

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung zur Expression des zellulären Retinsäure-
bindenden Proteins 2 (CRABP2) und zur Wirkung von all-
trans-Retinsäure (ATRA) in Neurofibromatose Typ 1-
assoziierten Nervenscheidentumoren**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Anna Dombrowski
aus Komsomolskoe / Kasachstan

Datum der Promotion: 09.09.2016

Inhaltverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Das Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ1.....	1
1.2	Die Pathogenese der Neurofibromatose Typ1.....	2
1.2.1	Das <i>NF1</i> -Gen	2
1.2.2	Neurofibromin.....	3
1.3	Benigne und maligne periphere Nervenscheidentumoren.....	4
1.3.1	Klassifikation.....	4
1.3.2	Genetische Grundlagen.....	5
1.3.3	Histologische Merkmale von NF1-assoziierten Nervenscheidentumoren.....	6
1.3.4	Differenzierung von Schwannzellen.....	6
1.3.5	Kultivierung von Schwannzellen.....	8
1.3.6	Die Therapie von NF1- assoziierten Tumoren.....	9
1.4	All- <i>trans</i> -Retinsäure (ATRA).....	9
1.4.1	Metabolismus und Wirkung von ATRA.....	9
1.4.2	CRABP2 und Neurofibrome.....	11
1.4.3	Retinsäure und Neurofibromin.....	13
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	13

2 Materialien und Methoden

2.1	Chemikalien, Lösungen und Medien.....	15
2.2	Kits.....	15
2.3	Geräte, Labormaterialien.....	16
2.4	Untersuchungsmaterial.....	16
2.4.1	Gewebeschnitte.....	16
2.4.2	Zellkultur.....	17
2.5	Zellkultur.....	17
2.5.1	Medien.....	17
2.5.2	Beschichtung der Kulturflaschen.....	17

2.5.3 Kultivierung von primären Schwanzzellen, Fibroblasten und MPNST-Zellen.....	18
2.5.4 Trypsinierung und Anreicherung von Schwanzzellen.....	18
2.5.5 Zellzahlbestimmung.....	19
2.5.6 Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	19
2.6 Behandlung mit ATRA.....	19
2.6.1 Zubereitung der Lösungen und Arbeiten mit ATRA.....	19
2.6.2 Behandlungskonditionen.....	20
2.7 Immunhistochemie.....	20
2.7.1 Verwendete Antikörper.....	20
2.7.2 Prinzip der Fluoreszenzfärbungen.....	22
2.7.3 Doppelmarkierung auf Gewebeschnitten (gegen S100- bzw. CD90 und CRABP2).....	22
2.7.4 Einfache Fluoreszenzfärbungen in den Zellkulturen.....	23
2.7.5 Mikroskopie.....	23
2.8 Messung der metabolischen Aktivität und Proliferation der Zellen.....	24
2.8.1 Zellpräparation und Zellbehandlung.....	24
2.8.2 XTT Proliferation Assay.....	24
2.8.3 BrdU Cell Proliferation Assay.....	25
2.9 Messung von programmiertem Zelltod und Zelldifferenzierung.....	25
2.9.1 Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie (FACS).....	25
2.9.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension.....	26
2.9.3 ApoBrdU TUNEL Assay.....	26
2.9.4 Immunzytochemische Markierungen.....	27
2.9.5 Messungen und Analyse der markierten Proben.....	27
2.10 Messung der CRABP2-Expression unter ATRA-Behandlung.....	28
2.10.1 Quantitative real-time-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR).....	28
2.10.2 RNA-Isolierung mit Trizol Reagent.....	29
2.10.3 Quantitative real-time-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) mittels TaqMan- Methode.....	30
2.11 Statistische Auswertung.....	31

3	<u>Ergebnisse</u>	
3.1	Expression von CRABP2 in NF1-assoziierten Neurofibromen.....	32
3.2	Kultivierung von Tumor-Schwanzzellen.....	37
3.3	Antiproliferative Eigenschaften von ATRA.....	37
3.4	Morphologische Zellveränderungen unter ATRA-Behandlung.....	40
3.5	Induktion von Apoptose in Tumor-Schwanzzellen durch ATRA.....	42
3.6	Differenzierende Wirkung von ATRA auf Schwanzzellen.....	46
3.7	Veränderung der CRABP2-Expression unter ATRA-Behandlung.....	48
4	<u>Diskussion</u>	
4.1	CRABP2-Expression in NF1-assoziierten Neurofibromen.....	50
4.2	CRABP2 als Vermittler der antiproliferativen Wirkung von ATRA.....	51
4.3	ATRA als potenzielles Therapeutikum für NF1-assoziierte Nervenscheidentumoren.....	53
4.3.1	Apoptose unter ATRA-Behandlung.....	53
4.3.2	Zelldifferenzierung unter ATRA-Behandlung.....	54
4.3.3	Ausblick.....	54
5	<u>Zusammenfassung</u>	56
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	57
7	<u>Eidesstattliche Versicherung</u>	67
8	<u>Lebenslauf</u>	71
9	<u>Danksagung</u>	73

Abkürzungsverzeichnis

kb	Kilobasen
bp	Basenpare
Da	Dalton
MAPK	<i>engl.</i> mitogen-activated protein kinase
CDK	<i>engl.</i> cyclin depended kinase (cyclin-anhängigen Kinase)
EVI	<i>engl.</i> ecotropic viral integration
OMPG	Oligodendrozytenmyelin-Glykoprotein
GRD	<i>engl.</i> GAP related domane
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GTP	Guanosin-Triphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
μ	mikro
ATRA	<i>engl.</i> all- <i>trans</i> retinoic acid (all- <i>trans</i> -Retinsäure)
bcl2	<i>engl.</i> B-cell lymphoma 2 (B-Zelllymphoma 2)
BrdU	Bromdesoxyuridin
CD	<i>engl.</i> Cluster of Differentiation (Differenzierungsgruppe)
CRABP2	<i>engl.</i> cellular retinoic acid binding protein (zelluläres Retinsäure bindendes Protein)
DAPI	4, 6-Diamino-2-phenylindol
DMEM	<i>engl.</i> Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>engl.</i> Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>engl.</i> Fluorescence-activated Cell Sorting (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)
FBS	<i>engl.</i> fetal bovine serum (Fetales Kälberserum)
FSC	<i>engl.</i> forward scatter (Vorwärtsstreuung)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
HSC	humane Schwannzellen
IBMX	3-iso-Butyl-L-Methylxanthin
l	Liter
M	Molar
min	Minuten
m	Milli
mm	Millimeter
MPNST	maligne periphere Nervenscheidentumore
NF1	Neurofibromin (NF1-Genprodukt)
NFI	Neurofibromatose Typ 1
PML	Promyelozytische Leukämie
PMP22	peripheres Myeloprotein 22

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>engl.</i> revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SSC	<i>engl.</i> sideward scatter (Seitwärtsstreuung)
SEM	<i>engl.</i> Standard Error of the Mean,
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TUNEL	<i>engl.</i> TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UKE	Universitätsklinikum Eppendorff Hamburg
XTT	2, 3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz

Abstrakt

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) gehört zu den häufigsten, genetisch bedingten Erkrankungen und ist mit der Manifestation von multiplen Nervenscheidentumoren, typischerweise kutanen und plexiformen Neurofibromen, verbunden. Die bei ca. 30% der Patienten vorkommenden, plexiformen Neurofibrome sind durch ein infiltratives Wachstum mit Nervenzerstörung gekennzeichnet, wodurch es zu schwerwiegenden neurologischen u.a. Defiziten kommen kann, des Weiteren können sie zu malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST) entarten. Es existiert zum heutigen Zeitpunkt keine systemische Therapie für plexiforme Neurofibrome. Unter aktuellen chemotherapeutischen Ansätzen zeigen die MPNST eine hohe Rezidivrate.

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe konnte eine niedrigere Expression des Retinsäure transportierenden Proteins CRABP2 (cellular retinoic acid binding protein 2) in plexiformen Neurofibromen im Vergleich zu kutanen Neurofibromen nachweisen werden. CRABP2 ist als Transporter und Mediator für Retinsäure bekannt. Retinsäure ist ein essentieller Regulator der Embryonalentwicklung und der neuronalen Differenzierung und hat antikanzerogene Eigenschaften.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Zellen benigner, NF1-assoziiierter Nervenscheidentumoren, die eine Expression von CRABP2 aufweisen, immunzytochemisch zu identifizieren. Weiterhin sollte in einem Zellkulturmodell die Wirkung von Retinsäure auf das Wachstum von Nervenscheidentumoren, insbesondere von plexiformen Neurofibromen und MPNST, in funktionellen Assays untersucht werden. Die molekularen Zusammenhänge von Retinsäure-Metabolismus und Expression von CRABP2 sollten dabei demonstriert werden. Ziel des Vorhabens war es, Retinsäure als potentiell Therapeutikum für NF1-assoziierte Nervenscheidentumore zu testen.

Im Rahmen dieser experimentellen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass eine *in-vitro*-Behandlung von primären Tumor-Schwanzzellen aus NF1-assoziierten Neurofibromen sowie von humanen MPNST-Zelllinien mit *all-trans*-Retinsäure (ATRA) zu einer Hemmung der Proliferation führt. Diese antiproliferativen Therapieeffekte sind von einer Induktion von Apoptose und Differenzierung der Tumor-Schwanzzellen in Richtung myelinisierender, reifer Schwanzzellen sowie von morphologischen Veränderungen der Zellen begleitet. Die höhere antiproliferative Wirkung von ATRA in der primären Schwanzzell-Kultur aus einem plexiformen Neurofibrom sowie der MPNST-Zelllinie NSF1 ist mit einer höheren CRABP2-Expression nach der ATRA-Gabe vergesellschaftet, so dass demonstriert wurde, dass CRABP2

durch ATRA hochreguliert wird und möglicherweise die antiproliferative Wirkung der ATRA vermittelt.

Da nur NF1-defiziente Schwannzellen in Neurofibromen CRABP2 exprimieren, während die Schwannzellen der Haut keine Expression aufweisen, deuten die Ergebnisse auf eine Transformations-bedingte Überexpression von CRABP2 in Tumor-Schwannzellen hin.

Zusammenfassend liegen erstmals viel versprechende Daten zur Rolle von CRABP2 in NF1-assoziierten Tumoren vor, die auf ein therapeutisches Potential von ATRA in diesen Tumoren hinweisen und die durch eine genauere Analyse von ATRA-vermittelten Signalwegen bei NF1 in tierexperimentellen Studien gefolgt werden sollten. Eine Therapie mit diesem, bereits bei anderen Krebserkrankungen erprobten Medikament, wäre eine wichtige Alternative zur chirurgischen Intervention von insbesondere plexiformen Neurofibromen, aber auch MPNST.

Abstract

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a common genetic disorder with manifestation of multiple peripheral nerve sheath tumors. Cutaneous and plexiform neurofibromas represent the hallmark of this tumor syndrome. Approximately 30% of patients develop plexiform neurofibromas being characterized by infiltrative growth resulting in neurological deficits. These tumors are prone to malignant transformation giving rise to malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). At present, no systemic therapy for plexiform neurofibromas does exist. Under current chemotherapeutic approaches MPNST show a high recurrence rate.

Our preliminary experiments demonstrated a lower expression of CRABP2 (cellular retinoic acid binding protein 2) in plexiform neurofibromas compared to the cutaneous ones. CRABP2 is known to transport retinoic acid (RA) and to mediate cellular RA effects. RA serves as essential regulator of embryonic and neuronal differentiation and possesses anti-carcinogenic properties.

The aim of the present work was to characterize CRABP2 expressing cells from NF1-associated peripheral nerve sheath tumors by immunocytochemistry in detail and to test RA as a potential therapeutic agent for NF1 associated peripheral nerve sheath tumors. Effects of all-*trans* RA (ATRA) were under focus to determine the impact on growth of tumor Schwann cells derived from plexiform neurofibromas and MPNST. Therefore functional assays were performed in a cell culture model. Molecular mechanisms of RA metabolism and expression of CRABP2 were to demonstrate.

In-*vitro*-treatment of primary tumor Schwann cells from neurofibromas with ATRA caused inhibition of proliferation. This anti-proliferative effect of ATRA therapy was accompanied by morphological changes, induction of apoptosis and differentiation of Schwann cells towards mature, myelin producing Schwann cells. A higher anti-proliferative effect of ATRA on a primary Schwann cell culture from a plexiform neurofibroma and on MPNST cell line NSF1 was associated with higher CRABP2 expression mediated by ATRA. It was therefore demonstrated that CRABP2 is up-regulated by ATRA and is very probably mediating anti-proliferative effects of ATRA. We also described that only NF1-deficient Schwann cells in neurofibromas express CRABP2, whereas normal Schwann cells did not show expression. This finding corresponds to a transformation-induced up-regulation of CRABP2 in tumor Schwann cells.

In summary, these promising data indicate a therapeutic potential of ATRA in NF1 associated peripheral nerve sheath tumors and a role of CRABP2 in these tumors. The experiments should be followed by further analysis of ATRA-mediated signaling pathways in Schwann cells and by

animal studies. Treatment with ATRA being already applied in other tumor disorders points to an important alternative to surgical intervention of plexiform neurofibromas and MPNST.

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 1

Die Neurofibromatose Typ 1 (Morbus Recklinghausen, NF1) ist mit einer Inzidenz von 1:3500 die häufigste dominant vererbte, genetisch bedingte Erkrankung, die eine hohe Penetranz und eine Spontanmutationsrate von 50% aufweist. Zu den typischen klinischen Merkmalen, welche bei etwa 90% der Patienten beobachtet werden, gehören gutartige Nervenscheidentumoren (kutane und plexiforme Neurofibrome), Pigmentflecken der Haut (Café-au-lait-Flecken) und Irishamartome (Lisch-Knötchen) (Abbildung 1). Die aktuell gültigen, diagnostischen Kriterien der Krankheit, die in den „National Institutes of Health“ festgelegt (NIH, 1988) wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Phänotypisch zeigen NF1-Patienten eine variable Ausprägung verschiedener klinischer Merkmale. Neben Neurofibromen entwickeln sie gehäuft weitere Tumoren, wie z.B. zentralnervöse Tumoren (Optikusgliome, pilozytische Astrozytome), maligne periphere Nervenscheidentumoren, endokrine Tumoren (Phäochromozytome, Karzinoide) und hämatopoetische Tumoren (juvenile myelomonozytische Leukämien, JMML).

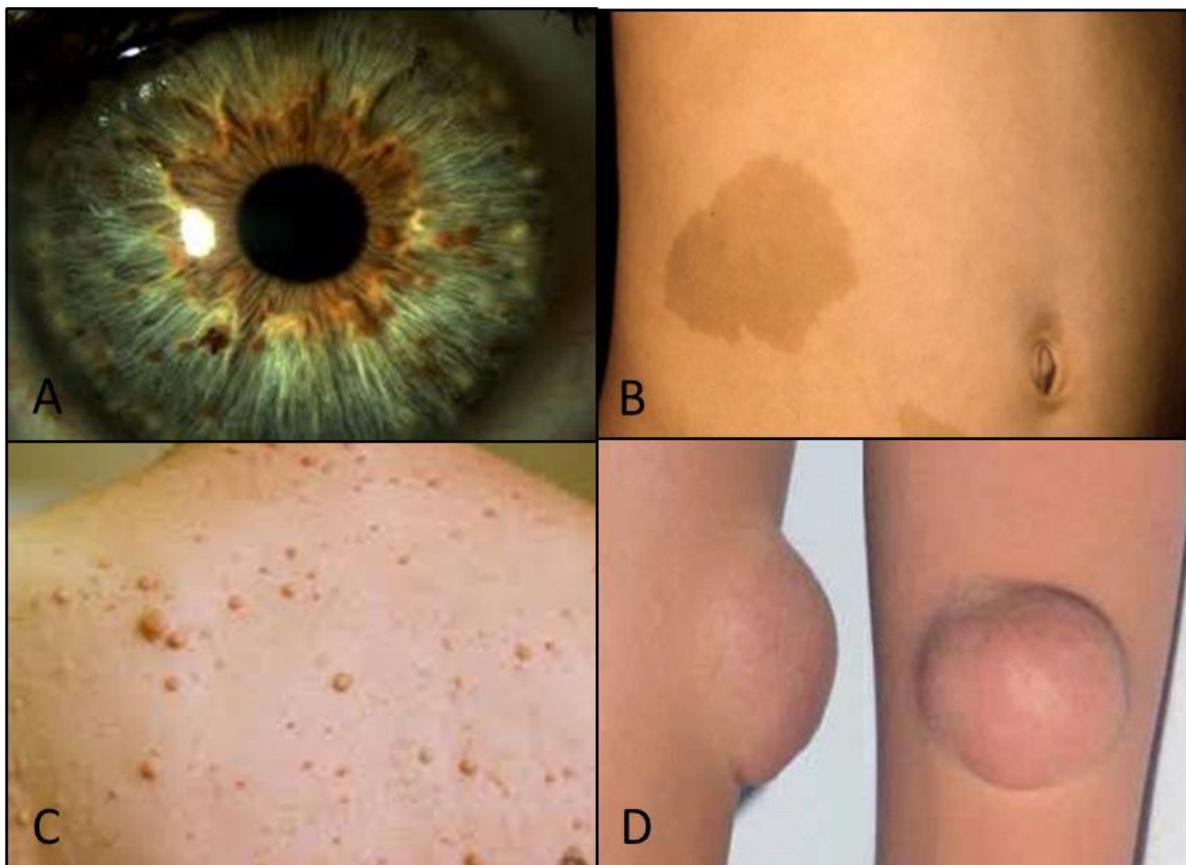


Abbildung 1. Typische klinische Merkmale: A) Lisch-Knötchen der Iris. B) Café-au-lait-Flecken. C) Kutane Neurofibrome. D) Plexiformes Neurofibrom.

Für die Diagnose NF1 sollen 2 oder mehr der folgenden Kriterien erfüllt werden:

- ≥ 6 Café-au-lait-Flecken mit einem Durchmesser > 5 mm (präpubertär)
bzw. > 15 mm (postpubertär)
 - ≥ 2 Neurofibrome irgendeines Typs oder 1 plexiformes Neurofibrom
 - axilläre oder inguinale Lentigines (Freckling)
 - Optikusgliom
 - ≥ 2 Irisharmatome (Lisch-Knötchen)
 - charakteristische Knochenanomalie
 - ein Verwandter 1. Grades mit NF1
-

Tabelle 1. Diagnostische Kriterien der Neurofibromatose Typ 1.

Aufgrund der krankheitsbedingten Aufmerksamkeitsstörung entsteht bei 40-60% der NF1-Patienten eine erhebliche Lernschwäche (29). Häufig werden Skelettanomalien wie Skoliose, Pseudoarthrose bzw. Dysplasien der Röhrenknochen beobachtet.

1.2 Die Pathogenese der Neurofibromatose Typ1

1.2.1 Das *NF1*-Gen

Die Ursache der Erkrankung ist eine Mutation im *NF1*-Tumorsuppressorgen, das auf dem langen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert ist (99). Am *NF1*-Lokus wurden Translokationen, Deletionen, Insertionen und Punktmutationen beschrieben.

Das *NF1*-Gen umspannt 350 kb der genomischen DNA, enthält 59 Exone und kodiert für eine mRNA von 11-13 kb (Abbildung 2A,B). Der offene Leserahmen des *NF1*-Transkripts aus 8457 bp kodiert für das 327 kDa Protein Neurofibromin aus 2818 Aminosäuren. Neurofibromin enthält eine Region aus 360 Aminosäuren, welche eine Sequenz-Homologie mit dem GAP (GTPase aktivierendes Protein) der Säugetiere und den IRA1- und IRA2-Genen der Hefe aufweist. Diese Region befindet sich in der zentralen Position des Gens, umfasst die Exone 21 bis 27 und wird als *NF1*-GAP related domain (*NF1*-GRD) bezeichnet (111).

Im großen Intron 27 des *NF1*-Gens finden sich drei weitere Gene in entgegengesetzter Leserichtung: das Oligodendrozytenmyelin-Glykoprotein (OMPG), EVI2A und EVI2B („ecotropic viral integration site“) (13, 106). Es wurden vier Transkripte nachgewiesen, welche

infolge des alternativen Spleißprozesses entstehen, die als GRD II, 3'ALT, 5'ALT1 und 5'ALT2 (Abbildung 2C) bezeichnet werden. Die Expression einzelner *NF1*-Transkripte konnte in vielen Organen und Gewebetypen sowie unterschiedlichen Tumorzellen nachgewiesen werden (19).

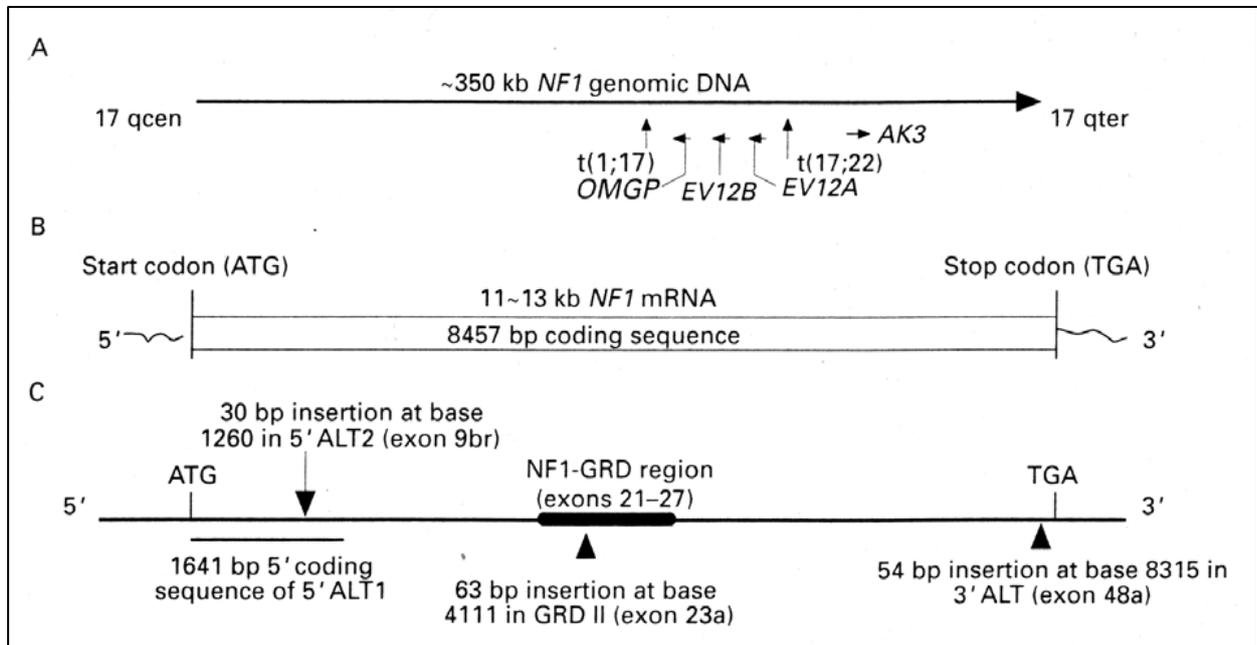


Abbildung 2. Die Gen-Struktur von *NF1*. (A) Größe des *NF1*-Gens und der eingeschlossenen Gene. (B) Größe des *NF1*-Transkripts (C) Lokalisation der *NF1*-GRD und der alternativ gespleißten *NF1*-Transkripte (96).

1.2.2 Neurofibromin

Neurofibromin zeigt die höchste Expression im Gewebe neuroektodermalen Ursprungs, z.B. im Gehirn, in peripheren Nerven, Rückenmark und Nebenniere. Mittels immunhistochemischer Färbungen konnte Neurofibromin im Zytoplasma der Oligodendrozyten, Neuronen, Ganglienzellen, nicht-myelinisierenden Schwannzellen, jedoch nicht in Astrozyten und myelinisierenden Schwannzellen nachgewiesen werden (20). Dabei wurde eine Kollokalisierung mit zytoplasmatischen Mikrotubuli beobachtet (41).

Die Homologie von Neurofibromin zu den Proteinen der GAP-Familie resultiert in der Fähigkeit, die Umwandlung der aktiven GTP-gebundenen Form des Ras-Proteins (Rat sarkoma-Protein) in eine inaktive GDP-gebundene Form zu stimulieren. Aufgrund der homologen Sequenzen zu den IRA1-, IRA2- und sar1-Genprodukten ist Neurofibromin auch ein Negativregulator von Ras1 bzw. des Ras-cAMP-Signalweges. Ras fungiert als zentraler Schalter vieler zellulärer Prozesse wie Wachstum, Migration, Teilung und Differenzierung (Abbildung 3). Die Akkumulation des aktiven Ras infolge des heterozygoten Verlustes des Neurofibromins kann über die vermehrte

Aktivierung der MAPK-Signalkaskade zur unkontrollierten Zellproliferation, Zellmigration und Dysbalance weiterer Ras-abhängiger Prozesse (z.B. des Lernens) führen. Weitere Studien demonstrierten die Funktion des Neurofibromins als Regulator der p21-Aktivität, das die Zyklin-anhängigen Kinase (CDK) inhibiert und den Zellzyklus reguliert (36, 70). Diese Beobachtungen bestätigen die Funktion des *NF1*-Gens als ein Tumorsuppressor in der Zelle.

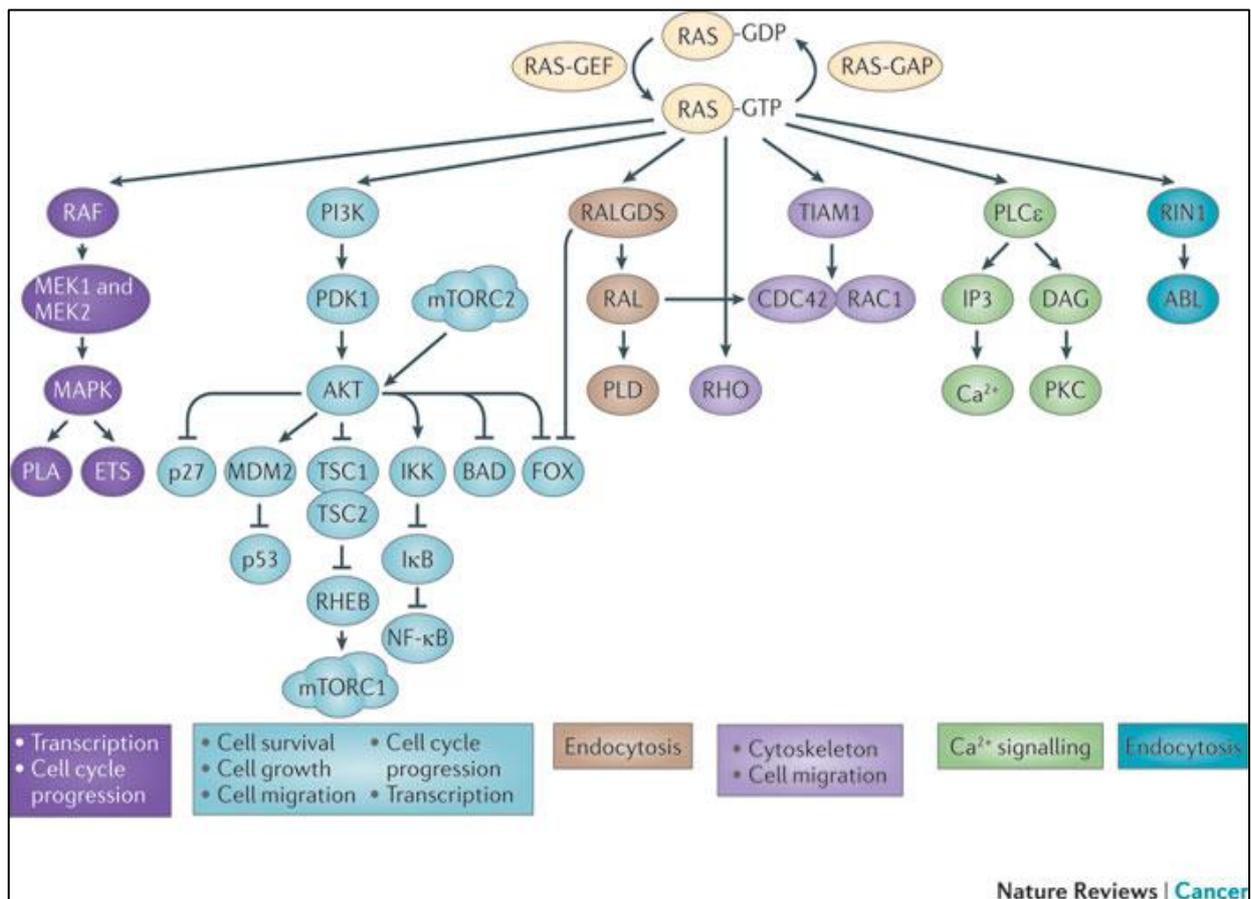


Abbildung 3. Signaltransduktionsweg des Ras-Proteins.

