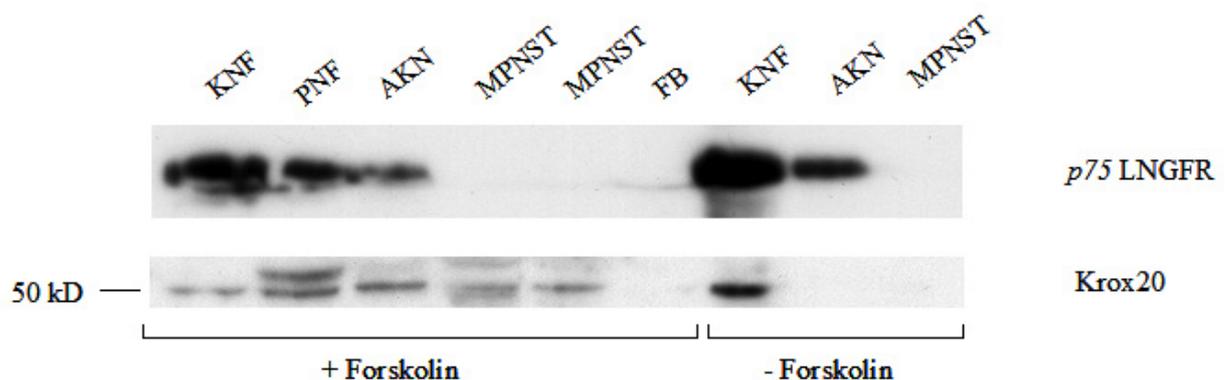


Abb. 3.3.3 Induktion der Krox20-Expression durch Forskolin (Western Blot)

Eine Kultur aus KNF wies vor der Behandlung größere Mengen an Krox20 auf, möglicherweise weil im Schwanzzell-Medium bereits Forskolin in einer geringeren Dosis vorhanden ist. In einer Fibroblasten-Kultur eines NF1-Patienten (*NF1^{+/-}*) konnte die Expression von Krox20 dagegen weder vor noch nach Forskolin-Behandlung nachgewiesen werden (Abb. 3.3.3). Ebenso wurde der *p75*-Rezeptor nur von Schwanzzellen (aus KNF, PNF und AKN) exprimiert.

In den getesteten PNF Kulturen wurde außerdem sichtbar, daß der Entzug der wachstumsfördernden Substanzen wie Neuregulin und Serum, sowie die gleichzeitige Erhöhung der Forskolin-Konzentration eine Abnahme der Expression der ErbB3- und *p75*-Rezeptoren bewirkte (Abb. 3.3.4). An diesem Beispiel wird weiterhin sichtbar, daß nicht alle AKN diese Rezeptoren exprimieren.

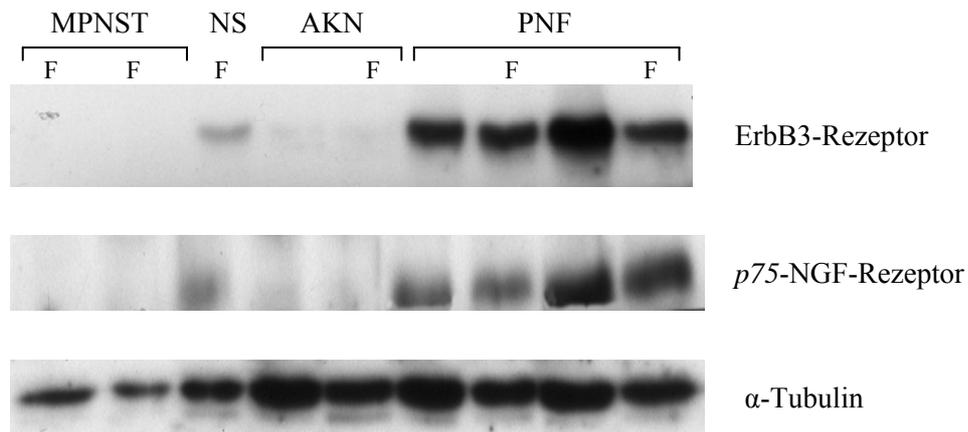


Abb. 3.3.4 Rezeptoren-Expression nach dem Entzug wachstumsfördernder Substanzen: Serum-Entzug und Forskolin-Zugabe (F) bewirken eine Herunterregulierung der *p75*- und ErbB3-Rezeptoren in PNF (Western Blot)

3.4 Medikamentöse Behandlung der MPNST-Zellen mit Sulindac-Metaboliten

Die Wirkung der neuen anti-neoplastischen Substanzen Sulindac Sulfon (Exisulind) und Sulindac Sulfid wurde an zwei stabilen MPNST-Zellkulturen untersucht. Dazu wurden die Proliferation, Vitalität und Einleitung von Apoptose in den MPNST Zellen vor und nach der Behandlung *in vitro* gemessen. Weiterhin wurde der Effekt dieser Substanzen auf die Ras- und JNK-Signaltransduktionswege untersucht. Zusätzlich wurde ein *in vivo* Pilotexperiment durchgeführt.

3.4.1 Hemmung der Zell-Proliferation

Exisulind und Sulindac Sulfid wurden auf ihre Fähigkeit hin, das MPNST-Zell-Wachstum zu hemmen, untersucht. Exisulind wurde in Endkonzentrationen von 100, 250 und 500 μM und Sulindac Sulfid von 50, 100 und 125 μM dem Medium beigelegt. Beide Sulindac-Metaboliten wiesen eine auffällige, dosisabhängige Wachstumshemmung der beiden MPNST-Zelllinien auf (Abb. 3.4.1). Dieser Effekt war nach 4 Tagen Behandlung ausgeprägter als nach zwei Tagen (Abb. 3.4.1). Die entsprechenden IC_{50} -Werte beider Zelllinien betragen nach 96 Stunden Behandlung 120 μM für Exisulind und 63 μM für Sulindac Sulfid. Die Proliferationsrate der Zellen blieb nach Zugabe der Trägerflüssigkeit DMSO in Konzentrationen die in der Behandlung verwendet wurden, unverändert (0,2 %).

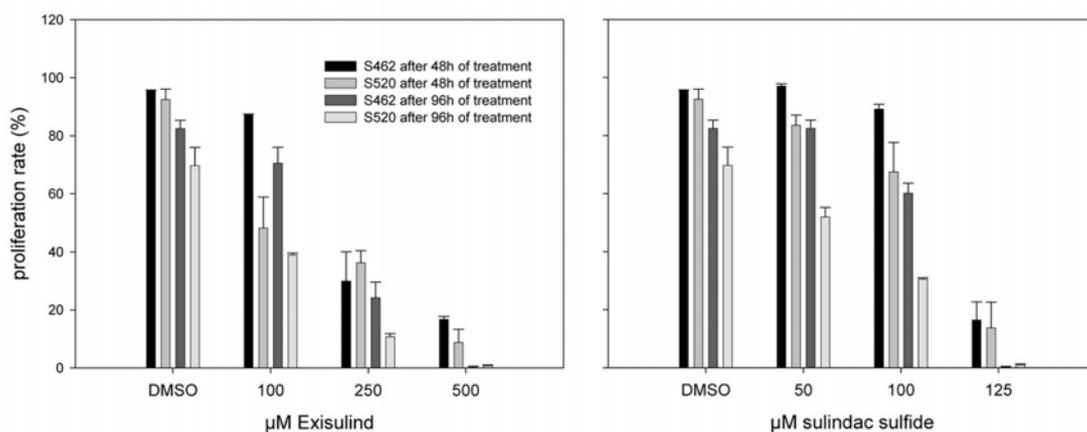


Abb. 3.4.1 Zeit- und Dosis-abhängige Wachstumshemmung der MPNST-Zellen der Linien S462 und S520

3.4.2 Apoptose-Einleitung

Um den Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung und Apoptose (programmierter Zelltod) zu bestimmen, wurden die Anzahl vitaler Zellen und die Menge der DNA-Fragmentierung simultan (im gleichen experimentellen Aufbau) gemessen. Die Vitalität der Zellen nahm nach 48 Stunden Behandlung stark ab (Abb. 3.4.2). Nur 1-33 % der Zellen zeigte bei einer Konzentration von 500 μM Exisulind zu diesem Zeitpunkt noch einen aktiven Metabolismus, verglichen mit Zellen die mit DMSO behandelt wurden. Abbildung 3.4.2 zeigt, daß die prozentuale Abnahme vitaler Zellen mit dem Anstieg der Apoptose-Rate bis zu 25-45 % bei Exisulind und bis zu 43-60 % bei Sulindac Sulfid, parallel zueinander verliefen. Die Einleitung der Apoptose wurde hier durch die photometrische Bestimmung der DNA-Fragmentierung quantifiziert. Zugabe von DMSO zum Kulturmedium (0,2 %) hatte keinen Einfluß auf den programmierten Zelltod.

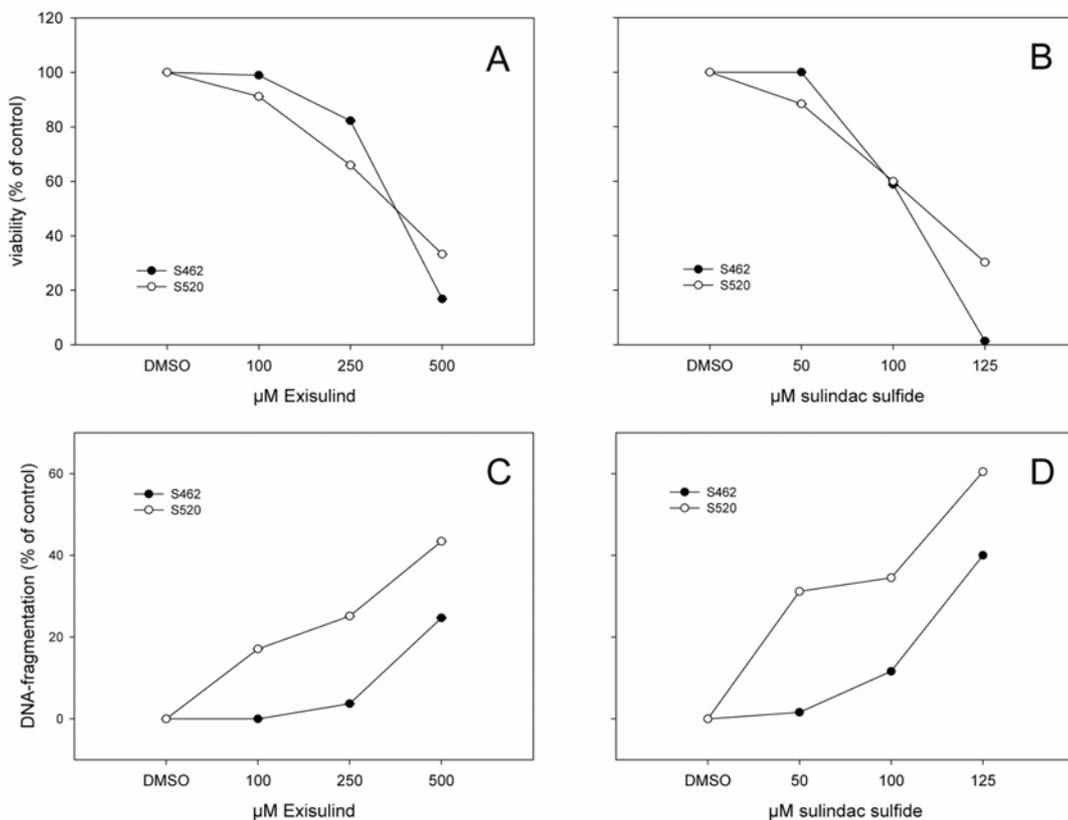


Abb. 3.4.2 Dosisabhängige Abnahme der Zell-Vitalität und Einleitung der Apoptose nach 48h

Weiterhin wurde die durch Sulindac-Metaboliten eingeleitete Apoptose mittels dem TUNEL-assay an beiden Zelllinien genauer untersucht. Die FACS-Analyse (Abb. 3.4.3) zeigt eine zeitabhängige Einleitung der Apoptose an MPNST-Zelllinie S462, die mit 500 μM Exisulind (A-C) oder 125 μM Sulindac Sulfid (D-F) behandelt wurde.

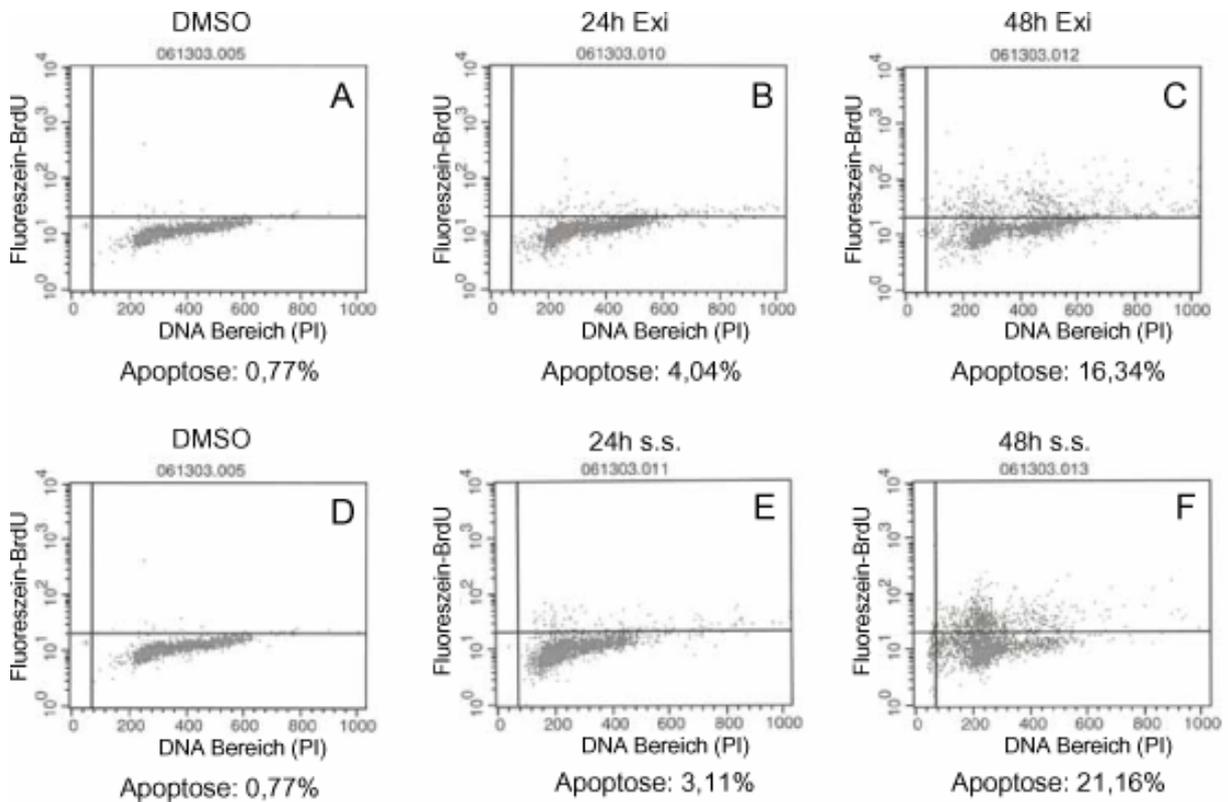


Abb. 3.4.3 TUNEL-Assay an MPNST-Zellkultur S462. Exi: Exisulind, s.s.: Sulindac Sulfid

Bei beiden Zelllinien stieg die Apoptose-Rate im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen um das 3-5 fache nach 24 Stunden Behandlung mit Exisulind, und um das 7-21 fache nach 48 Stunden Behandlung. Ähnlich verursachten 24 Stunden Behandlung mit Sulindac Sulfid eine 3-4 fache Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen, und eine 10-27 fache Erhöhung nach 48 Stunden Behandlung (Tab. 3.4.1).

