

# 5 Neurofibromatosen

WINFRID KRONE und HILDEGARD KEHRER-SAWATZKI

## Inhaltsverzeichnis

5.1	Einleitung	88	5.4.3.1	Interspeziesvergleiche des NF2-Gens	172
5.2	Neurofibromatose Typ 1 (NF1)	90	5.4.4	Formalgenetik	172
5.2.1	Krankheitsbild	90	5.4.4.1	Mutationenspektrum des NF2-Gens	174
5.2.1.1	Diagnostische Kriterien	90	5.4.4.2	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	175
5.2.1.2	Kardinalsymptome	90	5.4.5	Proteinprodukt des NF2-Gens:	
5.2.1.3	Komplikationen	92		Schwannomin/Merlin	177
5.2.1.4	Varianten	95	5.4.5.1	Struktur des Merlins	177
5.2.2	Genetik der NF1	97	5.4.5.2	Spleißbedingte Isoformen des Merlins	178
5.2.2.1	Formalgenetik	97	5.4.5.3	Expression des Merlins	179
5.2.2.2	Charakteristika des NF1-Gens	98	5.4.5.4	Intrazelluläre Lokalisation des Merlins	180
5.2.2.3	NF1-Pseudogene	102	5.4.5.5	Interdomänenassoziation des Merlins	182
5.2.2.4	Transkriptionsprodukte	102	5.4.5.6	Interaktionspartner des Merlins und der ERM-Proteine	185
5.2.2.5	Mutationen	105	5.4.5.7	Merlin als negativer Wachstumsregulator	188
5.2.2.6	Expressionsmuster des NF1-Gens	109	5.4.5.8	Regulation des Merlins durch posttranslationale Modifikation	189
5.2.3	Neurofibromin	112	5.4.5.9	Merlin vs. ERM-Proteine: Gemeinsamkeiten und Gegensätze	189
5.2.3.1	Neurofibromin als Mitglied der Ras-GAP-Familie	112	5.4.6	Pathogenese der NF2	190
5.2.3.2	Struktur-Funktions-Beziehungen	117	5.4.6.1	Schwannome	190
5.2.3.3	Regulation der NF1-Gen-Expression und der Neurofibrominaktivität	120	5.4.6.2	Meningeome	192
5.2.4	Mechanismen der Pathogenese bei NF1	123	5.4.6.3	Defekte des NF2-Gens bei glialen Tumoren	195
5.2.4.1	Formale Aspekte des Tumorsuppressorparadigmas	123	5.4.7	Molekulare Pathogenese	197
5.2.4.2	Mechanismen der Tumorgenese bei NF1	130	5.4.7.1	Stabilität mutanter Merlinformen	197
5.2.4.3	Molekulare Pathologie	139	5.4.7.2	Dysfunktion mutanter Merlinformen	199
5.2.4.4	Pathogenese der nichtneoplastischen Symptome der NF1	146	5.4.7.3	Phänotyp und Wachstumseigenschaften von kultivierten Schwann-Zellen aus NF2-assoziierten und sporadischen Schwannomen	202
5.2.4.5	Ursachen der variablen Expressivität der NF1	150	5.4.7.4	Auswirkungen der Merlindefizienz bei <i>Nf2(-/-)</i> -Embryonen	203
5.2.5	Künstliche Tiermodelle der NF1	155	5.4.7.5	Heterozygote <i>Nf2(+/-)</i> -Mäuse	204
5.2.5.1	Eigenschaften der Knockout-Mäuse mit Mutationen im NF1-Gen	155	5.4.7.6	Transgene Mäuse, die mutantes Merlin exprimieren	206
5.2.5.2	Eigenschaften der <i>Nf1(-/-)</i> -Mausembryonen	156	5.4.7.7	Funktionsanalyse des Merlins bei <i>Drosophila</i>	208
5.2.5.3	Untersuchungen zur Funktion des Neurofibromins in spezifischen Zellen der Knockout-Mäuse	157	5.4.8	CD44-Spleißvarianten in Schwannomen mit Mutationen des NF2-Gens	209
5.2.5.4	Analyse von Doppelmutanten aus <i>Nf1(+/-)</i> - u. a. Knockout-Mausstämmen	160	5.4.9	Reversion des v-Ha-Ras-transformierten Phänotyps durch Merlin	209
5.2.5.5	Chimäre Mäuse mit Mutationen im NF1-Gen	162	5.4.10	Somatische Mutationen des NF2-Gens in nicht mit NF2 assoziierten Tumoren	211
5.2.5.6	Transgene Mäuse	163	5.4.11	Abgrenzung der NF2 von der familiären multiplen Meningeomatose	211
5.3	Genetische Beratung, Patientenbetreuung und Therapie	164	5.4.12	Schwannomatose und NF2	211
5.3.1	Neurofibromatose Typ 1	164	5.5	Resümee	214
5.3.2	Neurofibromatose Typ 2	165	5.6	Literatur	216
5.4	Neurofibromatose Typ 2 (NF2)	166	5.6.1	Monografien	216
5.4.1	Geschichte	166	5.6.2	Zitierte Literatur	217
5.4.2	Krankheitsbild der NF2	166			
5.4.3	Das menschliche NF2-Gen	169			

## 5.1 Einleitung

Die Neurofibromatosen gehören zu einer Gruppe von etwa 25 Tumordispositionskrankheiten, denen konstitutionelle Heterozygotie für Mutationen an Tumorsuppressorgen zugrunde liegt. Allen diesen Krankheiten ist hohe Komplexität sowohl ihrer Manifestationsformen als auch der verursachenden Mechanismen auf zellbiologischer, biochemischer und molekulargenetischer Ebene gemeinsam. Ihre phänotypische Manifestation ist durch ausgeprägte variable Expressivität gekennzeichnet. Eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelationen sind deshalb nur selten nachweisbar. Auf molekularer Ebene besteht die Komplexität v. a. in den vernetzten Reaktionskaskaden der Signaltransduktion und in der multifaktoriellen Tumorgenese. Obwohl während des vergangenen Jahrzehnts bedeutende Fortschritte im Verständnis der Pathogenese der Neurofibromatosen gemacht wurden, sind wir von einer lückenlosen und eindeutigen kausalen Erklärung der Krankheitsbilder noch weit entfernt. So konnte z. B. bisher keines der nichtneoplastischen Symptome der NF1 im Sinn einer Folge des Neurofibrominmangels erklärt werden. Es kann deshalb auch in dieser Übersicht kein schlüssiges Bild vermittelt werden. Es wurde vielmehr der Versuch einer möglichst vollständigen Bestandsaufnahme unternommen.

Berichte und bildliche Darstellungen von Patienten, deren Phänotyp heute dem breiten Spektrum der Erscheinungsformen der Neurofibromatose zugeordnet werden würde, reichen bis ins 2. Jahrhundert unserer Zeitrechnung zurück. Zahlreiche detaillierte Beschreibungen besonders der grotesken Formen der NF1 folgten im Zeitalter der Aufklärung. Erst um die Mitte des 19. Jahrhunderts wurde von Virchow (1847) und Smith (1849) die Beziehung der Tumoren zum Bindegewebe des peripheren Nervensystems erkannt. Friedrich Daniel von Recklinghausen führte 1882 den Beweis für diese Hypothese in seiner Virchow gewidmeten Schrift: „Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuomen“ (1882). Von Recklinghausen prägte den Begriff „Neurofibromatose“, den wir heute mit den Zusätzen „Typ 1“ und „Typ 2“ (NF1 und NF2) den beiden genetisch am genauesten definierten Formen der Krankheit zuordnen. Eine detaillierte Darstellung der frühen Geschichte der Neurofibromatose gab Huson (1994 a). Aus der Flut rein kasuistischer Literatur der Folgezeit heben sich einige klinische Studien an größeren Patientenkollektiven ab; Zitate

finden sich in der Übersicht von Koch (1966). Mit der Beteiligung fast aller medizinischen Disziplinen an dieser regen Publikationstätigkeit ist auf das anschaulichste dokumentiert, dass von der Neurofibromatose praktisch alle Organe in Mitleidenschaft gezogen werden können, sei es infolge des Befalls durch Neurofibrome oder andere Tumoren, oder aufgrund nicht tumorbedingter, autochthoner Veränderungen. Die umfang- und folgenreichste unter den späteren Erhebungen dieser Art ist ohne Zweifel in der Monografie von Crowe et al. (1956) dokumentiert worden. Dieser Studie (und einer vorausgehenden Arbeit der Autoren) ist das diagnostische Kriterium der „mindestens 6 Café-au-lait-Flecken“ zu verdanken sowie auch die bis dahin genauesten Belege für die Häufigkeit der Kardinalsymptome und mancher Komplikationen der NF1.

In der Folgezeit wurden zunehmend klarere Unterscheidungen zwischen der

- „peripheren“ NF (NF1) und
- einer so genannten „zentralen“ Form (NF2)

getroffen, deren Symptomatik gleichwohl Überlappungen mit derjenigen der NF1 aufweist. Erst in der 2. Hälfte der 70er und Anfang der 80er Jahre wurde mit Laboruntersuchungen und experimentellen Studien, häufig an Zellkultursystemen, begonnen. Viele dieser Studien wurden in Band 486 (1986) der *Annals of the New York Academy of Sciences* zusammengefasst (Rubenstein et al. 1986). Ein kausalanalytisch ergiebiger und reproduzierbarer Laborparameter für NF1 ist aus diesen Arbeiten nicht hervorgegangen. Der Schwerpunkt der NF1-Forschung verlagerte sich konsequenterweise auf die Suche nach dem NF1-Gen.

Zu Beginn der Bemühungen um die Kartierung und Identifizierung des NF1-Gens galt für einige Zeit das Gen für den neuronalen Wachstumsfaktor (NGF $\beta$ ) als Kandidatengen. Die Hypothese erschien durch frühe Arbeiten begründet, wonach die Aktivität und/oder die Konzentration des NGF $\beta$  im Serum von NF1- und NF2-Patienten erhöht seien. Obwohl sich diese Befunde später nicht bestätigen ließen (Riopelle et al. 1984), gaben sie den Anlass zu Kopplungsstudien mit Hilfe zweier polymorpher Marker des NGF $\beta$ -Gens, durch die das NF1-Gen mit hoher statistischer Plausibilität von einer Region von je 13 cM beiderseits des NGF $\beta$ -Gens ausgeschlossen werden konnte (Darby et al. 1985). 1987 wurde aufgrund von 90 genau lokalisierten und 24 präliminar kartierten polymorphen DNA-Markern eine Ausschlusskarte erstellt (Sarfarazi et al. 1987). Hierdurch war es möglich, 18 der 22 Autosomen als Träger des

NF1-Gens auszuschließen; nicht ausgeschlossen blieben die Chromosomen 5, 10, 17 und 18. Daraufhin fokussierten Gusella und Mitarbeiter ihr Interesse auf den langen Arm von Chromosom 17. Dort war inzwischen das Gen für den niederaffinen NGF-Rezeptor lokalisiert worden (Huebner et al. 1986). Mit Hilfe zweier RFLP des NGFR-Gens ergaben sich in 9 von 13 NF1-Familien positive Lod-Scores, die sich bei einem Genabstand zwischen 10 und 20 cM zu signifikanten Kopplungswerten addierten (Seizinger et al. 1987b). Zwar war das NGFR-Gen als Kandidatengen ausgeschlossen, aber das NF1-Gen eindeutig 17q zugewiesen. Auch Kopplungsanalysen mit Hilfe möglichst vieler über das Genom verteilter Polymorphismen führten auf die Spur des NF1-Gens. So vermochten Barker et al. (1987a,b) das NF1-Gen der Zentromerregion des Chromosoms 17 zuzuordnen. Damit war der Weg zur genaueren Kartierung und zur Klonierung des NF1-Gens vorgezeichnet. Es bedurfte zunächst einer möglichst lückenlosen Belegung der perizentrischen Region 17 mit weiteren polymorphen Markern.

Der weitere Ablauf der Kartierung und Klonierung des NF1-Gens belegt die Ergiebigkeit gut organisierter internationaler Kooperation auf das anschaulichste. Auf einer von der National Neurofibromatosis Foundation (NNFF) geförderten Tagung von 75 Autoren aus 17 Institutionen wurden die Ergebnisse dieser Untersuchungen miteinander verglichen. Ihre gemeinsame Publikation in 10 Arbeiten erfolgte im Jahr 1987 [Editorial: Mulvihill u. Parry (1987); Zusammenfassung: Skolnick et al. (1987)]. Die Untersuchungen erlaubten jedoch noch nicht die eindeutige Zuweisung des NF1-Gens zum langen oder kurzen Arm von Chromosom 17, es bestand aber kein Zweifel mehr daran, dass es in der perizentrischen Region liegt. Die von Schmidt et al. (1987) bei einer NF1-Familie entdeckte, mit NF1 kosegregierende reziproke Translokation t(1;17)(p34.3; q11.2) verwies unzweifelhaft auf die Bande 11.2 auf dem langen Arm. Aber auch die genaue Anordnung der dem NF1-Gen nächstliegenden Marker konnte aufgrund dieser Daten noch nicht ermittelt werden. Diese Wissenslücken wurden durch Fortsetzung der internationalen Kartierungskooperation geschlossen, die an insgesamt 142 betroffenen Familien mit mehr als 700 Personen mit 13838 Typisierungen an 31 Markern durchgeführt wurde (Goldgar et al. 1989). Dabei bestätigte sich die Lokalisation des NF1-Gens in 17q11.2.

Die „physikalische“ Bestätigung der Anordnung flankierender Marker konnte mit Hilfe von Zell-

hybriden erreicht werden, die unterschiedliche Anteile des Chromosoms 17 enthalten. Auch die beiden derivativen Chromosomen einer inzwischen entdeckten reziproken Translokation t(17;22) (q11.2; q11.2) (Ledbetter et al. 1989) spielten hierbei eine entscheidende Rolle. Im *American Journal of Human Genetics* 44 (1989) sind diese Ergebnisse dokumentiert [Editorial: Collins et al. (1989)].

Die Kartierung der Translokationsbruchpunkte der beiden NF1-Patienten verhalf dazu, die Position des NF1-Gens innerhalb der damals bekannten Karte des Chromosoms 17 in der Region q11.2 näher einzuengen. Durch Pulsfeldgelelektrophorese gelang es, aberrante Restriktionsfragmente zu identifizieren, welche die jeweiligen Bruchpunkte überspannten. Die aus der Größe und Lage dieser aberranten Fragmente gewonnene Information verhalf dazu, die Translokationsbruchpunkte 56 kb voneinander entfernt in eine weitreichende Restriktionskarte der NF1-Region einzuordnen.

Die Suche nach kodierenden Sequenzen in der Bruchpunktregion führte zunächst zur Identifizierung von 3 Kandidatengen, EVI2A, EVI2B, und OMGp (Cawthon et al. 1990a; Cawthon et al. 1991; Viskochil et al. 1991). Jedoch überspannte keines dieser Gene den Bruchpunkt einer der beiden Translokationspatienten. Auch waren bei NF1-Patienten keine Mutationen in diesen Genen nachzuweisen. Erst später stellte sich heraus, dass diese Gene in einem großen Intron des eigentlichen NF1-Gens inseriert liegen. Viskochil et al. (1990) identifizierten 3 Patienten mit größeren Deletionen in dieser Kandidatenregion. Eine dieser Deletionen umspannte keines der 3 inserierten Gene, erwies sich aber als dem Translokationsbruchpunkt der t(17;22) unmittelbar benachbart. Damit waren Sequenzen des Gens zugänglich geworden, dessen Unterbrechung durch eine Translokation oder eine Deletion ursächlich mit NF1 verbunden ist. Mit genomischen Restriktionsfragmenten aus dieser Region gelang es dann, cDNA-Klone zu isolieren, von denen aus die Struktur des NF1-Transkripts erschlossen werden konnte. Die Entdeckung weiterer Mutationen in dieser Sequenz bei NF1-Patienten bewies, dass es sich um das NF1-Gen handelte (Cawthon et al. 1990b; Viskochil et al. 1990; Wallace et al. 1990). Die neuere Entwicklung der NF1-Forschung ist Gegenstand verschiedener Abschnitte der vorliegenden Übersicht.

Neurofibromatose ist die Bezeichnung für eine Gruppe von hereditären Krankheiten, welche in erster Linie durch multiple Anomalien der Haut und des peripheren und/oder des zentralen Nervensystems gekennzeichnet sind. Darüber hinaus

können weitere Organe primär oder sekundär betroffen sein. Durch autosomal-dominante Vererbung als genetische Entitäten belegt sind die Neurofibromatosen Typ 1 (NF1) und Typ 2 (NF2), deren zugehörige Gene auf den Chromosomenabschnitten 17q11.2 bzw. 22q12.2 lokalisiert sind. Beide Krankheiten treten auch als segmentale Formen auf, denen der Status somatischer Mosaik zugrunde liegt. Innerhalb des Formenkreises der NF1 werden diverse Varianten unterschieden, die in Kapitel 5.2.1.4 „Varianten“ besprochen werden.

Bei NF2 werden

- eine früh manifestierende schwere Verlaufsform (Wishart-Typ) und
- eine leichtere Verlaufsform mit späterem Erkrankungsalter (Gardner-Typ) unterschieden.

Da beide Varianten in derselben Familie auftreten, können sie nicht als getrennte genetische Entitäten betrachtet werden. Dies schließt jedoch das Vorkommen seltener Formen von NF2 mit familiär einheitlich höherem Erkrankungsalter nicht aus. Zum Formenkreis der NF2 wird auch die Schwannomatose gerechnet, die nosologisch deutlich von NF2 abgrenzbar ist. Ihre genetische Beziehung zu NF2 konnte bisher noch nicht eindeutig im Sinn der Kategorien von Allelie oder Locusheterogenität geklärt werden.

## 5.2 Neurofibromatose Typ 1 (NF1)

### 5.2.1 Krankheitsbild

#### 5.2.1.1 Diagnostische Kriterien

Die Standardisierung der diagnostischen Kriterien für NF1 durch eine Consensus Conference der National Institutes of Health im Jahre 1987 (NIH 1988) entsprach der Notwendigkeit einer Vereinheitlichung der insbesondere im Zusammenhang mit der Kartierung des NF1-Gens zu untersuchenden Patientenkollektive. In Tabelle 5.1 sind diese Kriterien zusammengefasst. Im Folgenden werden die Kardinalsymptome der NF1 nicht in der in Tabelle 5.1 dargestellten Reihenfolge, sondern eher ihrer Natur nach aufgeführt. Dabei wird zwischen den Hauptsymptomen – Pigmentierungsanomalien und Neurofibrome – und den Komplikationen der Krankheit unterschieden, worunter Krankheitserscheinungen verstanden werden, die nicht bei allen Patienten auftreten und schwere Verlaufsformen kennzeichnen.

Tabelle 5.1. Neurofibromatose Typ 1 (NF1)

Die diagnostischen Kriterien für NF1 sind erfüllt, wenn 2 oder mehr der folgenden Kennzeichen vorliegen

- 6 oder mehr Café-au-lait-Flecken mit einem größten Durchmesser >5 mm bei präpubertären und >15 mm bei postpubertären Individuen
- 2 oder mehr Neurofibrome beliebigen Typs oder 1 plexiformes Neurofibrom
- Gesprenkelte axilläre oder inguinale Hyperpigmentierung (skinfold freckling)
- Optikusgliom
- 2 oder mehr Lisch-Knötchen (Irishamartome)
- Eine umschriebene Knochenläsion wie Keilbeinflügel-dysplasie oder Verschmächigung/Auflockerung der langen Röhrenknochen (Rareficio) mit oder ohne Pseudarthrose
- 1 Verwandter I. Grads mit NF1, den obigen Kriterien entsprechend

Das Kriterium: „1 Verwandter I. Grads...“ darf im Zusammenhang mit der Überprüfung des Vererbungsmodus, z. B. bei Familien mit Verdacht auf unvollständige Penetranz, nicht zur Anwendung kommen, denn es nimmt ja vorweg, was überprüft werden soll.

#### 5.2.1.2 Kardinalsymptome

**Neurofibrome.** Die Namen gebenden Tumoren der NF1 bilden sich häufig erst zu Beginn oder im Verlauf der Pubertät. Ihre Anzahl kann gering sein und bleiben oder sich im Lauf des Lebens von NF1-Patienten unterschiedlich stark vermehren. Bei manchen Patienten kommt es zur Bildung vieler 100 Neurofibrome, wobei die Handflächen und die Fußsohlen sowie die behaarte Kopfhaut meist ausgespart bleiben. Bei einigen wenigen Patienten sind kongenitale multiple Neurofibrome beobachtet worden, ein frühes Zeichen einer schweren Verlaufsform. Andererseits gibt es Patienten, bei denen die Tumoren erst im 3. Lebensjahrzehnt entstehen, jedoch hat sich eine spät manifestierende Form der NF1 bisher nicht als eigene genetische Entität abgrenzen lassen. In verschiedenen Studien berichteten zwischen 30% und 60% der schwangeren NF1-Patientinnen von einer Vermehrung und/oder von der Vergrößerung ihrer Neurofibrome.

