

1. Einleitung

1.1. Die DNA-Methylierung

Mit dem Abschluss des „Human-Genom-Projekts“ im April 2003 [1] wurden 3 Billionen Basenpaare bestimmt und damit alle Gene der menschlichen DNA identifiziert. Die Herausforderung besteht nun darin, die molekularen Mechanismen, die eine selektive Genexpression erlauben, zu verstehen. So werden zwar alle Gene in einem Organismus in einem bestimmten Stadium des Lebenszyklus transkribiert, jedoch ist nur eine eingeschränkte Anzahl für die Differenzierung eines speziellen Zelltyps erforderlich. Wichtig ist daher nicht nur, die korrekten Gene zum „Anschalten“ zu selektieren, sondern auch solche, die inaktiviert werden sollen. Ein besonders gut untersuchter Inaktivierungsmechanismus von Genen ist die DNA-Methylierung. Diese feine Modifikation überzieht die Primärstruktur des Genoms und wird daher dem Gebiet der *Epigenetik* zugeordnet.

1.1.1. DNA-Methylierungsmuster im menschlichen Genom

DNA-Methylierung in höheren Eukaryonten betrifft nur die Base Cytosin, die am 5. Kohlenstoffatom mit einer Methylgruppe kovalent modifiziert wird (Abb. 1.1.). Durch diese Modifikation wird nicht die Basenpaarung von Cytosin in der Watson-Crick-Doppelhelix behindert [2]. Jedoch ist die Methylgruppe in der „major groove“ der DNA positioniert [3], wo sie leicht von Proteinen detektiert werden kann, die mit der DNA interagieren. Die Methylierung verleiht der DNA somit eine zusätzliche Information, die nicht in der Sequenz kodiert ist. 5'-Methylcytosin wird daher häufig als fünfte Base bezeichnet.

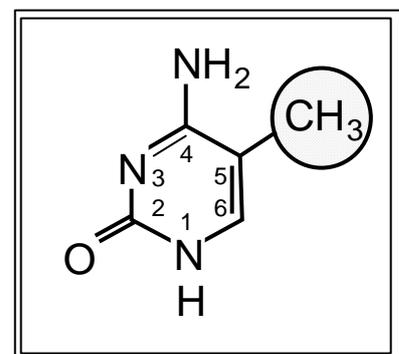


Abb. 1.1.: Molekulare Struktur von 5'-Methylcytosin

Diese Form der Informationsspeicherung ist flexibel genug, um auf unterschiedliche somatische Zelltypen adaptiert zu werden, und stabil genug, um während der Mitose und Meiose beibehalten zu werden. Cytosinmethylierung tritt nach der DNA-Synthese durch den enzymatischen Transfer einer Methylgruppe vom Methylendonator S-Adenylmethionin an die 5' Kohlenstoffposition des Cytosin auf. Diese enzymatische Reaktion erfolgt in einem komplexen Wechselspiel [4, 5] von DNA-Methyltransferasen (DNMT). DNMT1 ist das Hauptenzym für die DNA-Methylierung in Säugetieren. Da sie nach der DNA-Replikation einen vollständigen Methylierungsstatus aus hemi-methylierten Strängen wiederherstellt [6], wird sie auch als „Maintenance“-Methyltransferase bezeichnet. Im Gegensatz dazu sind DNMT3A und DNMT3B vor allem für die Methylierung neuer Positionen, also für den Prozess der *de novo* Methylierung [7] zuständig.

In Säugetieren stellt 5'-CpG-3' das vorrangige Erkennungsmotiv der DNA-Methyltransferasen dar, obgleich auch „non-CpG“-Methylierung beschrieben wurde [8]. Diese CpG-Dinukleotide sind stark unterrepräsentiert im menschlichen Genom, was auf die hohe Rate an Methylcytosin-zu-Thymin-Transitionsmutationen zurückgeführt wird [9, 10]. Da die aktive Transkription CpG-Dinukleotide vor Methylierung schützt [11], sind die Cytosine im Promotor und im ersten Exon von transkribierten Genen von der CpG-Depletion verschont und bilden als dichte CpG-Gruppen im weiten, CpG-leeren Genom die sogenannten CpG-Inseln. Eine allgemein akzeptierte Definition einer CpG-Insel wurde 1987 von Gardiner-Garden und Frommer [12] vorgeschlagen und beschreibt einen 200 bp langen Abschnitt der DNA mit einem C + G Gehalt von 50 % und einem beobachteten CpG- / erwarteten CpG-Anteil von 0,6. Diese willkürlichen Kriterien, die aus einer Zeit vor der Sequenzierung des Säugetiergenoms herrühren, schließen viele Sequenzen wie Alu-repetitive Elemente ein, die nicht mit der Genregulation assoziiert sind. Um diese gewöhnlicherweise stark methylierten Sequenzen auszuschließen und solche zu identifizieren, die in der Promotorregion liegen und die Genexpression kontrollieren, wurden neue, strengere Kriterien [13] für die Identifizierung von CpG-Inseln postuliert: ein größer als 500 bp langer Abschnitt der DNA mit einem C + G Gehalt von mindestens 55 % und einem beobachteten CpG- / erwarteten CpG-Anteil von 0,65.