Tabelle 3.4.1 Apoptose-Werte (TUNEL) nach 24h und 48h Behandlung

		24h Behandlung		48h Behandlung	
Zelllinie	DMSO	Exisulind	S.Sulfid	Exisulind	S.Sulfid
S462	0,77	4,04	3,11	16,34	21,16
S520	4,66	16,04	16,18	33,56	48,03

Nach 48 Stunden Behandlung mit 500 μM Exisulind oder 125 μM Sulindac Sulfid konnten in beiden getesteten Zelllinien Veränderungen der Zell-Morphologie und das Ablösen von der Kulturoberfläche beobachtet werden, nachdem die Zellen spärlicher und rundlich wurden (Abb. 3.4.4 B). Zellschrumpfen, nukleäre Kondensation und die Bildung apoptotischer Zellkörper wurden durch Färbung der Zellkerne mit Propidiumjodid sichtbar - eine weitere Bestätigung für die Einleitung des programmierten Zelltods, da es sich hierbei um klassische Eigenschaften von Apoptose und nicht Nekrose handelt (Abb. 3.4.4 C).

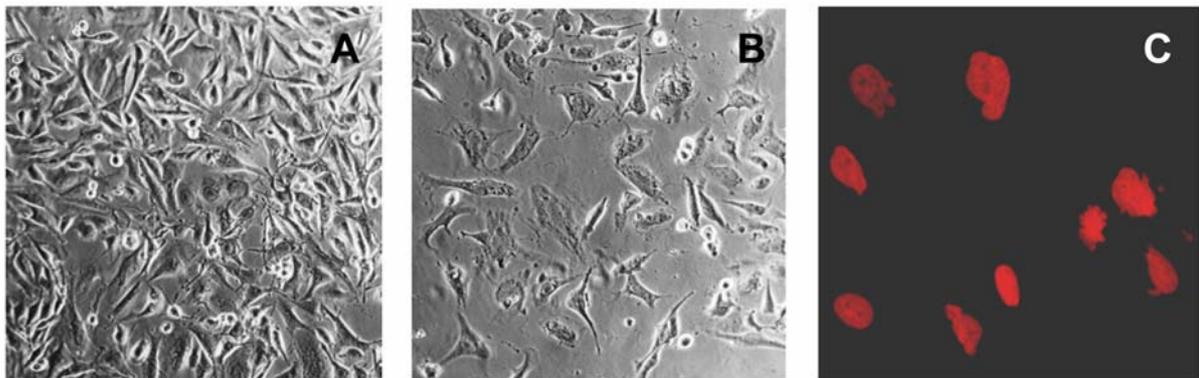


Abb. 3.4.4 MPNST-Zellen vor (A) und nach 48h Behandlung mit Exisulind (B) und Sulindac Sulfid (C, PJ gefärbte Zellkerne), (A,B: Phasenkontrast; Vergrößerung: A,B: x100; C: x400)

3.4.3 Herunterregulierung der Ras-Signaltransduktion

Um den Effekt der Sulindac-Metaboliten auf den Ras-Signaltransduktionsweg zu untersuchen, wurde der Gehalt an aktivem, phosphoryliertem Ras (Ras-GTP) durch Immunpräzipitation und darauffolgendem Western Blot mit einem monoklonalen Ras-Antikörper ermittelt, und ebenso die Aktivierung der extrazellulären Signal-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK 1/2) gemessen. Nach 24stündiger Behandlung mit den Sulindac Metaboliten wurde in beiden Zelllinien eine Abnahme an Ras-GTP beobachtet, die bei den Exisulind-behandelten Zellen etwas höher war (Abb. 3.4.5). Damit übereinstimmend war die Phosphorylierung von ERK1 (p44) und ERK2 (p42) ebenso nach der Behandlung reduziert. Keine Änderungen gab es im Anteil an basalem (inaktivem) ERK1/2 (Abb. 3.4.5).

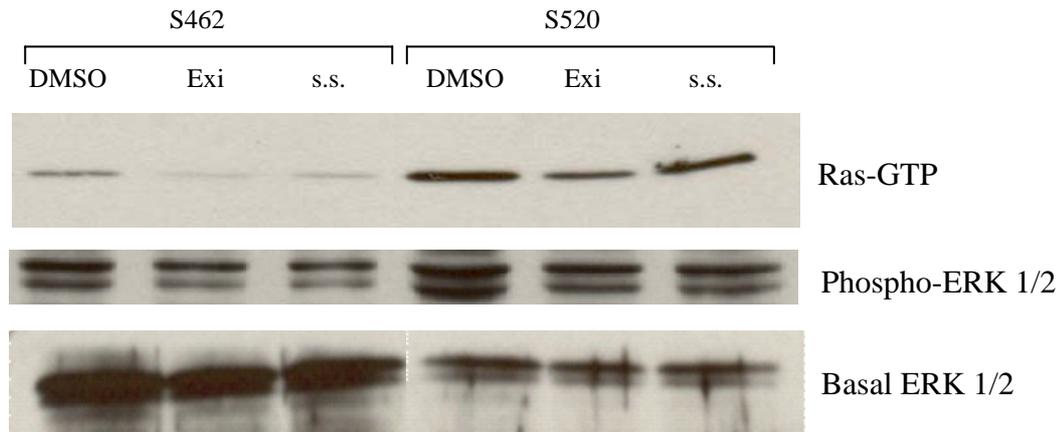


Abb. 3.4.5 Herunterregulierung von Ras-GTP und phospho-ERK1/2 nach medikamentöser Behandlung (Western Blot)

Unter serumfreien Bedingungen konnte eine sichtbare Abnahme der phospho-ERK1/2 Aktivierung bereits nach 8 Stunden gemessen werden.

Weiterführend wurde die Wirkung der beiden Substanzen nach Stimulation der Zellen mit dem epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), der den Ras-Signaltransduktionsweg über die Aktivierung des EGF-Rezeptors positiv reguliert, getestet. Der Ras-GTP-Level veränderte sich jedoch weder nach EGF Stimulierung, noch nach zusätzlicher Behandlung mit den Sulindac Metaboliten. Die Aktivierung von ERK1/2 wurde durch EGF hochreguliert, und zwar gleichermaßen in Sulindac behandelten und unbehandelten Zellen (Abb 3.4.6). Die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 war 5 Stunden nach der EGF-Zugabe immer noch erhöht.

Die Phosphorylierung von AKT, einem Protein das verschiedene apoptotische Transduktionswege negativ reguliert und eine wichtige Rolle bei Überlebenssignalen spielt, wurde durch eine 15 Minuten lange EGF-Stimulierung auch erhöht. Das zusätzliche Versetzen des Mediums mit Sulindac Metaboliten änderte nichts an dem erhöhten phospho-AKT Level, allerdings war diese Aktivierung 5 Stunden nach der Zugabe von EGF nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.4.6).

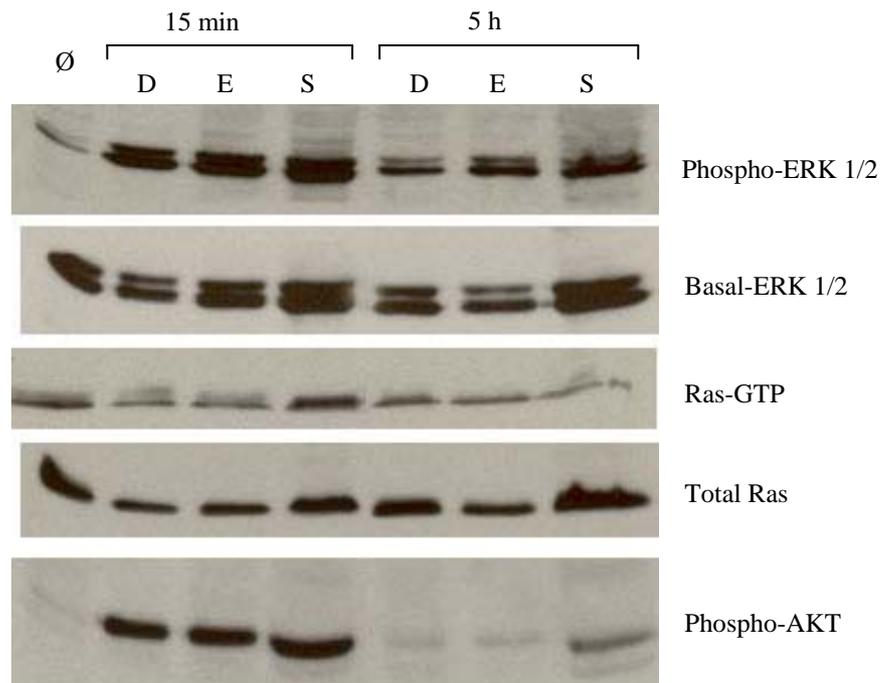


Abb. 3.4.6 Wirkung von EGF mit und ohne vorheriger medikamentöser Behandlung: Aktivierung von Ras, ERK und AKT durch EGF Stimulierung, nach 24h Behandlung mit dem Vehikel DMSO (D), mit Exisulind (E) oder mit Sulindac Sulfid (S) (Western Blot)

3.4.4 JNK und Kaspase-3 Aktivierung

Die Streß-aktivierte Protein Kinase/ Jun-terminale Kinase (SAPK/JNK) erfüllt eine Schlüsselfunktion im Apoptose Signaltransduktionsweg. Die Aktivierung dieses Proteins war bereits 16 Stunden nach Behandlungsbeginn mit beiden Sulindac Metaboliten nachweisbar und stieg weiter an nach 24 Stunden und 48 Stunden (Abb. 3.4.7). Behandlung mit DHA (Docohexanoid Säure), einer Substanz die bekanntlich Apoptose in Maus-MPNST Zellen induziert, hatte keinen Effekt auf die Phosphorylierung dieses Proteins.

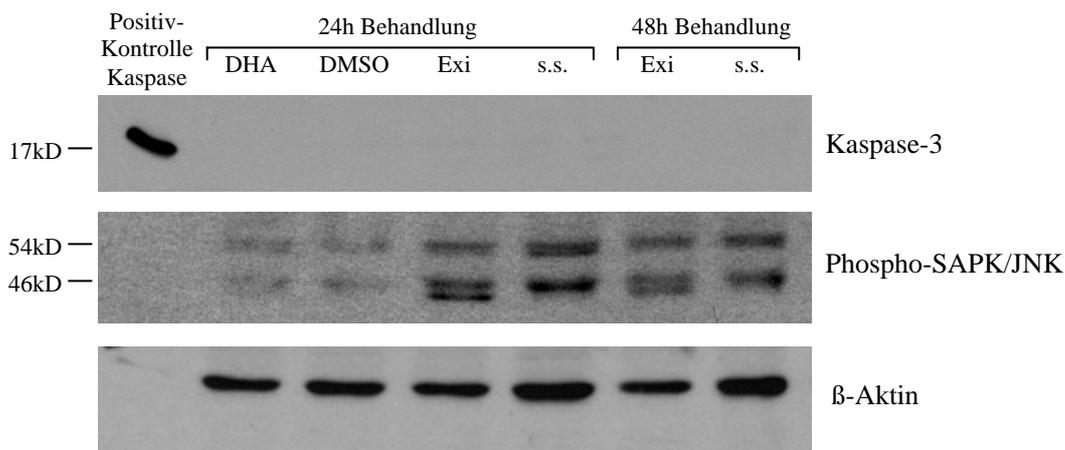


Abb. 3.4.7 Einfluß der Sulindac Metaboliten auf den JNK-Signaltransduktionsweg: JNK-Phosphorylierung ohne Kaspase-3 Aktivierung nach 24h und 48h Behandlung mit Exisulind (Exi) und Sulindac Sulfid (s.s.) (Western Blot)

Zusätzlich zur JNK-Aktivierung wurde die Spaltung von Kaspase-3 untersucht. Weder nach 8 Stunden und 16 Stunden noch nach 24 Stunden und 48 Stunden konnte eine Aktivierung der Kaspase-3 durch Behandlung mit Sulindac Metaboliten oder DHA nachgewiesen werden (Abb. 3.4.7). Demzufolge würden diese Substanzen unabhängig von einer nachweisbaren Änderung der Kaspase-3 Aktivierung Apoptose induzieren.

3.4.5 Hemmung des Tumorwachstums im Maus-Modell

In einem Pilotexperiment wurden 6 Nackt-Mäusen jeweils 10^7 Zellen einer MPNST-Zelllinie intraperitoneal injiziert. Nach ca. einer Woche hatten alle Mäuse Tumoren zwischen 18 mm^2 und 36 mm^2 Größe entwickelt. Sie wurden in zwei Gruppen aus je drei Mäusen eingeteilt. Die durchschnittliche Tumorgröße der Exisulind-Gruppe betrug vor der Behandlung 30 mm^2 und nach 14 Tagen Behandlung 15 mm^2 . Bei der Kontroll-Gruppe betrug die Durchschnittsgröße

vor der ersten Injektion 23 mm^2 und zwei Wochen später 19 mm^2 (Abb. 3.4.8). Während keine relevanten Änderungen der Tumorgöße in der Kontrollgruppe gemessen werden konnten, war die hemmende Wirkung von Exisulind auf das Tumorwachstum nach 9 Tagen signifikant ($p < 0.05$), wenn man den anfänglichen Unterschied der Tumorgößen zwischen Kontroll- und Exisulind-Gruppe berücksichtigte (Standard-Abweichung). Mäuse aus der Behandlungs-Gruppe erschienen leicht dehydriert, was auf Nebenwirkungen bei der verwendeten Dosis hindeutet.