1.3 Benigne und maligne periphere Nervenscheidentumoren

1.3.1 Klassifikation

Der Erkrankung namengebendes Hauptmerkmal der NF1-Patienten sind benigne periphere Nervenscheidentumoren, die Neurofibrome, die u.a. in die plexiforme und kutane Form untergliedert werden. Kutane Neurofibrome (Abbildung 1C) sind umschriebene, langsam wachsende Hautknoten, die in unterschiedlicher Anzahl (von 10 bis zu Tausenden) und Größe (selten größer als 1cm³) und mit Beginn der Pubertät auftreten (Abbildung 4A). Neben kosmetischen Problemen können die kutanen Neurofibrome Sensibilitätsstörungen und Schmerzen verursachen.

30 % der NF1-Patienten entwickeln plexiforme Neurofibrome (30) (Abbildung 1D). Diese sind umschriebene Neoplasien der peripheren Nerven, welche häufig einzeln vorkommen und bei schnellerem Wachstum erhebliche Größen erreichen können. Die plexiformen Neurofibrome verursachen häufig Nervenkompressionen und- destruktiven, welche klinisch zu neurologischer Symptomatik wie Schmerzen und Lähmungen führen können. In etwa 13 % der Fälle entstehen aus den plexiformen Neurofibromen die malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST) (28).

MPNST stellen 5-10% aller Weichteilsarkome dar und wachsen oft innerhalb von Nervenfaszikeln, infiltrieren die Perineuralscheide, das Epineurium, sowie das angrenzende Weichteilgewebe. MPNST wachsen invasiv und infiltrierend und metastasieren früh, vor allem in Lunge, Leber, Lymphknoten, Weichteilgewebe und Knochen. Die lokalen tumorbedingten Nervendestruktionen führen zu Funktionsverlusten und Schmerzen, das infiltrative Wachstum in anderen Organen verursacht entsprechende Funktionsstörungen.

1.3.2 Genetische Grundlagen

Ein Modell der Tumorentstehung, die „two-hit“-Hypothese von Knudson (81) basiert auf der Annahme, dass erst die Inaktivierung beider Allele eines Tumorsuppressorgens durch somatische Mutationen zur Tumorentwicklung führt. Beim ersten Hit handelt es sich meistens um die Funktionsverlust-Mutationen rezessiver Natur. Der zweite Hit in einem Tumorsuppressorgen resultiert im Verlust von Heterozygotie (Loss-of-Heterozygoty, LOH), der zur Geninaktivierung beider *NF1*-Gene führt. Die Inaktivierung eines Allels (Keimbahnmutation) des *NF1*-Gens führt zu einigen klinischen Merkmalen. Nur durch zusätzliche somatische Mutationen im zweiten Allel (second hit) in den Schwanzzellen kommt es zur Entwicklung der Neurofibrome sowie z.B. auch der Pseudoarthrosen. (31, 56, 67, 91, 95).

Die Entwicklung eines MPNST aus einem plexiformen Neurofibrom ist ein Mehrstufenprozess (31). Bisher ist bekannt, dass neben dem Funktionsverlust des *NF1*-Gens noch eine Vielzahl weiterer genetischer Änderungen eine entscheidende Rolle bei der malignen Transformation spielen (32, 65, 72, 92). Dabei finden sich gehäuft heterozygote und teilweise homozygote Deletionen der Tumorsuppressorgene *TP53* (p53) und *CDKN2A* (p16) (7, 59, 61, 73, 79). Die Mausmodelle für MPNST mit Keimbahn-Mutationen des *NF1*-Gens und des *TP53*-Gens bestätigten die Rolle von *TP53* für die maligne Transformation (17, 34, 108). In mehreren Studien konnte beobachtet werden, dass nur MPNST, nicht aber die gutartigen Neurofibrome eine *CDKN2A*-LOH aufweisen (7, 59, 61, 79).

1.3.3 Histologische Merkmale von NF1-assoziierten Nervenscheidentumoren

Histologisch bestehen die Neurofibrome vorwiegend aus neoplastischen, S100 positiven Schwannzellen, Perineuralzellen und Fibroblasten, eingebettet in reichlich Kollagenfasern und mukoide Substanz. Die Zellkerne sind oval bis spindelförmig, die Zellkörper schmal und wellig. Die Anzahl der Zellen mit atypischen Kernen sowie mit Mitosen ist gering (Abbildung 4A,B). Die MPNST sind demgegenüber zeldichte, spindelzellige Tumoren mit zahlreichen Mitosen und Nekrosen (Abbildung 4C), sowie nur in 50-70% der Fälle mit Expression von S100 und p53 (101).

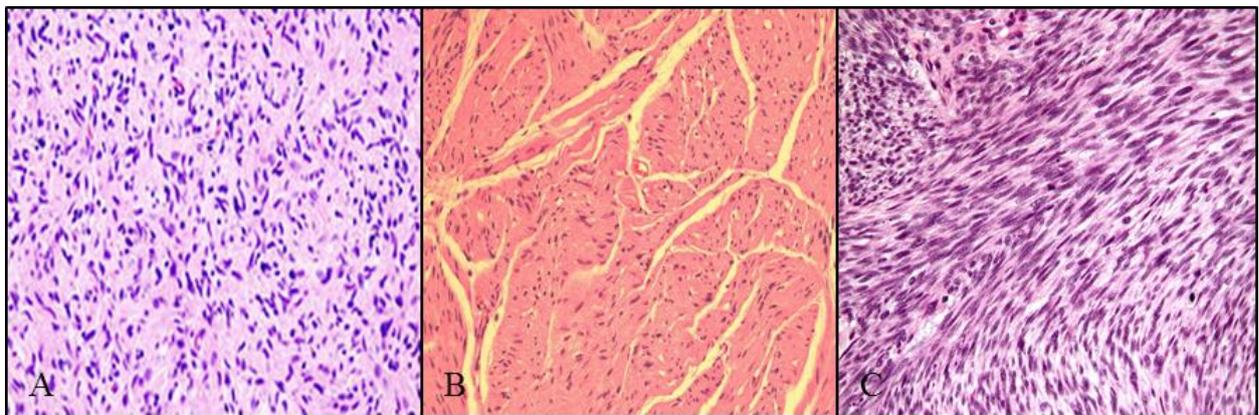


Abbildung 4. Histologische Bilder (HE-Färbung): kutanes Neurofibrom (A), plexiformes Neurofibrom (B) und MPNST (C) (20fache Vergrößerung).

1.3.4 Differenzierung von Schwannzellen

Im peripheren Nervensystem (PNS) bilden die Schwannzellen die Markscheide um die Axone der Neurone und produzieren Myelin. Spezialisierte Schwannzellen (perisynaptische Zellen oder Mantelzellen) bedecken die motorische Endplatte und dienen dem Zusammenhalt der motorischen Einheit (100, 106). Die Schwannzelle entwickelt sich aus einer multipotenten Neuralleistenzelle unter Einfluss von exogenen und endogenen Faktoren zu einer differenzierten adulten Schwannzelle (Abbildung 5). Die Zwischenstufen der Differenzierung der Schwannzellen sind durch unterschiedliche Genexpressionsmuster charakterisiert (64). Die Neuralleistenzellen, die aus dem Neuroepithel stammen, werden durch das „Bone Morphogenetic Protein“ (BMP-4) zur Ablösung vom Neuralrohr und Migration nach lateral-ventral gesteuert (61, 94). Weitere Differenzierungen der Schwannzellen erfolgen im Zielgewebe unter dem Einfluss des von den Neuronen sezernierten β -Neuregulins und Notchs zu den Schwannzell-Vorläuferzellen (75, 96). Die Neuralleistenzellen exprimieren das Intermediärfilament Nestin, Sox10 sowie den Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptor p75^{LNGFR}

(Low Affinity Nerve Growth Faktor Receptor) (50, 63). Die Schwanzzell-Vorläuferzellen exprimieren zusätzlich das Wachstums-assoziierte Protein 43 (GAP43), die Transkriptionsfaktoren Krox-24 und Oct-6 (SCIP), sowie die Myelinproteine Protein 0 (P0) und Peripheres Myelinprotein 22 (PMP22) (8, 44, 50). Die frühen Schwanzzellen, die sich aus Schwanzzell-Vorläuferzellen entwickeln, zeichnen sich durch eine Expression des kleinen Kalziumbindungsproteins S100, des sulfatierten Galaktozerebrosid O4-Antigens und Expression des Intermediärfilamentes „Glial Fibrillary Acidic Protein“ (GFAP) aus (50, 51, 74). Außerdem wird eine Hochregulierung der Transkriptionsfaktoren Oct-6 (2) und Krox-20 beobachtet. Die frühen bipolaren Schwanzzellen unterscheiden sich morphologisch von den flachen, epithelähnlichen Schwanzzell-Vorläuferzellen (63). Die frühen Schwanzzellen differenzieren kurz vor der Geburt zu reifen Schwanzzellen, welche in myelinisierende und nicht-myelinisierende Schwanzzellen eingeteilt werden. In den myelinisierenden Schwanzzellen kommt es zu einer Herunterregulation des Rezeptors p75 LNGFR und Hochregulation der Myelogene (wie z.B. P0, PMP22, MBP) und des Transkriptionsfaktor Krox-20. In nicht-myelinisierenden Schwanzzellen werden die Myelogene herunterreguliert, und der Transkriptionsfaktor Krox-24 heraufreguliert. Die Kaliber der Axone sowie die vom Axon ausgehenden β -Neuregulin-Signale bestimmen die Reifungsrichtung der Schwanzzellen.

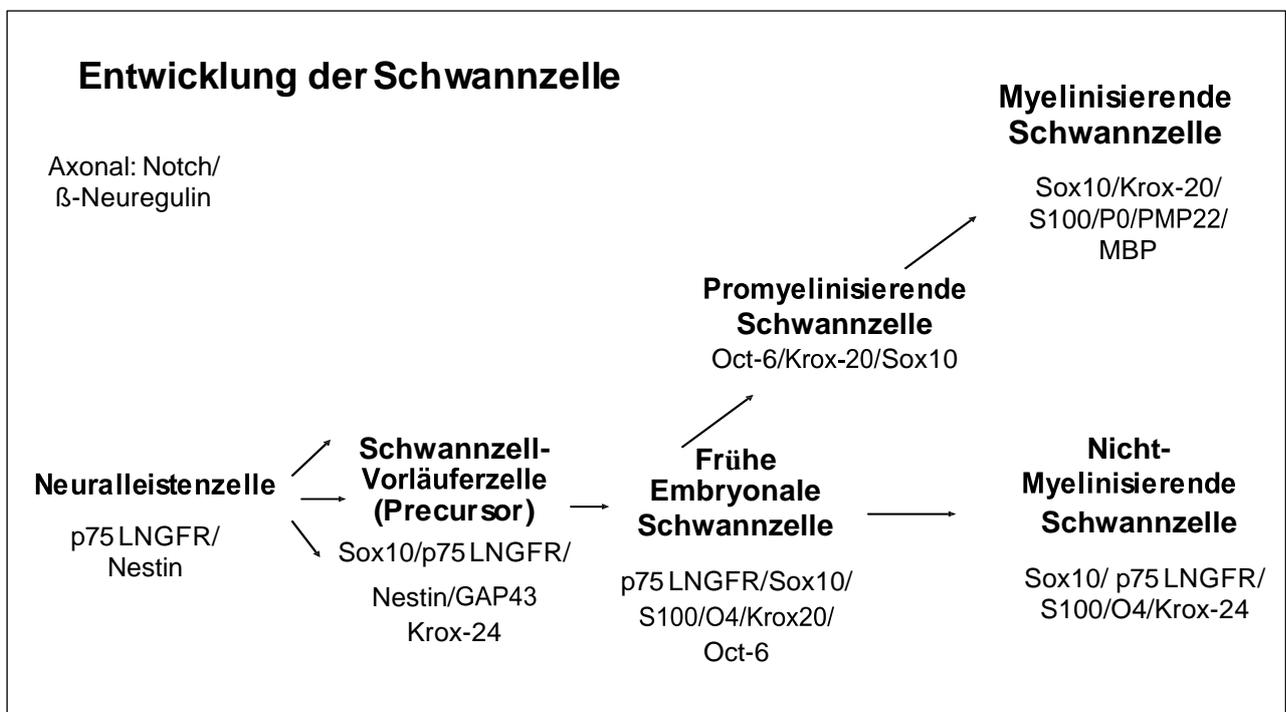


Abbildung 5. Differenzierungsstufen einer Schwanzzelle unter Einfluss von verschiedenen Faktoren (18).

1.3.5 Kultivierung von Schwannzellen

Die Kultivierung der humanen primären Schwannzellen ist sehr aufwendig. Die Schwannzellen weisen ein geringes Wachstum und frühe Zellalterung auf. Durch die Benutzung rekombinanter Hereguline für die Schwannzellkultur wurde es möglich, die Schwannzellen selektiv zu expandieren (91). Die Kulturen primärer humaner Schwannzellen benötigen besondere Bedingungen wie ein spezielles Medium, eine Lamininbeschichtung der Kulturoberfläche und eine 10%ige CO²-Konzentration im Brutschrank. Da die primäre Schwannzellkultur aus Schwannzellen und Fibroblasten besteht, ist eine selektive Trypsinierung nötig, um die Fibroblasten-Population zu verringern. Aufgrund der schnellen Zellalterung beträgt die Zeitspanne für die Durchführung von Experimenten nur 1-2 Passagen (31). Frahm et al. gelang es, die neoplastischen Schwannzellen aus mehreren Neurofibromen zu isolieren und kultivieren, um die Unterschiede in den Schwannzellen aus den kutanen und plexiformen Neurofibromen zu untersuchen (31).

Es konnten Unterschiede im Haftungsverhalten und in der Zellmorphologie beobachtet werden. Die Schwannzellen aus plexiformen Neurofibromen (PNF) (Abbildung 6B) besaßen in der Regel breitere und flache Zellkörper als die Zellen aus kutanen Neurofibromen (KNF) (Abbildung 6A). Es zeigte sich eine schlechtere Haftung der PNF-Zellen auf dem Substrat Laminin im Vergleich zu den KNF-Zellen. Die spindelförmigen primären Schwannzellen aus Neurofibromen ordneten sich in der Kultur parallel an, zeigten ein geringes Wachstum (Abbildung 6C) und exprimierten das S100-Protein.

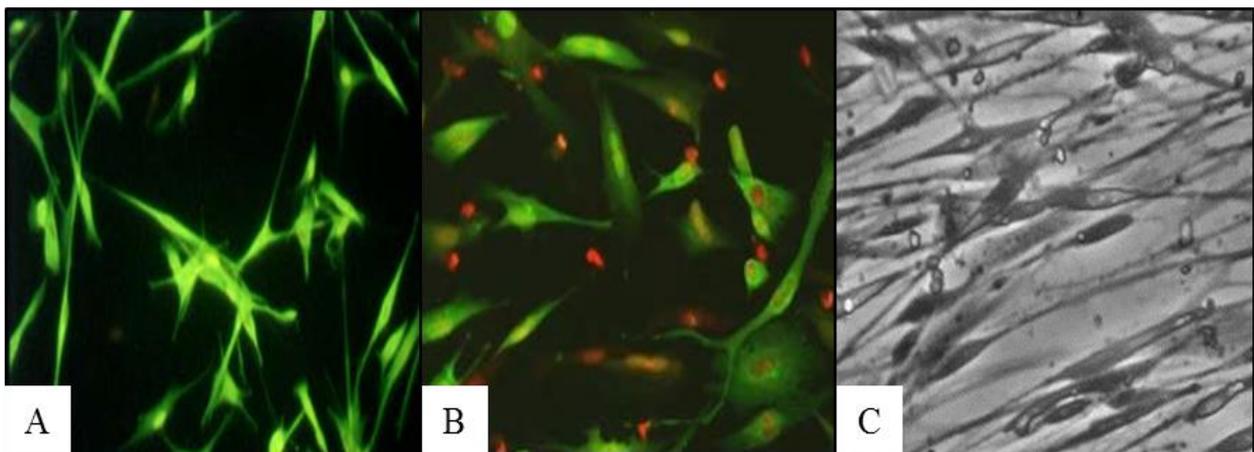


Abbildung 6. Beispielbilder der Schwannzellkulturen aus den Neurofibromen: bipolare, längliche, S100-positive Schwannzellen (A), häufig mit breiteren Zellkörpern in einem plexiformen Neurofibrom (B) sowie in der Kultur parallel angeordnet (C) (31).

1.3.6 Die Therapie von NF1- assoziierten Tumoren

Die aktuelle Therapie der Neurofibrome beschränkt sich auf die operative Entfernung der kutanen Tumoren sowie der oberflächlichen plexiformen Neurofibrome mittels Laser-Verfahren oder durch vollständige Exzision. Bei den tiefen plexiformen Neurofibromen gelingt in den meisten Fällen nur eine partielle Resektion, um neurologische Symptome zu vermeiden. Eine etablierte systemische Therapie der Neurofibrome existiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht. In klinischen Studien haben sich eine Reihe von Therapeutika, wie Thalidomid und Farnesylproteinase-Inhibitoren, als nicht effektiv gezeigt (3, 43, 110). In klinischen Phase II-Studien mit Imatinib (90) zeigen die NF1-Patienten nach 6monatiger Behandlung eine Volumenreduktion der plexiformen Neurofibromen von über 20%. Die Medikamentenstudie mit Sirolimus (m-TOR-Inhibitor), Nilotinib, Sunitinib, Sorafenib (Tyrosinkinase-Inhibitoren) werden erst in Phase I-Studien getestet. So zeigte Sorafenib beispielweise bis jetzt bei hoher Toxizität keinen klinischen Effekt (54). MPNST wachsen invasiv und infiltrierend und sprechen schlecht auf eine Strahlen- und Chemotherapie an. Die vollständige Resektion des Tumors gelingt nur durch eine ausgedehnte Operation, oft unter Amputation der betroffenen Extremität. In bestimmten Lokalisationen, wie z.B. spinal, ist eine randfreie Resektion nicht möglich. Zu den am meisten verwendeten Chemotherapeutika gehören Adriamycin und Ifosfamid, wobei die Kombination beider Substanzen nach EORTC-Analyse bis zu einer 46%igen Remissionsrate führen kann (59). Die Rezidiv- und Metastasierungsrate beträgt jedoch über 50%. Zu den alternativen Chemotherapeutika gehören Gemcitabine, Soratinib und platinhaltige Substanzen, welche bis jetzt in wenigen Fällen untersucht wurden und keine bessere Erfolgsrate auswiesen. Die begrenzten Therapiemöglichkeiten der aggressiven MPNST resultieren in einer niedrigen 5-Jahre-Überlebensrate von 21%, wobei die Prognose der Patienten mit NF1-assozierten MPNST weitaus schlechter sowie das Durchschnittsalter dieser Patienten um etwa 30 Jahre niedriger ist als in sporadischen Fällen (28).

1.4 All-trans-Retinsäure (ATRA)

1.4.1 Metabolismus und Wirkung von ATRA

All-trans-Retinsäure (ATRA) ist ein natürliches Vitamin A-Derivat (Retinol, $C_{20}H_{30}O$). ATRA wird vom Menschen als Provitamin A (Beta-Carotin) mit der Nahrung aufgenommen und zu einem aktiven Metaboliten durch die Enzyme Retinoldehydrogenase (ROLDH) und Retinaldehydrogenase (RALDH) oxidiert (84). ATRA gehört zur Gruppe der Retinoide, die im menschlichen Körper eine essentielle Rolle bei der Zellproliferation, Wachstums- und

Differenzierungsprozessen sowie bei der Embryogenese spielen (66). Als das erste, künstlich hergestellte Retinoid (Tretinoin) wird ATRA seit 50 Jahren in der Dermatologie gegen Akne eingesetzt (39).

Die Wirkung der ATRA wird über die nukleäre Retinoidrezeptoren (RAR und RXR) vermittelt (Abbildung 7). Das zelluläre Retinsäure-bindende Protein 2 (cellular retinoic binding protein 2, CRABP2) transportiert ATRA in den Zellkern und koaktiviert den ATRA-Rezeptor-Heterodimer-Komplex (25). Der Komplex bindet im Nukleus an die responsiven Elemente RARE (Retinoic Acid Response Element) und RXRE (Retinoic-X Responsive Element) der Zielgene (68, 69, 113). Dabei handelt es sich um DNA-Segmente in den Promoter-/Enhancerregionen dieser Gene. Durch die Bindung des Komplexes an die RARE werden weitere Transkriptionsmodulatoren rekrutiert und bestimmte Genabschnitte aktiviert (21, 22). Auf diese Weise entfalten Retinoide ihre hormonelle Wirkung direkt auf nukleärer Ebene und greifen in die Genexpression ein. Mehr als 530 Gene wurden in der Literatur bereits als direkte oder indirekte Ziele der Retinsäure beschrieben (5).

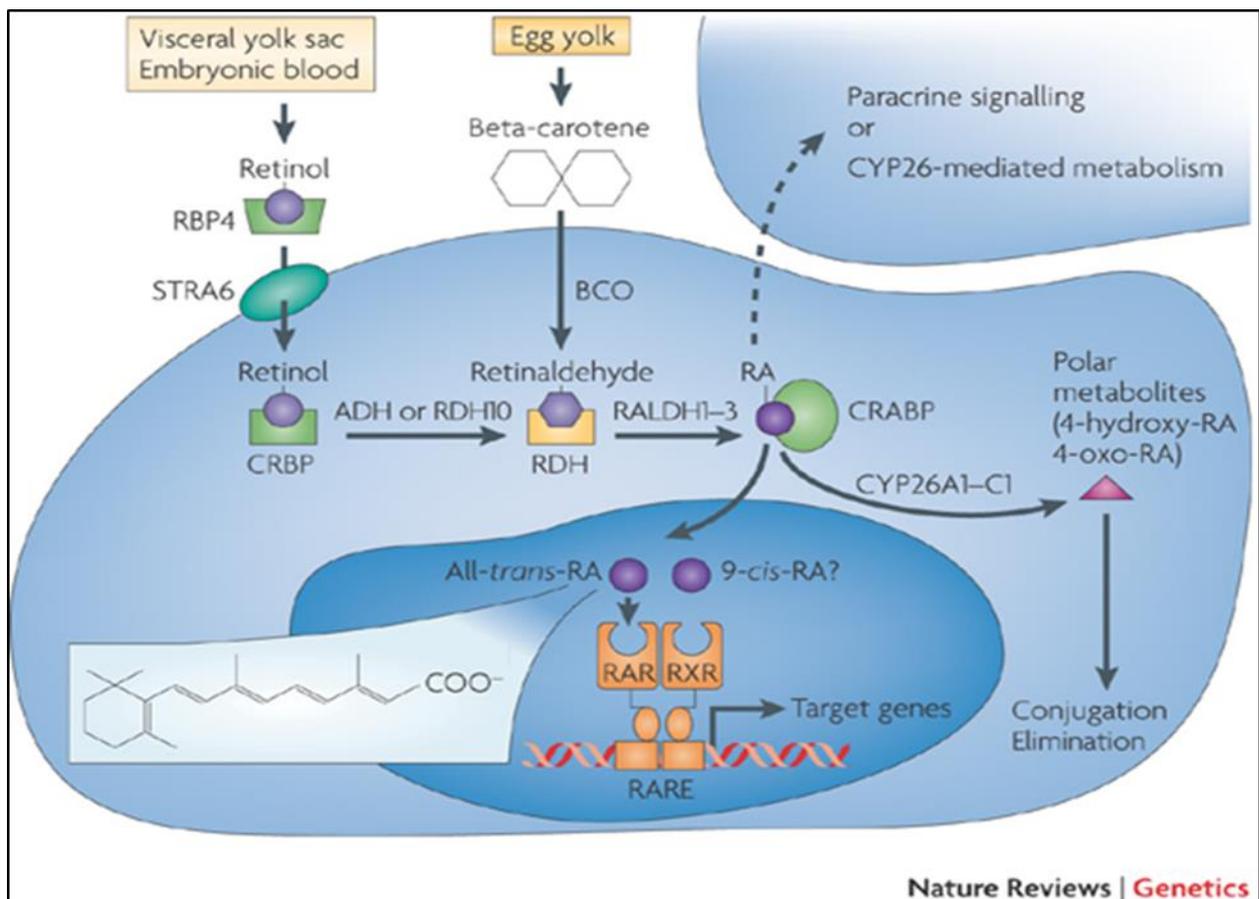


Abbildung 7. Metabolismus und Signalinduktionsweg von ATRA (78).

Die Mechanismen des An- und Abschaltens von Genen spielen unter anderem auch bei der Tumorentstehung und Tumorthherapie eine wichtige Rolle (76). In der Therapie der akuten promyeloischen Leukämie (APL) wird unter ATRA-Behandlung eine Remissionsrate von über 90% beobachtet (9). In der experimentellen Forschung konnten in den letzten Jahren große Erfolge in der Therapie weiterer maligner Erkrankungen mit ATRA erreicht werden: Antiproliferative Eigenschaften von ATRA konnten bei hepatozellulärem Karzinom (87), bei squamösen Krebszellen des Kopf-Hals-Bereiches (52), bei T-Zell-Lymphomen und Kaposi Sarkomen (116) sowie Borderline-Tumoren des Ovars (49) beobachtet werden. In Zellen des invasiven Prostatakarzinoms bei Ratten konnte der antimetastatische Einfluss von ATRA nachgewiesen werden (82). In Neuroblastom-Zelllinien (16) und Glioblastom-Zelllinien (53) induzierte ATRA die Apoptose und Zelldifferenzierung. Dabei steigerte ATRA in Kombinationstherapien durch synergistischen Effekt die Wirkung der eingesetzten Zytostatika. Weiterhin wurde die Rolle von ATRA in der neuronalen Regeneration belegt, womit der therapeutische Einsatz der ATRA bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer-Demenz und Morbus Parkinson sowie Nervenläsionen diskutiert wird (66).