Gewöhnlicherweise werden CpG-Inseln in normalen Zellen im unmethylierten Zustand erhalten. Dies erfolgt wahrscheinlich über die Protektion durch Transkriptionsfaktoren wie Sp1 [14]. Eine Ausnahme bilden CpG-Inseln, die mit „imprinted“ Genen und Genen des inaktivierten X-Chromosoms assoziiert sind. Interessanterweise steigt die Methylierung

zung einiger CpG-Inseln im normalen Gewebe mit dem Alter an [15, 16], bei gleichzeitig sinkendem 5'-Methylcytosin-Gehalt des gesamten Genoms [17].

1.1.2. DNA-Methylierung und transkriptionelle Aktivität

Im Jahre 1988 beschrieben Toniolo et al. [18] erstmals den modulierenden Effekt der DNA-Methylierung auf die Genexpression. Zwischenzeitlich wurde für eine Reihe von Genen eine inverse Korrelation zwischen der DNA-Methylierung und der transkriptionellen Aktivität demonstriert [19]. Für die Effizienz der Repression scheint dabei die Dichte der methylierten Cytosine von entscheidender Bedeutung zu sein [20, 21]. Andererseits wurde vermutet, dass die spezifische Position von methylierten Cytosinen wichtig für die Geninaktivierung ist [22].

Zur Erklärung des repressiven Signals der DNA-Methylierung werden daher zwei Modelle herangezogen: Die DNA-Methylierung kann direkt in der Konsensussequenz von Transkriptionsfaktoren deren Bindung verhindern [23]. Alternativ dazu kann die DNA-Methylierung auch indirekt durch methyl-DNA-bindende Proteine (MeCP2 und MBD) wirken [24]. Diese Proteine scheinen das DNA-Methylierungssignal in einen repressiven Zustand des Chromatins umzuwandeln, indem sie einen großen Komplex aus Histon-deacetylasen und Methyltransferasen rekrutieren [25, 26].

DNA-Methylierung definiert somit Regionen für die transkriptionelle Repression. Dies ermächtigt die Transkriptionsmaschinerie, die begrenzte Zahl von Genen auszuwählen, die wesentlich für das Überleben und die Differenzierung der Zelle sind. Die DNA-Methylierung ist daher durch Reduktion des „transkriptionellen Rauschens“ in Organismen mit einem komplexen Genom [27] für die Etablierung und Erhaltung einer zelltyprestriktiven Genexpression [28] essentiell.

Abgesehen davon ist sie aber auch in eine Vielzahl anderer biologischer Prozesse involviert; beispielsweise in den Schutz gegenüber parasitären DNA-Elementen und Retrotransposons [29, 30], dem genomischen Imprinting [31, 32] und der X-Chromosom-Inaktivierung [31, 33, 34].

1.1.3. DNA-Methylierung in Tumoren

In den letzten Jahren mehrten sich die Hinweise für eine Schlüsselrolle der DNA-Methylierung in der Entstehung von Tumoren [35]. So präsentierte eine Analyse des DNA-

Methylierungsprofils einer Zelle, das sogenannte „methylome“ [36], mehrere Unterschiede zwischen normalen Zellen und Tumorzellen. Sowohl sporadische als auch hereditäre Tumore zeigen eine Imbalance der Cytosinmethylierung. Einige Gene scheinen in einer tumorspezifischen Weise verändert methyliert zu sein [37]. Dieses Muster lässt vermuten, dass die Methylierung eines spezifischen Teils der Gene zur Entwicklung eines speziellen Tumortyps beiträgt. Dabei scheinen transformierende Prozesse wie die Erlangung eines Wachstumsvorteils und der Verlust der Wachstumskontrolle beeinflusst zu werden. Die Rolle der DNA-Methylierung in Tumoren ist schließlich komplex. So zählt neben der Hypermethylierung von CpG-Inseln [38] auch die genomweite Hypomethylierung [39] zu den DNA-Methylierungsdefekten in Tumoren. Beide epigenetischen Informationen sind mit einer Veränderung der Chromatinstruktur und somit auch der Genfunktion verbunden. Abgesehen davon führt die DNA-Methylierung unter speziellen zellulären Bedingungen und in besonderen „hot-spot“-Sequenzen [40] zu Punktmutationen, einer klassischen genetischen Läsion. In diesem Fall wandelt die Deaminierung von 5-Methylcytosin ein Cytosin in ein Thymin um. Das letztlich tumorspezifische DNA-Methylierungsprofil eines Zelltyps könnte folglich als biologischer Marker mit diagnostischer und prognostischer Relevanz dienen.