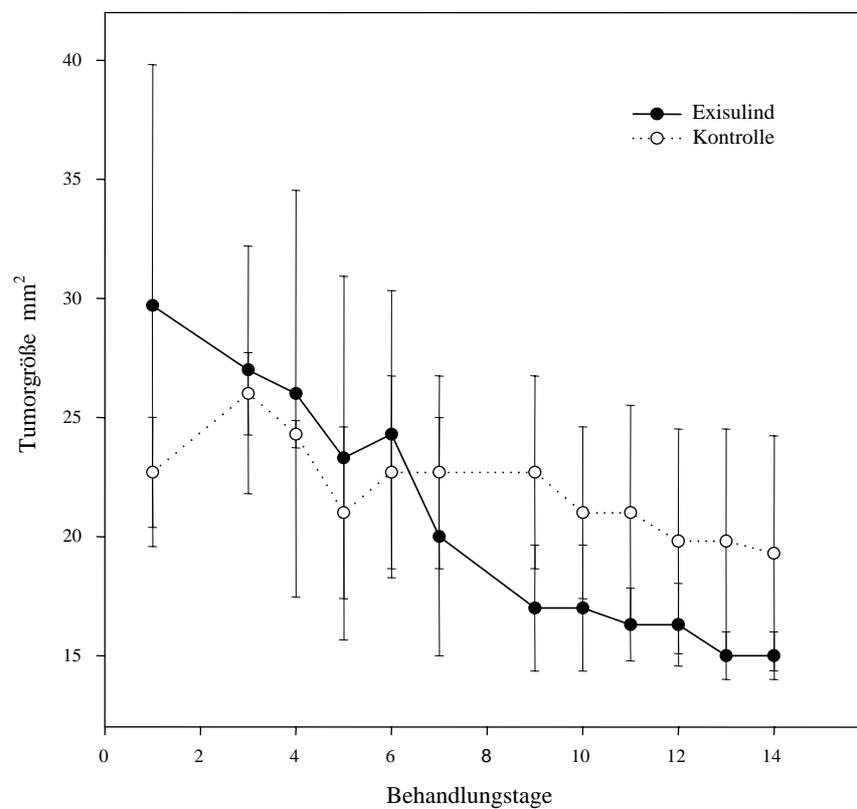


Abb. 3.4.8 Hemmung des Tumorwachstums in Mäusen

4 Diskussion

Die biologischen Eigenschaften und die Pathogenese der NF1-assoziierten Tumore wurden bislang unzureichend untersucht. Ein Grund für diese - auf zellbiologischer Ebene - geringen Kenntnisse über die NF1 Krankheit ist dadurch bedingt, daß es erst seit einigen Jahren durch neu etablierte Kulturbedingungen möglich ist, Schwannzellen - die einzigen neoplastischen Zellen in Neurofibromen - *in vitro* aus solchen Tumoren zu isolieren und zu kultivieren. Von malignen NF1-Tumoren sind bis heute weder Zelllinien verfügbar, noch wurde ein etabliertes Kultursystem beschrieben, welches dazu beitragen könnte, bislang offene Fragen, wie die des neoplastischen Ursprungs und der malignen Transformation von MPNSTs, zu bearbeiten und aufzuklären.

In dieser Arbeit wurden primär gezüchtete Zellen aus NF1-assoziierten gutartigen und bösartigen peripheren Nervenscheidentumoren in bisher größtem Umfang zellbiologisch und genetisch charakterisiert. Außerdem wurden vier stabile MPNST-Zellkulturen etabliert. Neue anti-neoplastische Substanzen konnten an zwei dieser Kulturen getestet und deren Wirkungsweise beschrieben werden.

4.1 Schwannzellen aus kutanen und plexiformen Neurofibromen

Zellbiologie

Die Kultur von primären humanen Schwannzellen birgt viele Schwierigkeiten und ist sehr aufwendig. Das Wachstum dieser Zellen wird nur unter speziellen Bedingungen erreicht, die weit über die standardisierten, herkömmlichen Methoden der Zellkultur hinausgehen: das spezielle Medium benötigt vier verschiedene Zusätze, die Kulturoberfläche wird mit Laminin beschichtet und die CO₂ Konzentration im Brutschrank beträgt 10 % (statt der üblichen 5 %), was einen zusätzlichen Inkubator nötig macht. Am aufwendigsten ist aber die selektive Trypsinierung, die bei jeder Kultur und in jeder Passage angewendet werden muß, um die Fibroblasten-Population unter Kontrolle zu halten. Hinzu kommt, daß nur aus einem geringen Anteil der angesetzten Neurofibrome Schwannzellen für die zellbiologische Charakterisierung isoliert und expandiert werden konnten (Abb. 3.1.3). Dabei ist die Zeitspanne, in der die überwiegende Zellpopulation in Kultur aus vitalen Schwannzellen bestand - und damit die einzige Zeitspanne in der Experimente durchgeführt werden konnten - extrem kurz (meistens nur über 1-2 Passagen lang, siehe Abb. 3.1.4). Erschwerend kam die Tatsache hinzu, daß

primäre Schwannzellen in der Regel den Prozeß der Kryo-Konservierung nicht überlebten (Daten nicht gezeigt). Desweiteren konnte die Beobachtung von Muir et al., daß einige Schwannzellen aus Neurofibromen einen verspäteten Eintritt der Seneszenz zeigten (eine tumorigene Eigenschaft), hier nicht bestätigt werden (Abb. 3.1.6). Zwar lebten Schwannzellen aus PNF durchschnittlich länger als KNF, jedoch lag dies wahrscheinlich an der langen anfänglichen Expansions-Phase von ca. 2-3 Wochen bei PNF (Abb. 3.1.5). Generell zeigten neoplastische humane Schwannzellen nicht das klassische Wachstums-Potential anderer primärer Tumorzelllinien *in vitro*. Das hier beschriebene Kultursystem und die damit zusammenhängenden Schwierigkeiten lassen die in den letzten Jahren von zwei Arbeitsgruppen optimierten Kulturbedingungen (Rosenbaum et al., 2000; Muir et al., 2001) immer noch verbesserungswürdig und ausbaubedürftig erscheinen. Die gegebenen Umstände verdeutlichen außerdem, daß erst die hohe Anzahl der verfügbaren Tumore (575) es ermöglichte, eine bedeutende Charakterisierung dieser Zellen vorzunehmen.

Die *in vitro* Eigenschaften der meisten gewonnenen Schwannzellen aus Neurofibromen, wie die Spindelform, die schwache Proliferation, die parallele Anordnung der Zellkörper und Fortsätze und die kurze Lebensdauer trotz ständiger mitogener Stimulation, entsprechen dem bereits bekannten charakteristischen Erscheinungsbild humaner Schwannzellen. Wie erwartet exprimierten diese Zellen den klassischen Schwanzzell-Marker S100 und die meisten ebenfalls den low-affinity- *p75*NGF-Rezeptor, der als Marker für nicht-myelinisierende Schwannzellen Anwendung findet. Da all diese Eigenschaften normalen wie neoplastischen Schwannzellen gemein sind, stehen sie wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der Pathogenese von Neurofibromen bzw. mit dem *NF1* Gen.

In KNF-Kulturen wurde gehäuft die Ausbildung von proliferativen Zell-Aggregaten beobachtet (Abb. 3.1.2). Hierbei scheint die ursprüngliche Schwanzzell-Dichte im Tumor eine wichtige Rolle zu spielen, da KNF in der Regel eine wesentlich geringere Tumorgroße als PNF verzeichnen (Abb. 1.1 und Tab. 1.3) und durch den kleineren Anteil an Bindegewebe eine höhere Zelldichte aufweisen. Zusätzlich spricht die Auflösung dieser Aggregate nach spätestens zweimaligem Passagieren dafür, daß sich die Klumpen nicht in Kultur zusammenfinden, sondern aus Tumorstücken bestehen, die sich bei der anfänglichen Zellisolierung nicht gänzlich aufgelöst haben. In diesem Fall wäre - im Gegensatz zur Behauptung von Muir et al., der die Entstehung solcher dichten Zellmassen durch eine fehlende Kontaktinhibition begründet - die Ausbildung von Zell-Aggregaten keine tumorigene Eigenschaft von Schwannzellen *in vitro*. Weiterhin stimmt diese Annahme mit dem Nachweis derselben Arbeitsgruppe überein, daß Schwannzellen aus Neurofibromen

keine Kolonien in Soft-Agar bilden. Von Schwannzellen aus gutartigen Neurofibromen sind solche tumorigenen Eigenschaften eigentlich auch nicht zu erwarten.

Desweiteren wurden Schwannzellen aus kutanen und plexiformen Neurofibromen ($NFI^{-/-}$) differenziert untersucht, wobei zusätzlich eine primäre humane Schwannzellen-Kultur aus einem gesunden Nerven (Wildtyp, $NFI^{+/+}$) als Kontrolle einbezogen wurde. Die neoplastischen Schwannzellen unterschieden sich von normalen Schwannzellen hinsichtlich der Zell-Anordnung im subkonfluenten Zustand, in dem $NFI^{-/-}$ Schwannzellen ein ungeordnetes, irreguläres Netzwerk formten (Abb. 3.1.8) - eine Beobachtung die während der Entstehung dieser Arbeit auch von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben wurde (Rosenbaum et al., 2000). Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig quantitative Unterschiede hinsichtlich der Proteinexpression des Neuregulin-Rezeptors ErbB3 zwischen neoplastischen und normalen Schwannzellen gefunden. Selbst wenn dies den neoplastischen Schwannzellen *in vitro* offensichtlich keinen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Schwannzellen beschafft, könnte die Hochregulierung dieses Wachstums-Rezeptors im Tumor eine große Rolle spielen.

Beim Vergleich von Schwannzellen aus PNF und KNF fiel auf, daß ausschließlich Schwannzellen aus PNF oftmals eine stark veränderte Morphologie aufwiesen, wie z.B. verbreiterte bzw. verdickte Zellkörper (Abb. 3.1.9). Dieses Ergebnis deutet erstmalig auf einen Unterschied zwischen KNF und PNF auf zellbiologischer Ebene hin. Möglicherweise spielen Adhäsions-Proteine hierbei eine Rolle, da z.B. Schwannzellen aus PNF im Gegensatz zu KNF bevorzugt auf Fibroblasten-Inseln wuchsen. Die schlechtere Haftung der PNF-Zellen auf dem Substrat Laminin könnte bedeuten, daß sie ein verändertes (oder fehlendes) Adhäsionsmolekül exprimieren, alternativ dazu könnten bestimmte Oberflächenmoleküle oder sezernierte Faktoren von Fibroblasten die Schwannzellen beeinflussen. In diesem Zusammenhang fiel weiterhin auf, daß das Zytoskelett von Schwannzellen aus PNF in manchen Fällen gegenüber der ursprünglichen Spindelform stark verändert war und der Zellkörper vollkommen ausgebreitet und flach erschien, wodurch die Zellen eine größere Verankerungsfläche auf dem Kulturboden nutzen. Dies kann infolge einer Störung der Zell-Gestalt, der Zell-Matrix und der Zell-Zell-Kommunikation oder von veränderten bzw. fehlenden Signal-Funktionen entstanden sein. Das Oligodendrozyten Myelin Glykoprotein (OMGP) könnte in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Dieses Glykoprotein kann während der Myelinisierung im ZNS nachgewiesen werden und übt wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit zu anderen Glykoproteinen wie N-CAM, LI und MAG wahrscheinlich eine Funktion als Adhäsionsmolekül aus (Mikol et al., 1990). Das OMGP-Gen

ist auf Intron 27b des *NF1* Gens lokalisiert und wird in umgekehrter Richtung zum *NF1* Gen transkribiert (Shen, 1996). Eventuell ist die *NF1*-Genregion um Intron 27 in PNF öfter von somatischen Mutationen betroffen als in KNF, wodurch die unterschiedlichen Adhäsions-Eigenschaften der Schwannzellen aus PNF erklärt werden könnten. Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen Neurofibromin und den Mikrotubuli des Zytoskeletts beschrieben (Bollag et al., 1993; Gregory et al., 1993) - das Fehlen von Wild-Typ Neurofibromin könnte somit ein Grund für das veränderte morphologische Erscheinungsbild sein, allerdings würde dies auch für Schwannzellen aus KNF zutreffen.

Eine ähnliche, abnormale Ausbreitung des Zytoskeletts wurde in Schwannzell-Kulturen aus Neurofibromatose Typ 2 Schwannomen (Akustikusneurinome) beobachtet (persönliche Daten nicht gezeigt). Bei der Entstehung solcher Schwannome spielt das defekte NF2-Genprodukt Merlin eine Rolle. Bisher ist bekannt, daß Merlin mit dem Aktin des Zytoskeletts interagiert und zu einer Familie von Adhäsionsmolekülen (ERM Proteine) homolog ist (Turunen et al., 1998). Möglicherweise sind bei der Entstehung von PNF ähnliche Mechanismen involviert.

Genetik

In dieser Arbeit wurden kutane und plexiforme Neurofibrome in Bezug auf somatische *NF1*-Allelverluste miteinander verglichen. Anhand der Mikrosatelliten-Analyse konnten in 20 % von 20 untersuchten KNF und in 33 % von 33 PNF ein LOH gefunden werden (Tab. 3.1.3). Es wurde bereits in früheren wie auch in dieser Arbeit, ein - nicht signifikanter - höherer Prozentsatz an LOH in PNF als in KNF beobachtet (Kluwe et al., 1999a; Rasmussen et al., 2000). Wenn man jedoch alle bisher veröffentlichten *NF1*-LOH-Daten zusammen berücksichtigt, ergibt das einen signifikanten Unterschied zwischen der Häufigkeit von *NF1*-LOH in kutanen und plexiformen Neurofibromen (Tab. 4.1). Dies ist der erste signifikante genetische Unterschied, der zwischen diesen beiden Tumortypen gefunden wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der komplette Verlust der zweiten *NF1* Kopie die Entstehung von PNF begünstigt, oder zusätzliche Faktoren bedingen den Verlust des zweiten *NF1*-Allels in der Tumorigenese von PNF. Andererseits kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß der LOH bei einigen KNF wegen einem hohen Anteil an nicht-Tumorzellen maskiert und daher unentdeckt blieb. So gesehen könnte auch der Entstehungszeitpunkt der somatischen Mutation, oder die Lage der betroffenen Subpopulation eine Rolle bei der Entwicklung in eine kutane bzw. plexiforme Neurofibrom-Variante spielen.