1.4.2 CRABP2 und Neurofibrome

Das Protein CRABP2 ist ein kleines Transportprotein, welches als transkriptioneller Ko-Aktivator fungiert. Ihm werden antiproliferative Eigenschaften i. S. eines Tumorsuppressors zugeschrieben. Es transportiert ATRA vom Zytosol in den Kern, wo es mit ATRA und den Rezeptoren (RARs) assoziiert. Über diesen Mechanismus kann CRABP2 den Transport von ATRA kontrollieren und die transkriptionelle Aktivität verstärken (23). CRABP2 ist innerhalb der Vertebraten hoch konserviert und wird in epithelialen Zellen verschiedener Organe wie Ovar, Uterus, Prostata, Niere, Augen sowie im embryonalen Gewebe exprimiert (25, 26, 27, 77, 98, 105). Es wird zelltypspezifisch im Zytoplasma, aber auch nukleär exprimiert (Abbildung 8A-B) sowie in vielen Tumoren überexprimiert (38, 83, 102, 103). Eine Überexpression führt beispielsweise in Brustkrebszellen zu einer verstärkten ATRA-Response (24). Weiterhin werden durch CRABP2 Retinsäure-unabhängige Prozesse vermittelt (24).

Die NF1-Arbeitsgruppe unter Leitung von Frau PD Dr. Anja Harder konnte mittels einer 2D-Protein-Elektrophorese eine differentielle Expression von CRABP2 in kutanen versus plexiformen Neurofibromen nachweisen. Diese Ergebnisse wurden mittels real time PCR sowie morphometrischer Analyse der CRABP2-Expression bestätigt: CRABP2 wird in kutanen Neurofibromen im Vergleich zu plexiformen signifikant stärker exprimiert (Abbildungen 8C-D und 9).

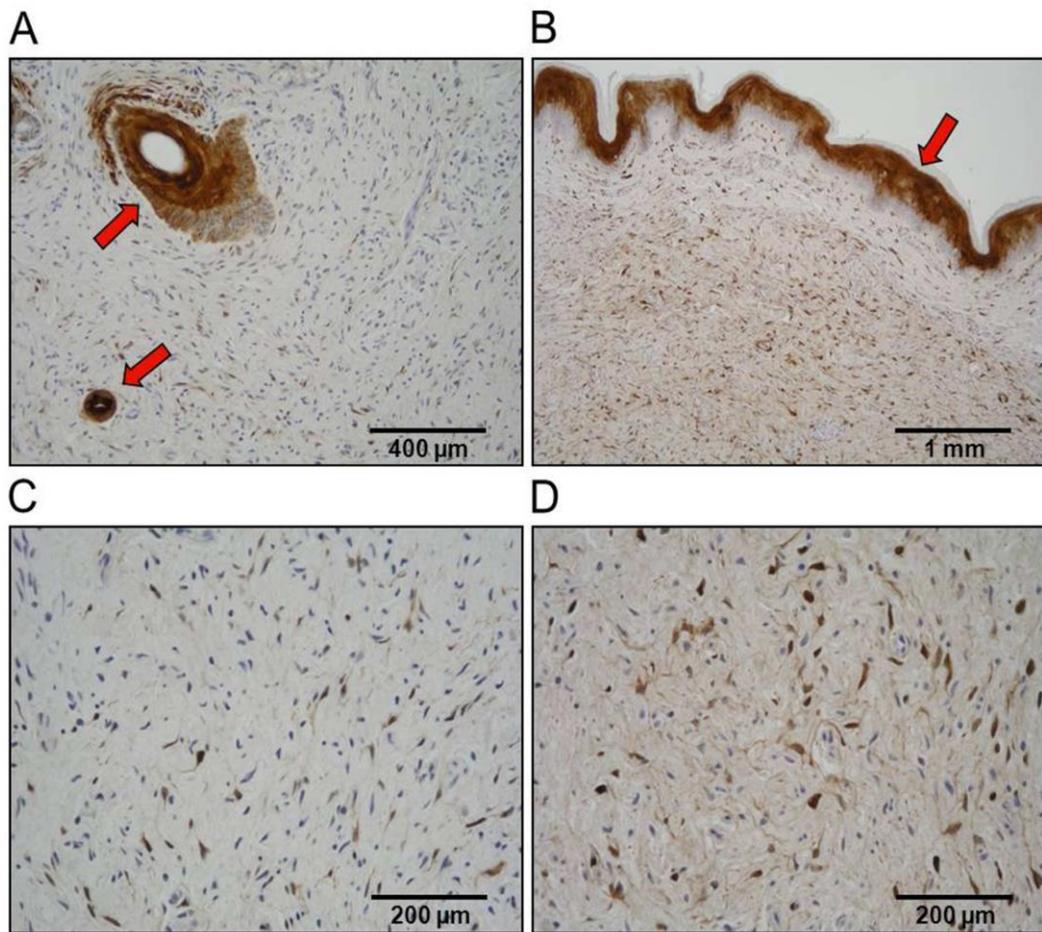


Abbildung 8. Immunhistologische Bilder: CRABP2-Expression in den Epithelzellen (Pfeile) (A-B), in einem kutanen Neurofibrom (C) sowie in einem plexiformen Neurofibrom (D).

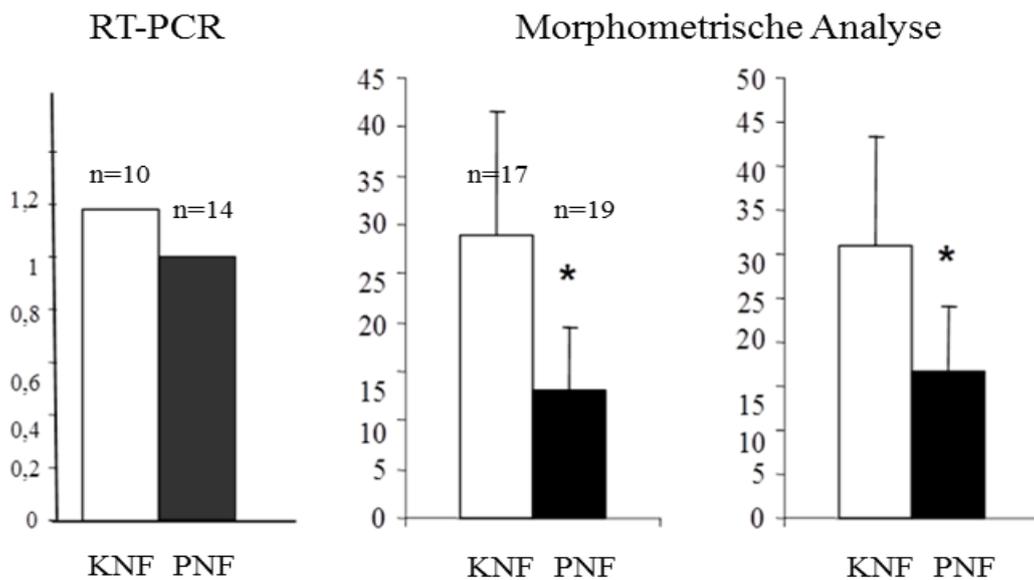


Abbildung 9. Quantifizierung der CRABP2-Expression: Protein-Expressionsmessung mittels real-time-PCR in 10 kutanen Neurofibromen (KNF) versus 14 plexiformen Neurofibromen

(PNF). *Morphometrische Analyse in 17 kutanen und 19 plexiformen Neurofibromen: Eine signifikant höhere CRABP2-Expression ist in den kutanen Neurofibromen nachweisbar.*

1.4.3 Retinsäure und Neurofibromin

Verschiedene Untersuchungen geben Aufschluss über den Zusammenhang zwischen der Expression von Neurofibromin und der Retinsäure (RA). In SH-SY5Y Neuroblastomzellen sowie in Ovarialkarzinom-Zelllinien konnte durch die Behandlung mit ATRA eine Veränderung der Expression der alternativ gespleißten NF1-Transkripte I und II zugunsten des Letzteren erzielt werden, was mit einer neuronalen Differenzierung der Tumorzellen verbunden war (80). Die Autoren spekulierten, ob eine differentielle Expression dieser Transkripte einen on-/off-Mechanismus darstellt, der die katalytische Aktivität von Neurofibromin bei der neuronalen Entwicklung und Differenzierung reguliert. Andere Studien konnten die unterschiedliche Expression der Transkripte nach RA-Behandlung in Neuroblastom-Zelllinien und PNET-Zellen nicht belegen (10). Weitere Untersuchungen konnten in zwei Neuroblastom-Zelllinien nachweisen, dass die durch RA bedingte Differenzierung und Wachstumsverlangsamung mit einem p21ras-unabhängigen Anstieg der Typ I GAP120 und Neurofibromin-mRNA verbunden war (11). Neurofibromin besitzt somit Effektor-Funktionen von RA. Die Neuroblastomzellen mit *NF1*-Mutation beispielweise zeigten eine Resistenz gegen ATRA (46).

Zytosolisches cAMP ist wichtig für die neuronale Differenzierung und führt bei der akuten promyelozytischen Leukämie zur Differenzierung der Tumorzellen, und zwar im Synergismus mit RA (42). Für Neurofibromin ist bekannt, dass es den cAMP-Spiegel positiv reguliert. Ob RA das cAMP über Neurofibromin mediiert, ist unbekannt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

1. In Voruntersuchungen konnte die Expression von CRABP2 mittels immunhistochemischer Färbungen in Gewebeschnitten von kutanen und plexiformen Neurofibromen nachgewiesen werden. Da die Neurofibrome biologisch ein Zellgemisch darstellen, soll in dieser Arbeit mittels Doppelmarkierungen von Gewebeschnitten und Zellen aus primären Zellkulturen aus NF1-assoziierten Neurofibromen analysiert werden, welche Zelltypen eine CRABP2-Expression aufweisen.

2. Plexiforme Neurofibrome sind aggressive Tumoren, welche mit Schmerzen und Funktionsverlusten der Nerven eingehen und somit die Lebensqualität der Betroffenen beeinträchtigen. Zusätzlich können plexiforme Neurofibrome zu malignen peripheren

Nervenscheidentumoren (MPNST) entarten und die Prognose der Erkrankung enorm verschlechtern. Die einzige erfolgreiche Therapie der plexiformen Neurofibrome beschränkt sich derzeit auf die Tumorexzision. Eine erfolgreiche systemische Therapie existiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht. Diverse Zytostatika und spezifische Medikamente werden in experimentellen und klinischen Studien getestet und zeigen bis jetzt keine überzeugenden Ergebnisse.

ATRA ist ein erprobtes Chemotherapeutikum, dessen Wirkung durch CRABP2 vermittelt wird und das klinisch in der Onkologie zur Behandlung der Tumorerkrankungen wie z.B. der promyelozytären Leukämie (PML) oder Ewing-Sarkomen eingesetzt wird. Die antiproliferativen und proapoptischen Effekte von ATRA wurden in mehreren experimentellen Studien in den verschiedenen Tumorarten nachgewiesen.

In dieser Arbeit soll die Wirkung von ATRA auf primäre Schwannzellkulturen und MPNST-Zelllinien aus NF1-assoziierten Tumoren in Hinblick auf Differenzierung, Zellproliferation sowie Apoptose untersucht werden, um Rückschlüsse auf das therapeutische Potential in diesen Tumoren ziehen zu können.

3. Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Harder ergaben eine differentielle Expression von CRABP2 in plexiformen und kutanen Neurofibromen. Da CRABP2 die antiproliferative Wirkung von ATRA vermittelt und die CRABP2-Expression durch ATRA gesteigert wird, könnte auch in NF1-assoziierten Tumoren die antiproliferative Wirkung von CRABP2 in der Zelle verstärkt werden. Diese Hypothese soll in dieser Arbeit an NF1-assoziierten Tumorzellen *in-vitro* geprüft werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen und Medien

3-iso-Butyl-L-Methylxanthin, Sigma
all-trans-Retinsäure, Sigma
DMEM, Lonza
DMSO, Invitrogen
DPBS, Lonza
Ethanol, Merck
FBS, Gibco
Fungizone, Gibco
Heregulin (*engl.* glial growth factor GGF), Sigma
Insulin, Sigma
Laminin, Sigma
L-Glutamin, Invitrogen
Lysine (Poly-L-lysine), Sigma
Methanol, Merck
Milchpulver, Roth
Mounting Medium DAPI, Dianova
Natriumpyruvat, Biochrom
Paraformaldehyd, Sigma
Penicillin/Streptomycin, Invitrogen
Trizol Reagent, Life Technologies
Trypsin/EDTA, Gibco
Wasser, destilliert, Lonza
Ziegen-Normalserum, DAKO

2.2 Kits

Agilent RNA 6000 Pico Kit, Agilent Technologies Genomics
APO-BrdU TUNEL Assay Kit, Invitrogen
Gene Expression Assay, Applied Biosystems
StepOnePlus real time PCR System, Applied Biosystems
TaqMan Universal MasterMix, Applied Biosystems
XTT Cell Proliferation Kit, Roche

2.3 Geräte , Labormaterialien

0, 22µm Spritzenvorsatzfilter, Millipore
2100 Bioanalyser, Agilent Technologies Genomics
25cm², 75cm² Zellkulturflaschen, Falcon
96-well-Kulturplatten, NUNC
Chamber slides, NUNC
diverse Pipetten und Spitzen, Eppendorf
Eismaschine, Ziegra
Eleaser Reader Infinite M200, TECAN
FACS-Gerät CantoII , BD
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer, Zeiss
Fluoreszenzmikroskop, Leica
Kamera DFC490, Leica
Kryoröhrchen, Nunc
Laboklav, SHP Steriltechnik AG
Mikrowelle, Sharp
Milli-Q Integral Water Purification System, Millipore
Multifuge 3SR Plus, Heraeus
Neubauer-Zellkammer, Assistent
Objekträger, Assistent
Präzisionswaage SBA 51, ScalTec
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen, Falcon
Sterilbank, Heraeus Instruments
Wasserbad 1002, GFL
Zentrifuge, Heraeus Instruments

2.4 Untersuchungsmaterial

2.4.1 Gewebeschnitte

Es wurden histologische Gewebeschnitte von in Paraffin eingebettetem Material zur Untersuchung der Expression von CRABP2 und anderer Proteine verwendet. Für die Färbungen wurden vornehmlich Schnitte von Tumoren verwendet, die bei Patienten mit NF1-assoziierten und nicht NF1-assoziierten Nervenscheidentumoren operativ entfernt worden waren. Zur Optimierung wurden auch Kontrollschnitte aus der Dermis verwendet.

2.4.2 Zellkultur

Die Wirkung von ATRA auf NF1-assoziierte Neurofibrome *in vitro* wurde in 3 primären Schwannzellkulturen aus plexiformen (1772, 1824,1, 1754) und 2 primären Zellkulturen aus kutanen Neurofibromen (1819, 1824) untersucht. Die primären Schwannzellen wurden durch Kooperationspartner der Arbeitsgruppe Mautner (UKE, Hamburg) aus frisch operierten Tumoren isoliert und nach der 1. Passage zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurden die NF1-assoziierten, genetisch charakterisierten MPNST-Zelllinien NSF1 (LOH in *NF1*), T265 (LOH in *NF1* und Überexpression von Platelet Derived Growth Factor Rezeptor, PDGFR α/β) und S462 (LOH in *NF1* und *TP53*) (4, 31, 41), freundlicherweise von Dr. N. Holtkamp zur Verfügung gestellt. Die spezifische Wirkung von ATRA wurde zur Kontrolle auch in einer primären humanen Schwannzelllinie (HSC) von ScienCell untersucht.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Medien

Standard-Medium

DMEM

10 % FBS

1 mM Natrium-Pyruvat

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin/Streptomycin

Schwannzell-Medium (31, 94)

Standard-Medium

0,5 mM IBMX (in 50 % Ethanol)

2 nM β 1-Heregulin (in PBS/0,1 % BSA)

2,5 μ M Insulin (in PBS)

steril filtrieren

Einfriermedium

10 % DMSO/ Standard-Medium

2.5.2 Beschichtung der Kulturflaschen

In 25 cm² Kulturflaschen wurde 0,5 ml 0,01%iger Poly-L-Lysin-Lösung (gelöst in sterilem Wasser) gegeben und 5 min durch vorsichtiges, ständiges Schwanken auf dem Flaschenboden

verteilt. Danach wurden die Kulturflaschen vorsichtig mit sterilem Wasser einmal gespült und zwei Stunden getrocknet.

Laminin wurde in einer Konzentration von 4 µg/ml in sterilem PBS gelöst und in Aliquots für 48 Stunden bei 4 °C gelagert. Für längere Zeit wurden die Laminin-Aliquots bei -20 °C aufbewahrt und vor dem Verbrauch bei Raumtemperatur aufgetaut. Die mit Poly-L-Lysin vorbehandelten Kulturflaschen wurden mit 1,5 ml Laminin-Lösung beschichtet und zwei Stunden bei 37 °C steril inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Laminin-Lösung entnommen und vorsichtig mit sterilem PBS dreifach gespült. Die beschichteten Flaschen wurden sofort verwendet oder mit 4 ml PBS bis zu 3 Tagen bei 4°C aufbewahrt.

2.5.3 Kultivierung von primären Schwanzzellen, Fibroblasten und MPNST-Zellen

Primäre Schwanzzellen wurden in 25 cm² Kulturflaschen mit 5 ml Schwanzzell-Medium im Inkubationsschrank (37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) kultiviert. Die Arbeiten mit den Zellen und Medien wurden im Zellkulturlabor in einer Gewebekulturbank steril durchgeführt. Das Schwanzzell-Medium wurde bei 4°C aufbewahrt und bis zu 3 Wochen verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte 3 Mal pro Woche. Vor dem Gebrauch wurden die Medien und Medienzusätze im Wasserbad bei 37°C aufgetaut bzw. aufgewärmt.

2.5.4 Trypsinierung und Anreicherung von Schwanzzellen

Die primären Schwanzzellkulturen sind Mischzellkulturen, bestehend aus Schwanzzellen und Fibroblasten. Es wurde das unterschiedliche Verankerungsverhalten an die Kulturflaschenoberfläche beider Zelltypen genutzt, um die Schwanzzellpopulation anzureichern. Nach Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml 0,05 % Trypsin für 2 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Wirkung von Trypsin mit 5 ml Standard-Medium blockiert. Im Medium aufgenommene Zellen wurden 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Schwanzzell-Medium resuspendiert, in eine nicht beschichtete 25 cm² Kulturschale ausgesät und 20 min bei 37 °C inkubiert. Da die Fibroblasten keine spezielle Beschichtung für das Anwachsen benötigen, hafteten sie in der kurzen Inkubationszeit am Flaschenboden. Bei fehlender Laminin-Beschichtung verankerten sich die Schwanzzellen nicht und blieben daher im Medium gelöst. Die frei schwimmenden Schwanzzellen wurden vorsichtig samt Medium entnommen und in der beschichteten 25 cm² Kulturflasche zur weiteren Inkubation ausgesät. Mit dieser Methode wurden Fibroblasten isoliert und für weitere Versuche selektiv kultiviert. MPNST-Zellen sowie Fibroblasten wurden im Standard-Medium in den 75 cm² Kulturflaschen gezüchtet und nach Standardmethoden passagiert.

2.5.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurde 10 µl aus 1 ml gut resuspendierten Zell-Medium-Gemisch in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Da der Abstand zwischen dem Deckgläschen und dem Objektträger 0,1 mm sowie die Fläche eines Quadrates 1 mm² beträgt, ergibt sich in einem Quadrat ein Volumen von 1 mm x 1 mm x 0,1 mm = 0,1 mm³ (= 0,1 µl). Die Zählung wurde in 4 Quadraten durchgeführt. Es wurde ein Mittelwert der Zellzahl in einem Quadrat gebildet.

Um die Zellzahl in 1 ml zu berechnen, wurde die Anzahl der Zellen pro Quadrat mit dem Volumen von 0,1 µl mit Faktor 10⁴ multipliziert (0,1 µl x 10⁴=1 ml). Um die notwendige Zellzahl bzw. Zellkonzentration zu erreichen, wurde die Zellsuspension entsprechend verdünnt.

2.5.6 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Nachdem die Zellen mit Trypsin behandelt und inkubiert worden waren (2.5.3), wurden sie mit 5 ml Medium resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der anschließenden Zentrifugation (5 min bei 1000 rpm) wurde der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1,8 ml Einfriermedium gelöst und in ein 2 ml Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen wurden bei -80°C in einer Styropor-Schachtel eingefroren, um einen schnellen Temperaturabfall zu verhindern. Für einige Monate wurden die Zellen bei -80 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml erwärmtem Medium gelöst, anschließend 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, und es wurde der Überstand entnommen. Das Zellpellet wurde dann in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Die genannten Arbeitsschritte wurden ohne Verzögerung durchgeführt, um das Einfriermedium sofort zu entfernen und somit die zytotoxische Wirkung von DMSO zu vermeiden. Am Folgetag wurden die Zellen zur Verankerungskontrolle mikroskopiert sowie das Medium gewechselt, um die abgestorbenen und nicht angewachsenen Zellen zu entfernen und DMSO-Reste auszuwaschen.

2.6 Behandlung mit ATRA

2.6.1 Zubereitung der Lösungen und Arbeiten mit ATRA

ATRA ist wasserunlöslich, licht-, wärme-, luftsensitiv und in höheren Konzentrationen zytotoxisch. Die Arbeiten mit ATRA wurden daher bei Raumtemperatur abgedunkelt durchgeführt, wobei stets Kittel, Mundschutz und Handschuhe getragen wurden. ATRA wurde

in 100 % Ethanol gelöst und als 0,01 M (3mg/ml) Lösung sowie als 0,01 mM Arbeitslösung bei -70 °C bis zu einem Jahr dunkel aufbewahrt. Vor der Behandlung wurde die Arbeitslösung bei Raumtemperatur aufgetaut und vorsichtig geschüttelt. Die Arbeitslösung wurde mit dem erwärmten Medium auf entsprechende Konzentrationen (siehe 2.6.2) verdünnt.

2.6.2 Behandlungskonditionen

Die effektivsten Behandlungskonditionen wurden anhand messbarer relevanter Veränderungen der Zellmorphologie und Zellvitalität unter ATRA-Behandlung etabliert, wobei die Morphologie der Zellen mikroskopisch beurteilt und die Zellvitalität mittels XTT Proliferation Assay gemessen wurde. Folgende ATRA-Konzentrationen wurden zur Zellbehandlung verwendet: 0,05 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M sowie 5 μ M. Die Arbeitslösung wurde mit dem Medium auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt, sodass die Endkonzentration von Ethanol 0,1 % betrug. Die Kontrollzellen wurden entsprechend mit einer 0,1%-igen Ethanol-Medium-Lösung behandelt, welche keine Beeinträchtigung in den Zellen erkennen ließ.

Zur Behandlung mit ATRA wurden die primären Zellen nach der 4. Passage sowie MPNST-Zelllinien verwendet. Vor der Behandlung befanden sich die Zellen mindestens eine Woche in Kultur. Vor der Behandlung wurden die primären Zellen trypsiniert (siehe 2.5.3), gezählt und im Schwanzzell-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine mit Laminin beschichtete 96-Loch-Platte in einer Endkonzentration von 10^4 Zellen /100 μ M Medium pro Loch ausgesät und über Nacht im Brutschrank zum Anwachsen inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und anschließend das Behandlungsmedium (ATRA bzw. Ethanol, gelöst im Medium) in entsprechenden Konzentrationen zugefügt.

Es wurden pro Konzentrationsreihe jeweils 3 Versuchsansätze und 1 Kontrollansatz für jede Messungsmethode verwendet. Die 96-Loch-Platte wurde mit Alufolie im Brutschrank abgedunkelt inkubiert. Das Behandlungsmedium wurde jeden 2. Tag gewechselt. Nach 7 Tagen der Behandlung mit ATRA wurden Messungen der Zellvitalität und Zellproliferation durchgeführt.

2.7 Immunhistochemie

2.7.1 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper:

anti-CRABP2-Maus-Antikörper (Professor Pierre Chambon, Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Strasbourg, France, 1:1000)

anti-CRABP2-Ziegen-Antikörper (SantaCruz, 1:250)

anti-S-100-Kaninchen-Antikörper (DAKO, 1:500)

anti-PMP22-Kaninchen-Antikörper (Abnova, 1:500)

anti-CD90-Maus-Antikörper (DIANOVA, 1:50)

anti-bcl2-Kaninchen-Antikörper (Invitrogen, 1:100)

Sekundäre Antikörper:

Alexa Fluor 488 anti-Maus- /anti-Kaninchen -Antikörper (Invitrogen, 1:100)

Cy3-konjugierte anti-Kaninchen-/ anti-Maus-/ anti-Ziegen-Antikörper (DIANOVA, 1:100)

Cy2-konjugierte anti-Kaninchen/anti-Maus--Antikörper (DIANOVA, 1:50)

Zielprotein	Zellpopulation	Lokalisation	Funktion
S100	Schwanzzellen, Gliazellen, Adipozyten, Melanozyten, Chondrozyten	Zytoplasma/ Zellkern	Bindung von Calcium, Hemmung der Mikrotubuli-Aggregation, Induktion der Phosphorylierung von Proteinkinase C
Glycosylphosphat-inositol-verankertes Glykoprotein (CD90)	Fibroblasten, Neurone, Endothelzellen, mesenchymale Stammzellen	Zytoplasma	T-Zellaktivierung, Beteiligung an der Zelladhärenz, axonalem Wachstum, Zellmigration, Zelltod, Tumorwachstum
Cellular retinoic acid binding protein (CRABP2)	Fibroblasten, Hautepithelzellen, Embryonalzellen	Zytoplasma	Interaktion mit der ATRA-Rezeptoren, Vermittlung der Stimulation von ATRA abhängigen Genen
B-cell lymphoma 2 (bcl2)	alle Zelltypen	Zytoplasma	Regulation des programmierten Zelltods
Promyelozytisches Protein 22 (PMP22)	Myelinisierende Schwanzzellen	Zytoplasma	Bestandteil der Myelinscheide von Nerven

Tabelle 2. Kurzcharakteristik der Zielproteine

Fluorochrom	Absorption, maximal (nm)	Emission, maximal (nm)	Bereich sichtbaren Spektrums
Alexa Fluor 488	495	519	grün
Cy2 (Carbocyanin),	492	508	grün
Cy3(Indocarbocyanin)	550	570	rot
DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindol)	358	461	blau

Tabelle 3. Kurzcharakteristik der fluoreszierenden Marker

2.7.2 Prinzip der Fluoreszenzfärbung

Die Erkennung bzw. Sichtbarmachung der untersuchten Proteine erfolgte mittels der Fluoreszenzfärbung bzw. -mikroskopie. Sie ist prinzipiell die effektivste Methode der Lichtmikroskopie zur Lokalisation von Proteinen, zur Feststellung von Interaktionen mit anderen zellulären Komponenten, sowie zur Visualisierung von Wechselwirkungen in lebenden Zellen. Sie basiert darauf, dass eine chemische Verbindung fluoresziert, wenn sie Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert und daraufhin sichtbares Licht mit einer bestimmten längeren Wellenlänge wieder aussendet.

Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz besteht in der Fixierung der Zellen auf einem Objektträger, einem darauf folgenden Antikörpernachweis, sowie einer anschließenden Detektion mit einem Sekundärantikörper, an dem ein fluoreszierender Marker (Fluorochrom) gekoppelt ist. Die Fluorochrome, die bei den folgenden Fluoreszenzfärbungen verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Verwendet man bei einer Probe zwei (Doppelmarkierung) oder mehrere Fluorochrome (Mehrfachmarkierung), die bei verschiedenen Wellenlängen fluoreszieren, können gleichzeitig mehrere Zielproteine erkennbar gemacht und mögliche Zusammenhänge oder Wechselwirkungen detektiert werden.

Um die Zellpopulationen (Schwanzzellen, Fibroblasten) in einer primären Zelllinie zu identifizieren und den Anteil der Schwanzzellen darin zu bestimmen, wurden Einfachmarkierungen gegen S-100 sowie Fibroblastenmarker CD90 durchgeführt. Mit der gleichen Methode wurde das Expressionsverhalten des proapoptotischen Proteins bcl2 unter ATRA-Behandlung untersucht. Die CRABP2-Expression in Schwanzzellen bzw. Fibroblasten wurde mittels einer Doppelmarkierung detektiert. Die Charakteristika einzelner Zielproteinen sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

2.7.3 Doppelmarkierungen auf den Gewebeschnitten (gegen S100 bzw. CD90 und CRABP2)

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden auf einem Objektträger platziert und in folgender Lösungsreihe entparaffiniert: Xylol (3 x 3 min), 100 % Ethanol (3 x 3 min), 90 % Ethanol (2 x 3 min), 80 % Ethanol (3 x 3 min), 70 % Ethanol (1 x 3 min), 50 % Ethanol (3 x 3 min), Aqua dest (2 x 3 min). Um die Bindung des Fibroblastenmarkers CD90 zu optimieren, wurden die entparaffinierten Gewebeschnitte zusätzlich in Citrat-Puffer (pH 6,0) in der Mikrowelle bei 600 Watt 10 min gekocht. Zunächst wurde auf den entparaffinierten Gewebeschnitten 20 min das Ziegen-Normalserum (1:50) inkubiert, um den

Hintergrund zu blockieren. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem ersten primären CRABP2-Maus-Antikörper (1:1000) benetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem anschließenden Spülgang mit PBS erfolgte die Markierung mit dem ersten sekundären Cy3-konjugierten Anti-Maus-Antikörper (1:100) durch eine Inkubationszeit von 60 min. Nach einem erneuten PBS-Waschgang wurde der zweite primäre anti-S-100-Kaninchen-Antikörper (1:500) bzw. anti-CD90-Maus-Antikörper auf die Schnitte aufgetragen und 120 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die mit dem PBS-Puffer gewaschenen Schnitte entsprechend der Spezies des zweiten primären Antikörpers mit dem zweiten sekundären Cy2-gekoppelten Antikörper (1:50) behandelt. Zusätzlich wurde diesem Ansatz das DAPI-Farbstoff hinzugefügt, sodass im gesamten Ansatzvolumen eine Verdünnung von 1:50 resultierte. Die Inkubationszeit des Gesamtansatzes auf dem Schnitt betrug 60 min. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte eingedeckelt, mit farblosem Nagellack versiegelt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

2.7.4 Einfache Fluoreszenzfärbungen in den Zellkulturen

Die Zellen wurden in beschichteten 8-Kammer-Objektträgern (Chamber-Slides) mit ATRA behandelt (siehe 2.6.2). Nach 7 Tagen der Behandlung wurde das Medium abgenommen und mit PBS vorsichtig gewaschen. Danach wurden die Zellen 10 min mit eiskaltem Methanol fixiert und anschließend 10 min getrocknet. Nach der Fixierung wurden die Zellen entweder gleich gefärbt oder bis zu einem späteren Zeitpunkt bei -20°C aufbewahrt.

Die vorbehandelten Zellen wurden zunächst mit 2%igem Milchpulver/PBS für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der primäre Antikörper (siehe 2.7.1 und Tabelle 3) für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreifach mit PBS gewaschen. Es folgte die lichtgeschützte Inkubation mit dem Fluorochrom-konjugierten sekundären Antikörper (siehe 2.7.1) für 60 min, der gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichtet war. Nach diesem Schritt wurde der sekundäre Antikörper dreifach mit PBS ausgewaschen. Die Kammern wurden entfernt, der Objektträger mit DAPI-Eindeckmedium eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die gefärbten Zellen wurden bis zum Mikroskopieren lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

2.7.5 Mikroskopie

Die gefärbten Gewebeschnitte (siehe 2.7.4) wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica) bei 20- und 40facher Vergrößerung mikroskopiert. Die mikroskopierten Bilder wurden mit der Kamera DFC490 und dem entsprechenden Computerprogramm „Leica Application Suite“

aufgenommen und anschließend mithilfe des Computerprogramms Adobe Photoshop (Version 6) überlagert. Die Analyse der gefärbten Zellen (siehe 2.7.5) erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Observer (Zeiss) bei 40facher Vergrößerung. Zur Bearbeitung der Bilder wurde die entsprechende Software AxioVision verwendet.

2.8 Messung der metabolischen Aktivität und Proliferation der Zellen

Um die Wirkung von ATRA auf die Vitalität und Proliferation von den benignen und malignen NF1-assoziierten Tumorzellen zu prüfen, wurden diese ohne sowie unter Behandlung mit ATRA mittels XTT Proliferation Assay (Invitrogen) sowie BrdU Cell Proliferation ELISA (Roche) untersucht und verglichen.

Die Versuche wurden mit zwei primären kutanen (1824, 1819), einer plexiformen (1754) Zellkultur, sowie drei MPNST-Zelllinien (T265, S462, NSF19) durchgeführt. Um die mögliche Spezifität der Behandlung gegen Tumor-Schwanzzellen zu prüfen, wurden normale primäre Schwanzzellen ebenfalls behandelt und untersucht.

2.8.1 Zellpräparation und Zellbehandlung

Die Zellen wurden nach der 4. Passage trypsiniert und gezählt. 10^4 Zellen wurden pro Loch auf die 96-Lochplatte pipettiert und 24 Stunden bei 37 °C zur Zelladhäsion inkubiert. Nach dem Mikroskopieren der Zellen und erfolgreicher Adhäsion, sowie etwa gleicher Konfluenz erfolgte die 7tägige Behandlung der Zellen mit 0,05 µM, 0,5 µM, 1 µM, 5 µM ATRA. Die Kontrollzellen wurden mit 0,1 % Ethanol, wie im Abschnitt 2.6.2 bereits beschrieben, parallel und unter identischen Bedingungen behandelt. Nach dem 7. Tag der ATRA-Behandlung wurden die Zellen mit Hilfe eines Proliferation Assays analysiert, die simultan auf einer 96-Lochplatte durchgeführt wurden.

2.8.2 XTT Proliferation Assay

Der XTT Proliferation Assay basiert auf der Fähigkeit der metabolisch aktiven Zellen aus gelbem Tetrazolium-Salz XTT eine orange Formazanlösung zu bilden. Der Gehalt des orangenen Formazanstoffes kann mittels Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines ELISA Readers quantifiziert werden, dabei korreliert er direkt mit der Menge der lebenden Zellen bzw. der Zellvitalität. Nach dem 7. Tag der Behandlung wurde zu den Zellen die XTT-Farblösung (Endkonzentration 0,3 mg/ml XTT) dem Medium hinzugefügt, welche aus einem

Elektronenkoppler und XTT-Farbreagenz vorbereitet wurde. Nach 60minütiger Inkubation (37 °C) wurde die Absorption des gebildeten Formazanstoffes bei einer Wellenlänge von 450nm mittels TECAN Infinite M200 gemessen. Es wurden mindestens zwei unabhängige Versuche mit mindestens 3 Ansätzen durchgeführt. Das Ergebnis wurde als durchschnittlicher Wert mit der Angabe des Standardfehlers (engl. standard error of the mean, SEM) angegeben. Die Messwerte der behandelten Zellen sind auf die Messwerte der Kontrollzellen bezogen und entsprechen prozentualen Anteilen.

2.8.3 BrdU Cell Proliferation Assay

Der BrdU Proliferation Assay wird zur Quantifizierung der Zellproliferation verwendet. Bei diesem Verfahren wird die Menge der in die DNA eingebauten 5-Bromo-2-Deoxyuridine (BrdU) spektrophotometrisch gemessen. Dabei kann eine Aussage über das Ausmaß der DNA-Synthese und somit über die Zellproliferation geliefert werden.

Für den Versuch wurden die Reagenzien aus dem BrdU Proliferation Assay Kit verwendet, es wurde die Anweisung für adhärenente Zellen angewandt. Am 7. Tag der Behandlung mit ATRA wurde die BrdU-Farblösung (Endkonzentration 10 µM BrdU) dem Schwanzzell-Medium hinzugesetzt. Es folgte eine Inkubation über 24 Stunden bei 37 °C. Danach wurde das Medium entnommen. Die Schwanzzellen wurden 30 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend 90 min mit der Anti-BrdU-Peroxidase-Lösung inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen dreifach mit dem Spülpuffer gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit der Substratlösung. Nach exakt 10 min wurde die photometrische Messung der entstandenen blauen Farblösung bei einer Wellenlänge von 370 nm am TECAN Infinite M200 durchgeführt.

2.9 Messung von programmiertem Zelltod und Zelldifferenzierung

Um die Wirkung von ATRA auf NF1-assoziierte Tumoren zu untersuchen, wurden der proapoptotische Effekt sowie Merkmale der Differenzierung in den ATRA-behandelten und unbehandelten humanen MPNST-Zelllinien mittels Fluoreszenz-aktivierter Durchflusszytometrie sowie Immunzytochemie analysiert und verglichen.

2.9.1 Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie (FACS)

Für die FACS-Messungen werden Zellen einer Zellsuspension mit Antikörpern wahlweise gegen Oberflächenmarker oder intrazelluläre Strukturen markiert. Die Antikörper sind an

Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, die im FACS-Gerät mit einem Laser angeregt werden. Die einzelnen Zellen werden anhand der Lichteinstreueigenschaften sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung charakterisiert.

Durch Einsatz von Lasern mit verschiedenen Spektren und Filtern kann die Anzahl unterschiedlich markierter Antikörper und somit die Informationsdichte der Zellanalyse erhöht werden, z.B. wurden die Zellen in diesem Versuch mit dem FACS-Gerät CantoII (BD) analysiert, welches die Detektion von bis zu 7 Fluoreszenzfarben ermöglicht.

2.9.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension

Die MPNST-Zelllinien S462, T265, NSF1 wurden 7 Tage mit 5 μM ATRA in 75 cm^2 Kulturflaschen behandelt, was sich als effektivste Behandlungsoption anhand der Proliferationsmessung herausgestellt hatte (siehe 3.7). Die Kontrollzellen wurden lediglich mit 0.1 % Ethanol behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 2 min mit 0.05 % Trypsin behandelt. Die Trypsin-Zellsuspension wurde anschließend mit Standardmedium gewaschen und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und mittels Neubauerkammer gezählt. $1-2 \times 10^7$ Zellen wurden in 0,5 ml PBS resuspendiert, in 5 ml 1% Paraformaldehyd gegeben und 15 min auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g für 5 min zentrifugiert, in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und die Zellen in 0,5 ml PBS aufgenommen und in 5 ml eisgekühltem, 70%igem Ethanol über Nacht bei -20°C permeabilisiert.

2.9.3 ApoBrdU TUNEL Assay

Zur Färbung von apoptotischen Zellen wurde der APO-BrdU-TUNEL Assay Kit verwendet. Die Färbung basiert auf der Fähigkeit der exogenen terminalen Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT), die zahlreiche 3'-OH-Gruppen der DNA-Fragmente, die in der letzten Apoptosephase der Zelle entstehen, als Startpunkt zu nutzen, um das Deoxythymidin-Analogon 5-Bromo-2-Deoxyuridin-5-Triphosphat (BrdUTP) unabhängig einzubauen. Nach der Inkorporation in die DNA wurden die BrdU-Triphosphate mit Fluorochrom-konjugierten Anti-BrdU-Antikörpern markiert. Diese Färbemethode von DNA-Bruchstücken ist unter anderem als Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) bekannt.

Die fixierten Zellen (siehe 2.9.2) wurden 5 min bei 300 x g zentrifugiert, wonach der Überstand entnommen wurde. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Spülpuffer gewaschen, 5 min bei 300 x g zentrifugiert, das Zellpellet in 50 μl DNA-Färbelösung (10 μl Reaktionspuffer, 0,75 μl

TdT-Enzym, 8,0 µL BrdUTP, 31,25 µL destilliertes Wasser) vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden 60 min bei 37 °C inkubiert und alle 15 min vorsichtig geschwenkt. Nach dem Färbvorgang wurde der Zellsuspension 1 ml Spülpuffer zugegeben und diese 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach in 95 µl Spülpuffer mit 5 µl Alexa Fluor 488 gekoppelten anti-BrdU-Antikörper resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde innerhalb von maximal 3 Stunden eine durchflusszytometrische Messung, sowie eine Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Als Kontrolle wurden die apoptotischen und nicht-apoptotischen Lymphozyten (Bestandteil des ApoBrdUTUNEL Assay Kit) mitgeführt und gefärbt.

2.9.4 Immunzytochemische Markierungen

Zur Messung von Differenzierungsprozessen der Schwanzzellen wurden diese mit polyklonalen Antikörpern gegen die Proteine S100 und PMP22 immunzytochemisch gefärbt.

Nach dem Zentrifugieren der Zell-Ethanol-Suspension (siehe 2.9.2) wurden die Zellen mit 1 ml Waschpuffer aus dem ApoBrdU TUNEL Assay Kit gewaschen und 5 min bei 300 x g erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen. Jede Zellprobe wurde mit 50 µl Färbelösung mit einem primären Antikörper (anti-S-100-Kaninchen bzw. anti-PMP22-Kaninchen-Antikörper) in einer Verdünnung 1:1000 vorsichtig resuspendiert und bei 37 °C für 60 min inkubiert. Alle 15 Minuten wurden die Proben leicht geschüttelt. Nach dem anschließenden Waschen mit 1 ml Spülpuffer wurde die Zellsuspension 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in der 100µl Lösung mit Spülpuffer und dem sekundären Alexa Fluor 488 gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper (1:100) resuspendiert. Nach einer 30-minütigen lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Analyse.

2.9.5 Messungen und Analyse der markierten Proben

Die markierten Zellen (siehe 2.9.4) wurden in Suspension mit einem FACS-Gerät (CantoII, BD) analysiert. Es wurden von jeder Zellprobe 10.000 Zellen zur Messung aufgenommen. Für jede Zelllinie wurden 2 bis 3 unabhängige Experimente durchgeführt.

Die TUNEL-gefärbten Zellen wurden zusätzlich mittels Fluoreszenzmikroskopie mit dem Axio Observer Mikroskop (Zeiss) analysiert. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension nach der Färbung auf einen Objektträger pipettiert, mit 10µl DAPI-Eindeckmedium gemischt und eingedeckelt.

2.10 Messung der CRABP2-Expression unter ATRA-Behandlung

Die Veränderungen der CRABP2-Expression unter ATRA-Behandlung wurden mittels quantitativer Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR) in behandelten und unbehandelten Zellen gemessen und untereinander verglichen. Die für die Messung benötigte RNA wurde aus den behandelten Zellen mittels Trizol Reagent isoliert.

2.10.1 Quantitative real-time-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Die Real-Time-quantitative-PCR ist eine Methode, die neben der Vervielfältigung der Nukleinsäuren mittels der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen in der exponentiellen Phase der PCR durchgeführt, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt.

Zur Quantifizierung der DNA werden Farbstoffe (z.B. SYBR Green), Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)- Sonden (z. B. TagMan-, LoopTag-Sonden, Molecular Beacons etc.) sowie LUX-Primer verwendet. Die TagMan-Sonde, die in dieser Arbeit angewandt wurde, ist an einem Ende mit einem Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Donor-Fluorochrom) markiert. Die Taq-Polymerase, besitzt neben einer Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität und kann somit die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbauen. So entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander, wobei es zu einer ansteigenden Fluoreszenz des Reporters kommt, die gemessen werden kann.

Man unterscheidet zwei Quantifizierungsmethoden der qRT-PCR, absolute und relative. Die absolute Quantifizierung wird zur Ermittlung der Kopienzahl des Zieltranskriptes verwendet und wird anhand einer gegebenen Kalibrierkurve durchgeführt, basierend auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR Produkten. Die relative Quantifizierung beschreibt die Veränderungen der Expression des Zielgenes, bezogen auf ein nicht reguliertes „Housekeeping Gen“ (z.B. Aktin, GAPDH) als eine interne Kontrolle. Die Berechnung der Expressionsunterschiede eines Zielgenes erfolgt meistens mit Hilfe einer Standardkurve oder nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode.

Berechnung nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode

Die unterschiedliche Expression wurde in dieser Arbeit als n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wertes angegeben. Der CT-Wert (engl. Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus) bzw. der CP-Wert (engl. Crossing Point) beschreibt den Zyklus, in dem der signifikante Fluoreszenz-Anstieg über der Hintergrund-Fluoreszenz detektiert wird. Dabei wird im ersten Schritt für jede

untersuchte Probe der CP-Wert des Referenzgens vom CP-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta\text{CP} = \text{CP Zielgen} - \text{CP Referenzgen}$). Nach dieser Normierung wird vom ΔCP Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCP Wert einer Kontrolle abgezogen (ΔCP); man kommt zum sog. „delta-delta CT“ Berechnungsmodell ($\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP Behandlung} - \Delta\text{CP Kontrolle}$). Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}} \quad (62).$$

2.10.2 RNA-Isolierung mit Trizol Reagent

Die primären Schwanzzellen 1819, 1754, 1827 sowie die MPNST-Zellen NSF, S462 und T265 wurden in 25 cm² Kulturflaschen mit 5 μM ATRA sowie die Kontrollzellen mit 0,1% Ethanol behandelt. Nach 7tägiger Behandlung wurde die RNA-Isolierung mittels Trizol Reagent durchgeführt. Das Reagenz ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, welche eine Zerstörung und Auflösung der Zellkomponenten bewirkt, dabei aber die RNA der Zellen schont. Da die Trizollösung toxisch ist, wurde die RNA-Isolierung unter der Abzugshaube durchgeführt. Den behandelten Zellen wurde das Medium abgenommen und sie wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 800 μl Trizol Reagent für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Zell-Trizol-Gemisch in ein 1,5 ml Reagenzröhrchen überführt. Dann wurde 160 μl Chloroform zugegeben, 15 Sekunden geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die Proben 15 min bei 5 °C bei 12.000xg zentrifugiert. Dabei trennte sich die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase. Die wässrige Phase, in der die RNA gelöst war, wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Zur RNA-Präzipitation wurde 400 μl Isopraponol hinzugefügt. Um die Ausfällung der RNA zu optimieren, wurde der Lösung 10 μg in RNase freiem Wasser gelöstes Glykogen hinzugefügt. Nach der anschließenden 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 10 min bei 5 °C bei 12.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, und das Pellet wurde mit 800 μl 75 % Ethanol gewaschen. Nach der 5minütigen Zentrifugation bei 5 °C und 7.500xg wurde der Überstand abgenommen, und die Proben wurden 5 min getrocknet. Daraufhin wurde das Pellet in 40 μl RNase freiem Wasser aufgelöst und 10 min bei 60 °C inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die RNA-Konzentration, sowie die RNA-Reinheit mittels RNA 6000 Pico Kits (Agilent) am Bioanalyser gemessen. Bis zur Messung wurden die Proben auf Eis gelegt. Erfolgte die Messung nicht unmittelbar nach der Isolierung, wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.10.3 Quantitative real-time-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) mittels TaqMan-Methode

Die qRT-PCR wurde mit Hilfe des TaqMan Universal MasterMix (Applied Biosystems) im StepOnePlus real time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt (Tabelle 5). Als interne Kontrolle wurde die Expression des endogenen GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet (Tabelle 6). Der Expressionslevel der spezifischen mRNA-Sequenzen wurde im Verhältnis zum GAPDH-Level mithilfe $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet (siehe Abschnitt 2.10.1). Die Reaktionen wurden bei einem Totalvolumen von 20 μL mit dem ThermoCycler-Programm durchgeführt (Tabelle 4). Jeder Ansatz enthält 10 μL TaqMan Master Mix, 1 μL Gene Expression Assay (Applied Biosystems) oder 0.4 μM von jedem Primer und 1 μL des cDNA-Templates entsprechend 1-25 ng gesamter RNA, welche für die cDNA-Synthese verwendet wurde.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	50°C	95°C	95°C	60°C
Zeit	2min	10min	15sek	1min
Zyklen	40 Wiederholungen			

Tabelle 4. Das ThermoCycler-Programm der qRT-PCR

Gen	Assay	Hersteller
CRABP2	Gene Expression Assay Hs00275636_m1	Applied Biosystems

Tabelle 5. TaqMan Gene Expression Assay

Gen	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)	Hersteller
GAPDH	F ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	76 RNA	Eurofins
	R CATAACCAGGAAATGAGCTTGACAA		
	P CTGGCATTGCCCTCAACGACCA		

Tabelle 6. Primer-Sequenzen für RT-PCR (F–Forward (vorwärts), R–Reverse (rückwärts), P–Probe).

2.11 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der morphologischen Zellveränderungen sowie der RNA-Expression von CRABP2 nach der ATRA-Behandlung wurde der einseitige t-Test angewandt. Die Expression von PMP22 wurde mittels Wilcoxon-Test statistisch analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von CRABP2 in NF1-assoziierten Neurofibromen

Es wurden insgesamt 80 Gewebeschnitte aus Neurofibromen (n=7) und der Haut (n=3) mikroskopiert. Es wurden 10 Doppelmarkierungen von Dermis mit jeweils 5 Markierungen gegen Fibroblasten- bzw. Schwannzellen und CRABP2, 38 Doppelmarkierungen von Neurofibromen mit Markierungen gegen Schwannzellen und CRABP2 sowie 42 Doppelmarkierungen von Neurofibromen mit Markierungen gegen Fibroblasten und CRABP2 durchgeführt. An alle Doppelmarkierungen wurde anschließend die DAPI-Färbung angeschlossen. Es wurden 225 Bilder von 3 verschiedenen Farbebenen mit der Kamera „Leica Application Suite“ erstellt und mit dem Computerprogramm Adobe Photoshop überlagert. Repräsentative Beispiele der beiden Dreifachmarkierungen sind nachfolgend dargestellt.

Bei den gut gelungenen Mehrfachfärbungen der Schnitte konnte man deutlich die grün leuchtenden Zytoplasmata der Fibroblasten oder der Schwannzellen erkennen. Durch entsprechende Fluoreszenzfiltereinstellungen konnte man weiterhin die rot fluoreszierenden CRABP2-positiven Zellen erkennen. In den Kontrollschnitten der Dermis waren die Drüsengänge und Epithelzellen gut identifizierbar. Durch die DAPI- Färbung der Zellkerne konnten die Zelleiber von Artefakten und unspezifischen Bindungen selektiert werden.

Untersuchung der CRABP2- und S100-Expression in Neurofibromen

Die Doppelmarkierungen der histologischen Schnitte von Neurofibromen mit Antikörpern gegen Schwannzellen (S100), CRABP2 und einer anschließenden Kernfärbung zeigte folgendes Überlagerungsmuster: An Lokalisationen, die reich an grün markierten Schwannzellen waren, fand sich eine geringe Koexpression von S100 und CRABP2, die sich gelb bis orange darstellte (Abbildung 8A, B). Bei der Überlagerung der Ebenen mit der DAPI-Färbung kam es zur Überschneidung von gelb und blau (Expression von S100 und CRABP2 im Kern), sodass eine rosa Farbe resultierte (Abbildung 8). Zahlreiche Schwannzellen zeigten keine Koexpression von CRABP2 (keine Überlagerung mit der CRABP2-Markierung) und blieben grün (Abbildung C). Bei Überschneidung mit der blauen Kernfärbung kam es zu einer hellblauen Farbe in letzteren Zellkernen. Außerdem markierte die DAPI-Färbung blaue Kerne von Zellen, die sich nur mit der roten CRABP2-Markierung anfärben ließen (Zellen ohne S100-Expression, aber mit CRABP2-Expression), wobei die Blau-Rot-Überlagerung zu einer lila Mischfarbe führte. Letztere Zellen stellen somit z.B. CRABP2-exprimierende Fibroblasten dar.

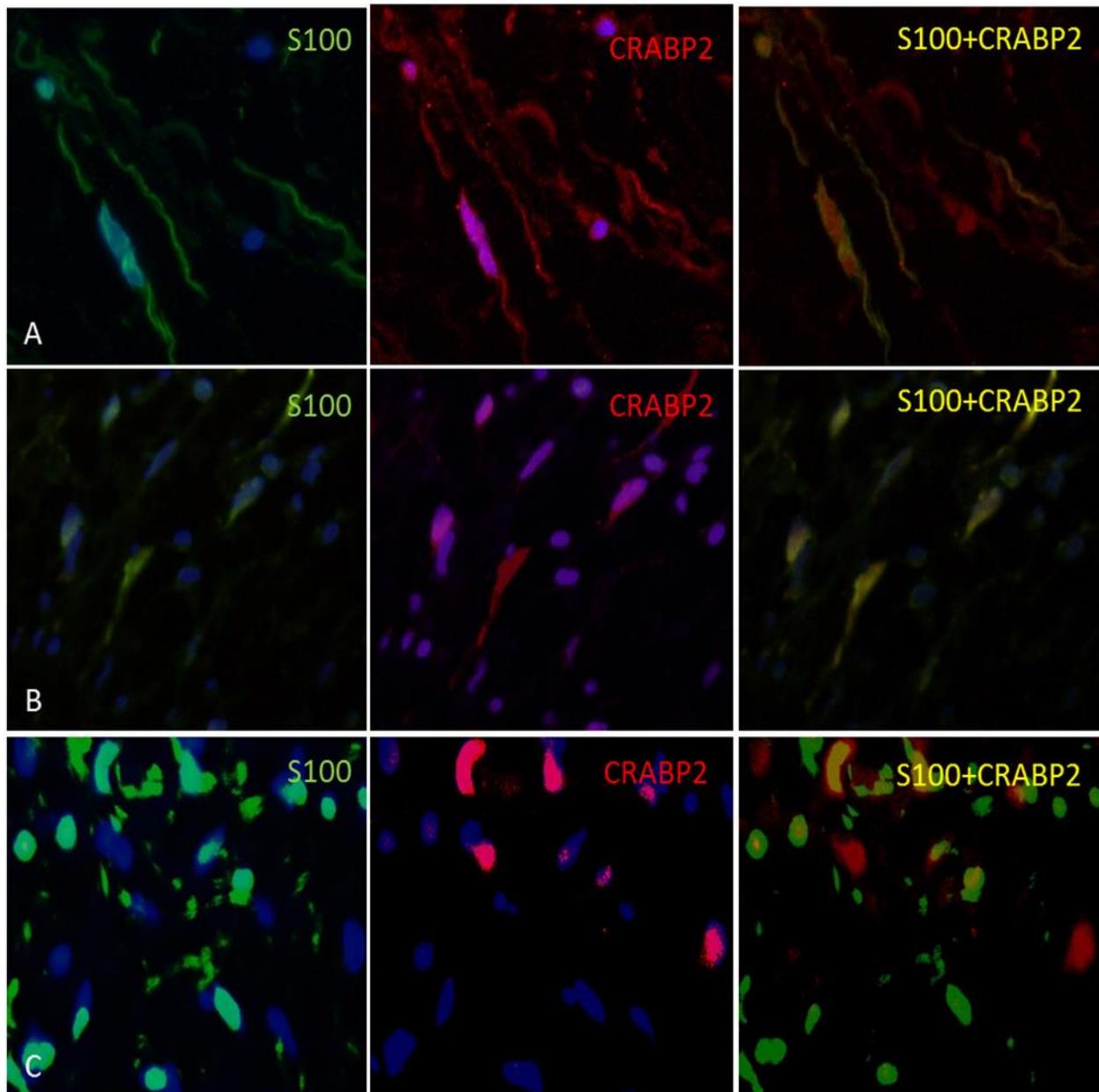


Abbildung 8. Repräsentative Doppelmarkierung gegen S100 der Schwannzellen und CRABP2 in Gewebeschnitten von Neurofibromen.