Über die Klassifizierung der Neurofibrome besteht keine einheitliche Meinung. Es erscheint zweckmäßig, kutane und subkutane Neurofibrome von solchen zu unterscheiden, die als noduläre oder fusiforme Tumoren an Nervenbahnen im Inneren des Körpers lokalisiert sind oder sich subkutan als diffuse plexiforme Neurofibrome ausbreiten.

ten. Im Gegensatz zu kutanen und subkutanen Neurofibromen können die nodulären, fusiformen und diffus-plexiformen Neurofibrome Schmerzen und/oder neurologische Ausfallserscheinungen verursachen, was Anlass zu ihrer zeitigen Exzision geben sollte. Kutane und subkutane Neurofibrome sind gut umschriebene, aber nicht kapselbegrenzte benigne Tumoren von weicher bis fester Konsistenz. Sie gehen von terminalen Zweigen der Hautnerven aus und zeigen in der Regel keine Beziehungen zu größeren peripheren Nervenbahnen. Eine Tendenz zur sarkomatösen Entartung ist bei diesen dermalen Neurofibromen nicht nachzuweisen.

Fusiforme und noduläre Neurofibrome können sich zu diffusen plexiformen Neurofibromen entwickeln. Oft sind plexiforme Neurofibrome als subkutane Schwellungen bereits im frühen Kindesalter zu erkennen. Sie breiten sich über fingerartige Fortsätze im Gewebe aus und können zu Entstellungen führen, wie z. B. die supraorbital entstehenden oder die eine ganze Extremität in Mitleidenschaft ziehenden Tumoren dieser Art. Plexiforme Neurofibrome finden sich bei 25–30% der NF1-Patienten; die Häufigkeit maligner Entartung wird mit 2–4% angegeben.

Neurofibrome bestehen aus mehreren unterschiedlichen Zelltypen, deren Anteile am Tumorgewebe in so weiten Grenzen variieren können, dass es sich um eine außerordentlich heterogene Gruppe von Tumoren handelt. Lassmann et al. (1977) wiesen die folgenden Zellarten in Neurofibromen nach:

- Schwann-Zellen,
- Fibroblasten,
- Perineuralzellen,
- Mastzellen,
- Kapillarendothelzellen,
- Perizyten und
- glatte Muskelzellen;

perivaskulär fanden sich auch

- Lymphozyten und
- Monozyten.

Nach Meinung dieser Autoren tragen alle zellulären Elemente des peripheren Nervengewebes zur Bildung von Neurofibromen bei.

#### *Pigmentierungsanomalien*

**Café-au-lait-Flecken (CALF) und gesprenkelte Hyperpigmentierung in Hautfalten.** An der Entstehung dieser Pigmentierungsstörungen sind in erster Linie Melanozyten beteiligt, jedoch ist noch nicht geklärt, ob CALF, Freckling und LN allein auf zell-

autonomen Anomalien der Melanozyten beruhen. Diese entstehen aus Melanoblasten, die beim Menschen im letzten Drittel des ersten Monats der Ontogenese von der Neuralleiste über dorsolaterale Routen abzuwandern beginnen. Die Besiedlung der Epidermis ist im 6. Monat vollendet. Die Entstehungsmechanismen der NF-Pigmentierungsanomalien sind unbekannt; relevante experimentelle Ergebnisse werden in Kapitel 5.2.4.4 „Pathogenese der nichtneoplastischen Symptome der NF1“, Unterkapitel „Pigmentierungsanomalien“, diskutiert.

CALF sind in der Regel das 1. Erkennungszeichen der NF1. Sie bilden sich während der ersten 2 Lebensjahre und nehmen in der Kindheit an Größe und Anzahl zu. Während das Kriterium „>6 CALF“ bis Mitte des 2. Lebensjahrzehnts zu 100% erfüllt ist, beginnen die CALF danach zu verblassen, sodass sie bei etwa 70% der über 50-jährigen Patienten angetroffen werden. Ob dies lediglich als Folge der altersgemäßen Abnahme der Melanozytendichte der Epidermis geschieht (Gilchrist et al. 1979), ist nicht geklärt. Von sehr seltenen Ausnahmen abgesehen haben alle Erwachsenen, bei denen 6 oder mehr CALF nachgewiesen werden, Neurofibromatose Typ 1. Bei Gesunden ist diese Anzahl von CALF äußerst selten anzutreffen. Das geht aus frühen Erhebungen an mehr als 8000 Personen im Alter von 14 Jahren und darüber hervor, die nicht an NF1 litten [zitiert in Huson (1994b)]. Bei gesunden Erwachsenen liegt die Häufigkeit von CALF im Bereich von 10–14%; die überwiegende Mehrzahl dieses Anteils zeigt 1–3 CALF.

Der Durchmesser der CALF variiert zwischen 0,5 und 50 cm; gelegentlich können auch größere Körperareale betroffen sein. CALF bilden sich bevorzugt in den nicht lichtexponierten Körperarealen; sie sind asymptomatisch und zeigen keine Tendenz zur malignen Entartung. Während ihre Begrenzung bei NF1 in der Regel glatt und gut definierbar ist, kann die Ausfärbung innerhalb eines CALF variieren.

Histologisch liegt dem CALF bei NF1 eine Veränderung der Zusammensetzung der Melanineinheit zugrunde. Darunter ist die Anzahl der Keratinozyten zu verstehen, die von einem Melanozyten mit Melanosomen versehen werden. Bei Gesunden wird dieser Parameter mit durchschnittlich 36:1 angegeben (Frenk u. Schellhorn 1969). Schon die nicht von CALF betroffene Haut der NF1-Patienten weicht mit 29:1 von diesem Wert ab. Dem entspricht die oft beobachtete leichte generelle Hyperpigmentierung bei NF1-Patienten. In CALF beträgt dieses Verhältnis nur noch 22:1 (Frenk u. Marazzi 1984). In den Pigmentflecken ist jedoch nicht nur

die relative Anzahl der Melanozyten erhöht, sondern auch die intrazelluläre Verteilung des Melanins auf die Melanosomen (s. Kapitel 5.2.4.4 „Pathogenese der nichtneoplastischen Symptome der NF1“, Unterkapitel „Pigmentierungsanomalien“). Die gesprenkelte axilläre und inguinale Hyperpigmentierung (Freckling; engl. auch „skinfold freckling“) besteht aus braunen Flecken mit einem Durchmesser von 1–3 mm. Diese treten etwas später in Erscheinung als CALF, unterscheiden sich histologisch jedoch nicht von diesen; es handelt sich also um kleine CALF. Lisch-Knötchen sind domkuppelförmige, gelbliche bis dunkelbraune Erhebungen auf der Oberfläche der Iris. Sie wurden bereits 1918 von Waardenburg beschrieben und gelegentlich histopathologisch untersucht, jedoch erkannte erst Karl Lisch (1937) ihre Assoziation mit NF1.

**Lisch-Knötchen (LN).** Lisch-Knötchen (LN) sind bei Spaltlampenuntersuchung leicht von den häufigen flachen Pigmentnävi der Iris zu unterscheiden. Die Anzahl der LN nimmt in Abhängigkeit vom Alter zu; im Gegensatz zu CALF bleichen sie im höheren Erwachsenenalter nicht aus. Die quantitativen Angaben über die altersabhängige Zunahme der LN unterscheiden sich beträchtlich (Lewis u. Riccardi 1981; Flueler et al. 1986; Huson et al. 1987), stimmen jedoch darin überein, dass bereits bei einem beachtlichen Anteil der NF1-Patienten <6 Jahren (zwischen 33% und 66%) LN beobachtet werden, sodass LN ein wichtiges diagnostisches Kriterium insbesondere bei sporadischen Patienten im Kindesalter darstellen. Von der Adoleszenz an gelten LN als das zuverlässigste Zeichen für NF1; Huson (1994b) sah LN bei 95% der NF1-Patienten im Alter zwischen 16 und 85 Jahren. Durch die elektronenmikroskopische Studie von Perry u. Font (1982) ist die maßgebliche Beteiligung von Melanozyten an der Entstehung von LN belegt. Nur etwa 30% der Melanozyten in LN enthielten vorrangig reife Melanosomen.

### 5.2.1.3 Komplikationen

Neben den Kardinalsymptomen tragen auch die Komplikationen in hohem Maß dazu bei, dass fast alle medizinischen Disziplinen von NF1-Patienten in Anspruch genommen werden müssen. In Tabelle 5.2 sind die wichtigsten Komplikationen und ihre Häufigkeiten, soweit aufgrund objektiver Populationsstudien bekannt, zusammengefasst [die meisten der Häufigkeitsangaben stammen von Huson (1994b) und dort zitierten Arbeiten dieser Au-

Tabelle 5.2. Komplikationen der Neurofibromatose 1

Kategorie	Symptome	Häufigkeit [%]	
Tumoren	Plexiformes Neurofibrom	30	
	Neurofibrosarkom (MPNST)	4	
	Rhabdomyosarkom	ca. 1	
	Symptomatisches Optikusgliom	5–7	
	Andere ZNS-Tumoren	1,5	
	Spinale Neurofibrome	1,5	
	Phäochromozytom	1	
	Duodenales Karzinoid Juvenile MML	0,7	
Skelettsystem	Skoliose	10	
	Pseudarthrose (Tibia, Fibula)	3,7	
	Keilbeinflügeldysplasie	ca. 1	
Gefäßsystem	Verdickung der Gefäßwände, engeres Lumen, Spindelzellproliferation in der Intima	ca. 50	
	Aneurismen, Stenosen, Infarkte (Aorta, Carotis interna, Nierenarterie), Bluthochdruck	6	
	Mentale Fähigkeiten	Spezifische Lernschwierigkeiten (Konzentrationsfähigkeit, Raumorientierung usw.)	40–60
		Geistige Retardierung (IQ<70)	8–10

torin]. Nicht aufgeführt wurden neurologische Komplikationen, die durch Raumforderndes Tumorstadium bedingt sind. Klinisch am bedeutendsten sind

- die plexiformen Neurofibrome,
- symptomatische Optikusgliome und
- die Skelettanomalien.

**Plexiforme Neurofibrome.** Plexiforme Neurofibrome sind oft kongenital erkennbar oder werden im frühen Kindesalter als große subkutane Schwellungen auffällig. Ihre Prädilektionsstellen sind der Rumpf, die Extremitäten und der Kopf. Wachsende plexiforme Neurofibrome ziehen oft die umgebenden Gewebe in Mitleidenschaft und können z.B. an den Gliedmaßen und am Kopf Hypertrophie oder Osteolyse verursachen. Orbitale und supraorbitale Tumoren dieser Art führen zu schweren Beeinträchtigungen des Visus.

Durch ihre unregelmäßige Begrenzung sind plexiforme Neurofibrome der totalen chirurgischen Exzision nicht zugänglich und erfordern deshalb wiederholte Eingriffe.

Die Entartung plexiformer Neurofibrome zu malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST, Neurofibrosarkome), welche bei 2–4% der Tumoren erfolgt, kündigt sich in der Regel

durch Schmerzen an und erfordert angesichts der infausten Prognose der MPNST sofortige therapeutische Intervention. Hinsichtlich genauerer Angaben sei auf die Monografien über NF verwiesen (s. Kapitel 5.6.1 „Monografien“).

**Optikusgliome.** Das Optikusgliom ist ein pilozytisches, also geringgradiges Astrozytom (WHO-Grad I), das entlang der gesamten Ausdehnung des N. opticus einschließlich des Chiasma opticum auftreten kann. Im englischsprachigen Schrifttum sind neben „optic glioma“ auch die Bezeichnungen „optic pathway glioma“ und „visual pathway glioma“ gebräuchlich. Die Assoziation dieses Tumors mit NF1 ist hoch signifikant, da etwa 70% der Kinder mit Optikusgliom an NF1 leiden. Es handelt sich um einen Tumor des Kindesalters mit einem mittleren Erkrankungsalter von 4,9 Jahren. Jenseits des Alters von 6 Jahren ist die Entstehung von Optikusgliomen extrem selten beobachtet worden. Die Angaben über die Häufigkeit unterscheiden sich je nach Erhebungsmethode beträchtlich; in Patientenkollektiven liegen sie zwischen 15 und 25%. Höchstens die Hälfte der Tumoren wird symptomatisch. Dabei kann es zur Beeinträchtigung aller visuellen Funktionsparameter kommen: Sehschärfe, Gesichtsfeld, Farbsehen, visuell evozierte Potenziale. Bei intraorbitaler Ausdehnung des Tumors kommt es zur Proptosis. Der Druck eines chiasmatischen Optikusglioms auf den Hypothalamus kann eine Pubertas praecox und beschleunigtes Längenwachstum auslösen. Dieses Phänomen tritt ausschließlich bei dem Teil (39%) der Kinder mit NF1 auf, die an einem Gliom des Chiasma opticum leiden (Habiby et al. 1995). Nur ein sehr geringer Anteil der Optikusgliome von Kindern mit NF1 wird progredient. Listernick et al. (1997) haben den Kenntnisstand über diese Komplikation der NF1 zusammengefasst und wichtige Strategien der Therapie vorgeschlagen.

**Skelettanomalien.** Von den Skelettanomalien sind 13–14% der Patienten betroffen (Huson 1994b; McGaughan et al. 1999). Ihre Bedeutung steht in einem auffälligen Missverhältnis zu unserer Unkenntnis ihrer Entstehungsmechanismen. Schon im Kindesalter manifestiert sich eine deutliche Wachstumsverzögerung (Köhler 1990). Die durchschnittliche Körperhöhe erwachsener NF1-Patienten liegt um 7–8 cm unter dem Bevölkerungsmitteiwert. Auch Makrozephalie wird bereits im Kindesalter auffällig, und ein Kopfumfang oberhalb der 95.–98. Perzentile ist bei NF1-Patienten allgemein 2- bis 3-mal häufiger als im Bevölkerungs-

durchschnitt. Dabei wurden Patienten mit plexiformen Neurofibromen am Schädel und solche mit Hydrozephalus nicht berücksichtigt. Genu valgum, Genu varum und Pectus excavatum sind im Kindesalter von NF1-Patienten ebenfalls häufige Auffälligkeiten.

Im Gegensatz zu diesen harmlosen morphologischen Charakteristika gehen die Anomalien der Wirbelsäule und der langen Röhrenknochen mit hoher Morbidität einher. In beiden Bereichen ist Früherkennung die unabdingbare Voraussetzung für wirksame orthopädische oder chirurgische Interventionen. Bezüglich der Details und der Behandlungsmethoden sei auf die Handbuchbeiträge von MacEwen (1990) und Fairbank (1994) hingewiesen.

Skoliosen treten bei NF1 schon im präadoleszenten Alter, oft schon unter 10 Jahren, auf. Die sich über 6–10 Wirbel erstreckenden C-förmigen Verbiegungen unterscheiden sich nur durch das frühe Erkrankungsalter von den bei Patienten ohne NF1 vorkommenden Skoliosen. Scharfe Abwinkelung und kurzbogige Skoliosen in Bereichen von höchstens 5 Wirbeln sind fast pathognomonisch für NF1. Letztere imponieren oft als zervikale Kyphosen. Eine Korrektur durch intervertebrale Fusion misslingt oft aufgrund der allgemeinen Rarefizierung der Knochensubstanz. Diese kann sich auch in Form von Exkavationen der Lendenwirbel (vertebral scalloping) manifestieren. Folgeschwere Anomalien der Röhrenknochen der Extremitäten sind:

- Ausdünnung der Knochensubstanz,
- kongenitale anterolaterale Verbiegung der Tibia mit Bruchgefährdung,
- Pseudarthrose an Tibia, Fibula, Ulna und Radius mit Neigung zu nicht heilenden Brüchen.

Eine besondere Form von Knochenschädigung kann durch angrenzende subkutane plexiforme Neurofibrome hervorgerufen werden. Dabei kann es sowohl zu tief greifenden Erosionen als auch zu exzessivem Wachstum kommen (Riccardi 1992). Die für NF1 charakteristischen Knochenanomalien sind radiologisch von denen gut unterscheidbar, die bei polyostotischer Fibrodysplasie (McCune-Albright-Syndrom, MIM 174800) auftreten (Riccardi 1992).

**Gefäßanomalien.** Die Fülle der kasuistischen Mitteilungen über Gefäßanomalien und dadurch bedingte Komplikationen des Krankheitsverlaufs kann hier keine Berücksichtigung finden. Grundsätzlich sind autochthone Gefäßanomalien von solchen zu unterscheiden, die durch Tumoren bedingt sind, welche die Gefäßfunktion beeinträchtigen.

Etwa 6% der NF1-Patienten leiden unter Bluthochdruck (Ferner 1994a). Bei 1/3 der Patienten beruht dieser auf Stenosen der Nierenarterie; andere Ursachen sind Aortenisthmusstenose oder das Vorhandensein eines Phäochromozytoms. Der Nierenarterienstenose liegen unterschiedliche mikroanatomische Anomalien zugrunde, welche letztlich auf eine Verdickung der Gefäßwand und eine Verengung des Lumens hinauslaufen (Salzer u. Salzer 1974). Außer in der Niere beobachteten diese Autoren entsprechende Gefäßanomalien im Herz, Pankreas, Ileum, Thyreoidea, der Milzarterie und in den Hirnhäuten.

Aneurismen der betroffenen Gefäße beruhen offenbar auf einer gestörten Zytoarchitektur der Gefäßwand bei gleichzeitiger Verengung des Lumens durch Hyperproliferation von Spindelzellen und polygonalen Zellen. Ähnliche Veränderungen wurden von Teixeira et al. (1988) in der Mikrovaskulatur von Neurofibromen beobachtet, wo besonders die Verlegung des Lumens durch multiple Fortsätze (Filopodien?) der Endothelzellen auffiel. Neben der Nierenarterie sind bei NF1-Patienten auch zerebrale Arterien von Stenosen und/oder Aneurismen betroffen, die zur Bildung multipler Kollateralen führen können. Die histopathologische Untersuchung lässt auch hier eine konzentrische Verdickung der Intima, Spindelzellproliferation und Aufspaltungen der Elastika erkennen. Eine spontane Ruptur oder eine Okklusion zerebraler Gefäße sind bei NF1 wiederholt beschrieben worden. Insgesamt ist die NF1-Vaskulopathie als eine systemische Störung des Gefäßsystems zu betrachten, die, vom Hochdruck abgesehen, relativ selten symptomatisch wird.

**Beeinträchtigungen intellektueller Fähigkeiten.** Die Beeinträchtigungen intellektueller Fähigkeiten durch NF1 und gewisse assoziierte Verhaltensstörungen sind von Ferner (1994b, 1996) kritisch dargestellt worden. Die Zuverlässigkeit von Studien über diese Problematik ist u. a. an 2 wichtige Voraussetzungen gebunden:

1. Die intellektuellen Fähigkeiten müssen mit etablierten psychometrischen Methoden quantitativ ermittelt werden.
2. Andere Ursachen intellektueller Defizite, insbesondere Epilepsie und/oder das Vorhandensein von Hirntumoren sind auszuschließen.

Der durchschnittliche Intelligenzquotient der NF1-Patienten ist um etwa 10 Punkte geringer als im Bevölkerungsmittel. Dies gilt für Angehörige aller sozioökonomischen Gruppen. In der Studie von Ferner et al. (1996) an 105 Kontrollprobanden

und 103 NF1-Patienten ergaben sich folgende IQ-Werte und Streubereiche:

- Kontrollen 101,6 (74–146);
- NF1-Patienten 88,6 (51–129).

Der Anteil geistig retardierter Patienten (IQ < 70) betrug 8% und ist damit etwa 2- bis 3-mal höher als im Bevölkerungsdurchschnitt. In 10 Studien, welche die obigen Voraussetzungen erfüllen [zusammengefasst von North (1999)], betrug die Häufigkeit von Lernbehinderung unter Schulkindern mit NF1 30–65% (im Mittel 53%), während solche Störungen in dieser Altersgruppe im Bevölkerungsmittel nur bei 6–9% auftreten. Die im Allgemeinen geringfügige Intelligenzminderung von NF1-Patienten betrifft nicht alle geistigen Teilfunktionen gleichermaßen, jedoch sind sowohl verbale als auch nonverbale Fähigkeiten betroffen. Die auffälligsten Defizite bestehen bei der räumlichen Orientierung, der visuellen Perzeption und beim Kurzzeitgedächtnis. Verhaltensanomalien wie Hyperaktivität, Konzentrationsschwäche, schlechte motorische Koordination und Mängel bei Planung und Organisation erschweren den Lernprozess zusätzlich. Aufgrund der von North (1999) zusammengestellten Ergebnisse mehrerer Studien ist mit einiger Regelmäßigkeit ein Defizit der Fähigkeit zur Lageorientierung (judgement of line orientation: JLO) festzustellen, sodass dies der beste Indikator der für NF1 charakteristischen kognitiven Schwierigkeiten zu sein scheint.