In rezenten Arbeiten fand man ähnliche somatische und Keimbahn-Mutations-Spektren in gutartigen Neurofibromen in Bezug auf den Mutationstyp, deren relative Frequenz und

Häufigkeit, und die vermeintlich unterliegenden Mechanismen der Mutagenese (Serra et al., 2001; Upadhyaya et al., 2004). Es gibt nach dem heutigen Stand der Forschung weder eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation zwischen der Keimbahn *NF1*-Mutation und dem Ausprägungsgrad der NF1-Krankheit (Kluwe et al., 2002), noch gibt es eine Korrelation zwischen der Art der somatischen Mutation und der Entwicklung zu entweder einem KNF oder einem PNF. Außerdem sind die somatischen Ereignisse in jedem Tumor unabhängig voneinander, wie am Beispiel von drei Patienten mit mehreren verschiedenen PNF und KNF, die in nur einem der Neurofibrome ein LOH aufwiesen, noch mal bestätigt wurde.

Tabelle 4.1 Eigene und bisher veröffentlichte Häufigkeiten von *NF1*-LOH in gutartigen und bösartigen *NF1*-assoziierten Tumoren.

<i>NF1</i> LOH	KNF			MPNST	Unterschied zwischen KNF und PNF	Unterschied zwischen gutartigen und bösartigen Tumoren
	KNF LOH/ Gesamt	und PNF LOH/ Gesamt	PNF LOH/ Gesamt			
Frahm	4/20		11/33	5/7	n.s.	p = 0.02
Rasmussen et al. (00)	2/15		4/10	3/5	n.s.	n.s.
Colman et al. (95)	8/22					
Serra et al. (97)	15/60					
Kluwe et al. (99)			8/14			
Upadhyaya et al. (04)		17/91		2/7		n.s.
Lothe et al. (95)				3/6		
Legius et al. (93)				1/1		
Glover et al. (91)				3/6		
Skuse et al. (89)				6/11		
Eisenbarth et al. (00)		2/7				
John et al. (00)		10/82				
Serra et al. (01)		32/116				
Gesamt	29/117		23/57	23/43	p = 0.03	
		113/470		23/43		p = 0.00002

Um der Frage nachzugehen, ob LOH das Wachstumsverhalten von Schwannzellen aus PNF *in vitro* beeinflusst, wurde der Zusammenhang der phänotypischen Eigenschaften dieser Schwannzellen und der Häufigkeit von Allelverlusten untersucht. Es stellte sich heraus, daß weder das Wachstum der Schwannzellen noch deren morphologisches Erscheinungsbild einen Zusammenhang zu dieser Form der somatischen Deletion aufwies. Dieses Ergebnis weist

darauf hin, daß offensichtlich noch andere, bisher unbekannte Faktoren neben dem Verlust der *NF1* Genexpression das *in vitro* Wachstum und die (veränderte) Morphologie von PNF im Gegensatz zu KNF bestimmen.

An zwei plexiformen und einem kutanen Neurofibrom mit LOH konnte ein vollständiger Allelverlust in den gewonnenen Schwannzellen, nicht aber in den Fibroblasten aus diesen Tumoren, nachgewiesen werden. Dies konnte bereits an kutanen Neurofibromen in früheren Arbeiten gezeigt werden, jedoch wurde hier die entscheidende Rolle von Schwannzellen bei der Entstehung von plexiformen Neurofibromen erstmals bestätigt. Außerdem weist dieses Ergebnis auf die Homogenität der getesteten Kultur hin. Rosenbaum et al. postulierte, daß zwei Schwanzzell-Subpopulationen aus *NF1*^{+/-} und *NF1*^{-/-} Zellen von Neurofibromen selektiv expandiert werden können, wobei die Zugabe von Forskolin ins Kulturmedium die Expansion von *NF1*^{+/-} Zellen fördern soll. Diese Erfahrung konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da alle Zellen unter Forskolin-haltigen Bedingungen in Kultur die somatische Deletion trugen und es sich deshalb in allen drei Fällen um eine reine *NF1*^{-/-} Population handelte. Eine Erklärung dafür wäre, daß die hier verwendeten Tumore zu wenig oder keine *NF1*^{+/-} Zellen enthielten.

4.2 Die Kultur von MPNST-Zellen

Zellbiologie

In dieser Arbeit wurden erstmalig die gewonnenen primären Zellen aus 5 MPNSTs anhand von LOH-Analyse der *NF1*, *p53* und *p16* Genregionen als neoplastische Zellen identifiziert. Im Gegensatz dazu wurden die zwei bisher in der Literatur erwähnten Zelllinien aus MPNSTs weder genetisch charakterisiert, noch wurde beschrieben wie und aus welchen Patienten sie erhalten wurden. Da es demnach keine bekannte Methode zur Kultivierung von primären MPNST-Zellen gab und diese malignen Tumore bei NF1-Patienten aus plexiformen Neurofibromen heraus entstehen, wurden die MPNSTs anfänglich nach der Methode zur Isolierung von Schwannzellen angesetzt, und dementsprechend unter Schwanzzell-Bedingungen kultiviert. Es stellte sich heraus, daß in den meisten Fällen keine Schwannzellen aus diesen Tumoren angewachsen sind, bzw. daß unter diesen Bedingungen nur nicht-neoplastische Zellen in der Kultur aufzufinden waren. Beim Wechsel zu standardisierten Kulturbedingungen konnten erstmals auch MPNST-Zellen angereichert werden, wie sich später durch die LOH-Analyse bestätigen ließ. Da sich die MPNST-Zellen morphologisch

voneinander und von den Schwannzellen unterschieden und ebenfalls nicht den S100-Marker exprimierten, blieb die genetische Verifizierung die einzige Möglichkeit zur Identifizierung der neoplastischen MPNST-Zellen. Neben der LOH-Analyse konnten die neoplastischen Zellen auch anhand der Karyotypisierung - wie an zwei Tumoren ohne LOH gezeigt wurde - über ihre abnormalen chromosomalen Veränderungen identifiziert werden.

Die gefundenen genetischen Alterationen in den Zellen sind mit Bestimmtheit nicht durch klonale Selektion in Kultur entstanden, da die Untersuchungen in frühen Passagen durchgeführt wurden. Die Malignität der erhaltenen Tumorzellen konnte anhand verschiedener Merkmale festgestellt werden: a) der Verlust von *p53* und *p16* Allelen wurde häufig in den MPNSTs aber nicht in den gutartigen Neurofibromen gefunden, b) abnormale Karyotypen wurden nur in MPNSTs und nicht in Neurofibromen nachgewiesen, c) die MPNST Zellen proliferierten im Vergleich zu Tumorzellen aus gutartigen Neurofibromen derselben Patienten doppelt bis dreifach so schnell.

In 4 weiteren MPNST-Kulturen konnte der LOH der originalen Tumore nicht in der DNA der daraus gewonnenen Zellen gefunden werden, womit deutlich wurde, daß es sich bei kultivierten Zellen aus MPNSTs nicht unbedingt um neoplastische Tumorzellen handelt. Dies kann durch die Heterogenität dieser Tumore erklärt werden, da entweder das Gewebestück, welches für die Kultur verwendet wurde, keine oder nur wenige vitale neoplastische Zellen enthielt, oder die angewendeten Kulturbedingungen favorisieren die Expansion von nicht-neoplastischen Zellen, wie Fibroblasten oder perineuriale Zellen. Hieraus wird deutlich, daß es sich bei den bisher beschriebenen MPNST-Zelllinien anderer Arbeitsgruppen, die keine genetische Verifizierung durchgeführt haben, nicht unbedingt um neoplastische MPNST-Zellen handeln muss.

Diese 4 Fälle demonstrieren klar den hohen Stellenwert der genetischen Verifizierung von primären MPNST Zellen in Kultur. Weiterhin ist es notwendig, die LOH-Analyse nach mehrmaligem Passagieren zu wiederholen, da a) die neoplastischen Zellen in manchen Fällen von nicht-Tumorzellen nachträglich noch überwuchert wurden, b) die Zellen nicht immortalisiert sind und zum Teil zusätzliche genetische Veränderung nach etwa 20 Passagen in Kultur entwickeln können und c) durch die häufige Zellteilung in Kultur auch einzelne Fälle von Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) beobachtet wurden.

Mikrosatelliten Instabilität und Klonalität

Genomische Instabilität kann auf chromosomalem wie auf dem Nukleotid-Level vorkommen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen MPNSTs von NF1 Patienten und MSI wurde in

einer neuen Studie erstmalig festgestellt (Upadhyaya et al., 2004). In dieser Arbeit konnte weder in Neurofibromen, noch in den MPNSTs eine MSI beobachtet werden, jedoch waren MPNST-Zellen in Kultur teilweise davon betroffen. Dies erscheint nicht ungewöhnlich zu sein, wenn man bedenkt, daß diese Zellen eine hohe genetische Instabilität aufweisen und sich in Kultur sehr häufig teilen. Da MSI jedoch nur selten in MPNSTs gefunden wurde (Luijten et al., 2000), trägt diese wahrscheinlich nicht zu der Tumorentstehung bei, sondern tritt als Folgeerscheinung der genetischen Instabilität dieser Tumore auf.

Weiterhin fiel auf, daß einer der drei *p16*-Mikrosatellitenmarker (D9S171), der den *CDKN2A*-Lokus flankiert, in manchen Fällen nur einen angedeuteten Allelverlust zeigte, während die beiden anderen nahegelegenen Marker einen vollständigen LOH aufwiesen und damit Störsignale von „kontaminierender“ DNA aus normalen Zellen ausschließen. Eine Erklärung hierfür wäre die Entwicklung zweier Subpopulation in dem MPNST, die eine trüge eine somatische Deletion auf der gesamten Chromosomenregion 9p21-23, während die andere Population nur den Bereich distal zum Marker D9S171 verloren hätte (der trotzdem das *CDKN2A*-Gen beinhalten könnte, siehe Abb. 3.2.3). Trifft diese Vermutung zu wäre gezeigt, daß ein MPNST nicht nur aus einem malignen Klon bestehen muß. Diese Annahme stimmt mit dem gefundenen Karyotyp aus einem MPNST überein, in dem drei verschiedene Zellklone nachgewiesen wurden.

MPNSTs zählen zu den klinisch aggressivsten Neoplasmen des Menschen und bisher gibt es keine effektiven Therapien (Ferner und Gutmann, 2002). Der Erhalt von genetisch verifizierten malignen Tumorzellen aus MPNSTs wurde erstmalig in dieser Arbeit beschrieben. Hierbei handelt es sich um die einzigen weltweit verfügbaren MPNST-Zellen, deren Neoplastizität nachgewiesen ist, und damit um eine wertvolle Bereicherung in der NF1-Forschung. Diese Zellen sind essentiell für die weitere biologische Charakterisierung sowie für die Aufklärung der Pathogenese dieser Malignität. Weiterhin stellen sie ein unverzichtbares Instrument für pharmakologische Studien dar, um neu entwickelte Substanzen auf ihre Eigenschaften und Wirkungen *in vitro* zu untersuchen.

4.3 Die maligne Transformation

Rolle des NF1-Gens in MPNSTs

Bei der Charakterisierung der NF1 Patienten mit MPNSTs wurde in 90 % der Fälle eine *NF1*-Keimbahn-Mutation bzw. Deletion gefunden. Das Vorkommen von Keimbahn-Deletionen des *NF1*-Gens liegt in der allgemeinen NF1-Population bei nur etwa 5 % (Kluwe et al., 2004), jedoch wurden bei den 10 MPNST-Patienten in dieser Arbeit drei solche Fälle aufgedeckt (30 %). Damit wird das kürzlich postulierte Ergebnis (aus einer Zusammenarbeit von einer belgischen und unserer Arbeitsgruppe) bestätigt, daß NF1-Patienten mit Deletionen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von MPNSTs aufweisen (DeRaedt et al., 2003). Demzufolge scheint ein Zusammenhang zwischen einer Keimbahn-*NF1*-Deletion und der Entwicklung von malignen Tumoren zu bestehen. Möglicherweise ist dies auf die größere Anzahl von Neurofibromen dieser Patienten zurückzuführen, denn wo viele Tumore sind, ergibt sich automatisch eine höhere Wahrscheinlichkeit für die maligne Transformation eines dieser Tumore. Eine weitere Erklärung wäre, daß eine Deletion das Eintreten des zweiten „Hits“ auf dem verbliebenen normalen Allel begünstigt, wodurch mehr Tumore entstehen; oder andere Gene, die das *NF1*-Gen flankieren und dadurch auch von der Deletion betroffen sind, agieren ebenfalls als Tumorsuppressorgene, womit deren Verlust die Entwicklung weiterer Neurofibrome und MPNSTs erleichtern würde (DeRaedt et al., 2003). Ebenso auffällig ist in diesem Zusammenhang die hohe *NF1*-LOH Häufigkeit der MPNSTs im Vergleich zu Neurofibromen; in 5 der 7 MPNSTs (an den drei Deletions-tragenden Patienten kann keine LOH-Analyse durchgeführt werden, da alle *NF1*-Mikrosatteliten-Marker bereits im Blut homozygot sind) wurde ein somatischer *NF1* Allelverlust gefunden (71 %). Der Unterschied der *NF1*-LOH-Häufigkeit zwischen MPNSTs und gutartigen Neurofibromen (KNF + PNF) ist signifikant, wie sich aus den hier gezeigten Daten oder auch unter Berücksichtigung aller bisher publizierten LOH Fälle in diesen Tumoren errechnen läßt (Tab.4.1). Dieser erstmals gezeigte signifikante Unterschied zwischen gutartigen und bösartigen NF1-Tumoren bezüglich der somatischen *NF1*-Deletion deutet - wie bereits eine Keimbahn-Deletion dieses Gens - erneut auf eine Mitwirkung von benachbarten Genen der *NF1*-Genregion, die von dem Allelverlust mitbetroffen sein könnten, bei der malignen Transformation hin. Andererseits können sporadische MPNSTs auch ohne den Verlust des *NF1* Gens entstehen, wie auch an einem Fall in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Eine biallelische Inaktivierung des *NF1*-Gens wurde bisher in nur einem MPNST beschrieben (Legius et al., 1993). In dieser Arbeit wurden 4 MPNSTs von Patienten mit identifizierter

Keimbahn-Mutation und gleichzeitigem LOH des *NF1*-Gens auf die entsprechende Keimbahn-Mutationen untersucht. In allen 4 Fällen konnte die Mutation homozygotisch in den MPNSTs nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, daß das intakte Allel das verlorene Allel ist. Eine solche biallelische Inaktivierung des *NF1*-Gens wurde bereits an gutartigen Neurofibromen in früheren Arbeiten nachgewiesen (Serra et al., 2001). Hier wird noch einmal die Tumorsuppressor-Theorie bestätigt, die besagt, daß eine Tumorentstehung durch den erfolgten zweiten „Hit“ bedingt wird.