1.1.4. Detektion der DNA-Methylierung

Der Methylierungsstatus der DNA kann mit mehreren Methoden detektiert werden, die sich im Wesentlichen in zwei Gruppen einteilen lassen:

- auf Restriktionsenzymen basierende Untersuchungen und
- auf Bisulfitbehandlung basierende Untersuchungen.

Die auf Restriktionsenzymen basierenden Analysen zählen zu den älteren Techniken, das DNA-Methylierungsmuster zu untersuchen. Sie nutzen die Inhibition bestimmter Restriktionsenzyme durch Methylierung ihrer Erkennungsstellen in der DNA als einen Indikator für das Vorhandensein von DNA-Methylierung an einem bestimmten CpG-Dinukleotid. Ein solcher experimenteller Ansatz in Kombination mit einer Southern Blot Analyse erfordert eine beträchtliche Menge qualitativ hochwertiger DNA. Diese Einschränkung kann mit einer „post-digestion“-PCR umgangen werden, die jedoch aufgrund inkompletter Enzymsspaltung zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. In letzter Zeit werden methylierungssensitive Enzyme erfolgreich in genomweiten Methy-

lierungsanalysen wie dem „restriction landmark genomic scanning“ (RLGS) [41] oder der „representational difference analysis“ (RDA) [42] genutzt.

Frommer und Kollegen revolutionierten 1992 das Gebiet der DNA-Methylierungsanalyse durch die Einführung der Bisulfit-Konversion [42]. Bei dieser Untersuchungsmethode wird die epigenetische Information der Cytosinmethylierung in eine Veränderung der primären Sequenz übersetzt: es findet eine Umwandlung unmethylierter Cytosine zu Uracil statt (mit nachfolgender Amplifikation als Thymin) [44], wohingegen methylierte Cytosine unverändert bleiben (Abb. 1.2.). Diese chemische Reaktion in Verbindung mit der PCR-Amplifikation und Sequenzierung ermöglicht eine detaillierte Information über das Verteilungsmuster der 5-Methylcytosine entlang eines Abschnittes der DNA, welcher einen einzelnen, individuellen DNA-Strang repräsentiert [43]. Außerdem kann eine methylierungsspezifische PCR (MSP) Technik die Präsenz eines spezifischen Methylierungsmusters mit sehr hoher Sensitivität und Spezifität detektieren [45].

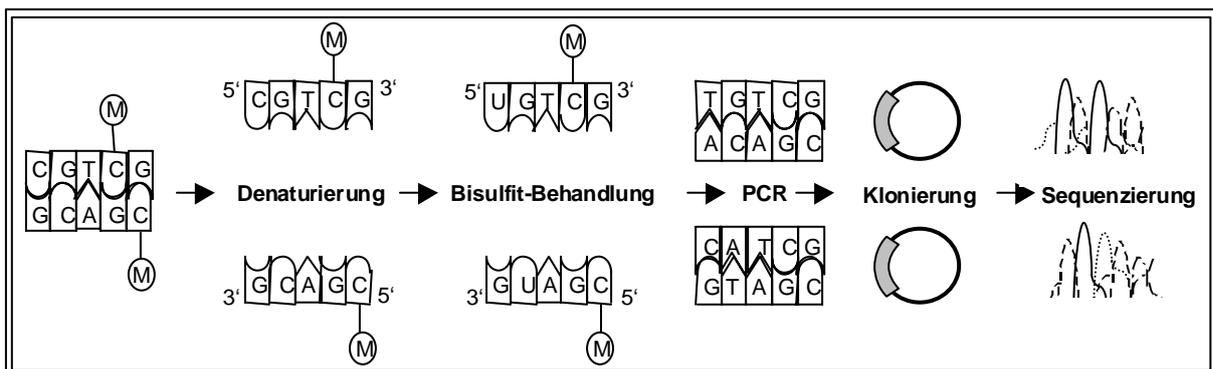


Abb. 1.2.: Prinzip der genomischen Bisulfitsequenzierung, bei der nicht-komplementäre Stränge entstehen

Die starke Zunahme der Techniken zur DNA-Methylierungsanalyse verhinderten die Entwicklung uniformer Standards und machten „cross-validation“-Studien problematisch. Gleichzeitig ist zu betonen, dass keine Technik und kein experimenteller Ansatz allgemein überlegen ist, da jeweils unterschiedliche Ziele wie quantitative Genauigkeit oder sensitive Detektion, hoher lokaler oder globaler Informationsinhalt, Kompatibilität mit formalin-fixiertem Gewebe oder Automatisierung verfolgt werden, die sich nicht in einer einzigen Technik vereinigen lassen. Daher hängt die Wahl der Methode von der jeweiligen Fragestellung ab.