Ätiologisch wurden die Lernbehinderungen und Verhaltensanomalien jugendlicher NF1-Patienten mit den postmortal im Gehirn nachweisbaren Folgen von Migrationsstörungen von Neuronen und Gliazellen in Zusammenhang gebracht. Hierzu gehören neuronale Heterotopien in der weißen Substanz, Störungen der kortikalen Zytoarchitektur und Schichtung sowie Anzeichen lokaler glialer Proliferation (Rosman u. Pearce 1967; Rubinstein 1986). Nach Einführung der Kernspintomografie (NMR) wurden im Gehirn jugendlicher NF1-Patienten bei T<sub>2</sub>-Gewichtung kontrastreiche Objekte beobachtet, die im Erwachsenenalter verschwinden. Sie finden sich v. a. in den Basalganglien, im Zerebellum, Hirnstamm und in der subkortikalen weißen Substanz. Ihre Häufigkeit liegt in verschiedenen Erhebungen bei 43–79%, jedoch scheint diese Variabilität hauptsächlich auf der Altersabhängigkeit ihres Vorkommens zu beruhen. Aufgrund ihrer unbekannteren Natur erhielten sie den Namen UBO (unidentified bright objects). Zahlreiche Arbeitsgruppen haben sich in der Folgezeit der Frage gewidmet, ob Vorkommen, Lokalisation, Anzahl



und Volumen der UBO mit den intellektuellen Defiziten der NF1-Patienten korreliert seien [Literatur bei North (1999)]. Obwohl die kontroverse Diskussion darüber nicht beendet ist, gibt es einige präzise Studien, welche eine solche Korrelation zweifelsfrei belegt haben (North et al. 1994; Joy et al. 1995). Dabei scheint die beeinträchtigte Lageorientierung (JLO) mit dem Vorkommen der UBO im Bereich der Basalganglien am besten zu korrelieren. Histologisch haben sich die UBO als Folgen dysplastischer und hyperplastischer Gliaproliferation und intramyelinärer Ödeme erwiesen (DiPaolo et al. 1995).

Einen gewissen Zugang zu den möglichen Ursachen der Lernbehinderung bei NF1 haben Modellorganismen wie die Nf1(+/-)-Maus und *Drosophila melanogaster* mit Mutationen im Neurofibromingen eröffnet. Dies wird Gegenstand der Kapitel 5.2.4.4 „Pathogenese der nichtneoplastischen Symptome der NF1“ und 5.2.5 „Künstliche Tiermodelle der NF1“ sein.

#### 5.2.1.4 Varianten

Es gibt eine Reihe von Varianten der NF1, die entweder auch als autosomal-dominant erbliche Entitäten bekannt sind oder bisher nur als sporadische Fälle auftraten. Sie entsprechen nicht den diagnostischen Kriterien, fallen aber z. T. durch zusätzliche Symptome auf. Ihre Klassifizierung ist immer wieder auf Schwierigkeiten gestoßen. Die Riccardi-Unterscheidung mit 8 Formen der NF1 hat sich nicht durchgesetzt; ihr lagen zwar sehr genaue Analysen

des klinischen Phänotyps zugrunde, jedoch fehlte bei den Typen NF3 (mixed), NF4 (variant), NF7 (late onset) und NF8 (not otherwise specified) der Nachweis der Vererbung (Riccardi 1992). Die spät manifestierende Form (NF7) ist inzwischen durch mindestens eine Beobachtung der Vererbung als genetische Entität belegt (Theiler et al. 1991).

Die Klassifizierung von Carey u. Viskochil (1999) orientiert sich an verschiedenen phänotypischen Kategorien, wie: atypisch und/oder segmentale Manifestation, verwandte Formen mit zusätzlicher Symptomatik und der schweren Manifestationsform bei den meisten Trägern einer vollständigen Deletion des NF1-Gens. Wir folgen hier diesem Schema in vereinfachter Form, berücksichtigen aber nur die Varianten, für deren allelische oder nichtallelische Relation zu NF1 es empirische Belege gibt (Tabelle 5.3).

**Segmentale NF1; der sichtbare Mosaikstatus.** Die häufigste Variante ist die des Mosaikstatus, der sich oft, aber nicht durchgängig, in Form der segmentalen Manifestation darstellt. Im Prinzip kann der Mosaikstatus entweder durch somatische Mutationen während der Ontogenese oder, bei bestehender konstitutioneller Mutation, durch somatische Rückmutation zustande kommen. Der letztere Mechanismus wird außerordentlich selten sein, da nur bestimmte Arten von Mutationen revertieren können und hierfür positionsspezifische Ereignisse erforderlich sind.

In Abhängigkeit vom Zeitpunkt und Ort (Zellpopulation, Gewebe) der Mutationen kann ein ge-

Tabelle 5.3. Autosomal-dominant erbliche Krankheiten des Formenkreises der Neurofibromatose Typ 1

Krankheit	Wichtigste Symptome	Genetische Relation zu NF1	
		Allelisch	Nichtallelisch
NF1	S. Diagnostische Kriterien (Kapitel 5.2.1.1 „Diagnostische Kriterien“)		
Segmentale NF (NF5)	Teilmanifestation der NF1 in einem Körpersegment	Mosaikstatus	
Familiäre spinale NF	Multiple Neurofibrome im Spinalkanal, oft paarig; CALF nur bei der NF1-gekoppelten Form?	+	+ Locusheterogenität
Familiäre CALF	Multiple CALF; keine Lisch-Knötchen, kein Freckling, keine Neurofibrome, Intelligenzminderung	+	+ Locusheterogenität
Gastrointestinale NF	Neurofibrome ausschließlich im Magen-Darm-Trakt; unvollständige Penetranz; Beginn im Erwachsenenalter	?	?
Watson-Syndrom	Zusätzlich zu NF1-Symptomatik: Pulmonalstenose, Intelligenzminderung	+	
NF-Noonan-Syndrom, NF-NS	Zusätzlich zu NF1-Symptomatik: Pulmonalklappenstenose, Pterygium colli, Minderwuchs, Intelligenzminderung, unvollständige Penetranz	+	+ Locusheterogenität

netisches Mosaik auf die Keimbahn oder auf die somatischen Zellen beschränkt sein oder beide Zellpopulationen betreffen. In diesem Fall wird von einem gonadosomatischen Mosaik gesprochen. Der im englischen Schrifttum verwendete Ausdruck „gonosomal“ sollte vermieden werden, da er seit Jahrzehnten für die Bezeichnung der Mosaik von Aneuploidien der Geschlechtschromosomen sinnvoll verwendet wird. Bei einer autosomal-dominant erblichen Krankheit mit vollständiger Penetranz weckt das Vorkommen von 2 oder mehr betroffenen Nachkommen gesunder Eltern den Verdacht auf ein Keimbahnmosaik bei einem der Eltern. Die Nachkommen zeigen in der Regel das volle Krankheitsbild. Diese Konstellation ist bereits in allen frühen Familienuntersuchungen über NF1 beobachtet worden. Den ersten molekularen Nachweis eines solchen Keimbahnmosaiks führten Lázaro et al. (1995): 2 an NF1 erkrankte Kinder gesunder Eltern trugen als konstitutionelle Mutation des NF1-Gens eine 12021-bp-Deletion, die sich ebenfalls in 10% der Spermatozoen des Vaters fand, nicht aber in seinen Lymphozyten. Oftmals fördert die sehr genaue Untersuchung der Eltern in einem solchen Fall Anzeichen einer Minimalmanifestation der Krankheit zutage, wie z. B. einzelne CALF, ein Neurofibrom oder sogar nur Lisch-Knötchen (Riccardi u. Lewis 1988).

Gonadosomatische Mosaikformen können als segmentale NF1 oder als milde generalisierte Manifestation der NF1 in Erscheinung treten. Riccardi (1982) gab der segmentalen NF1 die Bezeichnung NF5. Viskochil u. Carey (1994) haben aus der Originalliteratur 59 Fälle segmentaler NF1 zusammengestellt. 90% der Patienten hatten dermale Neurofibrome, 12% zusätzlich ein plexiformes Neurofibrom oder nur ein solches, CALF fanden sich bei 19 von 57 (1/3) und Freckling hatten 7 von 57 Patienten (12%). Keiner der Patienten wies alle 4 Merkmale auf, und nur 4 zeigten die Merkmalskombination Neurofibrome, CALF und Freckling.

Ruggieri et al. (1999) beobachteten im Rahmen einer umfangreichen Studie über segmentale NF1 9 Familien, in denen ein Patient mit segmentaler Manifestation Nachkommen mit dem vollständigen Krankheitsbild hatte. Somit ist auch der gonadosomatische Mosaikstatus bei NF1 phänotypisch und formalgenetisch belegt. Der Mosaikstatus bei NF1-Patienten mit Neumutationen wurde mit Hilfe von LOH-Studien an multiplen polymorphen Markern der NF1-Genregion in 5 Fällen von großen Deletionen des NF1-Gens nachgewiesen (Colman et al. 1996; Ainsworth et al. 1997; Wu et al. 1997; Rasmussen et al. 1998; Streubel et al. 1999).

Die Häufigkeit von Mosaiken wird bei NF1 und bei anderen autosomal-dominant erblichen Tumorerkrankheiten unterschätzt. Bei NF1, so argumentiert Zlotogora (1993), könnte dies 2 Gründe haben.

1. NF1-Gen-Mutationen in frühen Keimzellstadien, die also ein Keimbahnmosaik erzeugen, könnten außerordentlich selten sein. Dies könnte die Seltenheit von NF1-Familien mit mehreren betroffenen Kindern von gesunden Eltern erklären.
2. Die meisten postzygotischen Mutationen geschehen in der frühen Embryogenese, erzeugen also gonadosomatische Mosaikformen, von denen wiederum der größte Teil nicht segmental, sondern in generalisierter Form manifestiert. Unter den leicht betroffenen sporadischen NF1-Patienten wird mit einem höheren Anteil von Mosaiken zu rechnen sein als bisher angenommen. Auch bei NF2 (s. Kapitel 5.4.4 „Formalgenetik“) werden in zunehmendem Maß Mosaikfälle beschrieben (Evans et al. 1998b; Kluwe u. Mautner 1998). Gleiches gilt für beide Formen der tuberösen Sklerose (Verhoef et al. 1999).

**Familiäre spinale NF.** Die familiäre spinale NF ist durch multiple, oft paarige spinale Neurofibrome in potenziell allen spinalen Segmenten gekennzeichnet. Kutane, subkutane und diffuse plexiforme Neurofibrome fehlen, wie auch andere typische Symptome und Komplikationen der NF1. Häufiger als bei NF1 kommt es zur malignen Entartung. Bei der Analyse auf Kopplung mit dem NF1- bzw. NF2-Gen-Locus bei 4 Familien, in denen die Krankheit entsprechend dem autosomal-dominanten Vererbungsmodus segregierte, erwiesen sich 3 als mit dem NF1-Gen gekoppelt (Pulst et al. 1991; Poyhonen et al. 1997; Ars et al. 1998). Kopplung mit dem NF2-Locus konnte bei 2 dieser Familien ausgeschlossen werden und entfiel aufgrund des Nachweises der zugrunde liegenden NF1-Gen-Mutation bei der 3. Patientin (Ars et al. 1998). Den Patienten dieser 3 Familien war das Vorhandensein zahlreicher CALF gemeinsam. Demgegenüber fehlten jegliche Pigmentierungsanomalien bei der 4. Familie (Pulst et al. 1991), bei der die Krankheit nicht mit dem NF1-Gen segregierte. Bei dieser NF-Variante besteht also Locusheterogenität, und die zu NF1 allelische Form scheint sich durch Pigmentierungsanomalien als zusätzliches Symptom zu erkennen zu geben.

**Auf CALF beschränkte Variante der NF1.** Diese außerordentlich seltene Variante der NF1 wurde erstmalig von Parkes Weber (1909) beschrieben. Ric-

cardi (1980) bestätigte an 2 Familien die autosomal-dominante Vererbung des Merkmals sowie das Fehlen von Neurofibromen und der anderen Pigmentierungsanomalien der NF1. Die Patienten fielen auch durch geistige Retardierung auf. Aveliovich et al. (1995) gelang es, enge Kopplung zwischen dem autosomal-dominant erblichen Merkmal „familiäre CALF“ und dem NF1-Gen-Locus nachzuweisen. Jedoch zeigt auch diese Variante Locusheterogenität, denn Brunner et al. (1993) und Charrow et al. (1993) schlossen für je eine Familie die Kopplung dieses Merkmals mit NF1 aus. Die sich somit eröffnende Möglichkeit der Existenz eines 2. Gens mit Mutationen, die zur Entstehung multipler CALF führen, legt den Gedanken nahe, dass schwach hypomorphe Allele eines solchen Gens zur intrafamiliären Variabilität der Anzahl der CALF im Sinn modifizierender Gene beitragen könnten.

**Watson-Syndrom.** Das Watson-Syndrom ist durch eine meist abgeschwächte Manifestationsform der NF1 mit den zusätzlichen Symptomen Pulmonalstenose und eine bei allen Patienten einer Familie gleichmäßige Intelligenzminderung gekennzeichnet. Allanson et al. (1991) bewies Kopplung dieser autosomal-dominant erblichen Merkmalskombination mit dem NF1-Gen und Upadhyaya et al. (1992) fanden bei einer Familie eine 80-kb-Deletion des NF1-Gens. Die Mutationsanalyse an einer größeren Stichprobe wird Aufschluss darüber geben können, ob diese offensichtlich allelische Variante von NF1 durch eine bestimmte Kategorie oder Lokalisation von NF1-Gen-Läsionen bedingt ist.

**Gastrointestinale NF.** Die gastrointestinale NF ist eine weitere Variante, die in ihrer reinen Form durch ausschließlich auf den Magen-Darm-Trakt begrenzte Neurofibromatose gekennzeichnet ist. Andere Symptome der NF1 und NF2 treten nicht auf. Der Stammbaum der von Lipton u. Zuckerbrot (1966) beschriebenen Familie ist mit autosomal-dominanter Vererbung vereinbar. Die intestinalen Neurofibrome werden meist erst im mittleren oder späten Lebensalter symptomatisch. Eine Analyse der genetischen Beziehung zu NF1 liegt, wohl aufgrund der außerordentlichen Seltenheit der Krankheit, noch nicht vor. Neurofibrome des Gastrointestinaltrakts finden sich bei der klassischen NF1 mit einer Häufigkeit von 2,2% (Huson et al. 1988).

**NF1-Noonan-Syndrom.** Mit „NF1-Noonan-Syndrom“ (NF-NS) wird die relativ häufig beschriebene As-

soziation der NF1 mit NS benannt. Sie ist Gegenstand einer kontroversen Diskussion über die möglichen Ursachen, die diesem Phänomen zugrunde liegen. NS ist eine relativ häufige autosomal-dominant vererbte Krankheit mit variabler Expressivität und unvollständiger Penetranz. Ihre wichtigsten Symptome sind: angeborenes Pterygium colli, Minderwuchs, angeborene Herzfehler, besonders Pulmonalklappenstenose (verschieden von der Pulmonalstenose bei Watson-Syndrom), charakteristische Fazies und Intelligenzdefekte. Nicht alle Beobachtungen von NF-NS halten der Anwendung strenger diagnostischer Maßstäbe für NS stand (Carey 1998). Keine der bisher beschriebenen Familien, in denen NF1 und NS entweder vollständig oder partiell kosegregieren, ist widerspruchsfrei deutbar. Es gibt Hinweise auf Locusheterogenität des NS mit je einem Gen auf 12q (Jamieson et al. 1994) und auf 17q [nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zum NF1-Locus (Bahau et al. 1998)]. Aufgrund der Variabilität der Phänotypen beider Krankheiten und der unvollständigen Penetranz schließen sich manche der im Folgenden aufgeführten Hypothesen nicht aus:

- Es handelt sich um Zufallsassoziationen der beiden Krankheiten (Erwartungswert der Häufigkeit  $1:8 \times 10^6$ )
- NF-NS, aber nicht NS, ist eine allelische Variante von NF1. Symptome des NS wären in diesem Fall als Bestandteile des variablen Manifestationsspektrums von NF1 zu deuten. Die diskordante Segregation von NF1 und NS in NF-NS-Familien beruht auf der bekannten Unvollständigkeit der Penetranz des NS.
- Die diskordante, aber nicht zufallsgemäße Segregation von NF1 und NS in NF-NS-Familien beruht auf relativ enger Kopplung der beiden Gene auf 17q (Bahau et al. 1998).
- Die konkordante Segregation der NF1- und NS-Merkmale in manchen Familien mit NF-NS und der Nachweis einer kosegregierenden NF1-Gen-Mutation zeigen, dass NF-NS eine zu NF1 allelische genetische Entität darstellt (Carey 1998).

## 5.2.2 Genetik der NF1

### 5.2.2.1 Formalgenetik

Bei autosomal-dominantem Vererbungsmodus wird ein 1:1-Verhältnis von Betroffenen zu Gesunden unter den Nachkommen der Patienten erwartet. Für die Erhebung dieses Segregationsverhältnisses kommen nur solche Familienstudien in Be-

tracht, bei denen klar zwischen NF1 und NF2 unterschieden wurde, denn die Aussage sollte sich auf eine einheitliche genetische Entität beziehen. Es könnte z.B. die intrafamiliäre Variabilität der peripheren Symptomatik in NF2-Familien, die nicht als solche erkannt wurden, unvollständige Penetranz der NF1-Gen-Defekte vortäuschen. Dies mag einer der Gründe dafür sein, dass in älteren Serien immer wieder von „übersprungenen Generationen“ berichtet und mithin auf unvollständige Penetranz geschlossen wurde. In der bereits erwähnten Studie von Crowe et al. (1956) erfüllten 26 der 107 einbezogenen NF1-Familien die Voraussetzung, dass alle lebenden Mitglieder examiniert werden konnten. Zwar haben diese Autoren noch nicht zwischen NF1 und NF2 unterschieden, jedoch war keine der (aus heutiger Sicht) mindestens 5 NF2-Familien dieser Studie in dieser Stichprobe von 26 Familien enthalten. In 3 Studien ergab sich unter 161 Nachkommen von NF1-Patienten ein Segregationsverhältnis von 79:82 (NF1:gesund) (Crowe et al. 1956; Samuelsson u. Akesson 1988; Huson et al. 1989). Diese Segregationsverhältnisse belegen autosomal-dominante Vererbung mit vollständiger Penetranz. Bei einer Krankheit mit einem so hohen Maß an variabler Expressivität ist jedoch durchaus mit einem gewissen Anteil an Genträgern zu rechnen, welche die diagnostischen Kriterien nicht vollständig erfüllen und zwischen einem betroffenen Großelternanteil und Kindern mit der vollständigen Ausprägung des Krankheitsbilds stehen, also nicht den Status des somatischen Mosaiks (s. unten) repräsentieren. Hierauf wird im Zusammenhang mit der Frage nach der Bedeutung modifizierender Gene für die variable Expressivität der NF1 eingegangen (s. Kapitel 5.2.4.5 „Ursachen der variablen Expressivität der NF1“).

Seit Mutationen des NF1-Gens auf molekularer Ebene nachgewiesen werden können, bestätigt sich der autosomal-dominante Erbgang auch durch deren regelmäßige Kosegregation mit der Krankheit.

Die genetische Fitness – definiert als die Anzahl der Nachkommen pro Person in Relation zum Bevölkerungsmittel – ist bei NF1-Patienten mit etwa 0,5 deutlich vermindert. Es besteht diesbezüglich ein auffälliger Geschlechtsunterschied: Männer 0,31–0,41; Frauen: 0,60–0,78 (Samuelsson u. Akesson 1989, 1989; Huson et al. 1989). Eine verringerte Tendenz zur Fortpflanzung scheint die wesentliche Ursache der reduzierten Fitness zu sein.

Frühere Berichte über eine Abhängigkeit des Schweregrads der Krankheit bei den Nachkommen vom Geschlecht des übertragenden Elternteils haben sich nicht bestätigt. Auch besteht, im Gegen-

satz zu manchen anderen autosomal-dominant erblichen Krankheiten, kein Einfluss des Alters der Eltern auf die Häufigkeit sporadischer Fälle [Neumutationen; Huson et al. (1989)].

Homozygote oder komplex Heterozygote für NF1-Gen-Mutationen sind noch nicht beobachtet worden. Die intrauterine Letalität der am NF1-Gen-Locus homozygot defizienten Maus (Jacks et al. 1994a; Brannan et al. 1994; s. Kapitel 5.2.5 „Künstliche Tiermodelle der NF1“) legt es nahe, anzunehmen, dass der vollständige Funktionsverlust des NF1-Gens auch beim Menschen pränatale Letalität verursacht.

### 5.2.2.2 Charakteristika des NF1-Gens

Viktor A. McKusick (1998) klassifizierte die menschlichen Gene ihrer Größe nach in 5 Kategorien: small, medium, large, giant, mammoth.