Die CRABP2-Einfachmarkierungen in den Zellkulturen und Zelllinien zeigten eine unterschiedlich ausgeprägte CRABP2-Expression der Tumorschwannzellen: Die schnell proliferierenden Zellen (plexiforme Zellkultur 1754 und MPNST-Zelllinie T265) zeigten eine Expression des Proteins in einem großen Anteil der Tumorschwannzellen. In den langsamer wachsenden Zellkulturen 1824 und 1772 ließ sich dagegen nur ein kleiner Anteil CRABP2 positiver Tumorschwannzellen nachweisen (Abbildung 9).

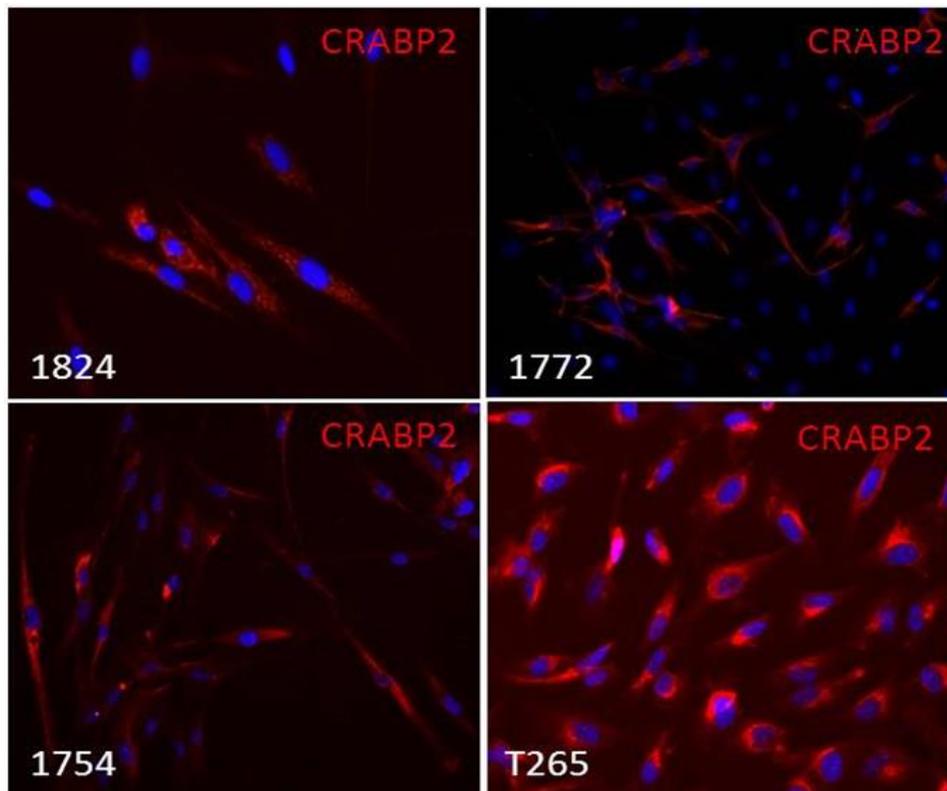


Abbildung 9. Fluoreszenzfärbung gegen CRABP2 in den Zellkulturen.

Untersuchung der CD90- und CRABP2-Expression in Neurofibromen

Die überlagerten Bilder der Schnitte mit der Doppelmarkierung gegen Fibroblasten und CRABP2, sowie der Kernfärbung zeigten folgendes Ergebnis: Die Hauptzahl aller grün fluoreszierenden Fibroblasten (CD90 positiv) ließ sich mit der roten CRABP2-Markierung komplett überlagern und gelb erscheinen, sodass von einer Koexpression auszugehen ist. Es war äußerst selten der Fall, dass der blaue Kern die gelbe Mischfarbe komplett überdeckte. Es fanden sich zusätzlich zahlreiche, nicht überlagerte blaue Kerne (Zellen ohne CD90 und ohne CRABP2-Expression), die unter anderem Schwannzellen zugeordnet wurden (Abbildung 11A).

Untersuchung der CD90- und CRABP2-Expression in der normalen Haut

Die Doppelmarkierungen in der Haut gegen CD90 und gegen CRABP2 zeigten eine deutliche Koexpression in den dermalen Fibroblasten, wobei sich alle grün markierten Fibroblasten mit der roten CRABP2-Markierung überlagerten und sich gelb darstellten (Abbildung 11B). Die Zellen der Hautanhangsgebilde blieben rot und somit nur mit CRABP2-Markierung, ohne dass sich eine CD90- Expression zeigte (Daten sind nicht gezeigt).

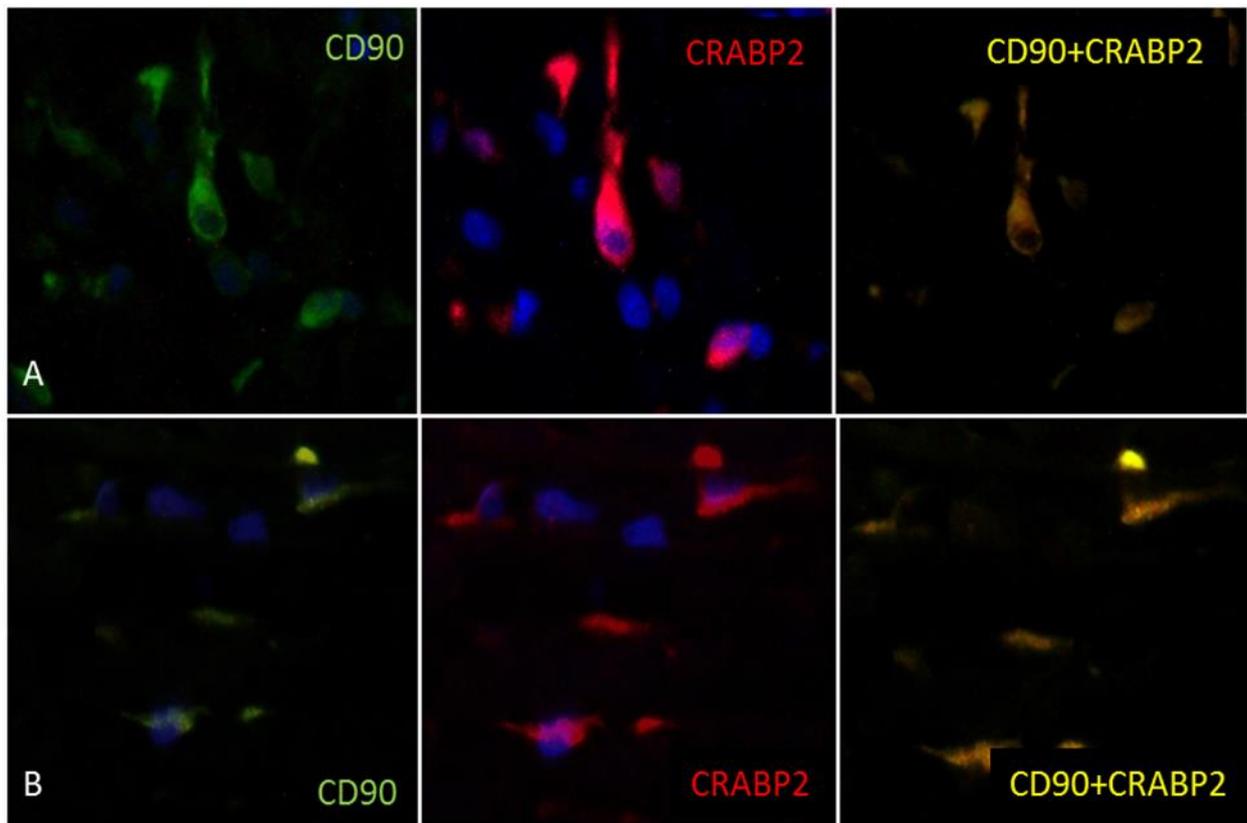


Abbildung 11. Doppelmarkierung gegen CD90 der Fibroblasten und CRABP2 in Gewebeschnitten.

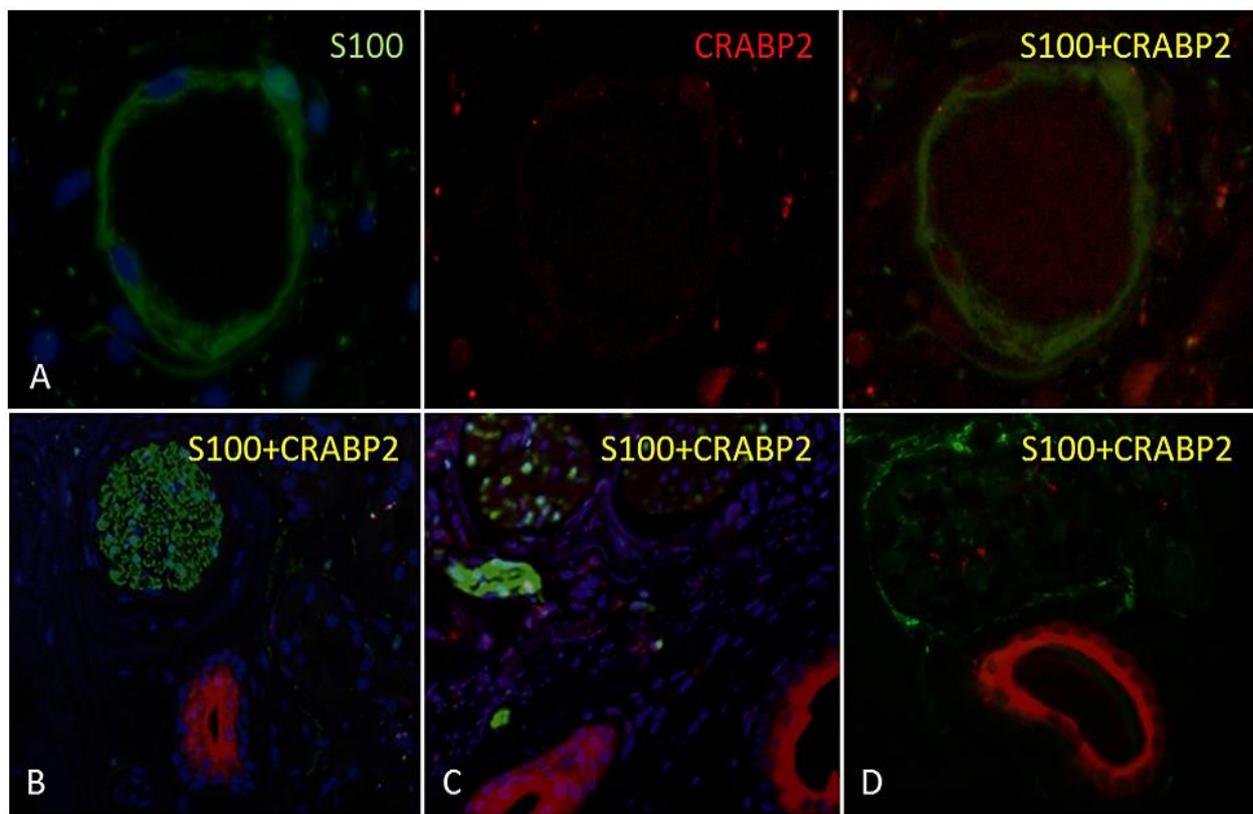


Abbildung 10. Kontrollschnitte der Dermis

Untersuchung der CRABP2- und S100-Expression in der normalen Haut

Die Mehrfachfärbung gegen S100 der Schwannzellen, gegen Kerne und gegen CRABP2 aller untersuchten Hautschnitte ließ keine Koexpression (Abbildung 10 A) erkennen: es fanden sich grüne S100-positive Schwannzellen (hauptsächlich in kleinen peripheren Hautnervenästen) und rote CRABP2-positive Hautanhangsgebilde, die dadurch gleichzeitig als interne Kontrolle einer valider Immunreaktion dienten (Abbildung 10 B-D).

3.2 Kultivierung von Tumor-Schwannzellen

Die primären Schwannzellkulturen wurden nach der 1. Passage übernommen und unter identischen Bedingungen kultiviert und behandelt (siehe 2.5.3). Nach jeder Passage und Isolierung der Fibroblasten wurde die Zellmorphologie lichtmikroskopisch beurteilt sowie der Anteil der Schwannzellen in der Kultur mittels Fluoreszenzfärbung gegen S100 und anschließender Auszählung bestimmt. Zur Auszählung wurden bei 20facher Vergrößerung 10 Gesichtsfelder in den verschiedenen Bereichen des gefärbten Präparats frei gewählt. Die S100 positiven Zellen sowie die DAPI markierten Zellkerne wurden in allen Feldern gezählt und summiert. Der Anteil der S100 positiven Schwannzellen an der Gesamtanzahl der Zellen (Anzahl der Zellkerne) wurde prozentual in der Kultur berechnet.

Die Zellkulturen zeigten folgendes Verhalten: Die Zellen proliferierten unterschiedlich stark. Die kutane Zellkultur 1824 und die plexiforme Zellkultur 1772 wuchsen wesentlich langsamer im Vergleich zu Zellkulturen 1824 (kutane) und 1754 (plexiforme). Alle Tumorzellkulturen zeigten dabei das schnellste Wachstum in der 3. bis 4. Passage. In den weiteren Passagen ließ die Proliferationsgeschwindigkeit deutlich nach. Die sogenannte „normale“ humane Schwannzellkultur ließ sich schwer anzüchten: die normalen Schwannzellen proliferierten sehr langsam und neigten dazu, in der Kultur zwiebelschalenartige Zellkonglomerate zu bilden. Nach der 4. Passage wurde bei diesen ein Wachstumsstopp beobachtet.

Morphologisch stellten sich die Schwannzellen als bipolare längliche Zellen dar (Abbildung 12). Diese ließen sich bei mäßiger Konfluenz von den flachen Fibroblasten mit breiten Zelleibern und mehreren Zellausläufern morphologisch gut abgrenzen (Abbildung 12). Bis auf eine geringe Verbreiterung der Zelleiber ließen sich in der Lichtmikroskopie bis zur 4. Passage keine wesentlichen morphologischen Veränderungen nachweisen. In den höheren Passagen wurden die Schwannzellen breiter und flacher, was die Unterscheidung von den Fibroblasten erschwerte.

Die Anzahl an Schwannzellen in der Kultur stieg mit jeder Passage bzw. nach jeder Fibroblastenselektion, sodass deren Anteil in allen Zellkulturen in der 3. bis 4. Passage durchschnittlich über 95% betrug.

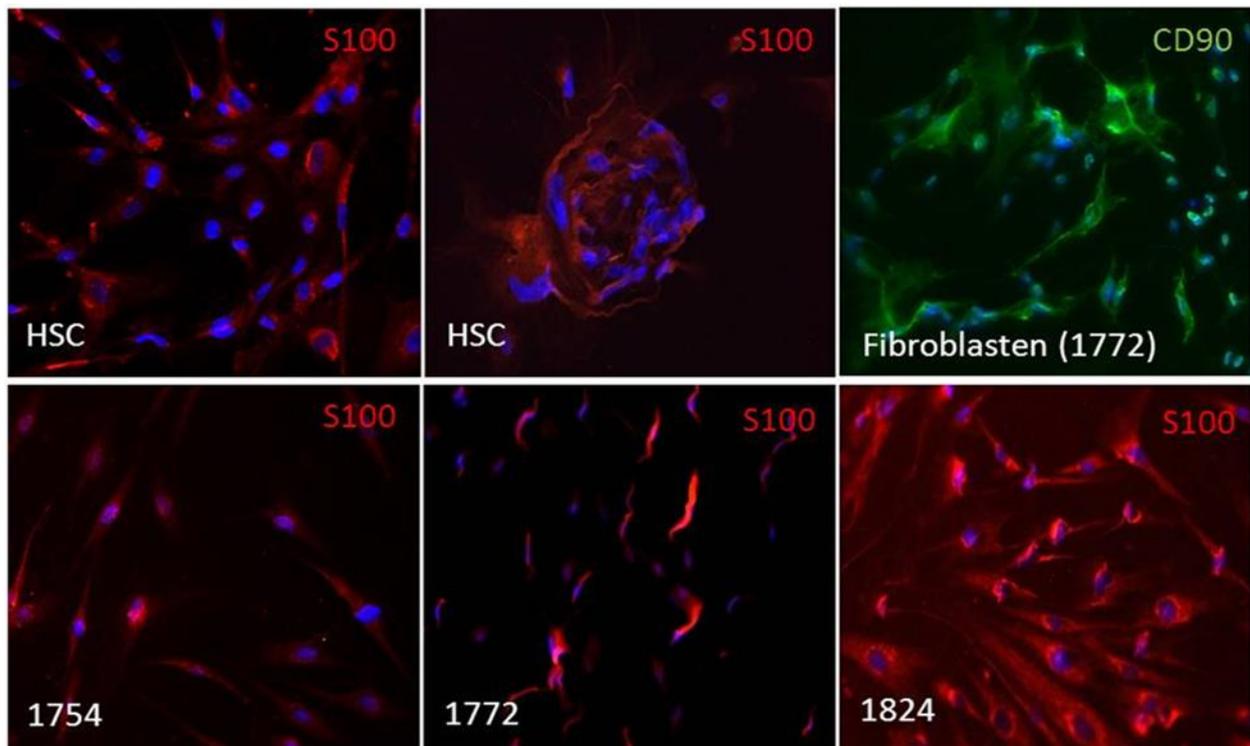


Abbildung 12. Fluoreszenzfärbung gegen S100 und CD90 bei 20facher Vergrößerung der Zellkulturen nach der 3. Passage. Man erkennt einen hohen Anteil an bipolaren Schwannzellen (S100 positiv).

Um die Messversuche optimal, effektiv und aussagekräftiger zu gestalten, wurden hierzu die Schwannzellkulturen erst nach der 3. bis 4. Passage verwendet (stärkste Proliferation, keine morphologischen Veränderungen und hoher Prozentsatz der Schwannzellen).

3.3 Antiproliferative Eigenschaften von ATRA

Nach 7-tägiger Behandlung der primären Zelllinien 1819, 1824, 1754, 1772 sowie der MPNST-Zelllinien T265, S462, NSF1 mit ATRA in verschiedenen Konzentrationen (0,5 μM , 1 μM , 5 μM) wurde die metabolische Aktivität bzw. Zellvitalität mittels XTT Proliferation Assay sowie die Zellproliferation mittels BrdU Proliferation Assay parallel gemessen und mit den Messwerten der Kontrollzellen verglichen. Die Zelllinien zeigten ein unterschiedliches Ansprechen auf die ATRA-Behandlung mit unterschiedlich ausgeprägter Reduktion der Zellaktivität und Zellproliferation bei verschiedenen effektiven Dosen.

Primäre Zelllinien aus den kutanen Neurofibromen wiesen folgende Veränderung unter der Therapie auf: Die Zellkultur 1819 zeigt eine Hemmung der Zellaktivität nach Behandlung mit allen ATRA-Konzentrationen bei 0,5 μM um 19 %, bei 1 μM um 11 % und bei 5 μM um 13 %. Bei der Zellkultur 1824 wurde ein besseres Ansprechen auf die Therapie beobachtet: bei 0,5 μM

um 25 %, bei 1 μM um 17 %, bei 5 μM um 23 % (Diagramm 1A). Zusammenfassend zeigt sich ein maximales Ansprechen in beiden kutanen Zelllinien unter der Therapie mit 0,5 μM ATRA mit einer Reduktion um durchschnittlich 22% im Vergleich zur Kontrolle. Die Messversuche unter der Behandlung mit niedriger Dosierung von ATRA (0,05 μM) zeigen keine wesentlichen Veränderungen der Zellvitalität in beiden kutanen Zellkulturen (Daten nicht dargestellt). Somit bewirkten die Dosisreduktion sowie die Dosissteigerung des Medikaments keinen besseren Hemmungseffekt auf die metabolische Zellaktivität.

Die Messungen mittels BrdU Proliferation Assay ließen in der kutanen Zellkultur 1819 unter Behandlung mit ATRA bei 1 μM eine maximale Reduktion der Proliferation beobachten, welche bis 18% betrug. Unter Behandlung mit 0,5 μM ATRA zeigen die kutanen Kulturen eine maximale durchschnittliche Hemmung der Zellproliferation um 12% im Vergleich zur Kontrolle (Diagramm 1B).

Die ausführlicher untersuchte plexiforme Zellkultur 1754 zeigte eine dosisabhängige Zellaktivitätshemmung im XXT Proliferation Assay um maximal 32% bei der Behandlung mit 5 μM ATRA sowie eine 42%ige Proliferationssenkung im BrdU Proliferation Assay bei 1 μM ATRA-Konzentration (Diagramm 1C). Exemplarische Einzelversuche mit den zwei weiteren plexiformen Zellkulturen lieferten eine Zellvitalitätsreduktion in der Kultur 1772 um maximal 51% (+/-13%) bei 0,5 μM ATRA, sowie in der Zellkultur 1824,1 um 20% (+/- 8%) bei 5 μM ATRA (Daten nicht dargestellt).

Bei den Messungen mittels XTT Assay stellte sich in allen MPNST-Zelllinien eine Hemmung der Zellvitalität mit unterschiedlicher Ausprägung dar: die Zelllinie S462 reagierte auf die Therapie mit einer Reduktion von 4-14% bzw. mit einem maximalen Effekt unter 0,5 μM ATRA. Die beiden anderen MPNST-Zelllinien zeigten eine stärkere Hemmung mit zunehmender ATRA-Dosis: in den NSF1-Zellen von um 17 % unter 0,05 μM bis um 37% unter 5 μM ATRA sowie in den T265-Zellen von um 6% unter 0,05 μM bis um 31% unter 5 μM ATRA (Diagramm 1D).

Zusammenfassend resultierte die ATRA-Behandlung von MPNST-Zellen im Durchschnitt in einer dosisabhängigen Reduktion der Zellvitalität mit maximaler Inhibition von 25% bei einer ATRA-Konzentration von 5 μM .

Im BrdU Proliferation Assay wurde ein unterschiedliches Ansprechen auf die ATRA-Behandlung mit folgendem Messergebnis beobachtet: In der Zelllinie T265 kam zur maximalen durchschnittlichen Proliferationssenkung von 13% (+/-7%) bei der Behandlung mit 1 μM ATRA. Die mehrmals wiederholten Proliferationsmessungen in der MPNST-Zelllinie S462 zeigten dagegen keine wesentlichen Veränderungen der Zellproliferation im Vergleich zur

Kontrolle. Die beste antiproliferative Medikamentenwirkung wurde in der Zelllinie NSF1 mit dosisabhängiger maximaler Reduktion auf 52% gemessen (Diagramm 1E).