1.1.5. Klinische Relevanz der DNA-Methylierung

Aus klinischer Sicht ist das epigenetische „silencing“ von Tumorsuppressorgenen aufgrund der Reversibilität epigenetischer Veränderungen und der daraus resultierenden Wiederherstellung der Genfunktion von besonderem Interesse. Eine Option der „epigenetischen Therapie“ [46] stellt der Prototyp der DNA-Methylierungsinhibitoren 5-Azacytidine dar. Dieses Nukleosidanalogen wird nach der Phosphorylierung zum Trinukleotid während der Replikationsphase anstatt von Cytosin in die DNA eingegliedert. Dort bildet es eine kovalente Bindung mit DNA-Methyltransferasen aus, die in einer Dezymierung der aktiven Enzyme und somit in einer Demethylierung der DNA resultieren [47]. Aktuelle klinische Studien zeigen, dass Methylierungsinhibitoren effektiv in der Behandlung des myelodysplastischen Syndroms und von Leukämien sein könnten [48].

Schließlich könnte das DNA-Methylierungsmuster, wie schon angesprochen, auch in der Diagnostik Anwendung finden, da es als einzige epigenetische Markierung in der aus Tumoren und Biopsien isolierten, genomischen DNA erhalten ist und somit einen stabilen Marker für die Zelltypidentität und das Genexpressionsprogramm darstellt. Dieser epigenetische Fingerabdruck könnte von großer klinischer Bedeutung sein, wenn seine diagnostische [49] und prognostische Relevanz [50] etabliert werden könnte.

1.2. Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1)

1.2.1. Das klinische Erscheinungsbild der NF1

Die Neurofibromatose Typ 1 ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die weltweit 1 von 3500 Menschen betrifft [51]. Patienten mit dieser Phakomatose leiden an multiplen Neurofibromen, an Abnormalitäten der Pigmentierung (Café-au-lait Flecken, axillärem Freckling und Lisch-Knötchen), an Knochenmalformationen, an Defekten des kardiovaskulären Systems und an Lernstörungen. Typischerweise tritt die NF1 mit einer extrem variablen phänotypischen Ausprägung sowohl inter- als auch intrafamiliär auf. Zur Diagnosestellung werden daher die folgenden Kriterien herangezogen (Tab. 1.1.).

Tab. 1.1.: Diagnostische Kriterien der Neurofibromatose Typ 1 entsprechend der NIH Consensus Development Conference (1988) [61]

DIE DIAGNOSE NEUROFIBROMATOSE TYP 1 IST ZU STELLEN, WENN ZWEI ODER MEHR DER FOLGENDEN KRITERIEN AN EINEM INDIVIDUUM PRÄSENT SIND:

- Sechs oder mehr Café-au-lait Flecken mit einem Durchmesser größer als 5 mm prä- und 15 mm postpubertär
- Zwei oder mehr Neurofibrome oder ein einziges plexiformes Neurofibrom
- Freckling in der Axillar- oder Inguinalregion (Crowe's sign)
- Optikusgliom
- Lisch-Knötchen (Iris-Hamartome)
- Eine charakteristische Knochenanomalie (wie Keilbeinflügeldysplasie oder Dysplasie des Kortex der langen Röhrenknochen)
- Ein Verwandter ersten Grades mit diagnostizierter NF1

Das dominanteste Merkmal der NF1 ist die Entwicklung von Neurofibromen. Es handelt sich dabei um benigne periphere Nervenscheidentumore (WHO Grad I), die sich aus neoplastischen Schwannzellen und nicht-neoplastischen Schwannzellen und Stromazellen wie Fibroblasten, Perineuralzellen und Mastzellen zusammensetzen. Nahezu alle NF1-Patienten entwickeln im Laufe ihres Lebens Neurofibrome. Diese werden dabei in zwei Hauptarten eingeteilt:

Der häufigste Typ ist das dermale Neurofibrom, welches aus den kleinen peripheren Nervenästen in der Dermis hervorgeht und gewöhnlich mit Beginn der Pubertät auftritt. Im Erwachsenenalter nimmt die Zahl und Größe der dermalen Neurofibrome oft zu. Das besondere Charakteristikum der dermalen Neurofibrome ist das ungleichmäßige Wachstumsmuster mit initialen Wachstumsperioden, gefolgt von klinischer Stabilität über Jahre oder sogar Dekaden. Die meisten dieser Neurofibrome entarten nicht maligne.