Das NF1-Gen ist mit seiner Länge von 335 kb in die Gruppe der riesigen Gene (giant) einzuordnen. Wie die Zusammenstellung der wichtigsten Charakteristika des NF1-Gens in Tabelle 5.4 zeigt, ist es zugleich ein sehr komplexes Gen, das durch eine extrem heterogene Größenverteilung seiner Introns gekennzeichnet ist, eine konservierte große 3'-UTR besitzt, die etwa 28% des größten Transkripts beansprucht, und das 4 inserierte Gene enthält. Der sehr geringe Anteil der Protein kodierenden Sequenzen von 2,6% reflektiert die extreme Größenzunahme der Introns des NF1-Gens während der Phylogenese der Wirbeltiere. Dies geht aus einem Vergleich mit dem NF1-Gen des Pufferfisches *Fugu rubripes* hervor, des Trägers des zweitkleinsten Vertebratengenoms (400 Mb). Das NF1-Gen von Fugu ist mit 27 kb 13-mal kleiner als das des Menschen (Kehrer-Sawatzki et al. 1998). Da das größtmögliche Leseraster mit 8302 bp bei Fugu nur um 299 Nukleotide kleiner ist als das des menschlichen NF1-Gens und der größte Anteil dieses Defizits (76%) dem Fehlen der Exons 9a, 12b und 48a zuzuschreiben ist, geht die überproportionale Größenzunahme des NF1-Gens fast vollständig auf eine Verlängerung der Introns zurück. In der Tat weichen nur 6 der 57 Exons des Fugu-NF1-Gens in ihrer Größe von den homologen Exons im NF1-Gen des Menschen ab. Introns 1 und 27b beanspruchen mit etwa 115 kb und 60,5 kb etwas mehr als die Hälfte der gesamten Ausdehnung des menschlichen NF1-Gens.

Einen Überblick über die Exon-Intron-Struktur des humanen NF1-Gens gibt Tabelle 5.5. Vergleiche der NF1-cDNA-Sequenz mit in Datenbanken ge-

Tabelle 5.4. Charakteristika des NF1-Gens

Charakteristika	
Lokalisation	17q11.2
Länge	335 kb
Transkriptionsrichtung	17cen→17qter
Größtes mögliches Leseraster (inklusive der alternativ gespleißten Exons 9a, 23a und 48a)	8601 bp
Anteil der Protein kodierenden Sequenzen	2,57%
5'-UTR und 3'-UTR der NF1-mRNA	484 bp bzw. 3512 bp
Funktionelle Domäne kodiert durch (GAP-related domain, GRD)	Exons 21–27a, 366 AA aufgrund von Homologievergleichen Exons 22–26, 230 AA, minimale Funktionseinheit in vitro
2 sehr große Introns	Nr. 1: ungefähr 115 kb; Nr. 27b: 60,5 kb
Kleinstes Intron	Nr. 20: 120 bp
3 inserierte Gene in Intron 27b, Transkriptionsrichtung	OMGP–6–kb–EVI2B–3,7 kb–EVI 2A 17qter→17cen
Aufbereitetes Pseudogen in Intron 37, Transkriptionsrichtung	ψAK3 mit intaktem Leseraster 17cen→17qter
Promotorregion	GC-reich, kein TATA-, kein CCAAT-Motiv, TATA <sup>-</sup> -Inr <sup>-</sup>

Tabelle 5.5. Längen und Positionen der Exons und Introns des NF1-Gens, nach Li et al. (1995) mit Ergänzungen

Exon Nr.	cDNA-Position	Länge [bp]	Intron [kb]	Exon Nr.	cDNA-Position	Länge [bp]	Intron [kb]
1	1	544/60 kodierend	ca. 15	23a	4111	63	6,0
2	61	144	3,10	24	4111	159	0,53
3	205	84	4,1	25	4270	98	1,25
4a	289	195	6,5	26	4368	147	1,27
4b	484	103	11,4	27a	4515	147	3,3
4c	587	68	0,22	27b	4662	111	60,5
5	655	76	0,80	28	4773	433	1,3
6	731	158	17,7	29	5206	341	2,7
7	889	174	0,40	30	5547	203	4,3
8	1063	123	0,2	31	5750	194	1,55
9	1186	75	1,6	32	5944	141	0,15
9a	1231	30	3,1	33	6085	280	0,40
10a	1261	132	4,4	34	6365	215	0,24
10b	1393	135	4,0	35	6580	62	0,15
10c	1528	114	2,5	36	6642	115	0,57
11	1642	80	0,54	37	6757	102	1,7
12a	1722	124	1,5	38	6859	141	2,4
12b	1846	156	1,2	39	7000	127	6,0
13	2002	250	0,49	40	7127	132	0,93
14	2252	74	0,23	41	7259	136	2,0
15	2326	84	1,3	42	7395	158	4,0
16	2410	441	0,38	43	7553	123	0,35
17	2851	140	0,28	44	7676	131	0,18
18	2991	123	0,46	45	7807	101	1,1
19a	3114	84	1,2	46	7908	143	0,35
19b	3198	117	0,55	47	8051	47	1,4
20	3315	182	0,12	48	8098	217	6,5
21	3497	212	2,2	48a	8315	54	6,7
22	3709	162	0,14	49	8315	3665/153 kodierend	
23–1	3871	104	12,9				
23–2	3975	136	4,0				

speicherten Sequenzen ließen einen hohen Grad von Ähnlichkeit in einem etwa 1080 bp umfassenden Abschnitt zu einem entsprechenden Segment der beiden Gene IRA1 und IRA2 von *Saccharomyces cerevisiae* erkennen, die für negative Regulatoren der Ras-Proteine (Ras1 und 2) kodieren (inhibitor of Ras). Die monomeren GTP/GDP-bindenden Proteine der Ras-Superfamilie sind im GTP-beladenen Zustand funktionell aktiv. Ihre physiologische Inaktivierung erfolgt durch die Stimulation ihrer meist geringen intrinsischen GTPase-Aktivität durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP), welche diese G-Proteine in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand überführen. Das erste GAP der Säuger, p120GAP, wurde von Trahey u. McCormick (1987) beschrieben. Die zueinander homologen katalytischen Domänen des p120GAP und des Neurofibromins erhielten die Bezeichnung GRD, von „GAP-related domain“. Die GRD-kodierende Sequenz des NF1-Gens beginnt in Exon 21 und endet in Exon 27a. Diese Zuordnung beruht auf Vergleichen der Homologie zu den entsprechenden katalytischen Domänen anderer GAP, insbesondere der beiden IRA-Proteine und des p120GAP. Das in Form von Expressionskonstrukten der NF1-GRD transfizierte Fragment des Neurofibromingens vermag ira<sup>-</sup>-Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* ebenso zu komplementieren, wie die entsprechende Domäne des p120GAP (Ballester et al. 1990; Martin et al. 1990; Xu et al. 1990a,b). Genauere Struktur-Funktions-Beziehungen der NF1-GRD werden im Zusammenhang mit den Eigenschaften des Neurofibromins behandelt (s. Kapitel 5.2.3 „Neurofibromin“).

**In das NF1-Gen inserierte Gene.** Bei der Suche nach dem NF1-Gen wurden zuerst Protein kodierende Sequenzen des EVI2B-Gens gefunden. Bei der Analyse der Translokationsbruchpunktregionen (s. Kapitel 5.1 „Einleitung“) wurden 3 im Intron 27b des NF1-Gens liegende Gene gefunden; ihre Eigenschaften sind in Tabelle 5.6 wiedergegeben. Diese 3 relativ kleinen Gene enthalten nur je ein Intron, das jeweils ein kurzes, nichtkodierendes Exon von einem längeren kodierenden Exon trennt. Somit ist das 1. Exon ein Bestandteil der 5'-nichttranslatierten Region (5'-UTR). Die Bezeichnungen EVI2A und EVI2B der ersten beiden Gene dieser inserierten Gruppe weisen auf die Homologie mit einem orthologen Doublett der Maus hin, das 1 von 5 Integrationsorten ökotroper C-Typ-Retroviren in myeloischen Leukämiezellen von BXH-2-Mäusen kennzeichnet. Auch bei der Maus liegen diese beiden Gene im Intron 27b des NF1-Gens,

Tabelle 5.6. Eigenschaften der Gene OMGp (Oligodendrozytenmyelinglykoprotein), EVI2A und EVI2B (ecotropic viral integration site), die im Intron 27b des NF1-Gens liegen

Gen	OMGp	EVI2B	EVI2A
Abstand		6315	3408
Gen <sup>a</sup>	3013	10202	4202
Transkript <sup>a</sup>	2047	1863	1325
Leserahmen <sup>b</sup>	1320	1345	699
5'-UTR <sup>a</sup>	490	78	411
3'-UTR	343	440	626
Intron	818	8339	2467
Promoter	TATA/ CAAT-Typ	Nicht bekannt	Nicht bekannt
Protein [Aminosäuren]	440	448	232

Größenangaben in Basenpaaren.

<sup>a</sup> Berechnet ab der 1. Base der bekannten 5'-Sequenz der jeweiligen Transkripte nach Cawthon et al. (1990, 1991), Viskochil et al. (1991) bzw. im Fall des OMGp-Gens ab der CAAT-Box (Position 8788–8791, GenBank accession Nr. 1 05367).

<sup>b</sup> Vom Start- bis zum Stoppkodon.

das auf Chromosom 11 in der zum proximalen Segment von 17q des Menschen orthologen Region lokalisiert ist (Buchberg et al. 1990b). Beide Gene werden in Zellen der myeloischen Reihe exprimiert, jedoch sind weder ihre Aktivierung noch ihre Inaktivierung durch retrovirale Integration das transformierende Ereignis, sondern die dadurch verursachte Inaktivierung des NF1-Gens (Largaespada et al. 1995) (s. auch Kapitel 5.2.4.2 „Mechanismen der Tumorgenese bei NF1“).

Die murinen C-Typ-Retroviren werden entsprechend der Herkunft der von ihnen beanspruchten Wirtsrezeptoren klassifiziert. Ökotope (engl.: ecotropic) Retroviren können nur an murine Rezeptoren binden. Demgegenüber erkennen xenotrope Retroviren nur fremde, nichtmurine Rezeptoren, während amphi- bzw. polytrope sowohl fremde als auch murine Rezeptoren zur Infektion benutzen.

Das in ihrer gemeinsamen Transkriptionsrichtung letzte dieser 3 Gene kodiert für das Oligodendrozytenmyelinglykoprotein (OMGp), das im Gehirn und im Rückenmark exprimiert wird und sich intrazellulär in Oligodendrozyten sowie an den Perikarya und in den Axonen großer Neuronen findet (Habib et al. 1998a). Sein Expressionsspektrum zeigt weitgehende Überschneidungen mit dem des NF1-Gens (s. auch Kapitel 5.2.2.6 „Expressionsmuster des NF1-Gens“). Wird OMGp in NIH3T3-Zellen überexprimiert, erweist es sich als ein negativer Wachstumsregulator, der die mitogene Wirkung von PDGF auf diese Zellen zu

hemmen vermag (Habib et al. 1998b). Das 4. der in das NF1-Gen inserierten Gene erwies sich als ein aufbereitetes Pseudogen mit hoher Homologie zum autochthonen Gen der Adenylatkinase 3 (AK3) auf 9p. Letzteres beansprucht 30 kb, während das intronlose  $\psi$ AK3, das mit gleicher Transkriptionsrichtung im Intron 37 des NF1-Gens liegt, nur 1700 bp einnimmt, die ein Leseraster von 669 bp beherbergen. Nur 3 der 13 Basensubstitutionen, in denen sich das  $\psi$ AK3- vom AK3-Gen unterscheidet, liegen in der kodierenden Region und sind synonyme Austausche (Xu et al. 1992a).

**Promotorregion.** Mit einem (G+C)-Gehalt von 37,5% liegt das NF1-Gen als Ganzes in einer leichten Isochore vom Typ LI, die innerhalb von 10 kb nach seinem 3'-Ende von einer schweren Isochore (H II) mit 51% (G+C) gefolgt wird (Eisenbarth et al. 2000b). Dennoch wird das NF1-Gen von einer (G+C)-reichen Promotorregion aus transkribiert, die weder das TATA- noch das CCAAT-Motiv enthält. Der Startpunkt der Transkription (Nukleotid +1) liegt im NF1-Gen des Menschen 484 bp oberhalb des Translationsstartkodons. Wie bei TATA-losen Promotoren erwartet, gibt es alternative 5'-Enden; sie liegen bei der NF1-mRNA des Menschen und der Maus bei +22 und -11. Die entsprechenden Transkripte wurden mit Hilfe von Primerextensionsexperimenten (Marchuk et al. 1991) und mit dem RNase-Protektionstest (Hajra et al. 1994) nachgewiesen. Keine der 3 möglichen Transkriptionsstartsequenzen entspricht der Konsensussequenz PyPyA<sub>+</sub>N-T/A-PyPy des Transkriptionsinitiators (Inr), wie sie von Javahery et al. (1994) ermittelt wurde. Demnach ist der engere Promotor des NF1-Gens ein TATA<sup>-</sup>Inr<sup>-</sup>-Promotor. Auch dies gilt gleichermaßen für die entsprechenden Sequenzen bei der Maus. Potenzielle *cis*-regulatorische Sequenzelemente sind im 5'-flankierenden Bereich des NF1-Gens zahlreich vertreten. Es ist bemerkenswert, dass eine ganze Reihe solcher Motive bereits in der 484 bp umfassenden Sequenz liegen, welche die 5'-UTR kodiert. Hier finden sich 2 potenzielle Bindungsstellen für den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 und 5 solcher Elemente für Ap2. Dieser letztere Transkriptionsfaktor wird interessanterweise überwiegend in Zelltypen exprimiert, die ontogenetisch von der Neuralleiste abstammen. Weitere potenzielle *cis*-regulatorische Sequenzmotive der 5'-UTR sind auch als Anteile an den Verstärkern (enhancers) des Insulin- bzw. des Apolipoprotein-E2-Gens bekannt. Diese Besetzung der 5'-UTR eines Gens mit 9 potenziellen *cis*-regu-

latorischen Sequenzelementen ist ungewöhnlich. Motive, die in der Regel oberhalb des Transkriptionsstarts liegen, nehmen hier die Positionen von „downstream promoter elements“ (DPE) ein, die sonst auf die Sequenzen bis etwa +35 beschränkt sind, bis wohin sich der gebundene basale Initiationskomplex erstreckt (Burke u. Kadonaga 1996). Ihre funktionelle Bedeutung im Kontext der gesamten Promotorstruktur des NF1-Gens ist noch nicht geklärt. Als isolierter Bestandteil eines Luciferasereportergenkonstrukts mit dem 5'-UTR-Anteil von +144 bis +474, also ohne den Transkriptionsstart, vermochte diese Region eine 8fache Steigerung der Transkriptionsrate zu bewirken (Viskochil 1998). Die Sequenzanalyse der ersten 450 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunkts ergab Anhaltspunkte für eine Reihe von *cis*-regulatorischen Motiven (Hajra et al. 1994). Unmittelbar vor +1 befindet sich ein cAMP-Responseelement (CRE), das sich von -16 bis -9 erstreckt. Die von den Autoren postulierte Überlappung dieses CRE mit einem Serumresponseelement (SRE) ist durch den Vergleich mit der funktionell sehr restriktiven SRE-Konsensussequenz nicht verifizierbar. Es folgen bis zur Position -375 9 weitere Motive, von denen jedoch nur 4 dem kritischen Vergleich mit den jeweiligen Konsensussequenzen standhalten. Diese sind:

- 2 überlappende SP1-AP2-Bindungsstellen (-142 bis -130, sowie -166 bis -157),
- 1 Motiv aus der SV40-Enhancersequenz (GT2, von -152 bis -146) und
- das E3B-Element (-371 bis -365), das aus dem Bereich des E3-Gens von Adenoviren bekannt ist.

Für die Analyse des 5'-flankierenden Bereichs wurde die transiente Transfektion von Cos1-Zellen mit Luciferasereportergenkonstrukten eingesetzt, die unterschiedliche Anteile dieser Sequenzen enthielten (Purandare et al. 1996; Viskochil 1998). Dabei wurde ein erster Hinweis auf das Vorhandensein eines Abschnitts, der in Cos1-Zellen einen gewissen Grad von Repression vermittelt, gewonnen. Das ergab sich aus der höheren Wirksamkeit eines kleineren gegenüber einem größeren Fragment; die die Repression vermittelnde Region scheint zwischen -3377 und -3305 zu liegen.

Auch im proximalen Bereich der das NF1-Gen 5'-flankierenden Sequenzen befindet sich eine Bindungsstelle für einen negativen Regulator der Transkription. Es handelt sich um das Proteinprodukt Tax des transregulatorischen Gens *tax* des humanen T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1 (HTLV-1).

Mehreren Arbeitsgruppen war aufgefallen, dass transgene Mäuse, die das tax-Gen unter der Kontrolle der 5'-LTR des HTLV-1 tragen, Neurofibrome entwickeln [Zitate bei Feigenbaum et al. (1996)]. Diese Beobachtung ließ einen hemmenden Einfluss des Tax-Proteins auf die Expression des NF1-Gens vermuten. In der Tat wird das LTR-tax-Konstrukt im PNS der Mäuse exprimiert. Die Menge der NF1-mRNA vermindert sich in trigeminalen Ganglienzellen zu dem Zeitpunkt, an welchem die Tax-Expression einsetzt; sie ist bei 17 Wochen alten tax-Transgenoten nicht mehr nachzuweisen. Die genauere Zuweisung der für die Repression erforderlichen NF1-Promotorsequenz gelang den Autoren mit Hilfe der Kofransfektion von LTR-tax mit CAT-Reportergenkonstrukten, denen unterschiedliche Anteile von 5'-flankierenden Sequenzen des NF1-Gens vorgeschaltet waren. Dabei erwies sich die Repression des kofransfizierten NF1-Promotor-CAT-Konstrukts als abhängig vom Vorhandensein des proximalen Abschnitts -236 bis -3. Schließlich konnte auch die Repression des intrinsischen NF1-Gens der NIH3T3-Zellen durch tax nachgewiesen werden (Feigenbaum et al. 1996).

Für das Verständnis der zelltypspezifischen und für Entwicklungsstadien charakteristischen Expressionsmuster des NF1-Gens ist eine genaue Kenntnis der funktionell bedeutsamen Sequenzen seiner Promotor-Enhancer-Region und der damit interagierenden transregulatorischen Faktoren unerlässlich. Solche Erkenntnisse könnten sich auch unter medizinischem Gesichtspunkt als relevant erweisen: Da die meisten Mutationen des NF1-Gens Haploinsuffizienz des Neurofibromins bewirken (s. Kapitel 5.2.2.5 „Mutationen“), böte die Möglichkeit der Transkriptionsstimulation des Wildtypallels der Patienten einen viel versprechenden Therapieansatz. Die für die 3'-UTR der NF1-mRNA kodierende Sequenz ist mit 3500 bp ungewöhnlich lang. Ihre hohe phylogenetische Konservierung bei Mensch und Maus mit 75% Sequenzidentität in 2 großen Segmenten, die zusammen 2/3 der 3'-UTR umfassen, lässt eine Bedeutung für funktionelle Regulation der NF1-Gen-Expression vermuten. Hierauf wird im Abschnitt über die Transkriptionsprodukte des NF1-Gens näher eingegangen (s. Kapitel 5.2.2.4 „Transkriptionsprodukte“).

### 5.2.2.3 NF1-Pseudogene

Bei der Mutationensuche im NF1-Gen fielen kreuzreagierende, NF1-verwandte Sequenzen auf, deren Leserahmen mehrfach durch Stoppkodons, kleinere

Deletionen und Insertionen unterbrochen ist. Diese Pseudogenesequenzen erfordern hohe Spezifität bei der Mutationsanalyse des Bona-fide-NF1-Gens. Insgesamt sind 12 NF1-Pseudogene auf 8 verschiedenen Chromosomen nachgewiesen worden (Tabelle 5.7) (Marchuk et al. 1991; Legius et al. 1992; Suzuki et al. 1994; Purandare et al. 1995; Cummings et al. 1996; Hulsebos et al. 1996; Regnier et al. 1997; Luijten et al. 2000). Es handelt sich dabei um nicht aufbereitete, also intronhaltige Pseudogene. Während im perizentrischen Bereich des Chromosoms 14 2 NF1-Pseudogene lokalisiert wurden, gibt es Hinweise darauf, dass auf Chromosom 15 drei NF1-Pseudogene liegen (Kehrer-Sawatzki et al. 1997; Regnier et al. 1997). Jedoch muss angenommen werden, dass die Anzahl der NF1-Pseudogenesequenzen auf Chromosom 15q11.2 interindividueller Variabilität unterliegt, da Pseudogenanteile innerhalb einer etwa 1 Mb umfassenden Repeatregion kartiert wurden, deren Kopienzahl polymorpher Variabilität unterworfen ist (Barber et al. 1998; Ritchie et al. 1998). Der Anteil an NF1-verwandten Exons, die bislang in den Pseudogenen nachgewiesen wurden, ist in Tabelle 5.7 angeführt. Daraus geht hervor, dass Sequenzen mit Homologie zu NF1-Gen-Bereichen distal von Exon 29 nicht in Form von Pseudogenen vertreten sind. Die Sequenzanalyse der NF1-Pseudogene auf den Chromosomen 2, 14, 15, und 22 weist darauf hin, dass diese Sequenzen vor 23–31 Mio. Jahren begannen, voneinander zu divergieren. Es ist anzunehmen, dass es etwa in dieser Zeitspanne zu einer Duplikation eines zentralen Segments des NF1-Gens gekommen ist, und dass diese erste partielle Kopie des NF1-Gens nach einer weiteren Duplikation die Ursprungssequenzen der heutigen NF1-Pseudogene entstehen ließ (Regnier et al. 1997; Luijten et al. 2000).