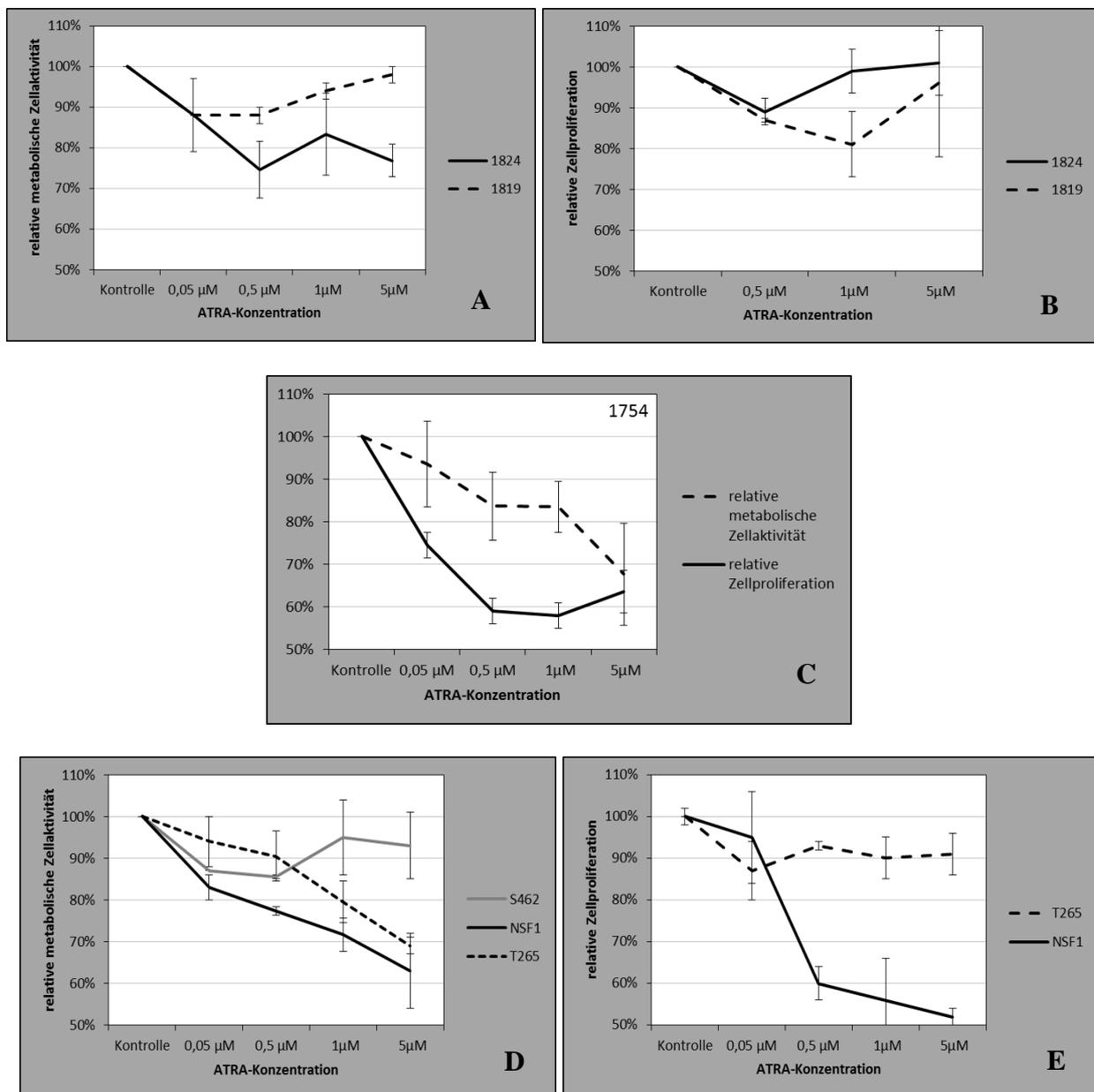


Diagramm 1. A) Die kutanen NF-Zellkulturen ($n=3$) zeigen eine nicht dosisabhängige Reduktion der metabolischen Aktivität sowie B) Proliferationshemmung im Vergleich zur Kontrolle mit maximaler Hemmung bei 0,5 µM bzw. 1 µM ATRA. C). Die plexiforme Zellkultur 1754 zeigt eine dosisabhängige Proliferationshemmung unter der Behandlung mit einem maximalen Effekt bei 1 µM ATRA ($n=3$). D). Es lässt sich eine dosisabhängige Reduktion der Zellaktivität in den MPNST-Zellen T265 und NSF1 demonstrieren ($n=3$). E) Eine deutliche dosisabhängige Hemmung der Proliferation stellt sich nur in der MPNST-Zelllinie NSF1 dar

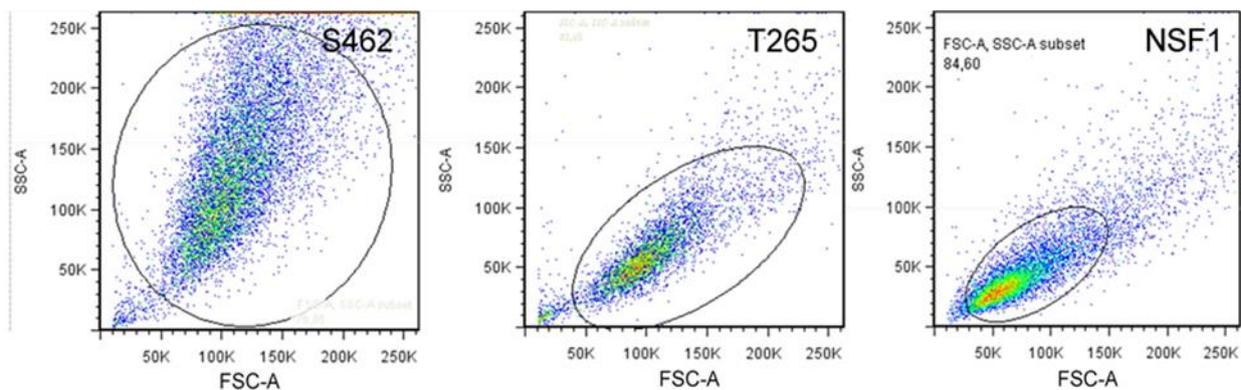
($n=3$). A-E) Die Messwerte sind als prozentualer Anteil bezüglich der Kontrollwerte (100%) mit Angabe des Standardfehlers (\pm -SEM) dargestellt.

3.4 Morphologische Zellveränderungen unter ATRA-Behandlung

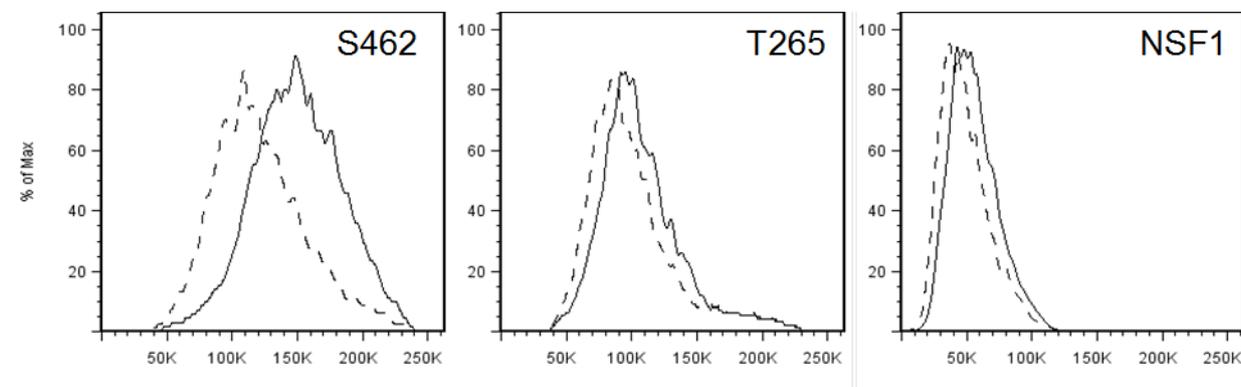
Die MPNST-Zelllinien S462, NSF1 und T265 wurden mittels FACS-Methode nach 7tägiger Behandlung mit 5 μ M ATRA untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen der unbehandelten Zellen verglichen. Auf der Abbildung 13A sind die großen Populationen der Tumorschwanzzellen erkennbar.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *Forward Scatter*) gilt als Maß für die relative Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC, *Sideward Scatter*) ist ein Maß für die Granularität einer Zelle. Sowohl die Messungen von FSC, als auch die Messungen von SSC ergaben signifikant höhere Messwerte der mit ATRA behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 7 und Abbildung 13B-C). Dieses Ergebnis weist somit auf morphologische Veränderungen der Zellen unter Therapie hin (Diagramm 2).

A)



B)



C)

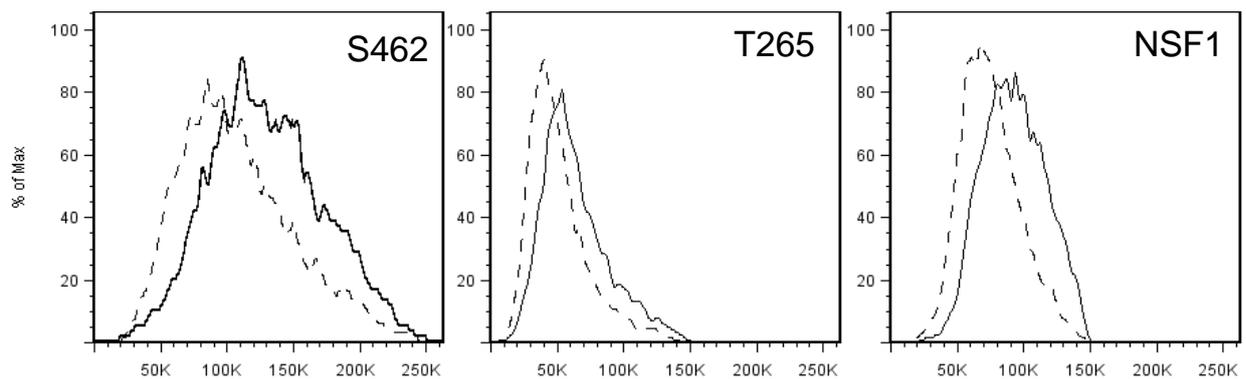


Abbildung 13. A) Dot-Blot-Darstellung der Schwanzzellpopulationen (mit Kreis markiert) in allen Zelllinien. Die Histogramme von FSC (B) und SSC (C) zeigen eine Linksverschiebung der behandelten Zellen (solide Linie) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Strichlinie). Dies deutet auf eine Zunahme von Zellgröße und Zellkomplexität der mit ATRA behandelten Zellen hin.

Zelllinie	Versuch	FSC, geom. Mean/%		SSC, geom. Mean/%	
		Kontrolle	5 μ M ATRA	Kontrolle	5 μ M ATRA
S462	1	14475/100	18086/125	12428/100	15195/122
	2	12393/100	13558/109	11454/100	15285/133
T265	1	13038/100	13642/105	6955/100	7495/108
	2	11904/100	12847/108	5854/100	7345/125
NSF1	1	7817/100	8834/113	5669/100	8973/158
	2	4279/100	5342/125	6553/100	11106/170

Tabelle 7. Messung von FSC bzw. SSC für alle Zelllinien. Die Werte ($n=2$) sind in geometrischem Mean bzw. als relative Werte im Vergleich zur Kontrolle (100%) angegeben.

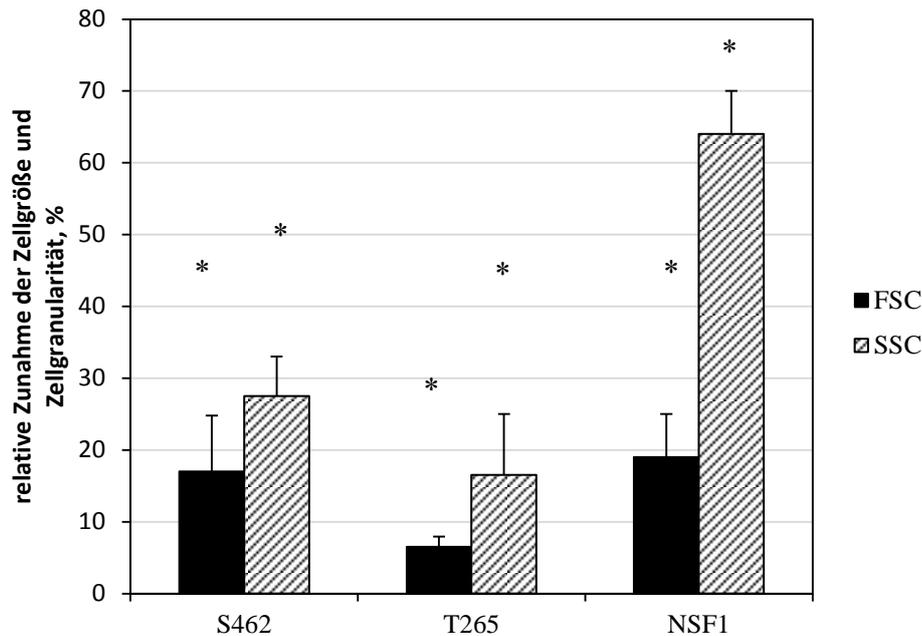


Diagramm 2. Mittlere relative Zunahme der Zellgröße sowie Zellgranularität im Vergleich zu Kontrollzellen (100%), Angabe des Standardfehlers.

3.5 Induktion von Apoptose in Tumor-Schwanzzellen durch ATRA

Die MPNST-Zelllinien S462, NSF1 und T265 wurden mittels FACS nach 7tägiger Behandlung mit 5 μ M ATRA mithilfe des ApoBrdU TUNEL Assays auf Apoptose untersucht.

Zunächst wurden Lymphozyten als Negativkontrolle verwendet. Dabei ließ sich keine Fluoreszenz detektieren, sodass hier keine Apoptose festgestellt werden konnte, und die Kontrolle als geeignet befunden wurde. Die Positivkontrolle hingegen ließ zwei Populationen von Zellen erkennen, wobei der immunpositive Anteil den apoptotischen Zellen entsprach (Abbildung 14A).

Die Bestimmung des programmierten Zelltodes mittels Messung TUNEL-gefärbter MPNST-Zellen ließ in allen Zelllinien die proapoptotische Tendenz nach der Behandlung mit ATRA erkennen (Abbildung 14B), jedoch war die Stärke des Effektes in den verwendeten Zelllinien unterschiedlich (Tabelle 8). Im Vergleich zu den Kontrollzellen sah man einen Anstieg der Apoptose in den S462-Zellen um 273% (SEM = 10%), in der T265-Zelllinie um 21% (SEM = 6%), und in den NSF1-Zellen um 8,9% (SEM = 1,3%) (Diagramm 3).

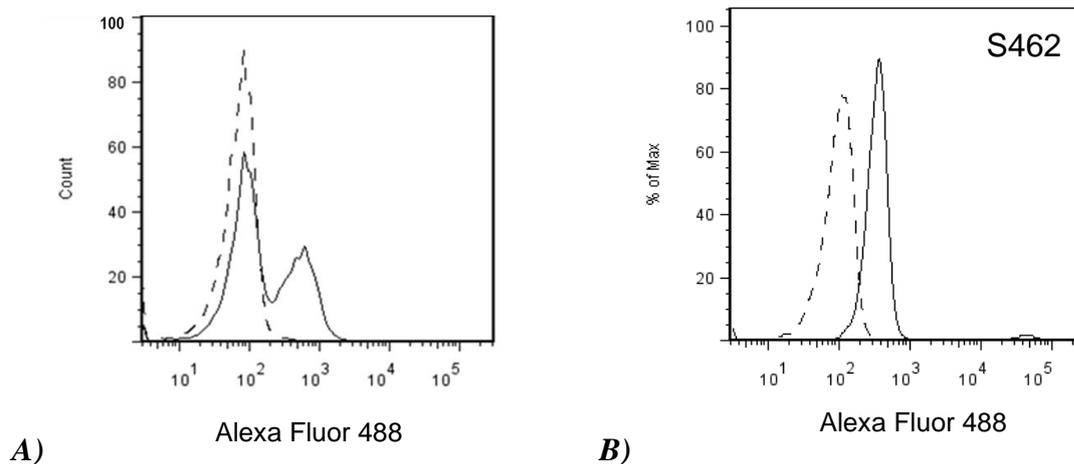


Abbildung 14. A) Darstellung einer Apoptose-negativen (Strichlinie) und einer Apoptose-positiven (durchgehende Linie) Lymphozytenpopulationen. B) Repräsentatives Histogramm: Fluoreszenz-Intensität (Y-Achse) und Prozentzahl positiver Zellen (X-Achse) der Zelllinie S462. Die Rechtsverschiebung nach der ATRA-Behandlung (durchgehende Linie) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Strichlinie) ist als eine Zunahme der Apoptose durch Therapie zu bewerten.

Zelllinie	Versuch	Kontrolle, geom. Mean/%	5 μ M ATRA, geom. Mean/%	Differenz, %
S462	1	104/100	363/349	249
	2	93/100	370/398	298
T265	1	56/100	61/109	9
	2	162/100	195/120	20
	3	145/100	194/134	34
NSF1	1	57/100	61/107	7
	2	14/100	15/108	8
	3	14/100	16/112	12

Tabelle 8. Einzelne Messungen der Apoptose (TUNEL-Färbung) in allen Zelllinien nach ATRA-Behandlung. Die Messwerte ($n=3$) sind in geometrischem Mean aufgrund einer logarithmischen Skala der Fluoreszenz-Intensität angegeben.

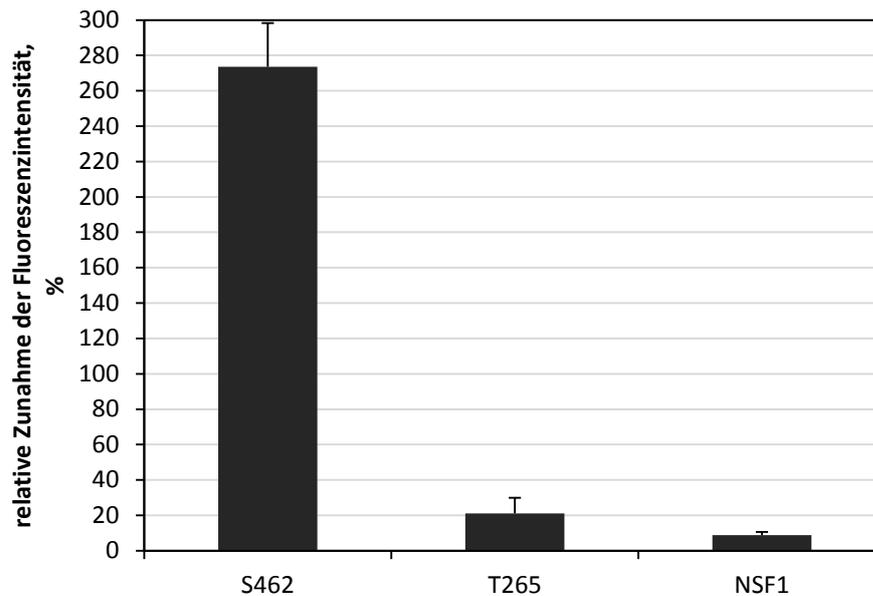


Diagramm 3. Mittlere relative Zunahme der Apoptose in allen drei MPNST-Zelllinien mit größter Steigerung der Apoptose in den S462-Zellen um 273% im Vergleich zu Kontrollzellen (100%), Angabe des Standardfehlers (SEM).

Um diese in den Tumor-Schwanzzellen durch die ATRA-Behandlung induzierte Apoptose mittels weiterer Methoden zu verifizieren, wurden immunhistochemische Untersuchungen mit einem Antikörper gegen bcl2 sowie eine TUNEL-Färbung durchgeführt. Es wurden hierfür mit ATRA behandelte sowie unbehandelte Zellen (1754, T265, S462) untersucht. Als Kontrolle dienten wieder nicht-apoptotische Lymphozyten (ApoBrdU TUNEL Assay Kit). Als Kontrolle dienten wieder nicht-apoptotische Lymphozyten (ApoBrdU TUNEL Assay Kit). Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression von bcl2 sowie TUNEL-gefärbter Zellen nach der Behandlung mit ATRA (Abbildung 15), die Zelllinie S462 zeigte jedoch keine bcl2-Expression (Daten sind nicht gezeigt). Zusammenfassend konnten wir nachweisen, dass die Behandlung von Tumor-Schwanzzellen mit ATRA sowohl von MPNST-Zelllinien als auch von Primärkulturen gutartiger Neurofibrome Apoptose induziert.

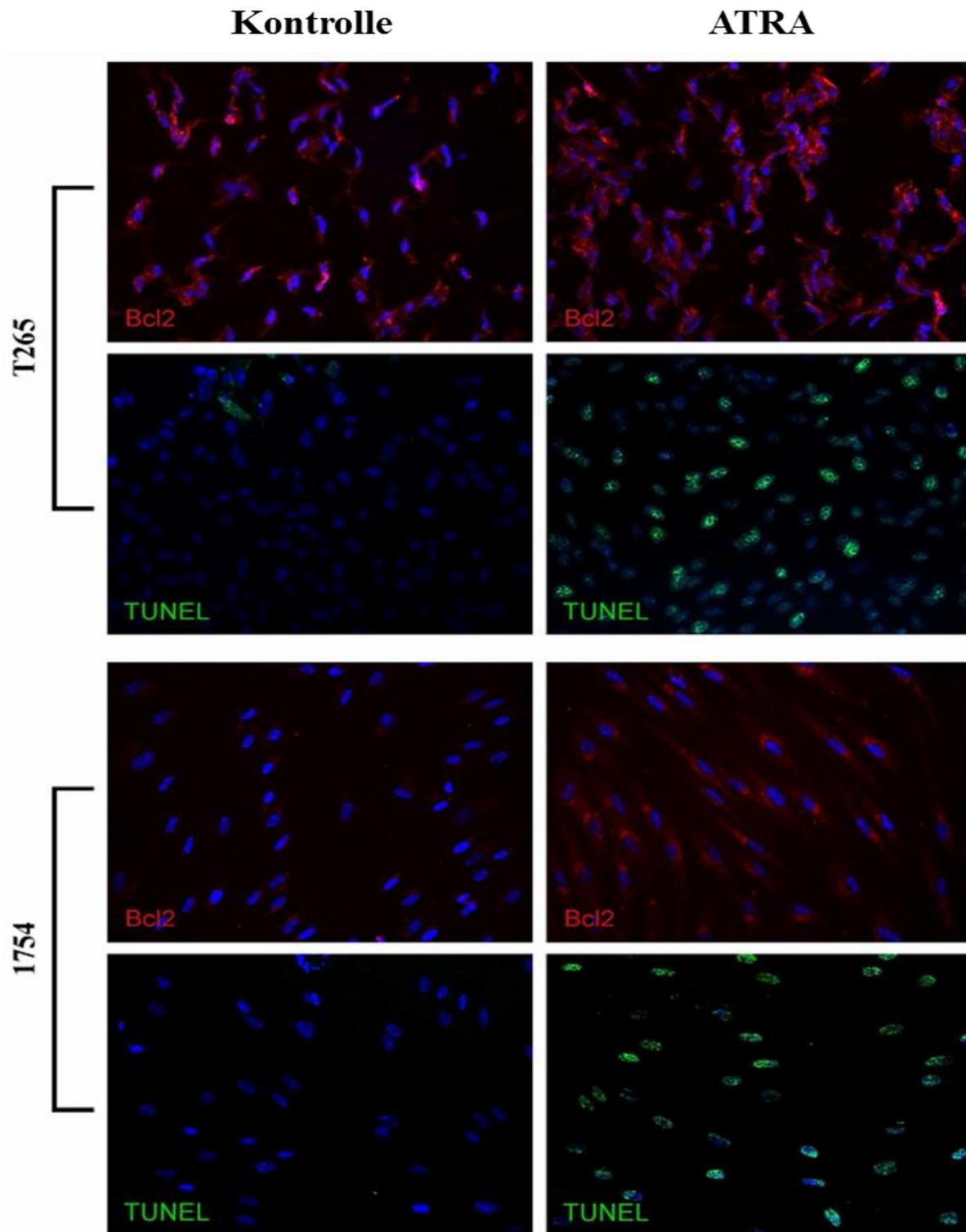


Abbildung 15. Fluoreszenzfärbung gegen *bcl2* und TUNEL in den Kontrollzellen (linke Spalte) und in den Schwanzzellen (rechte Spalte) nach der Behandlung mit ATRA in 20facher Vergrößerung. Immunzytochemischer Nachweis der Apoptose in der Zelllinie T265 bzw. Zellkultur 1754. Die Immunfluoreszenzmikroskopie lässt eine Zunahme der Apoptose und der *bcl2*-Expression unter ATRA-Behandlung in den beiden Zelllinien erkennen.

3.6 Differenzierende Wirkung von ATRA auf Schwannzellen

Zur Feststellung einer Differenzierung der malignen Schwannzellen unter Therapie wurden die Zellen mit primären Antikörpern gegen das S100- bzw. PMP22-Protein und mit entsprechenden sekundären Alexa Fluor 488 Antikörpern doppelt markiert. Beide Proteine werden in der Endphase der neuronalen Differenzierung einer Myelin-produzierenden Schwannzelle exprimiert und sollten als Maß der Differenzierung dienen (siehe 1.3.4).

Mittels FACS wurde die Anzahl von S100- und PMP22-exprimierenden Schwannzellen bestimmt, wobei mit ATRA behandelte und unbehandelte Zellen miteinander verglichen wurden. Die Messung der „negativen“ Zellprobe, der kein primärer Antikörper zugesetzt worden war, wurde als Maß für eine fehlende S100- und PMP22-Expression festgelegt.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass alle Proben der Schwannzellkulturen eine S100- und PMP22-Expression aufwiesen, die jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt war (Abbildung 16 und Tabelle 9). Alle drei MPNST-Zelllinien zeigten eine Zunahme der S100-Expression unter Medikamentenbehandlung: in der T265-Zelllinie um 140%, in der S462-Zelllinie um 70% und in der NSF1-Zelllinie um 48% (Diagramm 4).

Hinsichtlich der PMP22-Expression präsentierten die behandelten Zellen folgendes Verhalten: In den MPNST-Zelllinien führte die ATRA-Behandlung zu einer signifikant niedrigeren PMP22-Expression in den S462-Zellen um 24% und in den T265-Zellen 19% bzw. zu einer nicht signifikanten Reduktion in den NSF1-Zellen um 12%.

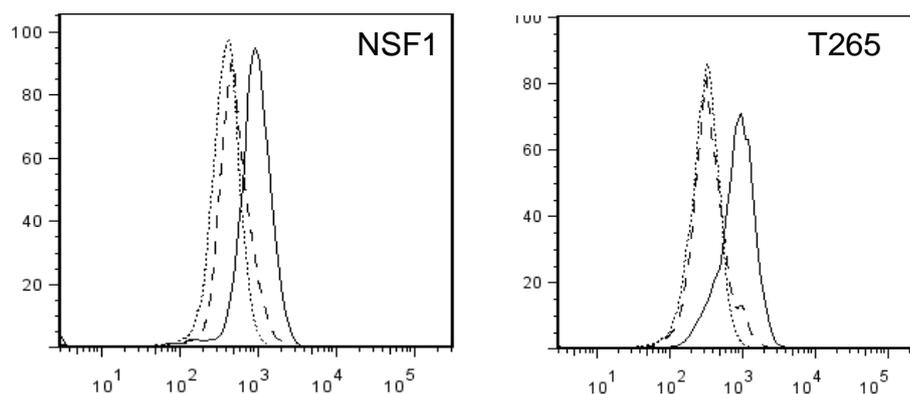


Abbildung 16. Repräsentative Histogramme der MPNST-Zelllinien NSF1 und T265 zeigen den Unterschied in der S100-Expression (Rechtsverschiebung) zwischen den Zellen unter ATRA-Behandlung (durchgehende Linie) bzw. ohne Behandlung (Strichlinie).

Zelllinie	Versuch	S100		Differenz,%	PMP22		Differenz,%
		Kontrolle, Mean/%	ATRA, Mean/%		Kontrolle, Mean/%	ATRA, Mean/%	
S462	1	559/100	835/150	50	120/100	73/61	-39
	2	499/100	904/181	81	318/100	275/86	-14
	3	321/100	584/181	81	235/100	192/81	-19
T265	1	310/100	759/245	145	602/100	550/91	-9
	2	341/100	800/234	134	436/100	356/81	-19
	3	-	-	-	1696/100	1173/70	-30
NSF1	1	499/100	858/172	72	1939/100	1807/93	-7
	2	940/100	1174/124	24	1578/100	1313/83	-17

Tabelle 9. Messung der S100- bzw. PMP22-Expression. Die Messwerte sind in geometrischem Mean angegeben.

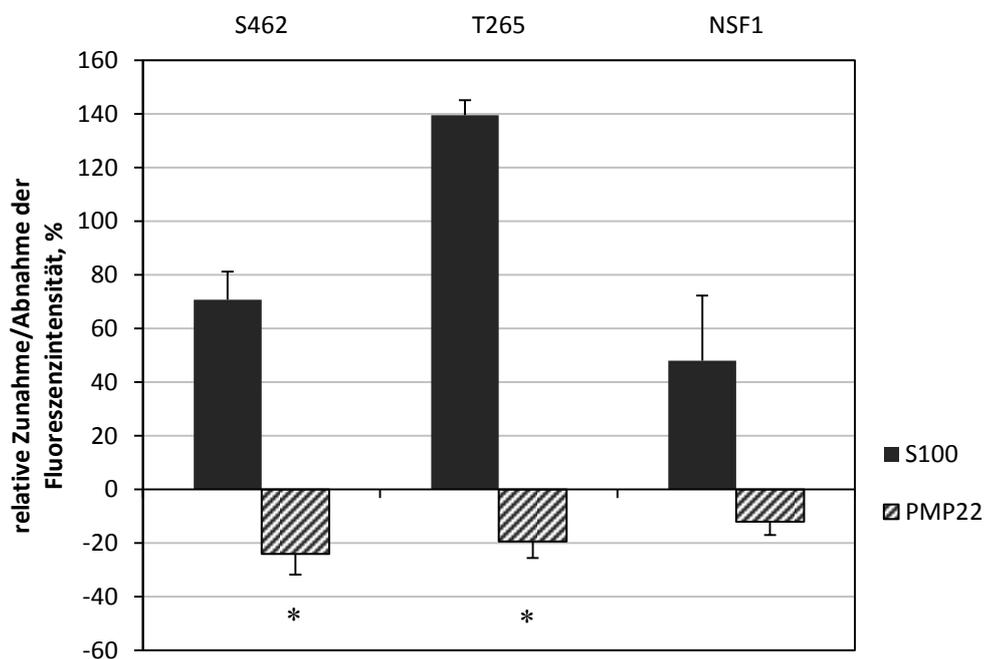


Diagramm 4. Mittlere relative Zunahme der S100-Expression / Abnahme der PMP22-Expression im Vergleich zur Kontrolle (100%) in den Zelllinien S462 (n=3), T265 (n=2/3) und NSF1 (n=2) (mit Angabe des Standardfehlers).