Der zweite Typ der Neurofibrome zeichnet sich durch ein diffus infiltratives Wachstumsmuster, ausgehend von spinalen und kranialen Nerven, aus und wird daher plexiformes Neurofibrom genannt. In der „South Wales“-Studie [52] besaßen 30 % der 125 NF1-Patienten plexiforme Neurofibrome. Sie sind aus den gleichen Zelltypen wie dermale Neurofibrome zusammengesetzt, haben jedoch eine ausgedehntere Matrix und häufig eine reichere vaskuläre Versorgung. Plexiforme Neurofibrome werden als kongenitale Tumore angesehen. Sie werden häufig kurz nach der Geburt entdeckt und

scheinen, insbesondere während der ersten Lebensdekade, rapide zu wachsen. Entsprechend ihrer Größe und Lokalisation verhindern diese Tumoren häufig eine normale neurologische Funktion und verursachen eine Hypertrophie der Weichteile und der Knochen [53]. Zusätzlich erfährt ein Anteil an plexiformen Neurofibromen (5 %) eine Transformation in einen malignen peripheren Nervenscheidentumor (MPNST).

MPNST sind aus polymorphen, spindelförmigen Zellen mit hoher mitotischer Aktivität aufgebaut, die in einem lockeren Retikulumfaserfilz eingebettet sind [54]. Obwohl MPNST auch in der Gesamtbevölkerung (ca. 0,001 %) auftreten können, haben Individuen mit einer NF1 ein vielfach erhöhtes Risiko, einen MPNST zu entwickeln (2-5 %) [55]. Außerdem werden NF1-assoziierte MPNST in einem früheren Lebensalter als die sporadischen MPNST (26 vs. 62 Jahre) diagnostiziert und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert (5-Jahres-Überlebensrate von 21 vs. 42 %) [56]. Die meisten NF1-assoziierten MPNST scheinen aus bereits existierenden plexiformen Neurofibromen hervorzugehen. Da diese Tumore einem nicht klar definierten Verlauf mit Perioden rapiden Wachstums gefolgt von Perioden relativer Ruhe unterliegen, ist die Diagnostik erschwert. Klinisch werden mit einem MPNST häufig Symptome wie nicht nachlassende Schmerzen unklarer Ursache, rasche Größenzunahme und Konsistenzveränderung von weich zu hart in Zusammenhang gebracht. Mittels MRT lassen sich die Lokalisation, die Ausdehnung und die Änderung der Form beschreiben, jedoch ist oft eine Abgrenzung zum plexiformen Neurofibrom durch unzuverlässige Bestimmung der malignen Transformation nicht sicher möglich. Als potentiell nützliche, nicht-invasive Methode hat sich diesbezüglich das ^{18}F FDG PET in einer retrospektiven Studie von 18 NF1-Patienten erwiesen [57]. Eine effektivere Unterscheidung zwischen einem niedriggradigen MPNST und einem aktiven, benignen, plexiformen Neurofibrom verspricht man sich von dem neuen Tracer ^{18}F -Thymidine, der den DNA-Umsatz detektiert. Aktuell gibt es keine klinischen oder pathologischen Kriterien, die mit der Progression eines plexiformen Neurofibroms in einen MPNST assoziiert sind. MPNST sind hoch aggressive Tumore, die in die Lunge, Leber, Gehirn, Weichteile, Knochen und Lymphknoten metastasieren und häufig rezidivieren.

Die Diagnose einer NF1 ist gewöhnlich nicht lebensbedrohlich. Die Mehrzahl der Patienten erreicht das Erwachsenenalter mit einem mittleren Überlebensalter von 61,2 Jahren [58]. Zu der im Vergleich zur Gesamtbevölkerung kürzeren Lebenserwartung tragen die beiden bedeutendsten Komplikationen der NF1 bei: die arterielle Hypertension und eine signifikant höhere Rate an Malignomen [58, 59]. So werden neben MPNST häufig

Astrozytome, Phäochromozytome und die chronisch myeloischen Leukämien im Kindesalter beobachtet [60].

1.2.2. Das *NF1* Gen

Die einheitlichen klinischen Diagnostikkriterien des NIH führten zu der Identifizierung einer relativ homogenen Kohorte von Patienten und Familien mit NF1 [61], welche letztlich entscheidend zur Ermittlung des für die Erkrankung verantwortlichen Gens beitrug. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) und Kopplungsanalysen resultierten in der Identifizierung der perizentromerischen Region des Chromosoms 17 als wahrscheinlichste Lokalisation für das *NF1*-Gen [62, 63]. Zwei NF1-Patienten mit balancierten Translokationen (t(1;17) und t(17;22)) lieferten schließlich den Schlüssel zur Identifizierung des *NF1*-Gens. So gelang im Jahre 1990 mit Hilfe von Sonden aus dem Bereich der Translokationsbruchpunkte die positionelle Klonierung des Gens [64-66]. Das *NF1*-Gen ist mit 350 kb genomischer DNA extrem groß [65, 67]. In den darauffolgenden Jahren wurde eine Vielzahl von Mutationen nachgewiesen [68, 69]. Bis auf einzelne Mutations-„hot-spots“ sind die Mutationen über das ganze Gen verstreut. Signifikante Genotyp-Phänotyp Korrelationen, die eine Vorhersage des klinischen Erscheinungsbildes erlauben, sind bisher nur für die großen Deletionen, nicht aber für die größere Zahl der kleineren Mutationen beobachtet worden [69]. Außerdem wird durch den großen Umfang des *NF1*-Gens und die hohe spontane Mutationsrate [70, 71] die Durchführbarkeit von routinemäßigem genetischen Screening der NF1-Patienten zur Diagnosesicherung erschwert. Die klinischen Diagnostikkriterien des NIH [61] haben somit weiterhin einen hohen Stellenwert bei der Feststellung einer NF1-Manifestation.