### 5.2.2.4 Transkriptionsprodukte

Die anhand von Northern-Blots geschätzte Länge der größten beobachteten NF1-mRNA beträgt 13000 Nukleotide (Nt). Aus der Sequenz und RNase-Schutz-Experimenten ergeben sich etwa 12100 Nt, von denen 484 der 5'-UTR und 3512 der 3'-UTR zugehören, wenn Letztere vom 1. Nt nach dem Stoppkodon bis zu einem Polyadenylierungssignal gerechnet wird. In die angegebene Länge der 3'-UTR sind 15 Nt eingerechnet, welche auf das Polyadenylierungssignal folgen und dem durchschnittlichen Abstand der Polyadenylierungsposition vom Signal entsprechen. Letzteres ist mit seiner Sequenz AGUAAA nicht mit der bekannten Konsensussequenz von 95% dieser Motive identisch, vermittelt



Tabelle 5.7. Chromosomale Lokalisation der NF1-Pseudogene

Exon Nr.	2q21	12q12	14q11.2	15q11.2	18p/q11	20p/q11	21q11.2	22q11.2
7							+	
8					+		+	
9					+		+	
10a								+
10b								+
11							+	-
12a	+	+	+			+		+
13	+		+	+				+
14			+	+				+
15			+	+				+
16		+	+					+
17			+					+
18			+	+				+
19a			+					+
19b				+				
20				+				
21				+				-
22				+				
23-1				+				-
24				+				
25				+				-
26				+				
27a				+				-
27b	+	+	+	+		-	-	+
28	-	-	+	-		-	+	-
29	+	-	+	-		-	+	-

(+) Nachweis von Pseudogen Exonsequenzen, (-) Ausschluss von NF1-ähnlichen Sequenzen.

aber noch etwa 30% der Polyadenylierungseffizienz von AAUAAA (Wickens 1990). Aufgrund von 3 weiteren Polyadenylierungssignalen in der proximalen Hälfte der 3'-UTR muss mit Längenvarianten der NF1-mRNA von Mensch und Maus gerechnet werden (Bernards et al. 1993).

Eine Anzahl von Normvarianten der NF1-mRNA entstehen durch alternatives Spleißen, Editing und, im Fall der so genannten N-Form, auch durch alternative Polyadenylierung. In Tabelle 5.8 sind die bis heute bekannten alternativen Formen der menschlichen NF1-mRNA hinsichtlich ihres Zustandekommens, ihrer Größe und der jeweils erwarteten Länge des Leserahmens zusammengestellt. Mit den alternativ gespleißten Exons erweitert sich der im NF1-Gen verfügbare Leserahmen von 2818 Kodons (Typ I) auf 2871 Kodons. Bisher ist keine NF1-mRNA bekannt, die alle zusätzlich eingespleißten Exons enthielte. Die Isoformen I (ohne Exon 23a) und II (mit Exon 23a) innerhalb der GRD werden in wechselnden Mengenverhältnissen ubiquitär exprimiert. Da die 63 bp des Exons 23a für ein polares Peptid kodieren, ist der Unterschied zwischen Neurofibromin Typ I und II sehr wahrscheinlich von funktioneller Bedeutung (s. Kapitel 5.2.3.1 „Neurofibromin als Mit-

glied der Ras-GAP-Familie“). Eine verwirrende Fülle von Publikationen über die Mengenverhältnisse dieser beiden Isoformen und ihre Veränderungen in verschiedenen physiologischen Zuständen und bei der malignen Transformation lässt bisher keine durchgängige Regelmäßigkeit erkennen [Zitate bei Shen et al. (1996) und Viskochil (1998)]. Es bedarf wohl einer jeweils systemspezifischen Interpretation dieser divergierenden Beobachtungen. Die funktionelle Relevanz der beiden Isoformen I und II wird auch dadurch hervorgehoben, dass Exon 23a nicht nur bei Säugern (Mensch, Maus, Ratte) sondern auch bei dem niederen Vertebraten *Fugu rubripes* alternativ gespleißt wird (Kehrer-Sawatzki et al. 1998).

Im Gegensatz zu Exon 23a zeigen die Isoformen mit Exon 9a (auch 9br, von „brain specific“) bzw. mit Exon 48a gewebespezifische Expression. NF-mRNA Typ 3 (Tabelle 5.8), welche eine 54-Nt-Insertion in Intron 48 enthält, die für 18 Aminosäuren des Neurofibromins Typ 3 kodiert (auch 3'-Alt genannt, von „alternative“ am 3'-Ende) wird im Herzmuskel und in der Skelettmuskulatur exprimiert (Gutmann et al. 1993 a). Die funktionelle Bedeutung dieser Gewebespezifität ist unbekannt. Es liegt nahe, anzunehmen, dass das Oligopeptid eine

Transkripttyp	Exons [(-) fehlend, (+) zusätzlich zu Typ I]			Anzahl zusätzlicher und fehlender Kodons	Länge des erwarteten Neurofibromins [Aminosäuren]	Expression nachgewiesen	Zitate
9br	9a (+)	23a (+/-)	48a (-)	+10, +/-21	2828	Gehirn	Danglot et al. (1995)
I	9a (-)	23a (-)	48a (-)	-	2818	Ubiquitär	Nishi et al. (1991); Suzuki et al. (1991)
II	9a (-)	23a (+)	48a (-)	+21	2839	Ubiquitär	Nishi et al. (1991); Suzuki et al. (1991)
3	9a (-)	23a (-)	48a (+)	+18	2836	Herz, Muskeln	Gutmann et al. (1993 a)
4	9a (-)	23a (+)	48a (+) <sup>a</sup>	+21, +18	2857	Herz, Muskeln	Gutmann et al. (1995 a)
5	9a (-)	23a (+/-)	29 (-) 48a (-)	+/-21, -815	2045/2024	Lymphozyten	Park et al. (1998)
6	9a (-)	23a (+/-)	30 (-) 48a (-)	+/-21, -968	1871/1850	Lymphozyten	Park et al. (1998)
7	9a (-)	23a (+/-)	29 (-) 30 (-) 48a (-)	+/-21, -1080	1759/1738	Lymphozyten	Park et al. (1998)
8	9a (-)	23a (+/-)	43 (-) 48a (-)	+/-21, -41	2798/2777	Zellkulturen	Eisenbarth u. Assum unveröffentlicht
N-Form	11-49 (-) <sup>b</sup>			-2267+4	551	Niere, Plazenta, HeLa-Zellen	Suzuki et al. (1992)
Editingprodukt	Δ23.1, 23.2-49 (-) <sup>c</sup>			-(1512+1 Nt)	1305	Ubiquitär	Skuse et al. (1996)

Die verwendete Nummerierung mit römischen und arabischen Zahlen erklärt sich aus der Vergabe der römischen Zahlen III und IV an 2 Spleißvarianten der NF1-mRNA der Maus, die beim Menschen nicht vorkommen. Der Einfachheit halber wurde die Nummerierung beim Menschen über 2 hinaus mit arabischen Ziffern fortgesetzt.

<sup>a</sup> cis-Stellung auf Proteinebene nachgewiesen.

<sup>b</sup> Entstehung s. Text.

<sup>c</sup> Kodon 16 in Exon 23.1 wird durch C→U-Editing zum Stoppkodon.

Interaktion des Neurofibromins mit einem muskelspezifischen Protein (Desmin?) vermitteln könnte. Die NF1-mRNA 9br (+ Exon 9a) enthält eine Insertion von 30 Nt in Intron 9 und wird ausschließlich im Gehirn, und zwar vorrangig in Neuronen des Vorderhirns, nicht aber des Hirnstamms, exprimiert (Danglot et al. 1995; Gutmann et al. 1999 a). Astrozyten und Astrozytome enthalten diese Variante nicht. Auch diese Zeltypspezifität harret noch ihrer funktionellen Begründung. Die Existenz der beiden gewebespezifisch exprimierten Exons und ihre Lage weit ab von der GRD weisen darauf hin, dass die großen, GRD-flankierenden Segmente des Neurofibromins Funktionen ausüben könnten, die von der Ras-Regulation unabhängig sind. Dafür spricht auch ihre phylogenetische Konservierung: Beide Spleißisoformen sind auch bei der Maus und bei der Ratte mit entsprechender Spezifität nachgewiesen worden. Exons 9a und 48a fehlen jedoch bei *Fugu rubripes*. Obwohl die Mutationen des NF1-Gens fast gleichmäßig über seine

Länge verteilt sind, fanden sich noch keine Mutationen in den 3 alternativ gespleißten Exons, die zusammen 1,8% des Leserahmens einnehmen.

Die ubiquitäre Spleißalternative Exon 23a (+/-) lässt erwarten, dass die meisten anderen Spleißvarianten jeweils in 2 Formen vorkommen, mit und ohne Exon 23a. Das ist in Tabelle 5.8<sup>1</sup> durch „23a (+/-)“ und die Angaben der zugehörigen Leserahmenlängen deutlich gemacht. Neurofibromin Typ 4 [23a(+) 48a(+)] wurde durch Gutmann et al. (1995 a) am Herzmuskel der Ratte mit Hilfe differenzieller Immunpräzipitation mit Antikörper gegen Typ 3 (48a-Epitop) und Western-Blot mit Antikörper gegen Typ II (23a-Epitop) nachgewiesen.

<sup>1</sup> Die in Tabelle 5.8 verwendete Nummerierung mit römischen und arabischen Zahlen erklärt sich aus der Vergabe der römischen Zahlen III und IV an 2 Spleißvarianten der NF1-mRNA der Maus, die beim Menschen nicht vorkommen. Der Einfachheit halber haben wir die Nummerierung beim Menschen über 2 hinaus mit arabischen Ziffern fortgesetzt.

Interessant ist die Entstehung der 2,9-kb-Variante mit der Bezeichnung N-Form, durch die auf die N-terminale Position dieses Transkripts hingewiesen werden soll. Die einfachste Erklärung dieser Form sieht vor, dass der 5'-Spleißort des Introns 10c übergangen wird und es 226 Nt nach einem im proximalen Intron 10c liegenden Stoppkodon und 16 Nt nach einem kanonischen Polyadenylierungssignal zur Polyadenylierung kommt. Die 4 zusätzlichen Kodons repräsentieren das 5'-Ende des Introns 10c und determinieren die 4 C-terminalen Aminosäuren des mutmaßlichen N-Form-Neurofibromins. Eine noch gebräuchliche Bezeichnung der N-Form ist 5'-Alt1 für „alternatives Transkript am 5'-Ende“. Entsprechend erhielt die 9br-Variante die Bezeichnung 5'-Alt2 (Shen et al. 1996). Die Isolierung des trunkierten Neurofibromins der N-Form und seine funktionelle Analyse wären im Hinblick auf unsere Unkenntnis der Bedeutung der GRD-flankierenden Segmente des Neurofibromins von großem Interesse.

Die zunehmende Anzahl von Beispielen der posttranskriptionalen Modifikation von mRNA und tRNA durch enzymatisch katalysierte Desaminierung, Amidierung oder Substitution von Basen veranlassten Skuse et al. (1996) dazu, die NF1-mRNA einer Prüfung auf Editing zu unterwerfen. Eine C:U-Desaminierung in Position 3916 der NF1-mRNA wurde gefunden, durch welche das Arg-Kodon 1306 in Exon 23.1 in ein Stoppkodon verwandelt wird. In Gewebeproben von Gesunden und NF1-Patienten sowie in Leukozyten war ein Anteil von im Mittel 1,7% der NF1-mRNA in dieser Weise verändert. Der Vergleich von Tumoren von NF1-Patienten ergab für kutane Neurofibrome Werte zwischen 1,9 und 5,7%, für plexiforme Neurofibrome 4,1–14% und bei Neurofibrosarkomen 4,3–17,5% Editing der NF1-mRNA. Wenn sich auch die Werte der verschiedenen Stichproben überlappten, ist doch eine deutliche Tendenz zu höheren Anteilen edierter NF1-mRNA in benignen und besonders in malignen Tumoren zu erkennen (Cappione et al. 1997). Die Editingposition liegt nahe am 5'-Ende der GRD, sodass das Translationsprodukt die Ras-GAP-Wirkung einbüßt, was durch das Vorkommen dieses C:U-Austausches als konstitutionelle Mutation einer NF1-Patientin bestätigt wird (Park u. Pivnik 1998). Es erscheint also möglich, dass dieser Editingvorgang durch Verminderung des funktionell aktiven Neurofibromins zur Tumorgenese bei NF1-Patienten beiträgt.

Die 5'-UTR der NF1-mRNA umfasst 484 Nt (Tabelle 5.4). Auf ihren überraschenden Gehalt an Transkriptionsfaktorbindungsstellen wurde bereits

in Kapitel 5.2.2.2 „Charakteristika des NF1-Gens“ hingewiesen. Die Translationsstartsequenz am 3'-Ende der 5'-UTR weicht zwar von der Konsensussequenz ab, die wichtigsten konservierten Positionen, das G an 3. Position vor und das G unmittelbar nach dem AUG-Kodon sind vorhanden.

Die 3'-UTR ist mit mehr als 3500 Nt ungewöhnlich groß; sie nimmt fast 29% der Länge der NF1-mRNA in Anspruch. Neben ihrer Länge lässt auch ihre hohe phylogenetische Konservierung eine funktionelle Bedeutung erwarten. Die 3'-UTR der NF1-mRNA des Menschen und der Maus enthalten 2 große Segmente (1700 und 500 Nt lang), in denen eine Sequenzidentität >75% besteht. Die Bedeutung der 3'-UTR für das Schicksal eukaryotischer mRNA ist durch eine Fülle von Untersuchungen belegt. Translatierbarkeit, Translationsgeschwindigkeit, Stabilität und intrazelluläre Lokalisation der mRNA können durch Sequenzmotive der 3'-UTR reguliert werden (Jackson 1993). Mit Hilfe von RNA-Protein-Bindungsstudien identifizierten Haeussler et al. (2000) 5 Proteinbindungsregionen (PBR1–5) in der 3'-UTR der NF1-mRNA, die mit je spezifischen Proteinen aus Zellextrakten Komplexe bilden. Das auf 38 Nt eingeeengte proximale (A+U)-reiche Sequenzelement PBR1 interagiert mit dem 32 KDa-Protein HuR (Keene 1999), das in die Regulation der Translation und Stabilität der mRNA von Protoonkogen, Zytokinen und Transkriptionsfaktoren involviert ist. Es ist zu erwarten, dass die Identifizierung der von den anderen PBR der NF1-3'-UTR gebundenen Proteine weitere Möglichkeiten der posttranskriptionalen Regulation der NF1-Gen-Expression unserem Verständnis erschließt.

### 5.2.2.5 Mutationen

Die Mutationensuche im NF1-Gen ist durch die große Zahl seiner Exons und der NF1-Pseudogene erschwert. Lohnende Ausbeuten an identifizierten Mutationen (>60%) sind am besten durch die Anwendung von Methodenkombinationen zu erzielen; aber selbst die Sequenzierung des gesamten kodierenden Anteils des NF1-Gens bei jedem Patienten (Fahsold et al. 2000) führt nicht zu einer 100%igen Erfassung der Mutationen. Hierfür mag ein unvermutet hoher Anteil von Mutationen in nichtkodierenden Sequenzen verantwortlich sein. Da die Ausbeute an erkannten Mutationen bei familiären Fällen deutlich höher liegt als bei sporadischen [s. z. B. Ars et al. (2000)] könnte auch ein Anteil nicht identifizierter Mosaik an Letzteren zu diesem Defizit beitragen. Die von Korf (1999) zusammenge-

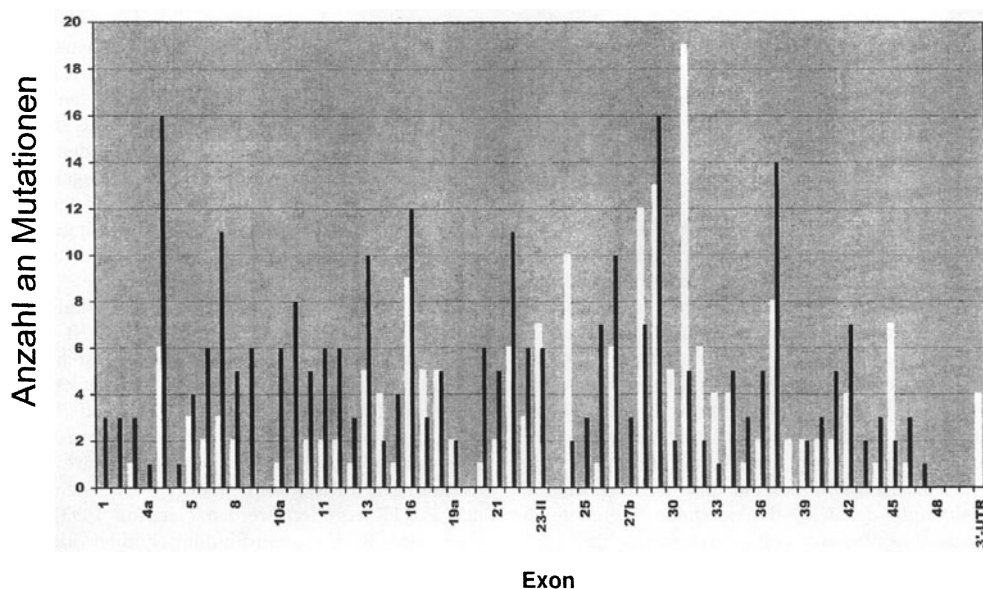


Abb. 5.1. Verteilung von Mutationen des NF1-Gens über seine Exons. *Schwarze Säulen:* 278 pathogene Mutationen, identifiziert von Fahsold et al. (2000), *weiße Säulen:* 191 bis No-

vember 1997 an das NF1 Genetic Analysis Consortium berichtete Mutationen (Korf 1998). Mit freundlicher Genehmigung von Priv.-Doz. Dr. Peter Nürnberg, Berlin

Tabelle 5.9. Zusammenfassung der bis März 1999 an die Zentrale des NNFF International NF1 Genetic Analysis Consortium (Korf 1999) gemeldeten Mutationen des NF1-Gens, ergänzt durch 5 Chromosomenanomalien, deren einer Bruchpunkt jeweils in 17q11.2 liegt

Mutationstyp	Anzahl
Strukturelle Chromosomenanomalien	9
Deletionen des ganzen Gens	38
Deletionen einzelner oder mehrerer Exons	42
Kleine Deletionen	63
Große Insertionen	3
Kleine Insertionen	29
Direkte Stoppmutationen (Nonsense)	51
Aminosäuresubstitutionen (Missense)	31
Mutationen in Introns (Spleißmutationen)	26
3'-UTR-Mutationen	4
Stumme, nichtpolymorphe Austausche	4
Summe	300

fassten Mutationen (Tabelle 5.9) repräsentieren nur einen Teil der inzwischen bekannten Aberrationen. In diese Stichprobe gingen die Ergebnisse zahlreicher Studien ein, in denen mit Methoden unterschiedlicher Ergiebigkeit einzelne oder wenige Exons analysiert wurden. Daher repräsentiert diese Stichprobe nicht das tatsächliche Mutationenspektrum des NF1-Gens.

Im Rahmen eines kooperativen Projekts haben es sich die Arbeitsgruppen um Fahsold, Nürnberg, und Hoffmeyer, Assum, zur Aufgabe gemacht, bei mehr als 500 NF1-Patienten die gesamte kodierende Region und die den Exons unmittelbar benachbarten Sequenzen auf Kleinmutationen hin zu untersuchen (Fahsold et al. 2000) (Abb. 5.1). Sie setzten dafür eine Kombination aus Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE) an genomischen PCR-Produkten, dem so genannten Proteintrunkationstest (PTT) und der Sequenzierung aller Exons bei allen Patienten ein. Bei 521 Patienten identifizierten Fahsold et al. (2000) 301 Sequenzveränderungen, von denen 278 als pathogen gelten können. Als Gründe für die überraschend geringe Erfolgsquote von 53,3% gaben die Autoren an:

- die Beschränkung auf Kleinmutationen, sodass große Deletionen des ganzen Gens oder multipler Exons nicht erfasst wurden;
- auch große Duplikationen oder Inversionen entgehen mit diesen Methoden dem Nachweis;
- Inaktivierung des Gens durch Promotormethylierung;
- nicht erfasste Mutationen in regulatorisch bedeutsamen Sequenzen der 5'-UTR und 3'-UTR;
- Locusheterogenität der NF1 und
- vielleicht auch Fehldiagnosen.

Solche Gründe können gewiss auch für die relativ geringen Erfolgsquoten anderer Bemühungen um die Identifizierung von NF1-Gen-Mutationen ins Feld geführt werden.