3.7 Veränderung der CRABP2-Expression unter ATRA-Behandlung

Die Expressionsanalyse von CRABP2 in den behandelten Zellkulturen 1824, 1819, 1754, 1827 sowie Zelllinien NSF1, T265, S462 und Kontrollzellen wurde mit Hilfe der qRT-PCR durchgeführt.

Die Messung des endogenen CRABP2-mRNA-Levels in den Zellen weist auf ein höheres Level von CRABP2 in den kutanen Zellkulturen 1819 und 1824 im Vergleich zu plexiformen Zellkulturen 1754 und 1827 (Diagramm 5A) hin. Die MPNST-Zelllinie T265 zeigt einen deutlich höheren Level der endogenen CRABP2-mRNA im Vergleich zu den Zelllinien S462 und NSF1 (Diagramm 5B).

Nach einer 7tägigen Behandlung mit 1 μ M ATRA (durchschnittlich effektivste Dosis hinsichtlich der Proliferationshemmung, siehe Abschnitt 3.3) zeigten die plexiformen Zellkulturen 1754 (n=3), 1827 (n=2) einen signifikanten Anstieg der CRABP2-mRNA-Expression im Vergleich zu den nicht signifikanten Änderungen der CRABP2-Expression in den kutanen Zellkulturen (Diagramm 6). Der höchste Anstieg um 117 % korrespondierte in der plexiformen Zellkultur 1827 mit dem initial niedrigsten basalen CRABP2-mRNA-Level.

Die Behandlung mit ATRA führte zu keinem signifikanten Anstieg der CRABP2-mRNA-Expression in den MPNST-Zelllinien T265 und S462. Die NSF1-Zelllinie zeigte dagegen einen signifikanten mRNA-Expressionsanstieg von CRABP2 um 323% (Diagramm 7).

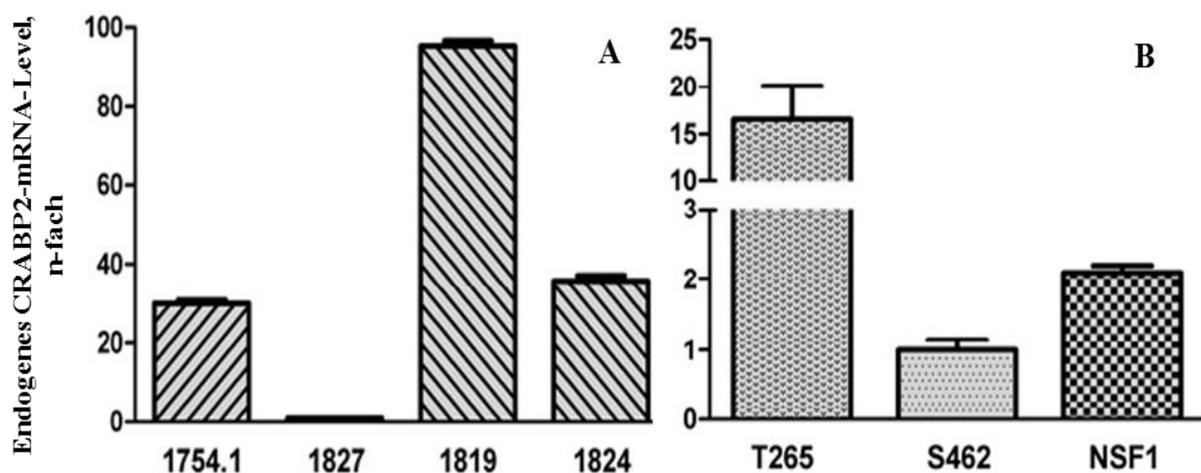


Diagramm 5. Endogene CRABP2-mRNA-Level in den primären kutanen (1819, 1824) und plexiformen (1754, 1827) Zellkulturen (A) sowie in den MPNST-Zellen (B) mit Angabe des Standardfehlers (SEM).

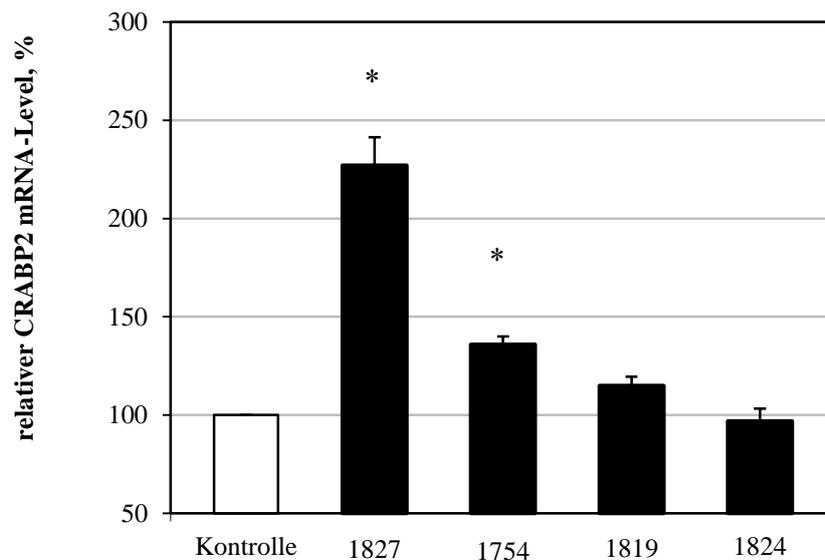


Diagramm 6. Relative mRNA-Level von CRABP2 in den plexiformen und kutanen Zellkulturen $n=3$). Es ist ein signifikant höherer Anstieg des mRNA-Levels in den plexiformen Zellkulturen im Vergleich zu den kutanen zu verzeichnen (Angabe des Standardfehlers).

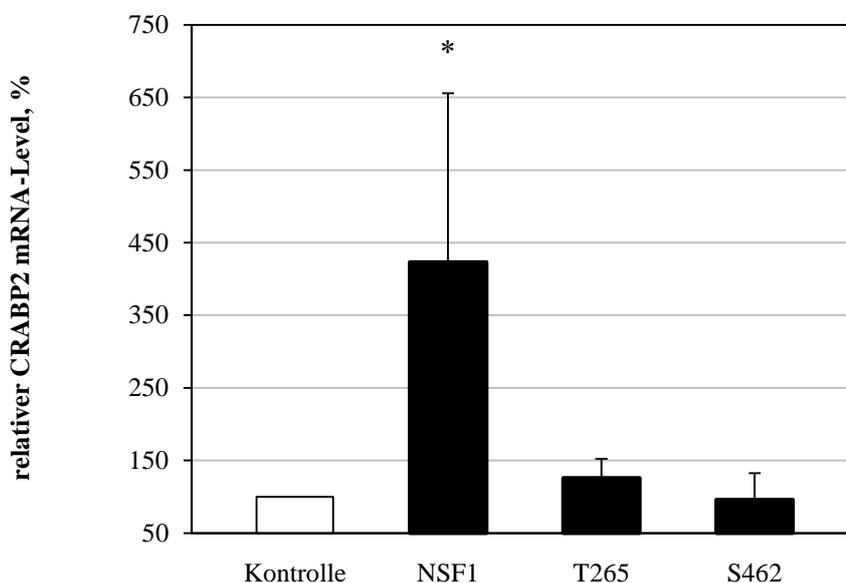


Diagramm 7. Relative RNA-Level von CRABP2 nach ATRA-Behandlung in den MPNST-Zelllinien. Es stellt sich ein signifikanter Anstieg nur in der Zelllinie NSF1 ($n=5$) dar. Die Zelllinien T265 ($n=3$) und S462 ($n=2$) zeigen keinen signifikanten Unterschied der CRABP2-Expression zur Kontrolle nach Behandlung unter Angabe des Standardfehlers (SEM).

4 Diskussion

4.1 CRABP2-Expression in NF1-assoziierten Neurofibromen

Voruntersuchungen aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Harder wiesen immunzytochemisch eine Expression von CRABP2 in Epithelzellen sowie in anderen Zelltypen in Neurofibromen nach. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine CRABP2-Expression in folgenden Zellen mittels Doppelmarkierungen genauer identifiziert werden: alle Fibroblasten und eine Population von Schwannzellen in Neurofibromen weisen eine Expression von CRABP2 auf. In der Haut konnte die Expression des Proteins in allen Fibroblasten, Epithelzellen, jedoch nicht in den Schwannzellen der Hautnerven beobachtet werden. Diese Erkenntnisse decken sich mit der Literatur: In mehreren experimentellen Studien konnte eine CRABP2-Expression in verschiedenen Organen, jedoch nicht in normalen Schwannzellen nachgewiesen werden (25, 26, 27, 77, 98, 105). Bei Nervenläsionen kam es ebenfalls in normalen Schwannzellen zur Hochregulierung der CRABP2-Expression, sodass eine Involvierung von CRABP2 in axonale Regenerationsprozesse postuliert wurde (104). Vergleichbare Prozesse sind damit durchaus für Neurofibrome relevant, da sich Reparaturprozessen ähnliche Mechanismen in den Neurofibromen nachweisen lassen. Eine erhöhte Expression in den untersuchten Zellen, unter anderem in den NF1-defizienten Schwannzellen innerhalb der Tumoren, kann hierdurch plausibel erklärt werden.

Im Vergleich zu normalen Schwannzellen weisen nach den Ergebnissen dieser Untersuchungen die neoplastischen Schwannzellen eine erhöhte CRABP2-Expression auf. Hinsichtlich der CRABP2-Expression im Tumorgewebe liegen in der Literatur allerdings inkonsistente Daten vor: die Expression des Proteins ist in Nierenzell- und Prostatakarzinomen herunterreguliert, in Wilms-Tumoren, Uterusleiomyomen sowie bei Polyzytämia vera hochreguliert (38, 83, 102, 103). Darüber hinaus wird eine hochregulierte Expression von CRABP2 in reifenden Organen beobachtet und somit dem Protein CRABP2 eine protektive Funktion in der Organentwicklung sowie Differenzierung zugeschrieben (6, 92). Da die neoplastischen Schwannzellen der Neurofibrome unreife Zellen darstellen, wäre es denkbar, dass sie das CRABP2 überexprimieren, z.B. um einer Zelldifferenzierung entgegenzuwirken, aber eventuell auch als Merkmal einer Transformations-bedingten Fehlregulation.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur in einem Teil der Schwannzellen, also einer Schwannzellpopulation, der Neurofibrome eine erhöhte CRABP2-Expression festgestellt. Man kann daher spekulieren, dass die CRABP2-positive Schwannzellpopulation jener entspricht, die haploinsuffizient für ein *NF1*-Allel (*NF1*^{+/-}) ist. Die Zelle könnte durch diesen Mechanismus

versuchen, durch eine erhöhte CRABP2-Expression die herunterregulierte Funktionen von Neurofibromin durch alternative Wege zu kompensieren, um sich vor einem vermehrten Zellwachstum sowie der Zellentartung zu schützen. Dann sollte man weiter annehmen, dass die normalen Schwanzzellen ($NF1^{+/+}$) diesen Kompensationsmechanismus nicht benötigen und demzufolge kein CRABP2 produzieren. In den Schwanzzellen mit vollständiger Inaktivierung beider $NF1$ -Allele ($NF1^{-/-}$ -Tumor-Schwanzzellen) scheinen diese Kompensationsmechanismen zu versagen: Man findet in der Literatur Hinweise auf die $NF1$ -vermittelte Modulation der CRABP2-Expression. In den Neuroblastom-Zellen SJ-NB10 mit $NF1$ -Defizienz sowie mit einer Aktivierung der exogenen $KRAS^{V12}$ -Expression konnte eine Suppression der ATRA-Zielgene, unter anderem des CRABP2-Gens, nachgewiesen werden (46), sodass diese Zellen eine Resistenz für Behandlung mit ATRA entwickelten. Der den $NF1$ -assoziierten Tumorzellen zugrunde liegende $NF1$ -Defekt mit konsekutiver Aktivierung des Ras-Proteins könnte ebenfalls zur Suppression der CRABP2-Expression führen. Bleibt man bei dieser Hypothese, könnte man aggressives Wachstum sowie die Neigung zur Transformation in den plexiformen Neurofibromen durch die Zunahme des Anteils an $NF1$ - und CRABP2-defizienten Schwanzzellen erklären. Diese Spekulationen regen zu genaueren Untersuchungen hinsichtlich einer differentiellen CRABP2-Expression in $NF1^{+/-}$ - und $NF1^{-/-}$ -Tumor-Schwanzzellen sowie hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen $NF1$ und CRABP2 an.

Zusammenfassend sieht man eine Expression von CRABP2 in $NF1$ -assoziierten Nervenscheidentumoren, die in „normalen“ Schwanzzellen nicht detektiert wird. Hieraus ergibt sich die Idee, CRABP2 als Target für eine Therapie von diesen Tumoren zu prüfen.

4.2 CRABP2 als Vermittler der antiproliferativen Wirkung von ATRA

In dieser Arbeit wurden die Effekte der Retinsäure in neoplastischen Schwanzzellen aus $NF1$ -assoziierten Nervenscheidentumoren *in vitro* erstmalig untersucht. Es konnte eine antiproliferative Wirkung von ATRA in allen untersuchten $NF1$ -assoziierten Zellkulturen und Zelllinien in unterschiedlicher Ausprägung nachgewiesen werden. Die antiproliferative Wirkung von ATRA konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen in mehreren experimentellen Studien demonstriert werden: In den Glioblastom-Zelllinien LN18 und U87MG sowie in den Ovarialkarzinom-Zellen CAOV3 führte die Behandlung mit ATRA durch ein gesteigertes Expressionslevel von p27 (Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinase) und ein erniedrigtes Level von CDK2 (Zyklin-abhängige Kinase 2) zu einem Zellzyklusarrest (89, 114). Thiele et al. beschreiben die Herunterregulierung der Expression von EGF-Rezeptor, N-myc, H-ras and c-myc sowie die Hochregulierung der Expression von Neurofilament in Neuroblastom-Zellen nach

Behandlung mit ATRA (104). All diese Faktoren sind an der Stimulierung der Proliferation beteiligt. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen der antiproliferativen Wirkung von ATRA und der CRABP2-Expression in den NF1-assoziierten Nervenscheidentumoren gelegt. In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe von PD Dr. Harder konnte mittels 2D-Gelelektrophorese, der RNA-Expressions-Messung sowie morphometrischer Analysen eine verminderte CRABP2-Expression in den plexiformen Neurofibromen im Vergleich zu den kutanen nachgewiesen werden. Konsistent zu diesen Voruntersuchungen war das basale mRNA-Niveau in den primären plexiformen Zellkulturen 1754 und 1827 niedriger als in den kutanen Zellkulturen 1819 und 1824.

Nach der Behandlung mit ATRA ließ sich folgende Konstellation zur CRABP2-Expression beobachten: In den Zellkulturen aus den plexiformen Neurofibromen und der MPNST-Zelllinie NSF1 ging die stärkste Hemmung der Proliferation mit einer signifikanten Steigerung der CRABP2-Expression einher, wobei die MPNST-Zelllinien T265 und S462 bei keiner signifikanten Änderung der CRABP2-Expression ebenfalls keine wesentliche Hemmung der Proliferation aufwiesen. Diese Erkenntnis bestärkt die Annahme, dass ATRA zur Hochregulierung der Expression von CRABP2 führt, das seinerseits die antiproliferative Wirkung von ATRA vermittelt bzw. verstärkt. Ähnliche Konstellationen konnte in anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden: In MRC-5-Emphysem-Fibroblasten führte beispielweise eine fehlende Induktion der CRABP2-Expression durch ATRA zur fehlenden Induktion der Elastin-Expression (88). Um eine direkte Vermittlung der antiproliferativen Wirkung von ATRA durch CRABP2 zu belegen, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Es scheinen weitere Einflussfaktoren und Mechanismen, wie Mutationen oder epigenetische Mechanismen, eine Rolle bei der Regulierung der Expression von CRABP2 zu spielen (12, 38). Darüber hinaus konnten Kosa et al. an NIH3T3-Zellen, die mit aktivierten H-ras-, K-ras- und N-ras-Onkogenen transformiert wurden, demonstrieren, dass es darunter zur Suppression der CRABP2-Expression und somit zu einer Hemmung der ATRA-Wirkung kommt, obwohl ATRA in höheren Mengen in der Zelle akkumuliert (56, 57). Somit scheinen *ras*-Onkogene, die in den NF1-assoziierten Nervenscheidentumoren ebenfalls aktiviert sind, den Metabolismus von ATRA und die Expression von CRABP2 signifikant zu beeinflussen.

Zusammenfassend wurde die Involvierung von CRABP2 in die Vermittlung des antiproliferativen Effekts von ATRA erstmalig in NF1-assoziierten Nervenscheidentumoren demonstriert. Die Induktion der CRABP2-Expression durch ATRA steht in den NF1-defizienten Zellen unter Einfluss weiterer Faktoren, die einer näheren Untersuchung bedürfen.

4.3 ATRA als potentielles Therapeutikum für NF1-assoziierte periphere Nervenscheidentumoren

In dieser Arbeit wurden weitere Effekte von ATRA demonstriert: In der plexiformen Zellkultur 1754 sowie in allen untersuchten MPNST-Zelllinien konnten nach der Behandlung mit ATRA eine Induktion von Apoptose und von morphologischen Veränderungen nachgewiesen werden.

4.3.1 Apoptose unter ATRA-Behandlung

In der plexiformen Zellkultur 1754 sowie in der Zelllinie T265 wurde die Induktion der Apoptose durch eine vermehrte Expression des in den intrinsischen Apoptoseweg involvierten bcl2-Proteins begleitet. Die Involvierung von ATRA in den intrinsischen Apoptoseweg wurde in der Literatur bereits in Glioblastom-Zelllinien nach Behandlung mit ATRA nachgewiesen: ATRA induzierte den Zelltod, der mit einem Anstieg der Bax:bcl2-Ratio, mit vermehrter Freisetzung vom Cytochrom C sowie mit gesteigerter Aktivierung der Caspase 3 einherging (114). Da bcl2 ein antiapoptotisches Protein ist, wäre es von Relevanz zu untersuchen, wie sich das Verhältnis des proapoptotischen Proteins Bax zu bcl2 in den NF1-assoziierten Tumorzellen unter ATRA-Behandlung verändert. In der MPNST-Zelllinie S462, die den höchsten proapoptotischen Effekt aufweist, ließ sich immuzytochemisch keine bcl2-Expression nachweisen.

Die S462-Zellen weisen eine TP53-Mutation und somit eine p53-Defizienz auf (31). Da p53 die Expression der proapoptotischen Proteine der bcl2-Familie stimuliert, ist die Expression von bcl2 in den S462-Zellen herunterreguliert. In der gleichen Zelllinie fanden Mashour et al. unter der Behandlung mit Docosahexaensäure (DHA) eine ERK-Aktivierung, gefolgt durch Induktion von Apoptose (71). Eine ERK-Aktivierung wurde in Neuroblastom- und Brustkrebszellen unter der Behandlung mit ATRA bereits beschrieben (35, 85). Weiterhin wurde in Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y) unter ATRA-Behandlung die Überexpression des Tumornekrose-Faktor-Rezeptors nachgewiesen, was ebenfalls auf die Involvierung von ATRA in den extrinsischen Apoptoseweg hinweist (15). Die unterschiedlich ausgeprägte proapoptotische Wirkung von ATRA in den untersuchten MPNST-Zelllinien mit unterschiedlichem, über die NF1-Mutation hinausgehendem genetischen Hintergrund, regt zur weiteren Untersuchungen an, um die Wirkungsmechanismen von ATRA in diesen Zellen besser zu verstehen und die Therapie, beispielweise mit weiteren Medikamenten zu kombinieren, um den apoptotischen Effekt der Retinsäure gegebenenfalls zu verstärken. Als Beispiel dazu könnten die Ergebnisse der Studie von Zhang et al. dienen: In den Glioblastom-Zellen U87MG, die eine Mutation von PTEN (phosphatase and tensin homolog located on chromosome ten) und eine daraus folgende relativ

geringe proapoptotische Wirkung von ATRA aufweisen, konnte unter der Kombination mit Interferon-Gamma ein signifikant höherer proapoptotischer Effekt durch die vermehrte Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges erzielt werden (114).

4.3.2 Zelldifferenzierung unter ATRA-Behandlung

Die FACS-Analyse der Expression der Proteine S100- und PMP22 in den untersuchten MPNST-Zelllinien belegte eine Hochregulierung des S100- sowie Herunterregulierung des PMP22-Proteins. Es ist bekannt, dass S100 in reifen Schwannzellen sowie PMP22 nur in myelinisierenden Schwannzellen expremiert wird (16). Somit entspricht diese Konstellation einer Differenzierung neoplastischer Schwannzellen zu nicht-myelinisierenden Schwannzellen. Um diese Aussage zu unterstützen, könnte man in zukünftigen Analysen die Tumor-Schwannzellen auf die Expression von LNGF-Rezeptor, der als Marker nicht myelischer Schwannzellen gilt (45), untersuchen. Die ATRA-induzierte Zelldifferenzierung wurde bereits von Imaizumi et al. an zwei MPNST-Zelllinien (MNS2 und MNS2PC) von einem NF1-Patienten demonstriert: In dieser experimentellen Studie wurde ATRA mit den aktuell verwendeten Chemotherapeutika (Ifosfamid, Etoposid, Adriamycin) verglichen. Nur unter ATRA-Behandlung konnten morphologische Veränderungen der untersuchten Zellen festgestellt werden, wobei die Zelldifferenzierung mit dem Anstieg des NF1-TypII-Transkriptes einherging (48).

4.3.3 Ausblick

Die antiproliferativen, proapoptotischen und differenzierenden Effekte von ATRA stellen die Basis zur therapeutischen Anwendung in der Onkologie dar und wurden bereits an mehreren anderen Tumorentitäten demonstriert.

Die gewonnenen Untersuchungsdaten dieser Arbeit decken ein therapeutisches Potential von ATRA erstmalig in den NF1-assoziierten plexiformen Neurofibromen und malignen peripheren Nervenscheidentumoren auf. Bekanntermaßen neigen bis zu 13% der plexiformen Neurofibrome zur malignen Transformation. Die Prognose der *NF1*-defizienten MPNST ist im Vergleich zu den sporadischen viel schlechter. Es existiert heutzutage keine effektive, etablierte Therapie für NF1-assoziierte Nervenscheidentumoren. Aktuelle klinische Studien zeigten bisher keine überzeugenden Ergebnisse. Daher ist der Nachweis der antikarzinogenen Wirkung von ATRA durch Proliferationshemmung und Induktion der Apoptose sowie der Zelldifferenzierung in einer NF1-assoziierten plexiformen Zellkultur sowie *NF1*-defizienten MPNST-Zelllinien ein vielversprechender Ansatz für weitere Untersuchungen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die Behandlung von NF1-assoziierten Schwannzellen mit ATRA etabliert. Die maximalen Effekte der Retinsäure konnten mit einer Dosis zwischen 0,5µM bis 5 µM erzielt werden. Die weitere Reduktion sowie Steigerung der Dosis brachten keine relevanten Verbesserungen des Therapieansprechens, sodass man nach weiteren Faktoren der Therapieoptimierung gesucht werden könnte. Die Resistenz einer Neuroblastom-Zelllinie gegenüber der Therapie mit ATRA in der Arbeitsgruppe Hötzel et al. ließ auf die Mutation des *NF1*-Gens als Ursache zurückschließen (46). Es wäre daher von Interesse, zu untersuchen, ob die sporadischen plexiformen Neurofibrome und MPNST ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit ATRA aufweisen. So könnte man die in der Literatur bereits vermutete Annahme, dass Neurofibromin in die Vermittlung der Effekte von ATRA involviert ist, nochmals bestärken und dieses Wissen zur Therapieoptimierung mit ATRA nutzen. Beispielsweise konnte die Therapie-Resistenz gegenüber ATRA in den Neuroblastom-Zellen mit einer *NF1*-Mutation bzw. aktiviertem Ras-Signalweg durch den Einsatz von MEK-Inhibitoren aufgehoben werden (46). In den Brustkrebszellen MMTV-neu wurde z.B. auch durch die Hemmung von FABP5 (fatty acid binding protein 5), eines Gegenspielers von CRABP2, die Inhibierung des Zellwachstums erzielt (93).

Untersuchungen in Glioblastom-Zelllinien wiesen für ATRA in Kombination mit anderen Medikamenten, wie Taxane und Interferone, einen synergetischen Effekt und eine signifikant höhere Apoptoserate nach (53, 114). In Neuroblastom-Zellen konnte die ATRA-induzierte Zelldifferenzierung mit Inhibitoren von Lipooxygenasen und Cyclooxygenasen unterstützt werden (15).

In der Kinderonkologie wird ATRA im Rahmen des Studien-Protokolls in der Erhaltungstherapie bei Ewing-Sarkomen angewandt. Weiterhin konnte ein Erhaltungseffekt von ATRA bei einzelnen Patienten mit einem defekten „Mismatch-Repair“ gezeigt werden (40). Diese Tatsachen motivieren zur Untersuchung weiterer Optionen zur Optimierung der Therapie mit ATRA und zu deren therapeutischer Anwendung auch in den NF1-assoziierten Nervenscheidentumoren.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Analyse der Rolle des zellulären Retinsäure bindenden Proteins (CRABP2) in Tumoren von Patienten mit Neurofibromatose Typ1 (NF1) und der Möglichkeit einer sich daraus ableitenden Behandlung von Tumor-Schwannzellen mit all-*trans*-Retinsäure (ATRA) als neue Therapiemöglichkeit. Erstmals sind die hier dargestellten Befunde in NF1 assoziierten peripheren Nervenscheidentumoren, insbesondere in Neurofibromen und der malignen Variante, den MPNST erhoben worden, für die es bislang bei Vorliegen einer NF1 keine suffiziente Chemotherapie gibt.