1.2.3. Neurofibromin als Wachstumsregulator

Das *NF1*-Genprodukt, das so genannte Neurofibromin, wird ubiquitär exprimiert, vorrangig jedoch in Neuronen, Oligodendrozyten und Schwannzellen des zentralen und peripheren Nervensystems [72, 73]. Sequenzanalysen von Neurofibromin enthüllten schließlich Hinweise zu seiner Funktion. Eine kleine (aus 360 Aminosäuren bestehende), zentral gelegene Region von Neurofibromin zeigt eine 30%ige Homologie zu der katalytischen Domäne von Mitgliedern der Ras-GTPase aktivierenden Proteinfamilie (Ras-GAP's family) [74, 75]. Diese Proteine fungieren als negativer Regulator von Ras

[75]. Sie inaktivieren Ras durch gesteigerte Konversion der aktiven GTP-gebundenen Form in seinen inaktiven Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen Zustand. In vielen Zelltypen stellt das aktive, GTP-gebundene Ras ein potentes wachstumsförderndes Signal dar und ermöglicht die onkogene Transformation *in vitro* und *in vivo*. Ras-GAP Moleküle wie Neurofibromin inaktivieren Ras, reduzieren das Ras-vermittelte mitogene Signal und inhibieren somit die Zellproliferation (Abb.: 1.3.). Aufgrund dieser entscheidenden Rolle bei der Regulierung der intrazellulären Signalwege wird Neurofibromin eine Funktion als Tumorsuppressor [76] zugesprochen.

Die Konsequenz der erhöhten Ras-Aktivierung in Neurofibromin-defizienten ($NF^{-/-}$) Zellen manifestiert sich durch die gesteigerte Aktivität verschiedener Ras-Effektoren wie RAF, ERK1/2, Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und p21-aktivierter Kinase (PAK) [77-81]. Die Aktivierung dieser Signalwege trägt schließlich zur erhöhten Proliferation von $NF1$ -nullizygoten ($NF^{-/-}$) Schwanzzellen sowie zur gesteigerten Proliferation und Mobilität von $NF1$ -heterozygoten ($NF^{+/-}$) Mastzellen bei [78, 79].

Unabhängig von der Ras-GAP-Aktivität scheint Neurofibromin zusätzliche Funktionen zu besitzen. So wurden regulierende Eigenschaften von Neurofibromin auf die Adenylyl cyclase und auf die Erzeugung von intrazellulärem zyklischen AMP (cAMP) beschrieben [82-84].

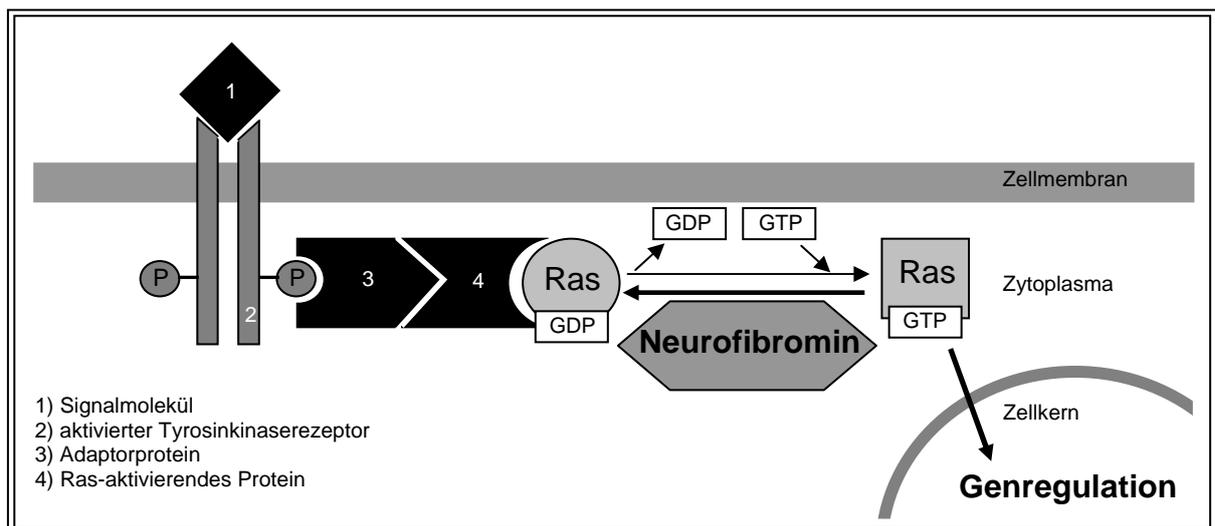


Abb. 1.3.: Interaktion von Neurofibromin mit dem Ras-Signalweg.