Die Stichproben des NF1-Konsortiums (Korf 1999) und von Fahsold et al. (2000) stimmen in folgenden Parametern überein:

- geringer Anteil von Missense-Mutationen (10,3% und 10,1%);
- sehr hoher Anteil Protein trunkierender Mutationen (ungefähr 80%);
- weitgehend gleichmäßige Verteilung der Mutationen über die Ausdehnung der kodierenden Region, es zeichneten sich keine prominenten Vorzugsorte (Hot spots) ab (Abb. 5.1).

In der Serie des Konsortiums sind nur 21 (7%) der 300 Mutationen bei mehr als einem Patienten verschiedener Familien beobachtet worden. In Tabelle 5.10 sind die rekurrenten Mutationen mit einer Häufigkeit von mehr als 1% zusammengefasst. Eine Diskrepanz zwischen den beiden Kollektiven besteht hinsichtlich der häufigsten rekurrenten Mutationen:

- Konsortium: R1947X (C5839T) bei 14 von 300 Patienten (4,59%),
- Fahsold et al.: R1513X (C4537) bei 7 von 278 Patienten (2,52%).

Ein Anteil von 4,6% an einer von 8601-bp-Positionen der NF1-cDNA mag die Bezeichnung dieser Position als Hot spot rechtfertigen, jedoch wird dies durch die Fahsold-Serie mit nur 3/278 Fällen der R1947X-Substitution in Frage gestellt (1,08%). Wie aus Tabelle 5.10 hervorgeht, betreffen alle C:T-Transitionen mit Häufigkeiten deutlich >1,0%

CpG- bzw. CpNpG-Positionen. Diese Transitionen sind also mit dem durch C-Methylierung vermittelten Mutationsmechanismus vereinbar. Auch viele nicht rekurrente Einzelbasenaustausche im NF1-Gen betreffen diese methylierungsempfindlichen Sequenzmotive; insgesamt sind es 66 von 181 (36,5%) im Fahsold-Kollektiv. Das entspricht der von Cooper u. Krawczak (1994) ermittelten Häufigkeit unter Einzelbasenaustauschen bei genetisch bedingten Krankheiten.

Mit größerer Berechtigung können die Positionen 6789–6792 in Exon 37 als Hot spot bezeichnet werden. Hier sind, verschiedene z.T. überlappende Serien zusammengenommen, 15 Mutationen gefunden worden (Tabelle 5.10). Welche Rolle hierbei die nicht perfekte, flankierende Repetition spielt, ist nicht bekannt, jedoch zeigten Böddrich et al. (1997), dass diese Struktur während der Replikation eine Art Möbius-Schleife bilden kann, die einerseits die Deletion begünstigen, andererseits aber die Fehlpaarungsreparatur behindern kann. Die 4-mal beobachtete 2027insC findet ihre wahrscheinlichste Erklärung im so genannten „slipped mispairing“ der DNA-Polymerase, da die C-Insertion in eine Sequenz von 7C (Positionen 2027–2033) hinein erfolgt. Weitere mechanistische Betrachtungen über die Mutationen im NF1-Gen finden sich bei Upadhyaya u. Cooper (1998).

In beiden Kollektiven sind die 3 alternativ gespleißten Exons 9br, 23a und 48a frei von Mutationen. Sie repräsentieren zusammen nur 1,71% der kodierenden Region, sodass sie zufällig von Mutationen ausgespart sein könnten. Im Fall der gewebespezifisch exprimierten Exons 9br (Gehirn) und

**Tabelle 5.10.** Rekurrente Kleinmutationen des NF1-Gens, die mehr als 1% der jeweiligen Stichprobe ausmachen

Mutation	Exon	x/n	%	Referenz
499delTGTT	4b	6/278	2,16	Fahsold et al. (2000)
D176E (T528A)	4b	4/278	1,44	Fahsold et al. (2000)
R416X (C1246T) <sup>a</sup>	9	4/278	1,44	Fahsold et al. (2000)
2027insC	13	4/300	1,33	Korf (1999)
R681X (C2041T) <sup>a</sup>	13	4/278	1,44	Fahsold et al. (2000)
R816X (C2446T) <sup>a</sup>	16	4/185	2,16	Bahua u. et al. (1998)
R1276X (C3826T) <sup>a</sup>	22	5/300	1,67	Korf (1999)
R1306X (C3916T) <sup>a</sup>	23–1	4/278	1,44	Fahsold et al. (2000)
K1423 E (A4267G)	24	5/300	1,67	Korf (1999)
R1513X (C4537T) <sup>a</sup>	27a	7/278	2,52	Fahsold et al. (2000)
R1947X (C5839T) <sup>a</sup>	31	14/305	4,59	Korf (1999)
6789delTTAC <sup>b</sup>	37	5/278	1,80	Fahsold et al. (2000)

<sup>a</sup> In einer CpG- oder CpNpG-Position.

<sup>b</sup> Positionen 6789–6792 in Exon 37 sind ein Prädispositionsstelle für verschiedenartige Mutationen: 5-mal 6789delTTAC (s. oben), 6-mal C6792A, 2-mal 6791insA, 1-mal 6790TT, 1-mal C6792G, in verschiedenen Stichproben: Robinson et al. (1995), Upadhyaya et al. (1996), Böddrich et al. (1997), Messiaen et al. (1997), Korf (1999), Fahsold et al. (2000).

48a (Muskulatur) müssten zelltypspezifische dominant-negative Effekte angenommen werden, sollte das Fehlen von Mutationen durch die Hypothese erklärt werden, dass Mutationen dieser Exons letal seien. Auch im vorletzten (48) und im kodierenden Anteil des letzten Exons (49) – zusammen 4,3% der kodierenden Region – sind noch keine Mutationen nachgewiesen worden. Ob diesem C-terminalen Abschnitt des Neurofibromins eine besondere funktionelle Bedeutung zukommt, ist fraglich, da er nicht zu den stärker konservierten Regionen gehört. Unter den Mutationen des NF1-Gens ist als Besonderheit die De-novo-Insertion eines Alu-Retrotransposons zu erwähnen, welche das erste Beispiel dieses Mutationsmechanismus im menschlichen Genom darstellte (Wallace et al. 1991). Diese Insertion betraf das väterliche Allel des sporadischen NF1-Patienten und inaktivierte die Spleißverzweigungssequenz des Introns 33. Wie diese Alu-Insertion erfolgt die überwiegende Mehrheit der Neumutationen des NF1-Gens am väterlichen Allel, entweder in der Keimbahn oder als somatische Mutation während der Ontogenese. Haplotypanalysen mit Hilfe intragener und flankierender Polymorphismen, die zugleich große Deletionen des NF1-Gens ausschlossen, ergaben bei 31 von 35 Familien (88,6%) sporadischer Patienten eine väterliche Herkunft des betroffenen Allels (Jadayel et al. 1990; Stephens et al. 1992; Lázaro et al. 1996). Obwohl die Natur der Mutationen in diesen Untersuchungen nicht bestimmt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es sich überwiegend um Einzelbasenaustausche, kleine Deletionen und kleine Insertionen handelte. Deletionen großer Teile des NF1-Gens oder des ganzen Gens wären durch Hemizygotie eines Anteils der informativen Marker aufgefallen. Untersuchungen der parentalen Herkunft von 60 großen sporadischen Deletionen des NF1-Gens zeigten, dass 74% das maternale Allel betrafen [Literatur bei Upadhyaya u. Cooper (1998)]. Damit entspricht die Abhängigkeit des Mutationsspektrums auch bei diesem Gen der allgemeinen Tendenz, dass Kleinmutationen eher paternaler, große Deletionen häufiger maternaler Herkunft sind.

Bei Prüfung bekannter Mutationen des NF1-Gens auf ihre Auswirkungen auf das Leseraster lassen >80% (251 von 300; 83,7%) die Entstehung verkürzter Neurofibrominmoleküle erwarten. Derartige trunkierte Proteinprodukte mutierter NF1-Gene konnten bisher im Western-Blot mit Antikörpern gegen C- und N-terminale Epitope noch nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich fallen sie einem raschen Abbau anheim oder sie entste-

hen bereits nur zu kleinen Anteilen, da von einer ganzen Reihe von NF1-Gen-Mutationen gezeigt werden konnte, dass sie auf der Ebene ihrer reifen Transkripte stark unterrepräsentiert sind (Hoffmeyer et al. 1995). Der größte Teil der NF1-Gen-Mutationen ist somit für die biochemisch-genetische Funktionsanalyse, wie sie bei zahlreichen Proteinen so erfolgreich ist (Hämoglobine, Ras-Proteine), wenig ergiebig. Man muss sich entweder an die etwa 10% Missense-Mutationen halten oder durch positionsspezifische, gezielte Mutagenese geeignete Mutanten erzeugen. In welcher Weise die Funktionsanalyse von Neurofibrominmutanten durchgeführt werden kann und welche Ergebnisse dabei erhalten werden, wird in Kapitel 5.2.4.3 „Molekulare Pathologie“, Unterkapitel „Funktionsanalysen von NF1-Gen-Mutationen“, dargestellt.

Einen hohen Anteil an den trunkierenden NF1-Gen-Mutationen stellen die Spleißmutationen. Die überwiegende Mehrzahl solcher Läsionen beruht entweder auf Mutationen der Konsensussequenzen der Donor-, Akzeptor- bzw. Verzweigungspositionen, oder auf der Entstehung neuer Sequenzmotive dieser Art, die alternativ zu den normalen oder ausschließlich benützt werden. Naturgemäß treten diese Spleißaberrationen nur bei Untersuchungen auf RNA-Ebene zutage, und deshalb empfehlen manche Autoren, alle auf DNA-Ebene identifizierten Kleinmutationen in dieser Weise auf ihre Auswirkungen auf den Spleißprozess hin zu prüfen (Ars et al. 2000; Fahsold et al. 2000). Wenn dies in größerem Umfang geschähe, müsste die frühe Schätzung des Anteils von Punktmutationen, die zu Spleißdefekten führen (Krawczak et al. 1992) auf 15%, gewiss zu höheren Werten korrigiert werden. Beispielhaft hierfür ist die Studie von Ars et al. (2000), in der alle 80 Patienten des Kollektivs auf DNA- und RNA-Ebene untersucht wurden. Unter den 44 identifizierten verschiedenen Mutationen gingen 19 (43,2%) mit Spleißaberrationen einher. Davon betrafen 9 die 5'-Spleißposition, 3 die 3'-Spleißposition und 5 erzeugten neue Spleißsequenzen. Die fehlenden 2 Mutationen konnten keiner dieser Kategorien zugeordnet werden. Es handelt sich um Stoppmutationen in Exon 7 bzw. Exon 37, die weitab von den Spleißsequenzen liegen und dennoch zum Überspringen (exon skipping) des jeweils betroffenen Exons führen (Messiaen et al. 1997; Hoffmeyer et al. 1998). Dass direkte oder indirekte Stoppmutationen „exon skipping“ verursachen können, war bereits an einigen anderen Genen beobachtet worden (Maquat et al. 1996). Diesen beiden NF1-Gen-Mutationen eng benachbarte andere Stoppmutationen

beeinträchtigen den Spleißprozess an Exon 7 bzw. Exon 37 nicht (Hoffmeyer et al. 1998). Ein Vergleich der Strukturen minimaler freier Energie dieser benachbarten Läsionen ergab Hinweise auf einen hohen Grad von Spezifität des durch Stoppmutationen verursachten Überspringens von Exons.

**Große Deletionen der NF1-Region.** Etwa 2–13% aller NF1-Patienten haben große Deletionen in der NF1-Gen-Region, die nicht nur das NF1-Gen, sondern auch die flankierenden Regionen des NF1-Gens umspannen. Diese Patienten zeigen häufig eine schwere Manifestation der Erkrankung, die durch zusätzliche Komplikationen wie dysmorphe Gesichtszüge und schwere intellektuelle Beeinträchtigung gekennzeichnet ist. Bei einem Anteil dieser Patienten werden multiple Neurofibrome im präpubertären Alter beobachtet. Die Herstellung eines BAC/PAC/YAC-Contigs der NF1-Region ermöglichte es, die Deletionsgröße bei insgesamt 43 NF1-Patienten näher einzuengen (Dorschner et al. 2000; Jenne et al. 2000; Lopez-Correa et al. 2000). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde deutlich, dass ein Großteil der Patienten ( $n=37$ ) Deletionen einer Größe von etwa 1,5 Mb aufweist, die neben dem NF1-Gen und den darin inserierten Genen mindestens 7 weitere Gene überspannen. Hinsichtlich der Funktion der entsprechenden Proteinprodukte ist wenig bekannt. Im Bereich der Deletionsbruchpunkte wurden große Duplicons entdeckt, die aus Clustern paraloger Sequenzen von 60–100 kb bestehen. Diese Duplicons oder Sequenzwiederholungen (NF1REPs), enthalten selbst mehrere Gene oder Pseudogene. Es wird vermutet, dass der hohe Homologiegrad zwischen den Duplicons distal und proximal zum NF1-Gen die Rekombination und den Verlust der zwischen den Duplicons liegenden Bereiche erleichtert. Da sich große De-novo-Deletionen des NF1-Gens häufig auf dem maternalen Chromosom 17 ereignen, scheint die durch NF1-REPs vermittelte Rekombination präferenziell mit meiotischem Cross-over während der Oogenese assoziiert zu sein. Die genaue Analyse der Deletionsgrenzen bei diesen Patienten wird es erleichtern, durch einen Vergleich mit der Manifestation der Erkrankung der Frage einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation nachzugehen und zu klären, ob NF1-Patienten mit großen Deletionen von einem „contiguous genes-syndrom“ betroffen sind.

### 5.2.2.6 Expressionsmuster des NF1-Gens

Die Tatsache, dass die Hauptsymptome der NF1, Neurofibrome und Pigmentierungsanomalien, ontogenetischen Derivaten der Neuralleiste zugeordnet werden können, ließ eine vorrangige Expression des NF1-Gens in SZ, Melanozyten, Spinalganglien, Projektionsneuronen und Phäochromozyten erwarten. Diese Vorstellung wurde bereits von den ersten Analysen des Expressionsspektrums des NF1-Gens widerlegt, die im Zug seiner Klonierung unternommen wurden. Wallace et al. (1990) sahen mit Hilfe des Northern-Blots und der RT-PCR NF1-Gen-Expression in folgenden menschlichen Geweben: Gehirn, Milz, Muskel, Kolon, Schilddrüse und Niere, aber nicht in der Lunge. Mamma- und Endometriumkarzinomgewebe sowie ein Adenom der Parathyreoidea waren ebenfalls positiv.

Die erste breit angelegte Erhebung auf Proteinebene wurde von Daston et al. (1992) mit Hilfe von Immunpräzipitation und Western-Blot an der adulten Ratte durchgeführt. Diese Autoren verwendeten Antikörper gegen je ein N- und ein C-terminales Epitop des Neurofibromins, um Kreuzreaktionen mit anderen GAP, insbesondere mit p120GAP auszuschließen. Die Ergebnisse dieser und eine Reihe weiterer Studien sind in Tabelle 5.11 zusammengefasst. Das Expressionsspektrum geht dabei weit über die Derivate der Neuralleiste hinaus. Bei Studien, die an Gewebeextrakten durchgeführt wurden, mag das Vorkommen von Gefäßen und/oder Nerven hier und da eine höhere Expression vorgetäuscht haben als der jeweils charakteristischen Zellsorte zukommt. Jedoch kann für den adulten Säugerorganismus von einer nahezu ubiquitären Expression des NF1-Gens ausgegangen werden, wenn auch die neuronalen Gewebe alle anderen an Intensität deutlich übertreffen. Auch der Nachweis des Neurofibromins in verschiedenen primären Zellkulturen (Tabelle 5.12) spiegelt die Breite seines Expressionsspektrums wider, da Zellen neuroektodermalen, ektodermalen und mesodermalen Ursprungs gleichermaßen Neurofibromin enthalten. Zur Ergänzung sind in Tabelle 5.13 auch Neurofibromin exprimierende etablierte Zelllinien aufgeführt; ihre Eigenschaften lassen in der Regel keine sicheren Rückschlüsse auf die Verhältnisse in ihren Ursprungsgeweben zu. Solche Linien sind oft als Modellsysteme für verschiedenartige Untersuchungen der Neurofibrominexpression und -funktion verwendet worden.

Die Veränderungen, welche das Expressionsmuster des NF1-Gens während der Ontogenese erfährt, sind an der Ratte (Daston et al. 1992), der

**Tabelle 5.11.** Neurofibromin und/oder NF1-mRNA in Geweben und Zellen von adulten Säugern (Mensch, Ratte, Maus, Hamster), zusammengefasst nach folgenden Originalarbeiten: Gutmann et al. (1991, 1995 a,b); Daston u. Ratner (1992); Ahlgren-Beckendorf et al. (1993); Malhotra u. Ratner (1994); Norton et al. (1995)

Ontogenetische Herkunft	Gewebe	Zellen
<i>Ektoderm</i>		
Neuralrohr	Gehirn Rückenmark (graue>weiße Substanz)	Projektionsneuronen; Motoneuronen Oligodendrozyten Astrozyten (-)
Neuralleiste	Periphere Nerven Sensible und autonome Ganglien Spinalganglien Nebennierenmark Pigmentzellen	Nichtmyelinisierende SZ Ganglienneuronen Satellitenzellen (-) Phäochromozyten Melanozyten
Oberflächenektoderm	Epidermis	Keratinocyten (Stratum basale)
<i>Mesoderm</i>	Skelettmuskulatur (+/-) Dermis und Subkutis (+/-) Niere Herz Blutgefäße	Myoblasten Fibroblasten Endothelzellen, glatte Muskelzellen (Aorta)
	Blut Milz Leber Pankreas Kolon Lunge	Lymphozyten Lymphozyten, Retikulum? Hepatozyten Endo- oder Mesodermanteile?
<i>Endoderm</i>		

**Tabelle 5.12.** Expression des Neurofibromins in primären menschlichen Zelllinien

Zellsorte	Herkunft	NF1-mRNA	Neurofibromin	Literatur
Fibroblasten	Dermis Neurofibrom	+	+	Kobayashi et al. (1993); Ylä-Outinen et al. (1998) Kaufmann et al. (1999b); Böddrich et al. (1995)
Keratinocyten	Epidermis	+	+	Hermonen et al. (1995)
Melanozyten	Epidermis	+	+	Kaufmann et al. (1999a,b); Griesser et al. (1995, 1997)
Lymphozyten	Blut	+	+	Wallace et al. (1990)
Schwann-Zellen	PNS Neurofibrom		+	Kluwe et al. (1999); Wallace et al. (2000)

Maus (Huynh et al. 1994) und beim Huhn (Stocker et al. 1995) erhoben worden. Obwohl sehr frühe Stadien nicht erfasst wurden, zeichnet sich vom Beginn der Organogenese an insofern ein gemeinsames Muster ab, als die Neurofibrominexpression während dieses Prozesses ansteigt, mehr und mehr Gewebe und Zelltypen erfasst und bis zu einer nahezu ubiquitären Expression fortschreitet. Erst postnatal wird die Neurofibrominexpression zunehmend beschränkt und bleibt im Wesentlichen im ZNS und PNS auf hohem Niveau bestehen (Daston u. Ratner 1992). In den beiden Säugetiersystemen (s. oben) können 3 Arten von Geweben mit unterschiedlichem Verlauf der Neurofibrominexpression unterschieden werden (Sherman et al. 1998):

1. Stetige Zunahme während der Ontogenese und Bestehenbleiben hoher Expression beim adulten Organismus.  
Dieses Verhalten zeigen folgende Zellarten: spinale Motoneuronen, Ganglionneuronen, Projektionsneuronen, Oligodendrozyten, nicht myelinisierende SZ und Phäochromozyten.
2. Pränataler Anstieg und postnatale Abnahme auf ein niedriges Niveau.  
Dieser Verlauf wird beim Herzen und der Skelettmuskulatur, aber auch bei einigen Neuronen beobachtet.
3. Pränatal gleich bleibend geringe Expression mit postnataler Abnahme auf kaum noch nachweisbare Mengen.  
Dies trifft für die Lunge, Leber und Niere zu. Mit Hilfe der RT-PCR nachweisbare Mengen



Linie	Herkunft		mRNA	Neurofibromin	Literatur
HeLa	Zervixkarzinom	Mensch	+	+	DeClue et al. (1991); Suzuki et al. (1992)
NIH3T3	Embryo	Maus	+	+	DeClue et al. (1991); Johnson et al. (1994); Norton et al. (1996)
Rat-1A	Fibroblasten	Ratte	+	+	Metheny u. Skuse (1996)
PC12	Phäochromozytom	Ratte	+	+	Johnson et al. (1993; 1994); Wallace et al. (1990); Andersen et al. (1993 a)
SK-Mel-2, -3, -5 u.a.	Melanome	Mensch	+	+	Huynh et al. (1992); Johnson et al. (1993)
NB-90-5, -6, -7 u.a.	Neuroblastome	Mensch	+	+	Gutmann et al. (1993 b)
MT <sub>4</sub> H1	SV40-T-transformierte SZ	Ratte	+	+	
C <sub>2</sub> H <sub>12</sub> , BC <sub>3</sub> H1	Myoblasten	Maus	+	+	Gutmann et al. (1994 b)
K562	CML, Blastenkrise	Mensch	+	+	Nakai et al. (1994)
NF188-3; NF190-8	Neurofibrosarkom <sup>a</sup>	Mensch	+	+	Wallace et al. (1990); DeClue et al. (1992)
Lu-130, -134B, -139, u.a.	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Mensch	+		Koh et al. (1995)

<sup>a</sup> 2 von 3 Linien zeigten schwache Expression.

von NF1-mRNA oder aus Gewebeextrakten immunpräzipitierbares Neurofibromin könnten in dieser Kategorie von Lymphozyten, peripheren Nerven oder Gefäßen stammen.