Rolle der p53 und p16 Gene

Bisher ist bekannt, daß neben dem *NF1* Gen noch eine Vielzahl weiterer genetischer Änderungen eine entscheidende Rolle bei der malignen Transformation spielen (Lothe et al., 1996; Mechttersheimer et al., 1999; Schmidt et al., 1999, 2000; Frank et al., 2003). Dabei finden sich gehäuft heterozygotische und teilweise homozygotische Deletionen der Tumorsuppressorgene *TP53* (*p53*) und *CDKN2A* (*p16*) (Menon et al., 1990, Legius et al., 1994; Berner et al., 1999; Kourea et al., 1999; Nielson et al., 1999; Birindelli et al., 2001). Im Gegensatz zum *NF1*-Gen wurde in nur einem MPNST mit *p53* LOH auch eine *p53* Mutation gefunden. Dieses Ergebnis entspricht früheren Untersuchungen die belegen, daß biallelische Inaktivierungen des *p53*-Gens nur selten in MPNSTs auftreten (Rasmussen et al., 2000; Lothe et al., 2001), und *p53* Mutationen häufiger in sporadischen als in *NF1*-assoziierten MPNSTs vorkommen (Birindelli et al., 2001). Andere Studien haben wiederum eine relativ hohe *TP53* Mutations-Frequenz und einige Fälle von biallelischer Inaktivierung des *p53*-Gens aufgedeckt (Nigro et al., 1989; Menon et al., 1990, Legius et al., 1994; Castresana et al., 1995). Diese Ergebnisse zeigen trotz ihrer Seltenheit, daß das *p53*-Gen eine Rolle in der Entwicklung von zumindest denjenigen MPNSTs spielt, die diese Mutationen enthalten.

Interessanterweise zeigten 60 % der MPNSTs einen *p53* Allelverlust auf. Die hohe Anzahl von *p53* LOH könnte daher rühren, daß dieses Gen in der direkten „Nachbarschaft“ zum *NF1* Gen liegt, dessen Verlust möglicherweise bedeutet, daß auch anliegende Regionen zum *NF1* Gen oder sogar ein großer Teil des Chromosoms 17 von diesem Verlust betroffen sein kann. Andererseits wies keines der 15 untersuchten Neurofibrome mit *NF1* LOH ebenfalls einen *p53* Allelverlust auf, was wiederum die Mitwirkung dieses Gens im Malignisierungs-Prozeß bestärkt.

Eine Erklärung für die geringe Aufdeckungsrate von *p53* Mutationen wäre die Anwesenheit von normalen Zellen und/oder die klonale Heterogenität der Tumor-Gewebeproben. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß das zweite Allel ebenfalls eine große intragene

Deletion trägt, die weder über die direkte Sequenzierung des *p53* Gens noch mittels LOH-Analyse detektiert werden kann. Außerdem wurde in dieser Arbeit nur der Mutations-Hotspot (Exons 4-8) untersucht, daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß weitere Mutationen auf den verbleibenden 5 Exons (2,3,9-11) unentdeckt blieben.

In vier der zehn MPNSTs wurde ein bekannter Polymorphismus gefunden. Dieser Polymorphismus (Kodon 72: Arg>Pro) steht im Zusammenhang mit einer Tumor-Prädisposition in verschiedenen menschlichen Krebsarten (Birgander et al., 1996; Sjalander et al., 1996; Fan et al., 2000) und deren Prognose (Wang et al., 1999). Bisher gibt es keine Untersuchungen über einen möglichen Zusammenhang dieses Polymorphismus mit der Entstehung von MPNSTs.

Vor einigen Jahren wurde gleichzeitig in zwei Studien entdeckt, daß Mäuse mit Keimbahn-Mutationen auf dem *NF1* und dem *p53* Gen, MPNSTs entwickeln (Cichowski et al., 1999; Vogel et al., 1999). Dieses Maus-Modell unterstützt die Rolle des *TP53*-Gens in der malignen Transformation von PNF in MPNST. Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung des *p53*-Gens geben die oftmals gefundenen chromosomalen Anomalien in humanen MPNSTs: beim Übergang der G1- in die S-Phase findet die Duplikation der Zentromere statt - bei einer Abwesenheit von *p53* können multiple Zentromere innerhalb eines Zell-Zyklus hergestellt werden, was zu einer übermäßigen chromosomalen Segregation während der Mitose führt (Fukusawa et al., 1996). Die dadurch entstandene genetische Instabilität bedingt Änderungen in der Chromosomenzahl und Polyploidien, die oftmals in MPNSTs gefunden werden.

Die Einstellung der *p53* Aktivität kann auch über indirekte Mechanismen erfolgen, wie z.B. durch das Protein MDM2, welches die *p53* Funktion antagonisiert. Aus dem *CDKN2A*-Gen entstehen durch alternatives Spleißen des ersten Exons zwei Transkripte (Mao et al., 1995; Stone et al., 1995), die für zwei verschiedene Proteine kodieren, das *p16^{INK4A}* und das *p14^{ARF}* Protein (Maus-Homolog = *p19^{ARF}*). Das *p14^{ARF}* Protein blockiert die MDM2-vermittelte *p53* Degradation (Pomerantz et al., 1998; Zhang et al., 1998). Somit hemmt das *CDKN2A*-Gen nicht nur den Retinoblastom (RB1) -Signaltransduktionsweg (über das *p16*-Protein), sondern auch den *TP53* Suppressor-Transduktionsweg. Eine homozygotische Deletion des *CDKN2A*-Gens auf Chromosomenband 9p21 - und der daraus zu folgenden Inaktivierung seiner beiden Transkripte *p16^{INK4A}* und *p14^{ARF}* - wurde in 50 % der MPNSTs in früheren Studien gefunden (Nielson et al., 1999; Kourea et al., 1999). In dieser Arbeit konnte ein heterozygotischer Verlust dieses Gens in 60 % der MPNSTs nachgewiesen werden. Somit kann der Verlust des *CDKN2A*-Gens zur *p53*-Inaktivierung beitragen und möglicherweise den Verlust nur eines *p53*-Allels im negativen Sinne kompensieren. *CDKN2A* LOH wurde bisher nur in MPNSTs,

nicht aber in gutartigen Neurofibromen gefunden, wodurch dessen Rolle in der Malignisierung von PNF nochmals bestätigt wird (Legius et al., 1994; Berner et al., 1999; Kourea et al., 1999; Nielson et al., 1999; Birindelli et al., 2001). Ebenfalls waren die *p53* und *p16* Gene in dem sporadischen MPNST ausgeschaltet.

Am Beispiel eines NF1-Patienten (#5) mit verschiedenen Tumoren konnten genetische Unterschiede zwischen dessen gutartigen und bösartigen Tumoren gezeigt werden. Obwohl alle Zellen des Körpers dieses Patienten ursprünglich den gleichen Ausgangspunkt hatten (sie trugen eine Keimbahn-*NF1*-Frameshift-Mutation) entwickelten sich unterschiedliche Tumortypen an verschiedenen Stellen. Dabei hatten beide hier untersuchten Tumore - ein gutartiges Neurofibrom (WHO-Grad I) und ein MPNST (WHO Grad III) - ebenfalls die somatische Mutation gemeinsam, nämlich den kompletten Verlust des zweiten *NF1*-Allels (LOH). Höchstwahrscheinlich trugen zusätzliche genetische Veränderungen zu der Malignisierung des einen Tumors bei, unter anderem der nachgewiesene Verlust eines *p53* und eines *p16* Allels.

Manche der in dieser Arbeit untersuchten MPNSTs hatten bereits den WHO Grad IV erreicht, unterschieden sich aber nicht - bezüglich der drei getesteten Genregionen - von solchen mit einem WHO Grad III, da in beiden ähnliche Allelverluste zu finden waren. Bei der Entwicklung von sekundären Glioblastomen kann der Prozeß der Malignisierung stufenweise von einem Grad I-Astrozytom bis zum Grad IV Glioblastom verfolgt werden, die Ausschaltung bestimmter Gene erhöht schrittweise den Malignitätsgrad (Kleihues und Cavenee, 2000). Diese Beobachtung konnte bei der Entstehung von MPNSTs nicht gemacht werden, da hier viele genetische Änderungen zusammenwirken und auch chromosomale Anomalien dabei keine Seltenheit sind. Daraus wird deutlich, daß der Mehrstufenprozeß der malignen Transformation von PNF in MPNSTs Grad III und Grad IV noch durch weitere bisher unbekannte Faktoren verursacht wird, und daß die Heterogenität solcher Tumore wahrscheinlich auf der Entwicklung verschiedener Klone beruht. Außerdem entsprechen all diese Beobachtungen der allgemein akzeptierten Meinung, daß die Tumorigenese von MPNSTs ein komplexer „multistep“ Prozeß ist, an dem eine Vielfalt an unterschiedlichen Typen von genetischen Defekten auf verschiedenen Loci beiteiligt sind, wobei eine molekulare Alteration die andere bedingen kann.

Zellbiologie

Es ist anzunehmen, daß es sich bei dem ursprünglichen Zelltyp, aus dem sich maligne Klone entwickeln können, um Schwannzellen handelt, da diese die neoplastischen Zellen in

gutartigen plexiformen Neurofibromen sind, aus denen MPNSTs bei NF1-Patienten üblicherweise entstehen. Für diese Theorie sprechen auch *NF1* und *p53* defiziente Mäuse, die MPNSTs entwickeln, die aus S100-positiven Zellen, also aus Schwannzellen, bestehen (Vogel et al., 1999). In früheren pathologischen Studien sowie in dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, daß nur die Hälfte der MPNSTs S100-positiv ist oder S100-positive Komponenten hat (Weiss et al., 1983; Woodruff et al., 2000). Außerdem fanden Perry und Kollegen kürzlich somatische *NF1*-Deletionen auch in S100-negativen MPNST Zellen. In der vorliegenden Arbeit wuchsen die isolierten Zellen aus fast allen MPNSTs - auch solche mit S100-positiven Komponenten - nicht unter Schwannzell-Kulturbedingungen, sie wiesen keine Spindelform auf und sie waren S100-negativ. In einem einzigen Fall wuchsen Zellen aus einem MPNST unter Schwannzell-Bedingungen, woraus sich eine kleine S100-positive Subpopulation ergab, die wahrscheinlich aus der immunhistologisch nachgewiesenen Neurofibrom-Komponente innerhalb des MPNSTs stammen. Im Gegensatz dazu konnten aus drei der insgesamt fünf Neurofibrome der gleichen MPNST-Patienten spindelförmige Schwannzellen angereichert werden. Alle diese Ergebnisse sprechen für eine Entdifferenzierung von Schwannzellen während der malignen Transformation von MPNSTs.

Um dieser Behauptung weiter nachzugehen, wurde die Expression von Schwannzell-Differenzierungs-relevanten Genen in malignen und benignen Tumorzellen von NF1-Patienten proteinbiochemisch untersucht. Die meisten Schwannzellen aus kutanen und plexiformen Neurofibromen exprimieren verstärkt den Neuregulin-Rezeptor ErbB3, sowie den low-affinity-NGF-Rezeptor p75 (LNGFRp75) - einem charakteristischen Marker von nicht-myelinisierenden Schwannzellen. In MPNSTs konnte keiner dieser Rezeptoren nachgewiesen werden.

Die Differenzierung von Schwannzellen ist ein reversibler Prozeß, die Myelinisierung kann beispielsweise durch Zugabe einer cAMP-erhöhenden Substanz (Forskolin) in murinen sowie humanen Schwannzellen induziert werden (Zorick und Lemke, 1996; Monuki et al., 1990; Morgan et al., 1991). Während MPNSTs im nicht-stimulierten Zustand Krox20 nicht exprimieren, ein Protein welches nur in myelinisierenden Schwannzellen nachgewiesen werden kann, zeigen sowohl Schwannzellen aus Neurofibromen als auch MPNSTs nach 24stündiger Induktion durch Forskolin erhöhte Krox20-Level. Diese Induktion geschieht nicht in jedem beliebigen Zelltyp, wie am Beispiel von Fibroblasten eines MPNST-Patienten gezeigt wurde. Schwannzellen aus einem KNF wiesen wider erwarten bereits vor der Induktion des Myelinisierungs-Prozesses eine erhöhte Krox20 Konzentration auf,

möglicherweise weil dem normalen Schwannzell-Medium bereits geringe Mengen an Forskolin beigemischt sind. An diesem und an anderen KNF und PNF konnte übereinstimmend gezeigt werden, daß die Expression des Wachstums-Rezeptors ErbB3 und des LNGF-Rezeptors durch die Zugabe von Forskolin herunterreguliert wird, was ebenso in der Entwicklung von murinen Nerven während der Myelinisierung beobachtet wurde (Carroll et al., 1997, Lemke und Chao, 1988). All diese Ergebnisse geben weitere Hinweise darauf, daß MPNST-Zellen ursprünglich aus Schwannzellen stammen und während der Malignisierung einen Prozeß der Entdifferenzierung durchlaufen, in dem ihnen die klassischen Eigenschaften von Schwannzellen verloren gehen. Trotzdem kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß sich andere nicht-Schwannzellen, z.B. undifferenzierte Stammzell-ähnliche Vorgängerzellen aus PNF, in maligne Tumorzellen umgewandelt haben.

4.4 Medikamentöse Behandlung von MPNST-Zellen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Metaboliten des NSAID Sulindac, Sulindac Sulfid und Sulfon, die Proliferation von Tumorzellen aus MPNSTs von NF1-Patienten hemmen. Weiterhin gab es einen Zusammenhang zwischen der beobachteten Apoptose-Induktion und der Abnahme der Zell-Vitalität, wodurch gezeigt werden konnte, daß die Einleitung der Apoptose entscheidend zur Wachstums-Hemmung der Zellen beiträgt. Exisulind und Sulindac Sulfid inhibierten gänzlich das MPNST-Zellwachstum durch die Apoptose-Einleitung bei Konzentrationen von respektive 500 μM und 125 μM . Die ermittelten IC_{50} -Werte (Exisulind: 120 μM und Sulindac Sulfid: 63 μM) haben eine ähnliche Größenordnung wie die aus früheren Studien an anderen Krebszelllinien, die für Exisulind zwischen 90 μM und 500 μM und für Sulindac Sulfid zwischen 30 μM und 90 μM lagen (Piazza et al., 1995; Lim et al., 1999; Soriano et al., 1999). Diese Substanzen wirkten effektiv bei der Behandlung der Zellen in Serum-haltigem Medium (10 %), während unter Serum-freien Bedingungen die Einleitung der Apoptose noch schneller und die Wachstumshemmung noch vollständiger war (Daten nicht gezeigt).