Folgende Erkenntnisse konnten gewonnen werden:

1. Die in-vitro-Behandlung von primären Tumor-Schwannzellen aus plexiformen Neurofibromen sowie von humanen MPNST-Zellkulturen mit ATRA führt zu einer Hemmung der Proliferation.
2. Diese günstigen antiproliferativen Effekte der in-vitro-Therapie mit ATRA sind begleitet von einer Induktion von Apoptose und Differenzierung der Tumor-Schwannzellen in Richtung myelinisierender, reifer Schwannzellen sowie von morphologischen Veränderungen.
3. Die höhere antiproliferative Wirkung von ATRA in der primären Schwannzellkultur aus einem plexiformen Neurofibrom sowie der MPNST-Zelllinie NSF1 ist mit einer höheren CRABP2-Expression nach der ATRA-Gabe vergesellschaftet, so dass demonstriert wurde, dass CRABP2 durch ATRA hochreguliert wird und möglicherweise die antiproliferative Wirkung der ATRA vermittelt.
4. Nicht alle Schwannzellen in Neurofibromen exprimieren CRABP2, sondern nur ein Prozentsatz. Es gibt auch Unterschiede zwischen dermalen Schwannzellen und Tumor-Schwannzellen in Neurofibromen bezüglich der CRABP2-Expression: nur die Schwannzellen in Neurofibromen synthetisieren CRABP2, die Schwannzellen der Haut exprimieren kein CRABP2. Diese Konstellation entspricht einer Transformations-bedingten Überexpression von CRABP2 in Tumor-Schwannzellen der peripheren NF1-assozierten Nervenscheidentumoren.

Zusammenfassend sind dies erstmals viel versprechende Daten zur Rolle von CRABP2 in o.g. NF1-assozierten Tumoren bei NF1, die auf ein therapeutisches Potential von ATRA in diesen Tumoren hinweisen und die durch eine weitere Analyse von ATRA-vermittelten Signalwegen bei NF1 in tierexperimentellen Studien gefolgt werden sollten.

6 Literaturverzeichnis

1. Ardern-Holmes SL, North KN. Treatment for plexiform neurofibromas in patients with NF1. *The Lancet Oncology* 2012;12:1175-1176.
2. Arroyo EJ, Bermingham JRJ, Rosenfeld MG, Scherer SS. Promyelinating Schwann cells express Tst-1/SCIP/Oct-6. *J Neurosci* 1998;18:7891-7902.
3. Babovic-Vuksanovic D, Widemann BC, Dombi E, Gillespie A, Wolters PL, Toledo-Tamula MA, O'Neill BP, Fox E, MacDonald T, Beck H, Packer RJ. Phase I trial of pirfenidone in children with neurofibromatosis 1 and plexiform neurofibromas. *Pediatr Neurol* 2007;36:293-300.
4. Badache A and De Vries GH. Neurofibrosarcoma-derived schwann cells overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and are induced to proliferate by PDGF BB. *J Cell Physiol* 1998;177(2):334-42.
5. Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 2002;43:1773-808.
6. Bass NM. Cellular binding proteins for fatty acids and retinoids: similar or specialized functions? *Mol Cell Biochem* 1993;123:191-202.
7. Birindelli S, Perrone F, Oggionni M, Lavarino C, Pasini B, Vergani B, Ranzani GN, Pierotti MA, Pilotti S. Rb and TP53 pathway alterations in sporadic and NF1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. *Lab Invest* 2001;81:833-44.
8. Blanchard AD, Sinanan A, Parmantier E, Zwart R, Broos L, Meijer D, Meier C, Jessen KR, Mirsky R. Oct-6 (SCIP/Tst-1) is expressed in Schwann cell precursors, embryonic Schwann cells, and postnatal myelinating Schwann cells: comparison with Oct 1, Krox-20, and Pax-3. *J Neurosci Res* 1996;46:630-640.
9. Breitman TR, Collins SJ, Keene BR. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood* 1981;57:1000-1004.
10. Burchill SA, Berry PA, Bradbury FM, Lewis IJ. Contrasting levels of p21ras activation and expression of neurofibromin in peripheral primitive neuroectodermal tumour and neuroblastoma cells, and their response to retinoic acid. *J Neurol Sci* 1998;157:129-137.
11. Burchill SA, Berry PA, Lewis IJ. Effect of retinoic acid on p21ras and regulators of its activity in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995;31A:476-481.

12. Campos B, Warta R, Chaisaingmongkol J. Epigenetically mediated downregulation of the differentiation-promoting chaperon protein CRABP2 in astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 2012;131:1963-68.
13. Cawthon RM, Andersen LB, Buchberg. cDNA sequence and genomic structure of Evi2B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene. *Genomics* 1991;9:446-60.
14. Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM. Identification and characterisation of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EVI2 and mapping of other transcripts. *Genomics* 1990;7:555-65.
15. Chlapek P, Redova M, Zifferblat K, Hermanova M, Sterba J, Veselska R. Enhancement of ATRA-induced differentiation of neuroblastoma cells with LOX/COX inhibitors: an expression profiling study. *J of Experimental&Clinical Cancer Research* 2010;29:1-45.
16. Cheung YT, Lau W K, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KW, Chang RC. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neuro Toxicology* 2009;30:127-135.
17. Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T. Mouse models of tumor development neurofibromatosis type 1. *Science* 1999;286:2172-2176.
18. Cornely C. Untersuchung des Transkriptionsfaktors Mash2 und der von ihm regulierten Zielgene bezüglich ihres Einflusses auf Proliferation und Apoptose von Schwannzellen. *Manuskript der Dissertation* 2006:4.
19. Danglot G, Regnier V, Fauvet D, Vassal G, Kujas M, Bemheim A. Neurofibromatosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5 part of the gene. *Hum Mol Genet* 1995;4:915-20.
20. Daston MM, Scrable H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N. The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at the highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron* 1992;8:415-28.
21. Dawson MI. Synthetic retinoids and their nuclear receptors. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2004;4:199-230.
22. De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J* 1991;5:2924-33.
23. Dieplinger B, Schiefermeier N, Juchum-Pasquazzo M. The transcriptional corepressor TPA-inducible sequence 7 regulates adult axon growth through cellular retinoic acid binding protein II expression. *Eur J Neurosci* 2007;26:3358-3367.

24. Donato LJ, Noy N. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid binding protein II signaling. *Cancer Res* 2005;65:8193-8199.
25. Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N. Distinct roles for cellular retinoic acid binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem* 1999;274:23695-23698.
26. Donovan M, Olofsson B, Gustafson AL, Dencker L, Eriksson U. The cellular retinoic acid binding proteins. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53:459-465.
27. Elder JT, Astrom A, Pettersson U. Differential regulation of retinoic acid receptors and binding proteins in human skin. *J Invest Dermatol* 1992;98:673-679.
28. Evans DG, Baser ME, McGaughan J, Sharif S, Howard E, Moran A. Malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 2002;39:311-314.
29. Ferner RE. Intellect in Neurofibromatosis 1. In: Huson SM, Hughes RAC editors. *The Neurofibromatosis: A pathogenic and clinical overview*. Chapman and Hall, London, 1994.
30. Ferner RE, Gutmann DH. International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. *Cancer Res* 2002;62:1573-1577.
31. Frahm S, Mautner VF, Brems H, Legius E, Debiec-Rychter M, Friedrich RE, Knofel WT, Peiper M, Kluwe L. Genetic and phenotypic characterization of tumor cells derived from malignant peripheral nerve sheath tumors of neurofibromatosis type 1 patients. *Neurobiol Dis* 2004;16:85-91.
32. Frank D, Gunawan B, Holtrup M, Fuzesi L. Cytogenetic characterization of three malignant peripheral nerve sheath tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;144:18-22.
33. Fu YS, Wang Q, Ma JX. CRABP-II methylation: A critical determinant of retinoic acid resistance of medulloblastoma cells. *Mol Oncol* 2012;6:48-61.
34. Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 1996;271:1744-1747.
35. Futami H, Sakai R. All-trans retinoic acid downregulates ALK in neuroblastoma cell lines and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with activated ALK. *Cancer Lett* 2010;297:220-5.
36. Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms and consequences. *Cancer research* 2005;65:3980-3985.
37. Gilgert R, Schweizer P, Schwäble J. Neuroblastoma: Induction of differentiation (Part I). *Eur J Pediatr Surg* 2000;10:79-82.

38. Goelden U, Pfoertner S, Hansen W. Expression and functional influence of cellular retinoic acid-binding protein II in renal cell carcinoma. *Urol Int* 2005;75:269-276.
39. Gollnick HP, Krautheim A. Topical treatment in acne: current status and future aspects. *Dermatology* 2003;206:29-36.
40. Gottschling S, Reinhard H, Pagenstecher C, Krüger S, Raedle J, Plotz G, Henn W, Büttner R, Meyer S, Graf N. Hypothesis: Possible role of retinoic acid therapy in patients with biallelic mismatch repair gene defects. *Eur J Pediatr* 2008;167:225-229.
41. Gregory PE, Gutmann DH, Mitchell A. The neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associated with microtubules. *Som Cell Mol Genet* 1993;19:265-74.
42. Guillemain MC, Raffoux E, Vitoux D, Kogan S, Soilhi H, Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Janin A, Daniel MT, Gourmel B, Degos L, Dombret H, Lanotte M, De The H. In vivo activation of cAMP signaling induces growth arrest and differentiation in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 2002;196:1373-1380.
43. Gupta A, Cohen BH, Ruggieri P, Packer RJ, Phillips PC. Phase I study of thalidomide for the treatment of plexiform neurofibroma in neurofibromatosis 1. *Neurology* 2003;60:130-132.
44. Hagedorn L, Suter U, Sommer L. P0 and PMP22 mark a multipotent neural crest derived cell type that displays community effects in response to TGF-beta family. *Development* 2000;126:3781-3794.
45. Hai M, Muja N, De Vries GH, Quarles RH, Patel PI. Comparative analysis of Schwann cell lines as model systems for Myelin gene transkription studies. *J Neuroscience Research* 2002;69:497-508.
46. Hölzel M, Huang S, Koster J, Ora I, Lakeman A, Caron H, Nijkamp W, Xie J, Callens T, Asgharzadeh S, C. Seeger R, Messiaen L, Versteeg R, Bernards R. NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome. *Cell* 2010;142:218-229.
47. Holtkamp N, Okuducu AF, Mucha J, Afanasieva A, Hartmann C, Atallah I, Estevez-Schwarz L, Mawrin C, Friedrich RE, Mautner VF. Mutation and expression of PDGFRA and KIT in malignant peripheral nerve sheath tumors, and its implications for imatinib sensitivity. *Carcinogenesis* 2006;27(3):664-71.
48. Imaizumi S, Motoyama T, Ogose A, Hotta T, Takahashi HE. Charakterisation and chemosensitivity of two human malignant peripheral nerve sheath tumour cell lines derived from a patient with neurofibromatosis type I. *Virchows Arch* 1998;433:435-441.

49. Iyengar TD, Ng S, Lau CC, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC. Differential expression of NF1 type I and type II isoforms in sporadic borderline and invasive epithelial ovarian tumors. *Oncogene* 1999;18:257-262.
50. Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, Gavrilovic. The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* 1994;12:509-527.
51. Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ, Mirsky R. Three markers of adult nonmyelin forming Schwann cells, 217c (Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 1990;109:91-103.
52. Jetten AM, Kim JS, Sacks PG, Rearick JI, Lotan D, Hong WK, Lotan R () Inhibition of growth and squamous-cell differentiation markers in cultured human head and neck squamous carcinoma cells by beta-all-trans retinoic acid. *Int J Cancer* 1990;45:195-202.
53. Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, Ray SK. Combination of all-trans retinoic acid and taxol regressed glioblastoma T98G xenografts in nude mice. *Apoptosis* 2007;12:2077-2087.
54. Kim A, Dombi E, Tepas K, Fox E, Martin S, Wolters P, Balis FM, Jayaprakash M, Turkbey B, Muradyan N, Choyke PL, Reddy A, Korf B, Widemann BC. Phase I trial and pharmacokinetic study of sorafenib in children with neurofibromatosis type I and plexiform neurofibromas. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:396-401.
55. Kluwe L, Friedrich R, Mautner VF. Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24:283-285.
56. Kosa K, Jones CS, DeLuca LM. The H-ras oncogene interferes with retinoic acid signaling and metabolism in NIH3T3 cells. *Cancer Research* 1995;55(21):4850-4.
57. Kosa K, Meyers M, DeLuca LM. Transformation of NIH3T3 Cells with ras oncogenes abrogates the retinoic acid induction of tissue transglutaminase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993;196 (3):1025–1033.
58. Kourea HP, Orlow I, Scheithauer BW, Cordon-Cardo C, Woodruff JM. Deletions of the INK4A gene occur in malignant peripheral nerve sheath tumors but not in neurofibromas. *Am J Pathol* 1999;55:1855-1860.
59. Kroep JK, Ouali M, Gelberblom H. First-line chemotherapy for malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) versus other histologic soft tissue sarcoma subtypes and as a prognostic factor for MPNST: An EORTC soft tissue and Bone Sarcoma Group study. *Ann Oncol* 2011;22:207-14.

60. Legius E, Dierick H, Wu R, Hall BK, Marynen P, Cassiman JJ, Glover TW. TP53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;10: 250-255.
61. Liem KF, Tremml G, Roelink H, Jessel TM. Dorsal differentiation of neuralplate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 1995;82:969-979.
62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001;25:402-408.
63. Lobsiger CS, Smith PM, Buchstaller J, Schweitzer B, Franklin RJM, Suter U, Taylor V. SpL201: a conditionally-immortalized Schwann cell precursor line that generates myelin. *Glia* 2001;36:31-47.
64. Lobsiger CS, Taylor V, Suter U () The early life of a Schwann cell. *Review Biol Chem* 2002;383:245-253.
65. Lothe RA, Karhu R, Mandahl N, Mertens F, Saeter G, Heim S, Borresen-Dale AL, Kallioniemi OP. Gain of 17q24-qter detected by comparative genomic Hybridization in malignant tumors from patients with von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Cancer Res* 1996;56:4778-4781.
66. Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:755-765.
67. Maertens O, Brems H, Vandesompele J, De Raedt T, Heyns I, Rosenbaum T, De Schepper S, De Paepe A, Mortier G, Janssens S, Speleman F, Legius E, Messiaen L. Comprehensive NF1 screening on cultured Schwann cells from neurofibromas. *Hum Mutat* 2006;27:1030-1040.
68. Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 1992;6:329-44.
69. Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA & Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990;345:224-9.
70. Martin GA, Viskochil D, Bollag G. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21 regulation. *Cell* 1990;63:843-849.
71. Mashour GA, Drissel SH, 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 und omega-6 fatty acids. *Oncogene* 2005;24:2367-2374.
72. Mechttersheimer G, Otano-Joos M, Ohl S, Benner A, Lehnert T, Willeke F, Moller P, Otto HF, Lichter P, Joos S. Analysis of chromosomal imbalances in sporadic and NF1

- associated peripheral nerve sheath tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:362-369.
73. Menon AG, Anderson KM, Riccardi VM, Chung RY, Whaley JM, Ledbetter DH, Kleider A, Martuza R, Gusella JF, Seizinger BR. Chromosome 17p deletions and p53 mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5435-5439.
74. Mirsky R, Dubois C, Morgan L, Jessen KR. KR.04 and A007-sulfatide antibodies bind to embryonic Schwann cells prior to the appearance of galactocerebroside; regulation of the antigen by axon-Schwann cell signals and cyclic AMP. *Development* 1990;109:105-16.
75. Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, Verdi JM, Hicks C, Weinmaster G, Anderson DJ. Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 2000;101:499-510.
76. Nagpal S, Chandraratna RA. Vitamin A and regulation of gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1:341-6.
77. Nezzar H, Chiambaretta F, Marceau G. Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface. *Mol Vis* 2007;13:1641-1650.
78. Niederreither K, Dolle P. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 2008;9:541-553.
79. Nielson GP, Stemmer-Rachmaninov AO, Ino Y, Moller MB, Rosenberg AE, Louis DN. Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation. *Am J Pathol* 1999;155:1879-1884.
80. Nishi T, Lee PS, Oka K, Levin VA, Tanase S, Morino Y, Saya H. Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation. *Oncogene* 1991;6:1555-1559.
81. Nordling CO. A new theory on the cancer-inducing mechanism. *British Journal of Cancer* 1953;7:68-72.
82. Nwankwo JO. Anti-metastatic activities of all-trans retinoic acid, indole-3-carbinol and (+)-catechin in Dunning rat invasive prostate adenocarcinoma cells. *Anticancer Res* 2002;22:4129-35.
83. Okuducu AF, Janzen V, Ko Y. Cellular retinoic acid-binding protein 2 is downregulated in prostate cancer. *Int J Oncol* 2005;27:1273-1282.
84. Petkovich PM. Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:136-42.

85. Pettersson F, Couture MC, Hanna N, Miller WH. Enhanced retinoid-induced apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells by PKC inhibitors involves activation of ERK. *Oncogene* 2004;23(42):7053-7066.
86. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT PCR. *Nuc Acids Res* 2001;29:2003-2007.
87. Piao YF, Shi Y, Gao PJ. Inhibitory effect of all-trans retinoic acid on human hepatocellular carcinoma cell proliferation. *World J Gastroenterol* 2003;9:2117-20.
88. Plantier L, Rochette-Egly C, Goven D, Boutten A, Bonay M, Lesèche G, Fournier M, Crestani B, Boczkowski J. Dysregulation of elastin expression by fibroblasts in pulmonary emphysema: role of cellular retinoic acid binding protein 2. *Thorax* 2008;63(11):1012-7.
89. Radu M, Soprano DR, Soprano KJ. S10 phosphorylation of p27 mediates atRA induced growth arrest in ovarian carcinoma cell lines. *J Cell Physiol* 2008;217(2):558-68.
90. Robertson KA, Nalepa G, Yang FC, Bowers DC, Ho CY, Hutchins GD, Croop JM, Vik TA, Denne SC, Parada LF, Hingtgen CM, Walsh LE, Yu M, Pradhan KR, Edwards-Brown MK, Cohen MD, Fletcher JW, Travers JB, Staser KW, Lee MW, Sherman MR, Davis CJ, Miller LC, Ingram DA, Clapp DW. Imatinib mesylate for plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1: a phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2012;13:1218–1224.
91. Rutkowski JL, Wu K, Gutmann DH, Boyer PJ, Legius E. Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 2000;9:1059-1066.
92. Schmidt H, Wurl P, Taubert H, Meye A, Bache M, Holzhausen HJ, Hinze R. Genomic imbalances of 7p and 17q in malignant peripheral nerve sheath tumors are clinically relevant. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:205-211.
93. Schug T, Berry D, Toshkov IA., Cheng L, Nikitin AY, Noy N. Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPAR / to RAR. *Medical Science* 2008;15:7546–7551
94. Sela-Donenfeld D und Kalcheim C. Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development* 1999;126:4749-4762.
95. Serra E, Rosenbaum T, Winner U, Aledo R, Ars E, Estivill X, Lenard HG, Lazaro C. Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations. *Hum Mol Genet* 2000;9:3055-3064.

96. Shah NM, Marchionni MA, Isaacs I, sroobant P, Anderson DJ. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell* 1994;77:349-360.
97. Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet* 1996;33:2-17.
98. Si SP, Tsou HC, Lee X, Peacocke M. Effect of cellular senescence and retinoic acid on the expression of cellular retinoic acid binding proteins in skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 1995;219:243-248.
99. Skolnick MH, Ponder BAJ, Seizinger B. Linkage of NF1 to 12 chromosome 17 markers: a summary of eight concurrent reports. *Genomics* 1987;1:374-81.
100. Son YJ und Thompson WJ. Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 1995;14:133-141.
101. Stark AM., Hugo HH, Buhl R, Mehdorn HM. Tumoren peripherer Nerven Dtsch Arztebl 2002;99:928-933
102. Steidl U, Schroeder T, Steidl C. Distinct gene expression pattern of malignant hematopoietic stem and progenitor cells in polycythemia vera. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1044:94-108.
103. Takahashi M, Yang XJ, Lavery TT. Gene expression profiling of favorable histology Wilms tumors and its correlation with clinical features. *Cancer Res* 2002;62:6598-6605.
104. Thiele C, Deutsch LA, Israel MA. The expression of multiple protooncogenes is differentially regulated during retinoic acid induced maturation of human neuroblastoma cell lines. *Oncogenes* 1988;3:281-288.
105. Torma H, Lontz W, Liu W, Rollman O, Vahlquist A. Expression of cytosolic retinoid binding protein genes in human skin biopsies and cultured keratinocytes and fibroblasts. *Br J Dermatol* 1994;131:243-249.
106. Trachtenberg JT und Thompson WJ. Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. *Nature* 1996;379:174-177.
107. Viskochil D, Cawthon R, O'Connell P. The gene encoding the oligodendrocyte myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *MolCell Biol* 1991;11:906-12.
108. Vogel K, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, Meyers K, Rushing EJ, Parada LF. Mouse Tumor Model for Neurofibromatosis Type 1. *Science* 1999;286:2176-2179.
109. Warrell RP, Jr., de The H, Wang ZY, Degos L. Acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 1993;329:177-189.

110. Widemann BC, Salzer WL, Arceci RJ, Blaney SM, Fox E, End D, Gillespie A, Whitcomb P, Palumbo JS, Pitney A, Jayaprakash N, Zannikos P, Balis FM. Phase I trial and pharmacokinetic study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in children with refractory solid tumors or neurofibromatosis type I and plexiform neurofibromas. *J Clin Oncol* 2006;24:507-516.
111. Wiest V, Eisenbarth I, Schmegner C, Krone W, Assum G. Somatic. NF1 mutation spectra in a family with neurofibromatosis type 1: toward a theory of genetic modifiers. *Hum Mutat* 2003;22 :423-427.
112. Xu G, O'Connell P, Viskochil D. The neurofibromatosis type 1 gene encodes protein related to GAP. *Cell* 1990;62:599-608.
113. Yu VC, Delsert C, Andersen B. RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 1991;67:1251-66.
114. Zhang R, Banik LN, Ray SK. Combination of all-trans retinoic acid and interferon-gamma upregulated p27kip1 and down regulated CDK2 to cause cell arrest leading to differentiation and apoptosis in human glioblastoma LN18 (PNET-proficient) and U87MG (PNET-deficient) cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;62:407-417.
115. Zhelyaznik N, Schrage K, McCaffery P, Mey J. Activation of retinoic acid signaling after sciatic nerve injury: up-regulation of cellular retinoid binding proteins. *Eur J Neurosci* 2003;18:1033-1040.
116. Zouboulis CC. Retinoids: which dermatological indications will benefit in the near future? *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001;14:303-15.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anna Dombrowski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Untersuchung zur Expression des zellulären Retinsäure-bindenden Proteins 2 (CRABP2) und zur Wirkung von all-trans-Retinsäure (ATRA) in Neurofibromatose Typ 1- assoziierten Nervenscheidentumoren“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Anna Dombrowski hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Originalarbeiten

1. Fischer-Huchzermeyer S, Dombrowski A, Wilke G, Stahn V, Streube A, Mautner VF, Harder A.

MEK inhibitor therapy augments response to ATRA in NF1 associated malignant peripheral nerve sheath tumors in-vitro.

Originalpublikation bei BMC Cancer eingereicht.

Beitrag im Einzelnen: geteilte Erstautorenschaft, Durchführung wesentlicher Experimente und Zusammenfassung der Ergebnisse.

2. Fischer-Huchzermeyer S, Dombrowski A, Hagel C, Mautner VF, Schittenhelm J, Harder A.

The cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2) does not act as a tumorsuppressor in MPNST but preserves cell survival independently of retinoic acid.

Originalpublikation bei Carcinogenesis eingereicht.

Beitrag im Einzelnen: Zweitautor, Durchführung einzelner Experimente.

Vorträge auf nationalen und internationalen Tagungen

1. Dombrowski A, Guse K, Holtkamp N, Kluwe L, Heppner FL, Friedrich RE, Mautner VF, Harder A. *All-trans Retinoic Acid (ATRA) Treatment Reduces Proliferation of Plexiform Neurofibroma Derived Cell Cultures and MPNST Cell Lines.* European Neurofibromatosis Meeting. Oslo 2010.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung aller Experimente.

2. Fischer S, Dombrowski A, Wilke G, Mautner VF, Friedrich RE, Harder A. *Phenotypes of NF1 associated Peripheral Nerve Sheath Tumors are associated with modified Retinoic acid*

signaling mediated by differential CRABPII expression. Meeting of the German Society of Neuropathology and Neuroanatomy 2012. DOI: 10.3205/12dgnn056 (Doc12dgnnPP3.12).

Beitrag im Einzelnen: Durchführung einzelner Experimente.

Posterpräsentationen auf nationalen und internationalen Tagungen

1. Dombrowski A, Guse K, Holtkamp N, Kluwe L, Heppner FL., Friedrich RE, Mautner VF, Harder A. *Antiproliferative effects of all-trans retinoic acid (ATRA) on neurofibroma cultures and MPNST cell lines*. The Children's Tumor Foundation Conference, Baltimore 2010. Abstract book: 27.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung aller Experimente.

2. Fischer S, Dombrowski A, Wilke G, Mautner VF, Friedrich RE, Heppner F, Stummer W, Paulus W, Harder A. *All-trans retinoic acid (ATRA) reduces proliferation of neurofibroma derived primary Schwann cells and MPNST cell lines*. Jahrestagung der Neuroonkologischen Arbeitsgemeinschaft (NOA) 2011. Abstract book: 10.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung einzelner Experimente.

3. Fischer S, Dombrowski A, Wilke G, Mautner VF, Friedrich RE, Harder A. *Role of Retinoic Acid Signalling in subtypes of NF1 associated Peripheral Nerve Sheath Tumors*. The Children's Tumor Foundation Conference, New Orleans 2012. Poster 11. Abstract book: 35.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung einzelner Experimente.

4. Fischer S, Dombrowski A, Wilke G, Mautner VF, Friedrich RE, Harder A. *CRABPII makes the difference in subtypes of NF1 associated Peripheral Nerve Sheath Tumors*. European Neurofibromatosis Meeting, Istanbul, 2012. P-9. Abstract book: 38.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung einzelner Experimente.

5. Fischer-Huchzermeyer S, **Dombrowski A**, Harder A. *Combined therapy of ATRA and MEKi reduces viability of MPNST cell lines*. The Children's Tumor Foundation Conference, Monterey 2015. P-15. Abstract book: 43.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung einzelner Experimente.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrer

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Betreuerin, Frau PD Dr. A. Harder, für die Überlassung des Themas der Dissertation, ihre hilfsbereite Unterstützung, konstruktive Kritik sowie viel Geduld und Verständnis. Ich bedanke auch mich für die Möglichkeit einer Teilnahme an der NF1-Konferenz in Baltimore (USA).

Ich bedanke mich

...bei Herrn Prof. Dr. Heppner für die Möglichkeit der Durchführung der Experimente im Labor des Instituts für Neuropathologie Charité-Universitätsmedizin Berlin sowie für Möglichkeit, Erfahrungen im wissenschaftlichen Arbeiten zu sammeln,

...bei den Mitarbeitern des Instituts, vor allem Dr. N. Holtkamp und Dr. G. Wilke, für die qualifizierten Ratschläge zur Durchführung einzelner Methoden,

...bei Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Mauntner (UKE, Hamburg) für die Einarbeitung in die Kultivierung von Schwanzzellen sowie für die zur Verfügung gestellten primären Schwanzzellkulturen,

...Frau Dr. S. Fischer-Huchzermeyer für gute und anregende Zusammenarbeit.

Mein letzter und größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung, Motivation und den Glauben an mich.