Die fast ubiquitäre Expression des NF1-Gens wirft die Frage auf, wie das begrenzte Spektrum der bei NF1 entstehenden Tumoren zu erklären sei. Dieser scheinbare Gegensatz ist bei NF2 noch extremer ausgeprägt (s. Kapitel 5.4.5.3 „Expression des Merlins“). Das entsprechende Problem besteht bei vielen anderen Tumorsuppressorgenen. So wird Rb1 als ein universeller Zellzyklusregulator praktisch ubiquitär exprimiert, aber seine konstitutionelle heterozygote Defizienz prädisponiert im Wesentlichen zu Retinoblastomen und Osteosarkomen. Andererseits findet die universelle Funktion des Rb1 aber darin ihre Entsprechung, dass ein vollständiger somatischer Funktionsverlust in zahlreichen sporadischen Tumoren erfolgt, besonders beim kleinzelligen Lungen-, Mamma- und Blasenkarzinom. Auch das APC-Gen, dessen Mutationen der adenomatösen Polyposis coli zugrunde liegen, ist ubiquitär exprimiert, und sein Produkt ist in einen offenbar universellen Prozess der Proliferationsregulation involviert. Hierzu steht die Vielfalt der zusätzlichen Tumoren, für welche Keimbahnmutationen des APC-Gens prädisponieren, in einem günstigeren Verhältnis als bei NF1 und NF2. Zum Teil in Abhängigkeit vom Ort der Mutation im APC-Gen können zusätzlich zu den Kolonkarzinomen folgende Tumoren entstehen: Desmoidtumoren und mandibuläre Osteome beim allelischen

Gardner-Syndrom; Medulloblastome, Glioblastome und Ependymome bei der allelischen Form des Turcot-Syndroms (Hamilton et al. 1995); sowie Hepatoblastome und Tumoren der Thyreoidea.

Bei NF1 ist bezüglich der Diskrepanz zwischen ubiquitärer Expression und spezifischem Tumorspektrum zu bedenken, dass Neurofibromin in den Progenitorzellen (SZ) der typischen NF1-Tumoren hoch exprimiert ist. Wenn dies auf eine vorrangige Bedeutung des Neurofibromins (im Vergleich zu anderen GAP) als Regulator von Wachstum und/oder Differenzierung von SZ schließen lässt, ist eine hohe Empfindlichkeit dieser Zellen gegen die Verminderung der NF1-Gen-Dosis verständlich. Entsprechend könnte in anderen Zellen der Beitrag des Neurofibromins zum Gesamtinventar der Ras-GAP gering und unbedeutend sein, sodass die Verringerung seiner Konzentration auf 50% der Norm und seine vollständige Defizienz (infolge somatischer Zweitmutation) ohne phänotypisch nachweisbare Folgen bleiben. Die Zelltypspezifität der Tumorgenese bei NF1 trotz ubiquitärer Expression des Neurofibromins würde unter diesen Gesichtspunkten also aus der Relation von Expressionsmuster und Redundanz der Ras-GTPasen resultieren. Diskutiert wurden in diesem Zusammenhang auch die Möglichkeiten, dass Neurofibromin zur Entfaltung seiner Wirkungen neuralleistenspezifischer Interaktionspartner oder posttranslationaler Modifikationen bedarf.

### 5.2.3 Neurofibromin

Einige Charakteristika des Neurofibromins sind in Tabelle 5.14 zusammengefasst.

#### 5.2.3.1 Neurofibromin als Mitglied der Ras-GAP-Familie

Es ist allen Mitgliedern der Superfamilie kleiner, monomerer GTPasen gemeinsam, dass sie von Guaninnukleotid austauschfaktoren (GEF), den Katalysatoren der Beladung mit GTP, aktiviert und von GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) inaktiviert werden. Neurofibromin gehört zu den für die Subfamilie der Ras-Proteine spezifischen GAP (s. Abb. 5.2). Säuger verfügen über mindestens 5 verschiedene Ras-GAP; ihr gemeinsames Kennzeichen ist eine etwa 300–360 Aminosäuren lange funktionelle Domäne, welche mit unterschiedlicher Spezifität Ras-Proteine bindet und deren GTPase-Aktivität stimuliert. Aufgrund ihrer Funktion hat diese Domäne ganz allgemein die Bezeichnung „GAP-related domain“ (GRD) erhalten. In Abb. 5.3 ist die erstaunliche Verschiedenheit der Segmente erkennbar, welche bei den unterschiedlichen Molekülen die GRD flankieren. Vergleiche mit den Ras-GAP anderer Spezies (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*) ließen erkennen, dass die GAP der Säuger unterschiedlichen Familien angehören, innerhalb deren sich die Sequenzähnlichkeit über die GRD hinaus in die flankierenden Sequenzen erstreckt. Letztere sind oft mit bekannten Domänen für die Interaktion mit anderen Proteinen ausgestattet, und solche Interaktionspartner werden gegenwärtig in stetig

nelle Domäne, welche mit unterschiedlicher Spezifität Ras-Proteine bindet und deren GTPase-Aktivität stimuliert. Aufgrund ihrer Funktion hat diese Domäne ganz allgemein die Bezeichnung „GAP-related domain“ (GRD) erhalten. In Abb. 5.3 ist die erstaunliche Verschiedenheit der Segmente erkennbar, welche bei den unterschiedlichen Molekülen die GRD flankieren. Vergleiche mit den Ras-GAP anderer Spezies (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*) ließen erkennen, dass die GAP der Säuger unterschiedlichen Familien angehören, innerhalb deren sich die Sequenzähnlichkeit über die GRD hinaus in die flankierenden Sequenzen erstreckt. Letztere sind oft mit bekannten Domänen für die Interaktion mit anderen Proteinen ausgestattet, und solche Interaktionspartner werden gegenwärtig in stetig

Tabelle 5.14. Charakteristika des Neurofibromins

Charakteristika		
Länge	2818 AS, Spleißisoform I Translationsprodukte anderer alternativ gespleißter mRNA	+21 AS des Exons 23a, Spleißisoform II
MG		+18 AS des Exons 48a, Spleißisoform 3'-Alt +10 AS des Exons 9br, Spleißisoform 5'-Alt-2 319 KDa aufgrund der Aminosäurezusammensetzung 240–290 KDa in der Gelelektrophorese
Merkmale der Aminosäuresequenz	6 potenzielle PKA Phosphorylierungspositionen <sup>a</sup>	583KKLT586 815RRMS818 873RKG876 2036KRVS2039 2573RKVS2576 2810KRNS2813
Domänen	1 potenzielle Tyr-Phosphorylierungsposition <sup>a</sup> Das FLR-Tripeptid enthaltende Kennzeichen aller Ras-GAP <sup>a</sup>	2549PRVAETDY2556 1386SAMFLRFINPAIVSP1400
	Funktionelle Domäne (GRD: GAP-related domain) Minimale funktionelle Domäne „NF1–230“ Keine Transmembrandomäne	366 AS zwischen 1173 in Exon 21 und 1538 in Exon 27a 230 AS zwischen 1248 in Exon 22 und 1477 in Exon 26 Keine SH2-, SH3- und Pleckstrin-Domänen
Prominente Expression	Mutmaßliche 2. funktionelle Domäne; enthält 3-mal 2 gepaarte Cys (622/632, 673/680 und 714/721 in Exons 12b und 13) Gehirn Rückenmark Spinalganglien Nebenniere Nichtmyelinisierende Schwann-Zellen Oligodendrozyten Projektionsneuronen Fast ubiquitäre Expression in kleinen Mengen	Exons 11–17

Martin et al. (1990); Xu et al. (1990); DeClue et al. (1991); Gutmann et al. (1991); Marchuk et al. (1991); Huynh et al. (1992); Uchida et al. (1992); Golubic et al. (1992); Fahsold et al. (2000).

<sup>a</sup> Zählung der AS ohne Exon 23a.

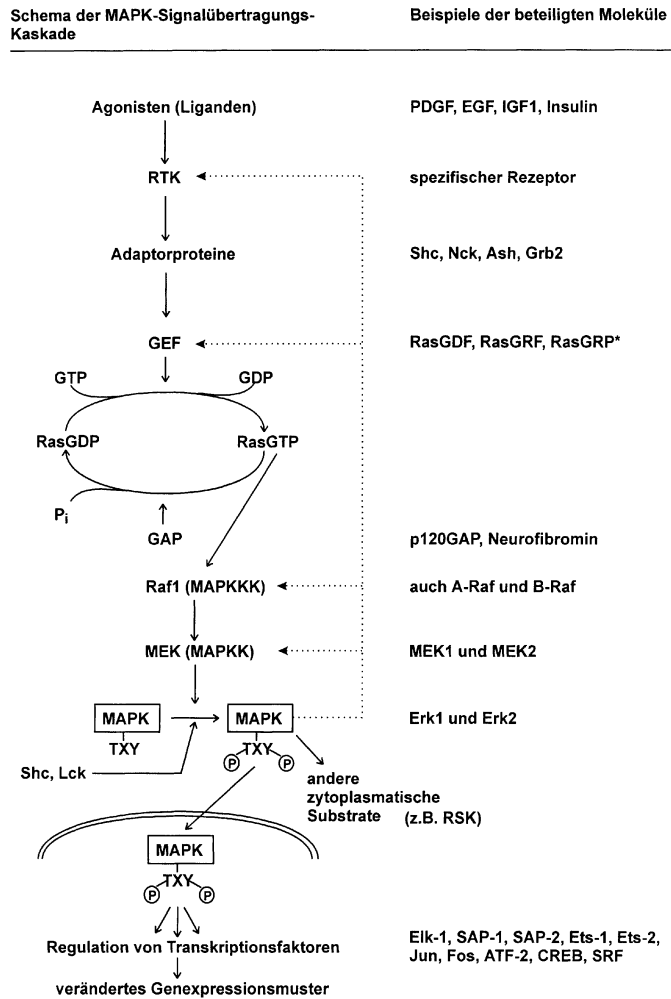


Abb. 5.2. Vereinfachtes Schema der durch aktivierte Rezeptortyrosinkinasen (RTK) ausgelösten und durch Ras vermittelten Signaltransduktion über die Raf-MEK-Erk-Kaskade, rechte Hälfte Bezeichnungen der beteiligten Moleküle, Ras-unabhängige Aktivierung von Raf und von MAPK durch Nichtrezeptortyrosinkinasen (Src, Lck) angedeutet. Punktirierte Linie: positive Rückkopplung durch Phosphorylierung übergeordneter Komponenten durch aktivierte MAPK, \*: zelltypspezifische Formen von Austauschfaktoren, nicht synonym mit GEF zu gebrauchen

wachsender Zahl entdeckt [Bourne et al. (1991); Ye et al. (1999); Feldmann et al. (1999) und in diesen Arbeiten zitierte Literatur].

Die Zugehörigkeit des Neurofibromins zur Familie der Ras-GTPase aktivierenden Proteine ergab sich aus Vergleichen seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz mit bekannten Sequenzen (Buchberg et al. 1990a; Xu et al. 1990a). Das einzige zu dieser Zeit bereits klonierte GAP der Säuger war das von Trahey u. McCormick (1987) entdeckte p120GAP. Innerhalb der GRD von Neurofibromin finden sich 25,8% Sequenzidentität und 48,7% Sequenzähnlichkeit zu p120GAP. Darüber hinaus besteht keine strukturelle Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Molekülen; sie gehören verschiedenen Subfamilien

an. Für Neurofibromin ist die Zugehörigkeit zu einer solchen Subfamilie belegt durch „DmNF1“ von *Drosophila melanogaster* mit seiner Sequenzidentität von 60% und durch die beiden „Inhibitoren von Ras“ der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), IRA1 und IRA2, die in einem etwa 1450 bp umfassenden Segment (Positionen 900–2350 im Neurofibromin), das die GRD einschließt, eine Sequenzähnlichkeit von mehr als 30% aufweisen. Die Neurofibromine aller untersuchten Vertebraten (*Fugu rubripes*, Maus, Ratte, Mensch) sowie von *Drosophila melanogaster* zeigen ein vergleichbar hohes Maß an Ähnlichkeit in dieser IRA-Homologieregion (Bernards et al. 1998; Kehrer-Sawatzki et al. 1998) (Abb. 5.3).

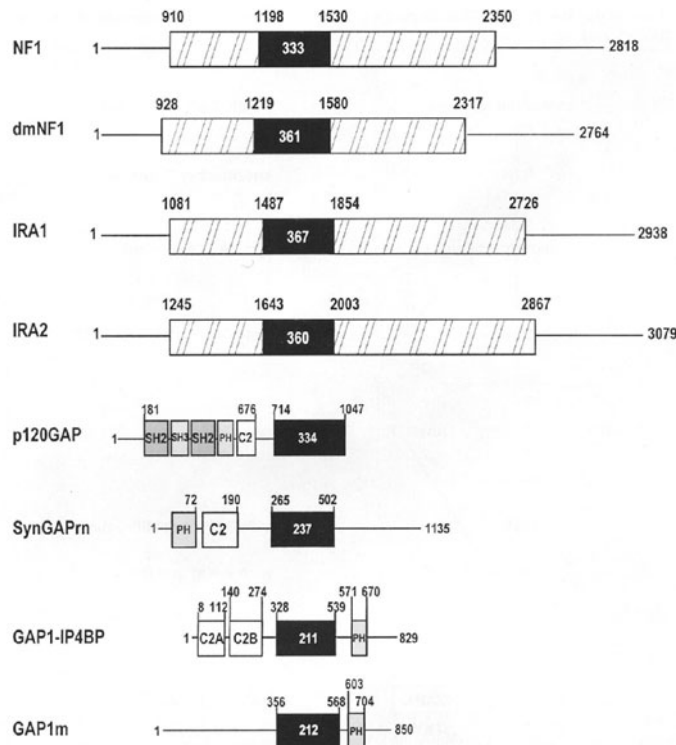


Abb. 5.3. Schematische Darstellung der Struktur von Ras-GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) vom NF1/IRA- und vom p120GAP-Typ. *NF1/IRA-Typ*: GRD-flankierende Segmente mit weitgehend unbekannter Funktion, *p120GAP-Typ*: multiple funktionelle Domänen zusätzlich zur GRD, *NF1* humanes Neurofibromin; *dmNF1* Drosophilaneurofibromin; *IRA1*, *IRA2* *Saccharomyces-cerevisiae*-Proteine *IRA1* und *IRA2*; *p120GAP* Mensch; *SynGAPPrn* SynGAP von *Rattus norvegicus*; *GAP1-IP4BP* humanes GAP für Ras und Rap, dessen Aktivität durch Inositol-1,2,4,5-Tetrakisphosphat stimuliert

wird. Es gehört zur GAPIII-Familie wie das humane GAP1m. *Schwarze Zahlen* Aminosäurepositionen, *schwarz unterlegte Regionen* GAP- bzw. GRD-Domänen (GAP related domain), *weiße Zahlen* Länge dieser Domänen, *schraffierte Regionen* Bereiche hoher Homologie zwischen *IRA1*, *IRA2*, dem humanen und dem Drosophilaneurofibromin außerhalb der GAP-Domäne, *SH2/SH3* Src-homologe Domänen; *PH* Pleckstrin-homologe Domäne; *C2A*  $Ca^{2+}$ -abhängige Phospholipidbindungsdomäne; *C2B*  $Ca^{2+}$ -unabhängige Phospholipidbindungsdomäne des Synaptotagmin II

Der Strukturähnlichkeit der GRD der IRA-Proteine, des p120GAP und des Neurofibromins entspricht erwartungsgemäß die funktionelle Homologie. Transfektion von *Saccharomyces-ira<sup>-</sup>*-Mutanten mit Vektoren, die entweder die cDNA des vollständigen p120GAP oder die seiner GRD enthalten, führt zur Komplementation dieser Mutationen (Ballester et al. 1990; Tanaka et al. 1990). Der *ira<sup>-</sup>*-Phänotyp der Hefe ist, ebenso wie der Phänotyp bei konstitutiv aktiviertem Ras (Mutante Ras2V19; entspricht beim Säuger der onkogenen Mutante RasV12), durch den Mangel an Speicherkohlenhydraten und durch Hitzeschockempfindlichkeit gekennzeichnet.

Die Expression der Neurofibromin-GRD in *ira<sup>-</sup>*-Mutanten hat auf diesen Phänotyp einen korrigierenden Effekt (Ballester et al. 1990; Martin et al. 1990). Die Autoren wiesen auch eine erhöhte Ras-GTPase-Aktivität in Extrakten aus Hefezellen, die H-Ras und die NF1-GRD bzw. p120GAP koexprimieren, nach. Wurde in solchen Versuchen nicht Wildtyp-Ras verwendet, sondern eine konstitutiv aktivierte (onkogene) Mutante wie RasV12, erwiesen sich sowohl p120GAP als auch die NF1-GRD erwartungsgemäß als unwirksam.

Die Tatsache, dass im Säugerorganismus mehrere GAP anzutreffen sind, wirft Fragen nach ihrem Expressionsspektrum während der Ontogenese

und im adulten Organismus, ihren Substratspezifitäten und ihrem jeweiligen Stellenwert bei der Aktivitätsregulation der Ras-Proteine auf. Die erschöpfende Kenntnis dieser Parameter wäre für die Beurteilung der Auswirkungen der Neurofibromindefizienz bei NF1 von Bedeutung. Die Koexpression von Neurofibromin und p120GAP im gleichen Gewebe oder der gleichen Zellsorte ist an verschiedenen Systemen nachgewiesen worden (Bollag u. McCormick 1991; DeClue et al. 1991), oft wurde jedoch lediglich der Anteil der Neurofibrominaktivität an der gesamten GAP-Aktivität bestimmt (Griesser et al. 1995). Selbst in den Fällen, bei denen die erwartete reziproke Beziehung zwischen Neurofibromin Spiegel und dem Anteil von Ras-GTP besteht, erscheint eine isolierte Betrachtung des Neurofibromins unangebracht. Martin et al. (1990) isolierten zum ersten Mal die Neurofibromin-GRD (NF1-GRD) als rekombinantes, mit einem immunogenen Epitop versehenes Protein und zeigten seine GAP-Aktivität *in vitro* mit N-Ras als Substrat. Die beiden rekombinanten Proteine NF1-GRD und p120GAP wurden auch für die Messung ihrer spezifischen Aktivitäten und ihrer Affinitäten zu N-Ras verwendet. Dabei zeigte p120GAP bei der verwendeten N-Ras-Konzentration eine mehr als 30fach höhere Aktivität, aber eine etwa 50-mal geringere Affinität zu diesem Substrat (Martin et al. 1990). Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse, wenn die katalytischen Domänen von p120GAP und Neurofibromin mit H-Ras als Substrat verglichen werden (Ahmadian et al. 1996):

p120GAP	$K_m = 9,7 \mu\text{M}$	$k_{\text{cat}} = 19 \text{ s}^{-1}$
Neurofibromin	$K_m = 0,3 \mu\text{M}$	$k_{\text{cat}} = 1,4 \text{ s}^{-1}$

Neurofibromin hat also eine 32-mal höhere Affinität zu H-Ras, erzielt aber eine 7,4-mal geringere Aktivität als p120GAP. Diese Unterschiede in den kinetischen Parametern deuten auf eine Beanspruchung der beiden negativen Regulatoren von Ras-Proteinen in verschiedenartigen physiologischen Situationen hin.

Für die Bestimmung der Ras-GAP-Aktivität *in vitro* stehen mehrere Methoden zur Verfügung. *In vitro* mit  $^{32}\text{P}$ -GTP beladenes rekombinantes Ras-Protein wird mit dem zu prüfenden Zellextrakt, der zu prüfenden Zellfraktion oder mit den reinen Proteinen (z. B. rekombinante GRD) inkubiert. Die zeitliche Abnahme der Radioaktivität ( $^{32}\text{P}$  release) in immunpräzipitiertem oder membrangebundenem Ras-Protein oder des dünnstschichtchromatografisch getrennten GTP ist ein Maß der Ras-GAP-

Aktivität. Dieser Trennung von GDP und GTP bedient sich auch die verbreitete Methode zur Bestimmung des Anteils GTP-beladenen Ras-Proteins in verschiedenen physiologischen Zuständen (Quotient Ras-GTP/Ras-GTP+Ras-GDP). Nach Markierung des gesamten Nukleotidpools einer Zellkultur mit  $^{32}\text{P}$ -Phosphat wird das Ras-Protein aus dem Zellextrakt immunpräzipitiert und die markierten Guaninnukleotide wie oben getrennt und der Bestimmung ihrer Markierung unterworfen. Klassische biochemische Methoden zur quantitativen Bestimmung der Ras-gebundenen Guaninnukleotide im Femtomolbereich verwendeten Scheele et al. (1995), indem sie die Nukleosiddiphosphatkinasereaktion und das Luciferin-Luciferase-System verwendeten. Für die Messung der Affinität von GAP zu ihren Ras-Substraten werden Letztere mit nicht hydrolysierbaren GTP-Analogen beladen (z. B. Guanylylimidodiphosphat).