In einer früheren Studie wurde gezeigt, daß Exisulind nur in Prostata-Krebszellen Apoptose einleitet, nicht aber in normalen epithelialen Prostata-Zellen (Lim et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden $\text{NFI}^{+/-}$ Fibroblasten von dem MPNST-Donor als Kontrolle

verwendet und das Wachstum dieser Zellen war nach der Exisulind Behandlung wesentlich geringfügiger inhibiert als das der MPNST Zellen (Daten nicht gezeigt). Da Exisulind eine Hemmung der Phosphodiesterase (PDE) in Tumorzellen bewirkt (Thompson et al., 2000; Soh et al., 2000), könnte dieser spezifische Effekt auf Tumor-Zellen durch eine Überexpression von cGMP-PDE in den meisten Neoplasien, im Gegensatz zu normalen Zellen, erklärt werden (Goluboff, 2001).

Gleiches gilt für die erhöhten RAS-GTP Level, die bereits in verschiedenen MPNSTs gefunden wurden (Basu et al., 1992; DeClue et al., 1992; Guha et al., 1996) und wahrscheinlich auf den Verlust der RAS-GAP Funktion von Neurofibromin zurückzuführen sind. In dieser Arbeit wurde die Menge an RAS-GTP und an phosphoryliertem ERK - einem „downstream“ gelegenen Effektor im Ras-Signaltransduktionsweg - merklich durch die Behandlung mit Exisulind oder Sulindac Sulfid reduziert, bei gleichbleibendem Level an basalem, unphosphoryliertem ERK. Hiermit wurde gezeigt, daß die hemmende Wirkung dieser Substanzen nicht auf zytotoxischen Effekten beruht, sondern spezifisch die Ras-ERK-Kaskade während der Wachstums-Hemmung beeinflusst. In Maus-MPNST-Zellen bewirkt die Stimulierung mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) eine Aktivierung von ERK bei gleichzeitiger Erhöhung der Proliferation (Li et al., 2002). Interessanterweise bewirkte die Zugabe von EGF zu den primären humanen MPNST Zellen keine Erhöhung an aktivem Ras, jedoch wurde die Phosphorylierung von ERK stark induziert. Eine Erklärung hierfür wäre, daß MPNST-Zellen bereits maximale Ras-GTP-Level exprimieren und daher keine weitere Steigerung mehr detektierbar ist. Es erscheint jedoch, daß die ERK Aktivierung durch EGF Stimulation unabhängig von Ras abläuft - im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität wurde eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg über eine cAMP-abhängige ProteinkinaseA beschrieben (Sweatt et al., 2001). Weiterhin wurden keine apoptotischen Effekte durch die Behandlung mit Sulindac Metaboliten auf die Ras-GTP und phospho-ERK Level in Anwesenheit von EGF festgestellt. Da die EGF-stimulierten Zellen trotzdem die Apoptose nach der Behandlung mit den Metaboliten einleiten, wird die beobachtete Reduktion der Zellzahl in diesem Fall anscheinend durch einen anderen als den Ras-Signaltransduktionsweg verursacht.

Die Einleitung der Apoptose ist offensichtlich eine der vorherrschenden Wirkungen der Sulindac Derivative auf MPNST Zellen, wobei AKT, ein aktiver Inhibitor von Apoptose, höchstwahrscheinlich nicht an diesem Effekt beteiligt ist, da seine phosphorylierte Form unter keiner Bedingung in den Zellen nachweisbar ist, außer im EGF-stimulierten Zustand (Abb. 3.4.6). Auf der anderen Seite wurde kürzlich gezeigt, daß der biologische

Aktionsmechanismus der Sulindac Metaboliten in humanen Darmkrebs-Zellen mit dem JNK-Signaltransduktionsweg zusammenhängt (Soh et al., 2000). In den MPNST Zellen begann die Aktivierung der phospho-JNK vor der Einleitung der Apoptose und erreichte ihren Höhepunkt nach 24 Stunden Behandlung, während die gemessene Apoptose-Rate nach 48 Stunden weiterhin anstieg. Dies deutet auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der JNK-Aktivierung und Apoptose hin. Da weiterhin keine Aktivierung der Kaspase-3 erfolgte, einem üblichen „downstream“ Regulator der JNK (Patel et al., 1996; Vivo et al., 2003), bedarf es einer weiteren Aufklärung, welche anderen Effektoren von JNK letztendlich die Apoptose einleiten.

Sulindac Sulfid und Sulfon unterscheiden sich in ihrer pharmakologischen Klassifizierung: ersteres ist ein NSAID und erniedrigt die Prostaglandin-Synthese über die Hemmung von COX-1 und -2, wohingegen der Sulfon Metabolit nicht wie ein NSAID agiert. Jedenfalls sind die Wirkungen beider Substanzen miteinander vergleichbar in Bezug auf die Wachstums-Hemmung, die Apoptose-Einleitung und den Einflüssen auf die Ras- und JNK-Signaltransduktionswege, wodurch die Vermutung nahe liegt, daß deren apoptotische Aktivität unabhängig von der COX-Hemmung stattfindet.

Die antineoplastische Wirkung der Sulindac Metaboliten trat etwas stärker bei der Sulfid-Komponente auf als bei Exisulind, wie auch bereits in früheren Studien gezeigt wurde (Piazza et al., 1995; Lim et al., 1999; Soriano et al., 1999). Jedoch kann die Langzeit-Einnahme von Sulindac Sulfid zu Irritationen des oberen gastrointestinalen Traktes durch die COX-Hemmung führen (Subbaramaiah et al., 1997). Dagegen wurde Exisulind von den meisten FAP-Patienten in einer Phase III- klinischen Studie gut vertragen und wird derzeit an Patienten mit Lungen-, Prostata-, Darm- und Brust-Krebs getestet (Goluboff, 2001). Außerdem wurden positive Ergebnisse mit Exisulind an *in vivo* Modellen verschiedener Krebsarten erzielt (Piazza et al., 1997; Thompson et al., 1997; Malkinson et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit bewirkte die tägliche Gabe von Exisulind an 6 Nacktmäusen mit subkutanen Tumoren aus humanen MPNST-Zellen, eine signifikante Abnahme der Tumorgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 9 Tagen, jedoch nicht ohne Nebenwirkungen wie Irritationen und Dehydrierung auszulösen. Diese rührten vermutlich von der hohen Dosierung her, deswegen sind weitere Experimente nötig, speziell eine größer angelegte *in vivo* Studie, um weitere Erkenntnisse über die Wirkungen und mögliche Nebenwirkungen dieser Substanzen zu erlangen. Bei diesem *in vivo* Modell, welches im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde, handelt es sich um das erste Tiermodell mit humanen MPNSTs das bis heute beschrieben wurde.

Zusammenfassend weist die hier beschriebene Wirkung beider Sulindac Metaboliten darauf hin, daß diese Substanzen effektiv das MPNST-Wachstum unter Anwendung nicht-toxischer Konzentrationen *in vitro* hemmen. Dieses vielversprechende Ergebnis eröffnet zum ersten Mal neue Perspektiven in der Behandlung von Patienten mit dieser Art von Malignität.

5 Zusammenfassung

NF1-Patienten werden durch gutartige und bösartige periphere Nervenscheiden Tumore gekennzeichnet. Bisher ist wenig bekannt über die zellbiologischen Eigenschaften von Schwannzellen aus Neurofibromen, dem einzigen neoplastischen Zelltyp in diesen Tumoren.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden in bisher größtem Umfang Schwannzellen in Kultur gewonnen und charakterisiert. Dabei konnten neben den bereits bekannten klassischen *in vitro* Eigenschaften dieser Zellen auch erstmalig morphologische Unterschiede zwischen Schwannzellen aus kutanen und plexiformen Neurofibromen beobachtet werden. Auffallend war, daß Schwannzellen aus plexiformen Neurofibromen eine veränderte Adhäsion im Zusammenhang mit einer Ausbreitung des Zytoskeletts aufzeigten.

Auf genetischer Ebene konnte eine höhere Anzahl von somatischen NF1-Allelverlusten in plexiformen als in kutanen Neurofibromen gefunden werden. Dagegen gab es keinen Zusammenhang zwischen den *NF1*-Allelverlusten und dem Wachstumsverhalten sowie den verschiedenen beobachteten Morphologie-Typen von Schwannzellen. Weiterhin wurde hier die entscheidende Rolle von Schwannzellen bei der Entstehung von plexiformen Neurofibromen durch den genetischen Nachweis einer somatischen Deletion nachgewiesen.

NF1-Patienten tragen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von MPNSTs. Bis heute sind keine MPNST-Zelllinien von klinisch und genetisch charakterisierten NF1-Patienten erhältlich. In dieser Arbeit wurden vier stabile MPNST-Zellkulturen etabliert und genetisch charakterisiert. Die LOH-Analyse verschiedener Tumorsuppressorgene ergab, daß nicht alle Zellen in Kulturen aus MPNSTs die gleichen somatischen Deletionen wie ihre Ursprungstumoren aufwiesen - womit gezeigt wäre, daß die hier erstmalig angewendete genetische Analyse effektiv und essentiell für die Verifizierung von primär kultivierten MPNST-Zellen ist.

Zellen aus den meisten MPNSTs zeigten nicht die typischen genetischen und phänotypischen Eigenschaften von $NF1^{-/-}$ Schwannzellen auf, obwohl bekannt ist, daß diese malignen Tumoren aus plexiformen Neurofibromen heraus entstehen. Jedoch konnte die Expression eines Gens, dessen Genprodukt während der Myelinisierung in Schwannzellen nachgewiesen wurde, in MPNST- wie in Schwannzellen induziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis darauf, daß MPNST-Zellen ursprünglich aus Schwannzellen stammen und während der Malignisierung einen Prozeß der Entdifferenzierung durchlaufen, in dem ihnen die klassischen Eigenschaften von Schwannzellen verloren gehen.

Weiterhin wurde die antineoplastische Wirkung der neuen chemopräventiven Substanzen Sulindac Sulfid und Sulindac Sulfon an zwei MPNST-Kulturen untersucht. Diese Wirkstoffe zeigten einen deutlichen Zeit- und Dosis-abhängigen, Wachstums-hemmenden Effekt der mit der Einleitung der Apoptose korrelierte. Dabei konnte eine Mitwirkung der Ras- und JNK-Signaltransduktionswege gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß diese Substanzen therapeutisch wertvoll für NF1-Patienten mit MPNSTs sein können.

Die hier erstmalig etablierten MPNST-Zellen stellen ein unverzichtbares Instrument für weitere Untersuchungen der Biologie und der Pathogenese dieser Neoplasie dar. Wenngleich zusätzliche pharmakologische Studien für die Entwicklung neuer Therapien erforderlich sind, könnten die benutzten Apoptose-einleitenden Substanzen für einen Heilversuch bereits genutzt werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AKN	Akustikusneurinom
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchonininsäure
bFGF	Basic Fibroblastic Growth Factor
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2' deoxyuridine
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclic Adenosin Monophosphat
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CDKN2A	<i>p16</i> Tumorsuppressorgen
cDNA	komplementäre Desoxiribonukleinsäure
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Zyccooxygenase
DHA	Docosahexaenoic Acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
dNTP	Deoxynukleotid Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinase 1 und 2
ERM	Ezrin Radixin Moesin
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm

GAP	GTPase Aktivierende Proteine
GDP	Guanosin-Diphosphat
GRD	Gap Related Domain
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
HBSS	Hanks Balanced Salts
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish-Peroxidase
IBMX	3-iso-Butyl-L-Methylxanthine
IC ₅₀ -Wert	Dosis einer Substanz bei der das Wachstum um die Hälfte reduziert wird
IgG	Immunglobuline
INK4	Inhibitoren von CDK4 und CDK6
JNK	C-Jun N-terminale Proteinkinase
kb	Kilo Basen
kDA	kilo Dalton
KNF	Kutanes Neurofibrom
Krox20	Zink-Finger Protein
LNGFR	Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor (p75NGFR)
LOH	Loss of Heterozygosity
MDM2	Mouse Double Minute2
MEKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGH	Massachusetts General Hospital
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPNST	Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
N-CAM	Neuronal Cell Adhesion Molecule
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NIH	National Institutes of Health
NSAID	Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug
OMGP	Oligodendrozyten Myelin Glykoprotein

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiesterase
PFGE	Pulsfeld Gelelektrophorese
PJ	Propidiumjodid
PKG	Proteinkinase G
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PNF	Plexiformes Neurofibrom
POD	Peroxidase
Ras	Rasheed sarcoma; p21 ^{ras} Onkoprotein
RB	Retinoblastom-Protein
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase
SCIP	suppressed cAMP-inducible POU
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-1-,2-diaminomethane
TP53 (<i>p53</i>)	Tumorsuppressor Protein 53
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyltransferase Nick End Labelling
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität
WHO	World Health Organisation
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

7 Literaturverzeichnis

1. **Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J, 1992.** Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature* 356: 713-715.
2. **Berner JM, Sorlie T, Mertens F, Henriksen J, Sater G, Mandahl N, Brogger A, Myklebost O, Lothe RA, 1999.** Chromosome band 9p21 is frequently altered in malignant peripheral nerve sheath tumors: Studies of CDKN2A and other genes of the pRB pathway. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 151-160.
3. **Birgander R, Sjalander A, Zhou Z, Fan C, Beckman L, Beckman G, 1996.** p53 polymorphisms and haplotypes in nasopharyngeal cancer. *Hum Hered* 46: 49-54.
4. **Birindelli S, Perrone F, Oggionni M, Lavarino C, Pasini B, Vergani B, Ranzani GN, Pierotti MA, Pilotti S, 2001.** Rb and TP53 pathway alterations in sporadic and NF1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. *Lab Invest* 81: 833-844.
5. **Bollag G, McCormick F, Clark R, 1993.** Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *EMBO J* 12: 1923-1927.
6. **Bunn PA Jr., Chan DC, Earle K, Zhao TL, Helfrich B, Kelly K, Piazza G, Whitehead CM, Pamukcu R, Thompson W, Alila H, 2002.** Preclinical and clinical studies of docetaxel and exisulind in the treatment of human lung cancer. *Semin Oncol* 29: 87-94.
7. **Carroll SL, Miller ML, Frohnert PW, Kim SS, Corbett JA, 1997.** Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J Neurosci* 17: 1642-1659.
8. **Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM, Viskochil D, Weiss RB, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland NG, White R, 1990.** Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EVI2 and mapping of other transcripts. *Genomics* 7: 555-565.
9. **Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T, 1999.** Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science* 286: 2172-2176.
10. **Cichowski K, Jacks T, 2001.** NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 104: 593-604.
11. **Chan DC, Earle KA, Zhao TL, Helfrich B, Zeng C, Baron A, Whitehead CM, Piazza G, Pamukcu R, Thompson WJ, Alila H, Nelson P, Bunn PA Jr. 2002.** Exisulind in combination with docetaxel inhibits growth and metastasis of human lung cancer and prolongs survival in athymic nude rats with orthotopic lung tumors. *Clin Cancer Res* 8: 904-912.