1.2.4. Der *NF1*-Promotor

Der humane *NF1*-Promotor enthält eine CpG-Insel [85]. Die höchste Konzentration von CpGs beinhaltet dabei eine 1,2 kb große Region der DNA-Sequenz, die den Transkriptionsstartpunkt umgibt. Der *NF1*-Promotor zeigt zur korrespondierenden murinen Sequenz einen hohen Grad an Konservierung [86]. Der Bereich der höchsten Homologie liegt in der für die Regulation der Transkription wichtigen 5'UTR („untranslated region“) zwischen Transkriptionsstartpunkt und Exon 1. Eine Reihe potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie Erkennungssequenzen für Sp1 (+416 und +460) und AP2 (+72, +264, +306, +335 und +463), ein „cAMP response element“ (-16) und ein „serum response element“ (-14) sind hier lokalisiert [87]. Zusätzlich zu diesen hochkonservierten Bindungsmotiven besitzt der humane *NF1*-Promotor in upstream-Richtung nicht-konservierte Bindungsstellen für AP2 (-166 und -139) und Sp1 (-141 und -165) sowie eine „octamer“ Bindungsstelle (-94).

1.2.5. Pathogenese der *NF1*-assoziierten Nervenscheidentumore

Wie in anderen Tumorsyndromen werden Individuen mit einer *NF1* mit einem mutierten (nicht funktionierenden) und einem Wildtyp- (funktionierenden) *NF1*-Gen in jeder Körperzelle geboren. Diese *NF1*-heterozygote Voraussetzung alleine ist insuffizient, um die Entstehung von Tumoren zu erklären. Entsprechend der „two-hit“-Hypothese von Knudson [88] löst erst die Inaktivierung des erhaltenen Wildtyp-*NF1*-Allels in einer individuellen Zelle die Bildung der *NF1*-assoziierten Tumore aus [89].

Um die Rolle der biallelischen *NF1*-Inaktivierung in der *NF1*-assoziierten Tumorigenese näher zu charakterisieren, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Tiermodelle etabliert. Die anfänglichen Mausmodelle waren jedoch wenig informativ, da die *NF1*-nullizygoten (*NF1*^{-/-}) Mäuse bereits intrauterin aufgrund eines Defekts der Herzgefäße starben und die *NF1*-heterozygoten (*NF1*^{+/-}) Mäuse nicht die klassischen Zeichen einer Neurofibromatose Typ 1 wie Neurofibrome und hyperpigmentierte Haut entwickelten [90, 91]. Die fehlende Bildung von Neurofibromen in *NF1*-heterozygoten (*NF1*^{+/-}) Mäusen deutet darauf hin, dass der Verlust beider *NF1*-Allele essentiell für die Entwicklung von Neurofibromen sein könnte. Um die Mutationsrate in den Mäusezellen erhöhen zu können, wurden chimärische Mäuse sowohl mit *NF1*^{-/-} als auch mit *NF1*^{+/+}-Zellen erzeugt. Diese Mäuse entwickelten plexiforme Neurofibrome, die ausschließlich von *NF1*

^{-/-} Zellen [92] stammten. Diese Studie lieferte somit den zwingenden Beweis, dass der Verlust beider *NF1*-Allele ein obligater Schritt in der Bildung plexiformer Neurofibrome ist.

Trotz der multizellulären Zusammensetzung wird vermutet, dass dermale und plexiforme Neurofibrome einen klonalen Ursprung haben [93]. Die genetische Untersuchung von Zelllinien aus Neurofibromen zeigte, dass Schwannzellen (die 60-80 % der Neurofibrome ausmachen) und nicht Fibroblasten die somatische *NF1* Genmutation besitzen [94-96]. Im Gegensatz zu Fibrozyten exprimieren *NF1*^{-/-} Schwannzellen keine *NF1* mRNA und kein Protein Neurofibromin [95]. Außerdem werden Schwannzellen in Neurofibromen mit einer defekten Ras-Regulation assoziiert [97]. Diese Ergebnisse sprechen für eine entscheidende Rolle der Schwannzellen in der *NF1*-Tumorigenese. Die Verbesserung der Tiermodelle mit gewebsspezifischer *NF1*-Inaktivierung ermöglichte schließlich Einsichten in die Funktion von Neurofibromin in den relevanten Zellpopulationen. So wird angenommen, dass die komplette *NF1*-vermittelte Tumorigenese neben dem Verlust beider *NF1*-Allele in den neoplastischen Schwannzellen zusätzlich *NF1*^{+/-} heterozygote, nicht-neoplastische Zellen in der Tumorumgebung erfordert, die funktionell zur Tumorbildung beitragen [98]. So wurden verstärkt proliferative Eigenschaften von *NF1*-heterozygoten Mastzellen von *NF1*-Patienten und von *NF1*^{+/-} Mäusen beobachtet [99]. Aufgrund der Zytokinexpression von degranulierenden Mastzellen wird daher spekuliert, dass *NF1*-heterozygote (*NF1*^{+/-}) Mastzellen ein wachstumsförderndes „microenvironment“ für *NF1*-nullizygoten (*NF1*^{-/-}) Schwannzellen in peripheren Nerven schaffen [77, 79, 98].