12. **Cnossen** MH, van der Est MN, Breuning MH, van Asperen CJ, Breslau-Siderius EJ, van der Ploeg AT, de Goede-Bolder A, van den Ouweland AM, Halley DJ, Niermeijer MF, **1997**. Deletions spanning the neurofibromatosis type 1 gene: implications for genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis type 1? *Hum Mutat* 9: 458-464.
13. **Colman** SD, Williams CA, Wallace MR, **1995**. Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of NF1 gene. *Nature Genet* 1: 90-92.
14. **Cooper** DN, Krawczak M, **1990**. The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Hum Genet* 85: 55-74.
15. **Däschner** K, Assum G, Eisenbarth I, Krone W, Hoffmeyer S, Wortmann S, Heymer B, Kehrer-Sawatzki H, **1997**. Clonal origin of tumor cells in a plexiform neurofibroma with LOH in NF1 intron 38 and in dermal neurofibromas without LOH of the NF1 gene. *Biochem. Biophys Res Commun* 234: 346-350.
16. **Daston** MM, Scrable H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N, **1992**. The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron* 8: 415-428.
17. **DeClue** JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR, **1992**. Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell* 69: 265-273.
18. **Eisenbarth** I, Beyer K, Krone W, Assum G, **2000**. Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 66: 393-401.
19. **Evans** DG, Baser ME, McGaughan J, Sharif S, Howard E, Moran A, **2002**. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 39: 311-314.
20. **Ewen** ME, Sluss HK, Whitehouse LL, Livingston DM, **1993**. TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 74: 1009-1020.
21. **Fahsold** R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Kucukceylan N, Abdel-Nour M, Gewies A, Peters H, Kaufmann D, Buske A, Tinschert S, Nurnberg P, **2000**. Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum Genet* 66: 790-818.
22. **Fan** R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, Christiani DC, **2000**. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 1037-1042.
23. **Ferner** RE, **1994**. Intellect in Neurofibromatosis 1. In: Huson SM, Hughes RAC, editors. *The Neurofibromatosis. A pathogenic and clinical overview*. London: Chapman and Hall.

24. **Ferner RE** und **Gutmann DH**, **2002**. International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. *Cancer Res* 62: 1573-1577.
25. **Fearon ER** und **Vogelstein B**, **1990**. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
26. **Frank D**, **Gunawan B**, **Holtrup M**, **Fuzesi L**, **2003**. Cytogenetic characterization of three malignant peripheral nerve sheath tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 144: 18-22.
27. **Fukasawa K**, **Choi T**, **Kuriyama R**, **Rulong S**, **Vande Woude GF**, **1996**. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271: 1744-1747.
28. **Gassmann M** and **Lemke G**, **1997**. Neuregulins and neuregulin receptors in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 7: 87-92.
29. **Giardiello FM**, **Hamilton SR**, **Krush AJ**, **Piantadosi S**, **Hylind LM**, **Celano P**, **Booker SV**, **Robinson CR**, **Offerhaus GJ**, **1993**. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 328: 1313-1316.
30. **Glover TW**, **Stein CK**, **Legius E**, **Andersen LB**, **Brereton A**, **Johnson S**, **1991**. Molecular and cytogenetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Genes Chromosomes Cancer* 3: 62-70.
31. **Goluboff ET**, **2001**. Exisulind, a selective apoptotic antineoplastic drug. *Expert Opin Investig Drugs* 10: 1875-1882.
32. **Gregory PE**, **Gutmann DH**, **Mitchell A**, **Park S**, **Boguski M**, **Jacks T**, **Wood DL**, **Jove R**, **Collins FS**, **1993**. Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associates with microtubules. *Somat Cell Mol Genet* 19: 265-274
33. **Guha A**, **Lau N**, **Huvar I**, **Gutmann D**, **Provias J**, **Pawson T**, **Boss G**, **1996**. Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors. *Oncogene* 12: 507-513.
34. **Gutmann DH**, **Wood DL**, **Collins FS**, **1991**. Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. *Proc Natl Acad Sci* 88: 9658-9662.
35. **Gutmann DH**, **Cole JL**, **Stone WJ**, **Ponder BAJ**, **Collins FS**, **1994**. Loss of neurofibromin in adrenal gland tumors from patients with neurofibromatosis type 1. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 55-58.
36. **Gutmann DH**, **Collins FS**, **1995**. Neurofibromatosis type 1. In: **Scriver CR**, **Beaudet AL**, **Sly WS**, **Valle D** (Eds.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, McGraw-Hill, New York, pp76-96.
37. **Gutmann DH**, **Aylsworth A**, **Carey JC**, **Korf B**, **Marks J**, **Pyeritz RE**, **Rubenstein A**, **Viskochil D**, **1997**. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 278: 51-57.
38. **Han EK**, **Arber N**, **Yamamoto H**, **Lim JT**, **Delohery T**, **Pamukcu R**, **Piazza GA**, **Xing WQ**, **Weinstein IB**, **1998**. Effects of sulindac and its metabolites on growth and

- apoptosis in human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 48: 195-203.
39. **Harlow E** and Lane D, **1999**. Using Antibodies: A Laboratory Manual. *CSHL Press*, Europe.
40. **Herrmann C**, Block C, Geisen C, Haas K, Weber C, Winde G, Moroy T, Müller O, **1998**. Sulindac sulfide inhibits Ras signaling. *Oncogene* 17: 1769-1776.
41. **Huson SM**, **1989**. Recent developments in the diagnosis and management of neurofibromatosis. *Arch Dis Child* 64: 745-749.
42. **Huson SM**, Hughes RAC, editors, **1994**. *The Neurofibromatosis. A pathogenic and clinical overview*. London: Chapman and Hall.
43. **John AM**, Ruggieri M, Ferner R, Upadhyaya M, **2000**. A search for evidence of somatic mutations in the NF1 gene. *J Med Genet* 37: 44-49.
44. **Kastan MB**, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW, **1991**. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-6311.
45. **Kayes LM**, Burke W, Riccardi VM, Bennett R, Ehrlich P, Rubenstein A, Stephens K, **1994**. Deletions spanning the neurofibromatosis 1 gene: identification and phenotype of five patients. *Am J Hum Genet* 54: 424-436.
46. **Kleihues P** and Cavenee WK, **2000**. Tumours of the nervous system. World Health Classification of Tumours *IARC Press, Lyon*.
47. **Kluwe L**, Friedrich RE, Mautner VF, **1999a**. Allelic loss of the *NF1* gene in NF1-associated plexiform neurofibromas. *Cancer Genet Cytogenet* 113: 65-69.
48. **Kluwe L**, Friedrich RE, Mautner VF, **1999b**. Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. *Genes Chromosom Cancer* 24,: 283-285.
49. **Kluwe L**, Friedrich RE, Korf B, Fahsold R, Mautner VF, **2002**. *NF1* mutations in neurofibromatosis 1 patients with plexiform neurofibromas. *Hum Mutat* 19: 309.
50. **Kluwe L**, Friedrich RE, Peiper M, Friedman J, Mautner VF, **2003**. Constitutional NF1 mutations in neurofibromatosis 1 patients with malignant peripheral nerve sheath tumors. *Hum Mutat* 22: 420.
51. **Kluwe L**, Siebert R, Gesk S, Friedrich RE, Tinschert S, Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF, **2004**. Screening 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the NF1 gene. *Hum Mutat* 23: 111-116.
52. **Knudson AG Jr.**, **1971**. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 820-823.

53. **Kourea** HP, Orlow I, Scheithauer BW, Cordon-Cardo C, Woodruff JM, **1999**. Deletions of the INK4A gene occur in malignant peripheral nerve sheath tumors but not in neurofibromas. *Am J Pathol* 55: 1855-1860.
54. **Legius** E, Marchuk DA, Collins FS, Glover TW, **1993**. Somatic deletion of neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumor suppressor gene hypothesis. *Nature Genet* 3: 122-126.
55. **Legius** E, Dierick H, Wu R, Hall BK, Marynen P, Cassiman JJ, Glover TW, **1994**. TP53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 250-255.
56. **Lemke** G, Chao M, **1988**. Axons regulate Schwann cell expression of the major myelin and NGF receptor genes. *Development* 102: 499-504.
57. **Lengauer** C, Kinzler KW, Vogelstein B, **1998**. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649.
58. **Leppig** KA, Kaplan P, Viskochil D, Weaver M, Ortenberg J, Stephens K, **1997**. Familial neurofibromatosis 1 microdeletions: cosegregation with distinct facial phenotype and early onset of cutaneous neurofibromata. *Am J Med Genet* 73: 197-204.
59. **Levi** AD, Bunge RP, Lofgren JA, Meima L, Hefti F, Nikolics K, Sliwkowski MX, **1995**. The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation. *J Neurosci* 15: 1329-1340.
60. **Li** H, Velasco-Miguel S, Vass WC, Parada LF, DeClue JE, **2002**. Epidermal growth factor receptor signaling pathways are associated with tumorigenesis in the NF1:p53 mouse tumor model. *Cancer Res* 62: 4507-4513.
61. **Lim** JT, Piazza GA, Han EK, Delohery TM, Li H, Finn TS, Buttyan R, Yamamoto H, Sperl GJ, Brendel K, Gross PH, Pamukcu R, Weinstein IB, **1999**. Sulindac derivatives inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 58: 1097-1107.
62. **Lopez-Correa** C, Brems H, Lázaro C, Estivill X, Clementi M, Mason S, Rutkowski JL, Marynen P, Legius E, **1999**. Molecular studies in 20 submicroscopic neurofibromatosis type 1 gene deletions. *Hum Mutat* 14: 387-393.
63. **Lothe** RA, Saeter G, Danielsen H, Stenwig AE, Hoyheim B, O'Connell B, Borresen AL, **1993**. Genetic alterations in a malignant schwannoma from a patient with neurofibromatosis (NF1). *Path Res Pract* 189: 465-471.
64. **Lothe** RA, Slettan A, Saeter G, Brogger A, Borresen AL, Nesland JM, **1995**. Alterations at chromosome 17 loci in peripheral nerve sheath tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 65-73.
65. **Lothe** RA, Karhu R, Mandahl N, Mertens F, Saeter G, Heim S, Borresen-Dale AL, Kallioniemi OP, **1996**. Gain of 17q24-qter detected by comparative genomic hybridization in malignant tumors from patients with von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Cancer Res* 56: 4778-4781.

66. **Luijten M**, Redeker S, van Noesel MM, Troost D, Westerveld A, Hulsebos TJ, **2000**. Microsatellite instability and promoter methylation as possible causes of NF1 gene inactivation in neurofibromas. *Eur J Hum Genet* 12: 939-945.
67. **Malkinson AM**, Koski KM, Dwyer-Nield LD, Rice PL, Rioux N, Castonguay A, Ahnen J, Thompson H, Pamukcu R, Piazza GA, **1998**. Inhibition of 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumor formation by FGN-1 (sulindac sulfone). *Carcinogenesis (Lond.)* 19: 1353-1356.
68. **Mao L**, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D, **1995**. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res* 55: 2995-2997.
69. **Martin GA**, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM, et al., **1990**. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 63: 843-849.
70. **Martinsson T**, Sjoberg RM, Hedborg F, Kogner P, **1997**. Homozygous deletion of the neurofibromatosis-1 gene in the tumor of a patient with neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 95: 183-189.
71. **Mashour GA**, Mashour SN, Frahm S, Farassati F, Martuza RL, Mautner VF, Kindler-Röhrborn A, Kurtz A: Differential Modulation of Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Growth by Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids. manuscript submitted **2003**.
72. **Mautner VF**, Kluwe L, Thakker SD, Lark RA, **2002**. Treatment of ADHD in neurofibromatosis type 1. *Dev Med Child Neurol* 44: 164-170.
73. **Mautner VF**, Friedrich RE, von Deimling A, Hagel C, Korf B, Knofel MT, Wenzel R, Funsterer C, **2003**. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis type 1: MRI supports the diagnosis of malignant plexiform neurofibroma. *Neuroradiology* 45: 618-625.
74. **Mechtersheimer G**, Otano-Joos M, Ohl S, Benner A, Lehnert T, Willeke F, Moller P, Otto HF, Lichter P, Joos S, **1999**. Analysis of chromosomal imbalances in sporadic and NF1-associated peripheral nerve sheath tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 362-369.
75. **Menon AG**, Anderson KM, Riccardi VM, Chung RY, Whaley JM, Ledbetter DH, Kleider A, Martuza R, Gusella JF, Seizinger BR, **1990**. Chromosome 17p deletions and p53 mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5435-5439.
76. **Messiaen LM**, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, Speleman F, Paepe AD, **2000**. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat* 15: 541-555.
77. **Metheny LJ**, Cappione AJ, Skuse GR, **1995**. Genetic and epigenetic mechanisms in the pathogenesis of neurofibromatosis type 1. *J Neurolpathol Exp Neurol* 54: 753-760.