Die Entstehung von MPNST wird jedoch durch die fehlende *NF1*-Gen-Expression und die erhöhte Ras-Aktivierung alleine nicht suffizient erklärt. Vielmehr sind wahrscheinlich kooperierende genetische Alterationen mit funktioneller Inaktivierung bedeutender Zellzyklusregulatoren wie p53, p27^{Kip1} und p16 für die maligne Transformation erforderlich [94, 95, 97, 100-106]. Diese Hypothese wird durch Beobachtungen an *NF1*- und *p53*-heterozygoten Mäusen (*NF1*^{+/-}; *p53*^{+/-}) unterstützt, die MPNST mit „loss of heterozygosity (LOH)“ an beiden Tumorsuppressorloci [92, 107] besaßen. Außerdem demonstrierte eine Untersuchung humaner MPNST, dass zusätzlich zur *NF1*-Inaktivierung auf Chromosom 17 die Hälfte der Tumoren eine Mutation in einem anderen Tumorsuppressorgen (p53) aufweisen [102]. Die Hypothese, dass zwei oder mehr Mutationen auf verschiedenen Genloci für die Entwicklung eines MPNST nötig sind, wird ebenfalls durch die niedrige Inzidenz dieser malignen Tumoren in der klinischen Praxis bestätigt.

1.2.6. Therapeutische Optionen für NF1-assoziierte Nervenscheidentumore

Da dermale Neurofibrome vorrangig ein kosmetisches Problem darstellen, beschränken sich die therapeutischen Interventionen auf plexiforme Neurofibrome und die sich daraus entwickelnden MPNST.

Die Behandlung der plexiformen Neurofibrome folgt zumeist empirischen Erkenntnissen mit chirurgischen Eingriffen als Therapie erster Wahl bei rapidem Größenwachstum. Die Effizienz alternativer Behandlungsmethoden wie der Einsatz des Antihistaminikums Ketotifen [108, 109], des Redifferenzierungstherapeutikums Retinsäure und des anti-angiogenetischen Medikaments Thalidomid [110] stellte sich als zweifelhaft heraus. Außerdem wurden Studien mit einem eher pathogenesebasierten therapeutischen Ansatz (Farnesylproteintransferaseinhibitor [111], 5-Methyl-1-Phenyl-2-(1*H*)-Pyridon [112, 113]) initiiert, die jedoch aufgrund des unvorhersehbaren Wachstumsverhaltens und der irregulären Form der plexiformen Neurofibrome und der damit verbundenen erschwerten Bestimmung der objektiven Ansprechrate nur ungenügend evaluierbar sind.

Die gegenwärtige Behandlung der MPNST [114] besteht wie bei anderen Weichteilmalignomen in einer kompletten chirurgischen Exzision mit adjuvanter Radiatio bei mäßig bis schlecht differenzierten Tumoren bzw. bei gut differenzierten Tumoren, die nicht im histologisch sauberen Tumorbett reseziert wurden.

Weichteilsarkome scheinen schlecht auf Chemotherapeutika anzusprechen (partielle Remissionsrate der besten verfügbaren Therapie ~ 25 % [115]). Die Chemotherapie dieser Tumorentität ist daher gewöhnlicherweise auf die Behandlung der metastasierten Erkrankungssituation beschränkt. Zu den effektiven Therapiekonzepten gehört die Monotherapie mit Doxorubicin oder eine Kombinationstherapie mit Doxorubicin und Ifosfamid [115]. Kontrovers wird der Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie diskutiert. Eine Metaanalyse [116] hat zwar einen deutlichen Vorteil einer anthrazyklinbasierten Chemotherapie in Bezug auf die rezidivfreie Zeit ergeben, jedoch blieb das Gesamtüberleben unbeeinflusst.

Aus der geringen Ansprechrate der MPNST auf derzeitige systemische Therapien ergibt sich jedoch die Notwendigkeit, zunächst die molekularen Grundlagen für die Entstehung und Progression der Nervenscheidentumoren zu definieren und somit den Weg für „target therapies“ durch spezifische Behandlung der jeweiligen Tumorarten zu eröffnen.