78. **Mikol DD**, Alexakos MJ, Bayley CA, Lemons RS, Le Beau MM, Stefansson K, **1990**. Structure and chromosomal localization of the gene for the oligodendrocyte-myelin glycoprotein. *J Cell Biol* 111: 2673-2679.
79. **Morgan L**, Jessen KR, Mirsky R, **1991**. The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: progression from an early phenotype (04+) to a myelin phenotype (P0+, GFAP-, N-CAM-, NGF-receptor-) depends on growth inhibition. *J Cell Biol* 112: 457-467.
80. **Muir D**, Neubauer D, Lim IT, Yachnis AT, Wallace MR, **2001**. Tumorigenic properties of neurofibromin-deficient neurofibroma Schwann cells. *Am J Pathol* 158: 501-513.
81. **National Institutes of Health** Consensus Development Conference Statement Neurofibromatosis, **1988**. *Arch Neurol Chicago* 45: 575-578.
82. **Nielson GP**, Stemmer-Rachmaninov AO, Ino Y, Moller MB, Rosenberg AE, Louis DN, **1999**. Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation. *Am J Pathol* 155: 1879-1884.
83. **Nigro JM**, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al., **1989**. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708.
84. **Ottini L**, Esposito DL, Richetta A, Carlesimo M, Palmirotta R, Veri MC, Battista P, Frati L, Caramia FG, Calvieri S, et al., **1995**. Alterations of microsatellites in neurofibromas of von Recklinghausen's disease. *Cancer Res* 55: 5677-5680.
85. **Patel T**, Gores GJ, Kaufmann SH, **1996**. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 10: 587-597.
86. **Peltonen J**, Jaakola S, Lebowohl M, **1988**. Cellular differentiation and expression of matrix genes in type 1 neurofibromatosis. *Lab Invest* 59: 760-771.
87. **Perry A**, Roth KA, Banerjee R, Fuller CE, Gutmann DH, **2001**. NF1 deletions in S-100 protein-positive and negative cells of sporadic and neurofibromatosis 1 (NF1)-associated plexiform neurofibromas and malignant peripheral nerve sheath tumors. *Am J Pathol* 159: 57-61.
88. **Piazza GA**, Rahm AL, Krutzsch M, Sperl G, Paranka NS, Gross PH, Brendel K, Burt RW, Alberts DS, Pamukcu R, et al., **1995**. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 55: 3110-3116.
89. **Piazza GA**, Alberts DS, Hixson LJ, Paranka NS, Li H, Finn T, Bogert C, Guillen JM, Brendel K, Gross PH, Sperl G, Ritchie J, Burt RW, Ellsworth L, Ahnen DJ, Pamukcu R, **1997a**. Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels. *Cancer Res* 57: 2909-2915.
90. **Piazza GA**, Rahm AK, Finn TS, Fryer BH, Li H, Stoumen AL, Pamukcu R, Ahnen DJ, **1997b**. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of

- sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res* 57: 2452-2459.
91. **Pomerantz J**, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA, **1998**. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92: 713-723.
 92. **Poyhonen M**, Kytola S, Leisti J, **2000**. Epidemiology of neurofibromatosis type 1 (NF1) in northern Finland. *J Med Genet* 37: 632-636.
 93. **Purandare SM**, Huntsman Breidenbach H, Li Y, Zhu XL, Sawada S, Neil SM, Brothman A, White R, Cawthon R, Viskochil D, **1995**. Identification of neurofibromatosis 1 (NF1) homologous loci by direct sequencing, fluorescence in situ hybridization, and PCR amplification of somatic cell hybrids. *Genomics* 30: 476-485.
 94. **Rasmussen SA**, Friedman JM, **2000a**. NF1 gene and neurofibromatosis 1. *Am J Epidemiol* 151: 33-40.
 95. **Rasmussen SA**, Overman J, Thomson SAM, Colman SD, Abernathy CR, Trimpert RE, Moose R, Virdi G, Roux K, Bauer M, Rojiani AM, Maria BL, Muir D, Wallace MR, **2000b**. Chromosome 17 loss-of-heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1. *Genes Chromosomes Cancer* 28: 425-431.
 96. **Rasmussen SA**, Yang Q, Friedman JM, **2001**. Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. *Am J Hum Genet* 68: 1110-1118.
 97. **Regnier V**, Meddeb M, Lecointre G, Richard F, Duverger A, Nguyen VC, Dutrillaux B, Bernheim A, Danglot G, **1997**. Emergence and scattering of multiple neurofibromatosis (NF1)-related sequences during hominoid evolution suggest a process of pericentromeric interchromosomal transposition. *Hum Mol Genet* 6: 9-16.
 98. **Riccardi VM**, **1992**. Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History and Pathogenesis, 2nd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MA.
 99. **Rice PL**, Goldberg RJ, Ray EC, Driggers LJ, Ahnen DJ, **2001**. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation and induction of apoptosis by sulindac metabolites. *Cancer Res* 61: 1541-1547.
 100. **Rutkowski JL**, Tennekoon GI, McGillicuddy JE, **1992**. Selective culture of mitotically active human Schwann cells in vitro. *Nature Med* 1: 80-83.
 101. **Rutkowski JL**, Kirk CJ, Lerner MA, Tennekoon GI, **1995**. Purification and expansion of human Schwann cells in vitro. *Nat Med* 1: 80-83.
 102. **Rutkowski JL**, Wu K, Gutmann DH, Boyer PJ, Legius E, **2000**. Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 9: 1059-1066.

103. **Sawada S**, Florell S, Purandare SM, Ota M, Stephens K, Viskochil D, **1996**. Identification of NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofibroma. *Nature Genet* 14: 110-112.
104. **Scheithauer BW**, Woodruff JM, Erlandson RA, **1999**. Neurofibroma. Tumors of the peripheral nervous system. In: Atlas of Tumor Pathology, third series, fascicle 24, Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, pp 177-218.
105. **Schmidt H**, Wurl P, Taubert H, Meye A, Bache M, Holzhausen HJ, Hinze R, **1999**. Genomic imbalances of 7p and 17q in malignant peripheral nerve sheath tumors are clinically relevant. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 205-211.
106. **Schmidt H**, Taubert H, Meye A, Wurl P, Bache M, Bartel F, Holzhausen HJ, Hinze R, **2000**. Gains in chromosomes 7, 8q, 15q and 17q are characteristic changes in malignant but not in benign peripheral nerve sheath tumors from patients with Recklinghausen's disease. *Cancer Lett* 155: 181-190.
107. **Serra E**, Puig S, Otero D, Gaona A, Kruyer H, Ars E, Estivill X, Lazaro C, **1997**. Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas. *Am J Hum Genet* 61: 512-519.
108. **Serra E**, Rosenbaum T, Winner U, Aledo R, Ars E, Estivill X, Lenard HG, Lazaro C **2000**. Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations. *Hum Mol Genet* 20: 3055-3064.
109. **Serra E**, Ars E, Ravella A, Sánchez A, Puig S, Rosenbaum T, Estivill X, Lázaro C, **2001**. Somatic NF1 mutational spectrum in benign neurofibromas: mRNA splice defects are common among point mutations. *Hum Genet* 108: 416-429.
110. **Serrano M**, Hannon GJ, Beach D, **1993**. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707.
111. **Shannon KM**, O'Connell P, Martin GA, Paderanga D, Olson K, Dinndorf P, McCormick F, **1994**. Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med* 330: 597-601.
112. **Shen MH**, Harper PS, Upadhyaya M, **1996**. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet* 33: 2-17.
113. **Sherman LS**, Atit R, Rosenbaum T, Cox AD, Ratner N, **2000**. Single cell Ras-GTP analysis reveals altered Ras activity in a subpopulation of neurofibroma Schwann cells but not fibroblasts. *J Biol Chem* 275: 30740-30745.
114. **Sherr CJ**, **1996**. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677.
115. **Side L**, Taylor B, Cayouette M, Conner E, Thompson P, Luce M, Shannon K, **1997**. Homozygous inactivation of NF1 in bone marrow cells from children with neurofibromatosis type 1 and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med* 336: 1713-1720.

116. **Sjalander** A, Birgander R, Hallmans G, Cajander S, Lenner P, Athlin L, Beckman G, Beckman L, **1996**. p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis* 17: 1313-1316.
117. **Skuse** GR, Kosciolk BA, Rowley PT, **1989**. Molecular genetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Genes Chromosomes Cancer* 1: 36-41.
118. **Skuse** GR, Cappione AJ, **1997**. RNA processing and clinical variability in neurofibromatosis type I (NF1). *Hum Mol Genet* 6: 1707-1712.
119. **Soh** JW, Mao Y, Kim MG, Pamukcu R, Li H, Piazza GA, Thompson WJ, Weinstein IB, **2000**. Cyclic GMP mediates apoptosis induced by sulindac derivatives via activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1. *Clin Cancer Res* 6: 4136-4141.
120. **Soh** JW, Mao Y, Liu L, Thompson WJ, Pamukcu R, Weinstein IB, **2001**. Protein kinase G activates the JNK1 pathway via phosphorylation of MEKK1. *J Biol Chem* 276: 16406-16410.
121. **Soriano** AF, Helfrich B, Chan DC, Heasley LE, Bunn PA Jr., Chou TC, **1999**. Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 59: 6178-6184.
122. **Stone** S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A, **1995**. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res* 55: 2988-2994.
123. **Subbaramaiah** K, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ, **1997**. Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 201-210.
124. **Sweatt** JD, **2001**. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76: 1-10.
125. **Thompson** HJ, Jiang C, Lu J, Mehta RG, Piazza GA, Paranka NS, Pamukcu R, Ahnen DJ, **1997**. Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 57: 267-271.
126. **Thompson** WJ, Piazza GA, Li H, Liu L, Fetter J, Zhu B, Sperl G, Ahnen D, Pamukcu R, **2000**. Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin. *Cancer Res* 60: 3338-3342.
127. **Thomson** SA, Fishbein L, Wallace MR, **2002**. NF1 mutations and molecular testing. *J Child Neurol* 17: 555-561.
128. **Tlsty**, **1997**, in *Kastan: Genetic Instability and Tumorigenesis*, pp 37-46, Springer, Heidelberg.
129. **Tonsgard** JH, Yelavarthi KK, Cushner S, Short MP, Lindgren V, **1997**. Do NF1 gene deletions result in a characteristic phenotype? *Am J Med Genet* 73: 80-86.

130. **Topilko P**, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P, **1994**. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371: 796-799.
131. **Topsakal C**, Akdemir I, Tiftikci M, Ozercan I, Aydin Y, **2001**. Malignant schwannoma of the sciatic nerve originating in a spinal plexiform neurofibroma associated with neurofibromatosis type 1—case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 41: 551-555.
132. **Turunen O**, Sainio M, Jaaskelainen J, Carpen O, Vaheri A, **1998**. Structure-function relationships in the ezrin family and the effect of tumor-associated point mutations in neurofibromatosis 2 protein. *Biochim Biophys Acta* 1387: 1-16.
133. **Upadhyaya M**, Han S, Consoli C, Majounie E, Horan M, Thomas NS, Potts C, Griffiths S, Ruggieri M, von Deimling A, Cooper DN, **2004**. Characterization of the somatic mutational spectrum of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in neurofibromatosis patients with benign and malignant tumors. *Hum Mutat* 23: 134-146.
134. **Van Stolk R**, Stoner G, Hayton WL, Chan K, DeYoung B, Kresty L, Kemmenoe BH, Elson P, Rybicki L, Church J, Provencher K, McLain D, Hawk E, Fryer B, Kelloff G, Ganapathi R, Budd GT, **2000**. Phase I trial of exisulind (sulindac sulfone, FGN-1) as a chemopreventive agent in patients with familial adenomatous polyposis. *Clin Cancer Res* 6: 78-89.
135. **Viskochil D**, Buchberg AM, Xu G, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA, White R, O'Connell P, **1990**. Deletions and translocations interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 62: 187-192.
136. **Viskochil D**, **1999**. Neurofibromatosis 1. Introduction. *Am J Med Genet* 89: v-viii.
137. **Vivo C**, Liu W, **2003**. Broaddus VC c-Jun N-terminal kinase contributes to apoptotic synergy induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand plus DNA damage in chemoresistant, p53 inactive mesothelioma cells. *J Biol Chem* 278: 25461-25467.
138. **Vogel K**, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, Meyers K, Rushing EJ, Parada LF, **1999**. Mouse Tumor Model for Neurofibromatosis Type 1. *Science* 286: 2176-2179.
139. **Wallace MR**, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Oden HM, Saulino HM, Fountain JW, Brereton AM, Nicholson J, Mitchell AL, Brownstein BH, Collins FS, **1990**. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249: 181-186.
140. **Wallace MR**, Rasmussen SA, Lim IT, Bray BA, Zori RT, Muir D, **2000**. Culture of cytogenetically abnormal Schwann cells from benign and malignant NF1 tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 27: 117-123.
141. **Wang YC**, Lee HS, Chen SK, Chang YY, Chen CY, **1999**. Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism in lung carcinomas. *Eur J Cancer* 35: 226-230.

142. **Weiss SW, Langloss JM, Enzinger FM, 1983.** Value of S-100 protein in the diagnosis of soft tissue tumors with particular reference to benign and malignant Schwann cell tumors. *Lab Invest* 49: 299-308.
143. **Woodruff JM, Kourea HP, Louis DN, Scheithauer BW, 2000.** Malignant peripheral nerve sheath tumour. In: Kleihues, P., Cavanee, W.K. (Eds.), WHO Classification: Tumours of the nervous system, IARC Press, Lyon, pp. 172-174.
144. **Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M, 1991.** Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352: 345-347.
145. **Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG, 1998.** ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92 : 725-734.
146. **Zorick TS and Lemke G, 1996.** Schwann cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 8: 870-876.
147. **Zorick TS, Syroid DE, Arroyo E, Scherer SS, Lemke G, 1996.** The Transcription Factors SCIP and Krox-20 Mark Distinct Stages and Cell Fates in Schwann Cell Differentiation. *Mol Cell Neurosci* 8: 129-145.

Schriftenverzeichnis

De Raedt T, Brems H, Wolkenstein P, Vidaud D, Pilotti S, Perrone F, Mautner V, **Frahm S**, Sciot R, Legius E (2003). Elevated risk for MPNST in NF1 microdeletion patients. *Am J Hum Genet* 72: 1288-1292.

Frahm S, Mautner VF, Brems H, Legius E, Debiec-Rychter M, Friedrich RE, Knofel WT, Peiper M, Kluwe L (2004). Genetic and Phenotypic Characterization of Tumor Cells Derived from Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors of Neurofibromatosis 1 Patients. *Neurobiology of Disease* 16: 85-91.

Frahm S, Kurtz A, Kluwe L, Farassati F, Friedrich RE, Mautner VF (2004). Sulindac Derivatives Inhibit Cell Growth and Induce Apoptosis in Primary Cells from Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors of NF1-Patients. *Cancer Cell International* 4: 4.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in den Laboren der Neurochirurgischen Klinik und der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie am Universitätskrankenhaus Eppendorf angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt:

... Lan Kluwe und Victor-Felix Mautner, die das Entstehen dieser Arbeit nicht nur finanziell möglich gemacht haben. Von sehr hoher Bedeutung war für mich, daß sie es mir ermöglicht haben, in Boston bei einem Forschungs-Institut der Harvard-Medical-School für einige Monate im Rahmen dieser Dissertation zu arbeiten. Die dort gewonnenen Erfahrungen waren richtungsweisend für meine berufliche Zukunft.

... Andreas Kurtz, der mich im Labor in Boston betreut und unterstützt hat.

... Faris Farassati, der mir beigebracht hat, daß Forschung auch Spaß machen kann.

... Katrin Lamszus und Manfred Westphal, für die Gastfreundschaft im Labor für Hirntumorbiologie.

... Kim, die den Spaßfaktor im Labor um einige Potenzen erhöht hat.

... Jessica, die immer mit einem Lächeln meine „Aufträge“ entgegennahm und durchführte.

... Svenja und Hildegard, für das Beibringen diverser zellbiologischer Methoden und sonstiger hilfreicher Kniffe.

... Dorothea, für die qualifizierten Kommentare und Gespräche.

... Regina, für das kleine Glück zwischendurch in Form von Schokolade und anderen Leckereien.

... meinen Eltern, für die moralische Unterstützung.