Die beiden ubiquitär exprimierten Spleißisoformen des Neurofibromins Typ I und II unterscheiden sich durch die Insertion von 21 Aminosäuren in Position 1370 bei Typ II. Mit 6 Lysin- und 2 Glutaminsäureresten handelt es sich um ein polares Oligopeptid in einer weitgehend neutralen Umgebung. Es überrascht deshalb nicht, dass die katalytischen Eigenschaften der GRD durch diese Insertion verändert werden. Die Typ-II-GRD hat eine geringere GTPase aktivierende Wirkung auf H-Ras, aber eine höhere Affinität zu diesem Substrat als Typ I (Andersen et al. 1993b). Typ-II-Neurofibromin wäre also geeignet, bei niedriger Ras-Konzentration als Regulator der Ras-Aktivität zu dienen. Die Regulation dieses alternativen Spleißprozesses zugunsten der einen oder der anderen Form ist also vermutlich von funktioneller Bedeutung (s. Kapitel 5.2.2.4 „Transkriptionsprodukte“).

Bedeutsam sind auch die strukturellen Unterschiede zwischen p120GAP und Neurofibromin. Während die GRD mit 333 Aminosäuren nur 12% des Neurofibromins beansprucht und seinen ausgedehnten, die GRD flankierenden Abschnitten noch keine funktionelle Rolle zuerkannt werden konnte, nimmt die GRD des p120GAP das C-terminale Drittel des Moleküls ein, und die 2/3 zum N-Terminus hin beherbergen 5 funktionelle Domänen (s. Abb. 5.3). Proteine, die mit Letzteren in Wechselwirkung treten, sind identifiziert worden; sie heißen GAP-assoziierte Proteine und beziehen p120GAP in multifunktionaler Weise in Prozesse der Signaltransduktion ein (McGlade et al. 1993; Leblanc et al. 1998; Ye et al. 1999; Feldmann et al. 1999). Beim Neurofibromin weist lediglich die Häufung von Missense-Mutationen in einem N-ter-

minalen Abschnitt und dessen überdurchschnittliche phylogenetische Konservierung auf die Existenz einer zusätzlichen funktionell bedeutsamen Domäne hin (Kehrer-Sawatzki et al. 1998; Fahsold et al. 2000). Für die getrennte Erfassung der Aktivitäten von p120GAP und Neurofibromin hat sich die Anwendung des für Neurofibromin spezifischen Inhibitors *n*-Dodecylmaltosid als zweckdienlich erwiesen. Auch gegen die Phospholipide Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat und Phosphatidylsäure sowie gegen Arachidonsäure (Golubic et al. 1991) ist Neurofibromin empfindlicher als p120GAP (Bollag u. McCormick 1991). Diese Lipide gehören zu den Kleinmolekülen, deren intrazelluläre Konzentration nach Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen durch die zugehörigen Wachstumsfaktoren ansteigt. In einer Reihe von Extrakten aus Geweben und Zellkulturen fanden diese Autoren stets die Aktivitäten beider Enzyme mit Anteilen der Neurofibrominaktivität zwischen 0,57% (Xenopusoozyten) und 79% (PC12-Zellen). In primären Kulturen menschlicher Fibroblasten trägt Neurofibromin 15% zur gesamten GAP-Aktivität bei (Kobayashi et al. 1993), in epidermalen Melanozyten etwa 1/3 (Griesser et al. 1995).

**Intrazelluläre Lokalisation.** Bei der Erforschung der intrazellulären Lokalisation des Neurofibromins sind immunzytochemische Analysen von Zellfraktionierungsstudien zu unterscheiden, wenngleich sich beide immunologische Nachweise des Neurofibromins zunutze machen.

Einen elementaren Ansatz der Zellfraktionierung wandten DeClue et al. (1991) auf Homogenate von <sup>35</sup>S-markierten NIH3T3-Kulturen an. Der postnukleäre Überstand wurde durch Zentrifugation bei 100000 g in eine Partikelfraktion (P100) und einen Überstand (S100) getrennt. Der weitaus größte Teil des p120GAP fand sich im Überstand, während Neurofibromin annähernd vollständig mit der Partikelfraktion sedimentierte. Eine weitere schonende Zellfraktionierungsmethode ergab, dass ein wesentlicher Anteil des Neurofibromins in der P100-Fraktion offenbar als Komponente eines hochmolekularen Komplexes mit einem Protein mit einem Molekulargewicht (MG) von 400–500 KDa vorliegt (DeClue et al. 1991).

Ähnliche Verteilung von p120GAP und Neurofibromin im Zytosol bzw. in der Partikelfraktion beobachteten Hattori et al. (1992) an Homogenaten von Rinder- und Rattenhirn. Diese Autoren untermauerten ihre mit Immunoblots gewonnenen Ergebnisse durch GAP-Aktivitätsmessungen in den jeweiligen Fraktionen und fanden, dass in der Tri-

ton-X100-unlöslichen Fraktion aller anderen Gewebe, wenn überhaupt, weniger als 10% der in Gehirnextrakten gefundenen Neurofibrominaktivität nachzuweisen waren.

In der Haut des reifen Rattenfetus (E21) fanden Malhotra u. Ratner (1994) die höchste immunologisch nachweisbare Neurofibrominexpression in den Keratinozyten des Stratum spinosum, wo es an der Plasmamembran und in mutmaßlichen Transportvesikeln lokalisiert ist. Das Vorhandensein von NF1-mRNA in diesen Zellen belegt deren autochthone Neurofibrominsynthese; das Protein stammt also nicht aus den Melanozyten, die ihrerseits sowohl in der nicht betroffenen Haut als auch in CALF von NF1-Patienten Neurofibromin enthalten (Malhotra u. Ratner 1994; Griesser et al. 1995). Mit Hilfe der verwendeten immunelektronenmikroskopischen Methode sahen die Autoren kein Neurofibromin an der Kernmembran, in Mitochondrien oder in Assoziation mit dem Zytoskelett der Keratinozyten. Da die Ras-Proteinsubstrate des Neurofibromins in ihrem aktiven Zustand in der Plasmamembran verankert sind, ist eine Assoziation des Neurofibromins mit der Plasmamembran zu erwarten. Ein weiteres Beispiel hierfür sind B- und T-Lymphozyten der Maus, die neben einer diffusen zytoplasmatischen Neurofibrominfärbung einen membranständigen Anteil zeigen (Boyer et al. 1994). Beim antigeninduzierten Capping der B-Zell-Antigen-Rezeptoren werden das membranständige und das zytoplasmatische Neurofibromin im Sinn eines Kocapping mit dem Antigen-IgG-Komplex neu verteilt.

Die auffällige Konzentration des Neurofibromins in den Dendriten großer Projektionsneuronen konnten Nordlund et al. (1993) auf der ultrastrukturellen Ebene dem glatten endoplasmatischen Retikulum (sER) und vesikulotubulären Strukturen zuordnen. In Purkinje-Zellen des Rattenzerebellums zeigen besonders gestapelte Membranvesikel (Zisternen) hohe Neurofibrominimmunreaktivität. Zellkern, Kernmembran, Golgi-Apparat, Mitochondrien, raues ER und die Plasmamembran bleiben unmarkiert.

Eine immunzytochemische Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Neurofibromins in primären Mausembryofibroblasten und in 2 fibroblastoiden Zelllinien ergab eine perinukleäre zytoplasmatische Färbung in NIH3T3-Zellen und den primären Fibroblasten (Gregory et al. 1993). Außerordentlich kontrovers werden inzwischen frühere Beobachtungen über die Assoziation des Neurofibromins mit den Mikrotubuli diskutiert (Golubic et al. 1992; Bollag et al. 1993; Gregory et al. 1993;

Nordlund et al. 1993; Malhotra u. Ratner 1994; Roudebush et al. 1997). Im Gegensatz zu den anderen Autoren sahen Roudebush et al. (1997) eine Assoziation des Neurofibromins mit den Mitochondrien in verschiedenen Zellsystemen. Ob ein Teil der Widersprüche auf der bekannten Assoziation von Mitochondrien mit Mikrotubuli beruht, bleibt durch weitere Untersuchungen zu klären.

### 5.2.3.2 Struktur-Funktions-Beziehungen

Die Größe des Neurofibromins setzt der Erforschung von Struktur-Funktions-Beziehungen erhebliche Schwierigkeiten entgegen. Aus diesem Grund war bisher v.a. die GRD Gegenstand derartiger Analysen. Bisher sind 2 Wege beschrritten worden:

1. Identifizierung funktionell relevanter Segmente und Aminosäurepositionen anhand des Grads der phylogenetischen Konservierung,
2. Bestimmung von Funktionsparametern bei künstlichen und/oder natürlichen Mutationen, wobei Letztere im Prinzip auch die Erhebung von Korrelationen zwischen der Manifestationsform der Krankheit und dem Genotyp des Patienten ermöglichen sollten.

Analysen funktioneller Parameter an Mutanten des Neurofibromins *in vivo* (z.B. in transfizierten *Saccharomyces*-stämmen) oder *in vitro* (mit rekombinanten Proteinen) tragen unmittelbar zu unserem Verständnis der Pathogenese der NF1 bei und sollen deshalb in Kapitel 5.2.4.3 „Molekulare Pathologie“, Unterkapitel „Funktionsanalysen von NF1-Gen-Mutationen“, behandelt werden. Hier sei nur kurz auf die Einsichten eingegangen, die aus Vergleichen von Aminosäuresequenzen von Ras-GAP gewonnen wurden.

Bei solchen Vergleichen der GRD von menschlichem Neurofibromin mit p120GAP und den beiden IRA-Proteinen (ScNeurofibromine) fielen 17 Abschnitte auf, innerhalb deren höhere phylogenetische Konservierung besteht als in den übrigen Anteilen. Die 4 dieser Segmente, die eine besonders hohe Konservierung zeigen und die GRD charakterisieren, wurden als Blöcke 1–4 oder 1, 2, 3A und 3B bezeichnet (Abb. 5.4). Etwa 1/3 der relativ seltenen Missense-Mutationen des NF1-Gens betreffen die GRD, die nur 12,8% der kodierenden Sequenz beansprucht ( $\chi^2 = 18,5$ ;  $p < 0,01$ ). Von den 12 pathogenen Missense-Mutationen in der GRD betreffen 8 hoch konservierte Aminosäurepositionen innerhalb der Blöcke 1, 3A und 3B, obwohl diese Blöcke nur etwa 20% der Aminosäuren der

GRD enthalten. Die zuerst am Beispiel der instabilen Hämoglobine und später am Gerinnungsfaktor IX (Bottema et al. 1991) nachgewiesene positive Korrelation zwischen phylogenetischer Invarianz einer Aminosäureposition und der Wahrscheinlichkeit der klinischen Manifestation ihrer mutativen Veränderungen scheint also auch für Neurofibromin zu gelten. Es wäre interessant, die Manifestationsformen der GRD-Mutationen an invarianten Positionen mit denjenigen anderer Missense-Mutationen des NF1-Gens zu vergleichen. Die Koinzidenz der Häufung pathogener Missense-Mutationen in phylogenetisch konservierten Regionen führte Fahsold et al. (2000) auf die Spur einer mutmaßlichen 2. funktionellen Domäne des Neurofibromins im Bereich der Exons 11–17 (s. Kapitel 5.2.5 „Mutationen“). Dieser Abschnitt enthält die von Izawa et al. (1996) erstmalig beschriebene cysteinreiche Region, gekennzeichnet durch 3 Paare eng benachbarter Cysteinreste, eine Konfiguration, die einer bekannten ATP-Bindungsdomäne ähnelt. Darüber hinaus liegen dort 3 der 6 PKA-spezifischen Serin-Threonin-Phosphorylierungsmotive des Neurofibromins (Marchuk et al. 1991).

Für das Studium der strukturellen Voraussetzungen der GAP-Aktivität des Neurofibromins ist es von Interesse, zu ermitteln, auf welche Größe die Sequenz der GRD reduziert werden kann, ohne wesentlich an GAP-Aktivität und Ras-Affinität einzubüßen. Aufgrund der Homologie zu den IRA-Proteinen und zum DmNeurofibromin war die Länge der GRD des Neurofibromins auf 366 Aminosäuren veranschlagt worden. Gideon et al. (1992) klonierten ein proteolytisches Fragment von 333 Aminosäuren, das noch die volle GAP-Aktivität des Neurofibromins *in vitro* entfaltet und ira<sup>-</sup>-Mutanten zu komplementieren vermochte. Damit war die aktive vermeintliche Minimaldomäne des Neurofibromins auf die Größe derjenigen des p120GAP mit 334 Aminosäuren reduziert. Diese beiden Proteine mit den Kurzbezeichnungen NF1-333 und GAP-334 waren Gegenstand genauester kristallografischer Röntgenstrukturanalysen (Scheffzek et al. 1998), wobei einerseits der prinzipiell gleichartige Aufbau der beiden Domänen, andererseits aber auch aufschlussreiche Unterschiede im Detail zutage traten, welche die Verschiedenheit der Ras-Affinität und der spezifischen Ras-GAP-Aktivität verständlich machen. Darüber hinaus erlaubt das so gewonnene Strukturmodell der NF1-333 plausible Interpretationen der Auswirkungen von Missense-Mutationen und der Insertion der 21 Aminosäuren der Typ-II-Spleißvariante (Scheffzek et al. 1998).

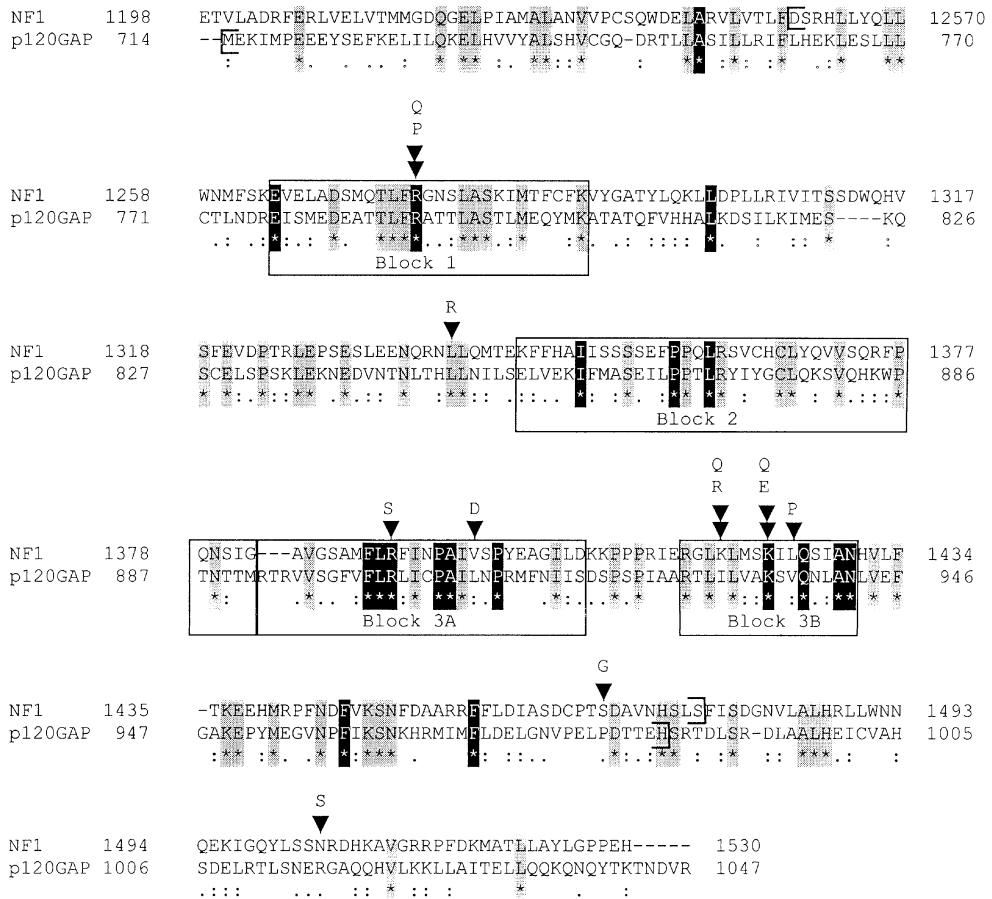


Abb. 5.4. Vergleich der Aminosäuresequenzen der GAP-Domänen von Neurofibromin und p120GAP. Eingerahmt die 4 Blöcke, innerhalb deren hohe Sequenzähnlichkeit zwischen den GRD von Neurofibromin, p120GAP, IRA1 und IRA2 besteht. Grau bzw. schwarz, Stern identische Aminosäuren; die schwarz unterlegten Positionen, von denen 15 in den homologen Sequenzblöcken liegen, sind auch bei dmGAP1, ceGAP

und rnGAP1m identisch, Doppelpunkte konservative Aminosäureaustausche, einfache Punkte semikonservative Aminosäureaustausche, schwarze Dreiecke die beobachtete und/oder künstlich erzeugte Missense-Mutationen, eckige Klammern jeweilige minimale funktionelle Domänen „NF1230“ und „GAP275“

NF1-333 und GAP-334 bestehen aus 14  $\alpha$ -Helices, welche durch unterschiedlich lange, z.T. frei bewegliche Schleifen miteinander verbunden sind. 3 N-terminale (1<sub>ex</sub>, 2<sub>ex</sub> und 3<sub>ex</sub>) und 3 C-terminale Helices (4<sub>ex</sub>, 5<sub>ex</sub> und 6<sub>ex</sub>) bilden mit Anteilen ihrer zugehörigen Verbindungsschleifen eine so genannte Extradomäne (NF1<sub>ex</sub>; GAP<sub>ex</sub>) mit erstaunlich ähnlicher dreidimensionaler Struktur trotz geringer Sequenzhomologie. Die beiden Teile der Extradomäne flankieren die 8 Helices der zentralen Domäne (NF1<sub>c</sub>, GAP<sub>c</sub>), welche die Ras-Bindungsfur-

che (Ras-binding groove) in Helices 6<sub>c</sub> und 7<sub>c</sub> und ihre zugehörigen Schleifen enthält.

NF1<sub>c</sub> ist identisch mit der auf 230 Aminosäuren reduzierten wirklichen Minimaldomäne des Neurofibromins mit Ras-GAP-Aktivität, die von Ahmadian et al. (1996) hinsichtlich ihrer strukturellen und biochemischen Eigenschaften charakterisiert wurde. Dieser Abschnitt (NF1-230) reicht von Asp1248-Phe1477; bei p120GAP entspricht dem das 273 Aminosäuren lange Segment (GAP-273) von Met714-His986 (Gamblin u. Smerdon 1998;



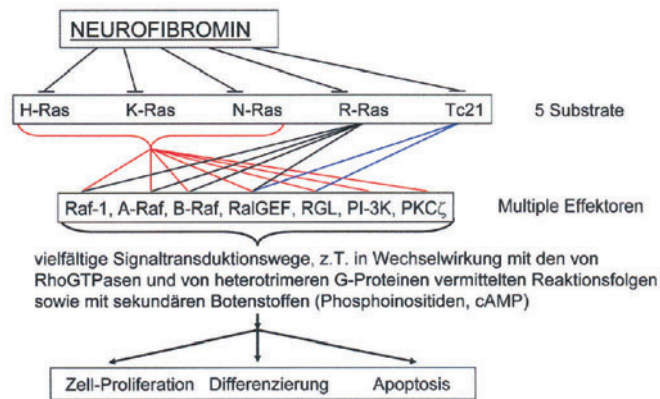


Abb. 5.5. Veranschaulichung der multiplen Wirkungsmöglichkeiten des Neurofibromins als negativer Regulator (-) von GTPasen der Ras-Subfamilie

Scheffzek et al. 1998). Die Ras-Bindungsfurche des Neurofibromins beansprucht die Aminosäuren 1381–1431. Anzahl und Verteilung polarer und neutraler Aminosäuren an den Ras-Kontakten unterscheiden sich von denen des homologen Abschnitts in GAP-334 in einem Sinn, der eine einleuchtende Interpretation der Aktivitäts- und Affinitätsunterschiede zwischen diesen Proteinen ermöglicht (Scheffzek et al. 1998).

Die röntgenkristallografische Strukturanalyse wurde nicht nur an den beschriebenen Domänen der Ras-GAP durchgeführt, sondern auch an ihren Komplexen mit einem Ras-Protein (Scheffzek et al. 1997). Das Ergebnis ist insofern überraschend, als die Stimulation der Ras-GTPase durch die GRD nicht oder nicht nur durch eine allosterische Veränderung des Ras-Proteins im Komplex mit dem GAP zustande kommt, sondern durch direkte Einwirkung eines Arginins des GAP, das Kontakt mit dem  $\gamma$ -Phosphat des Ras-gebundenen GTP aufnimmt. Dieses Arg nimmt eine exponierte Position in der Schleife zwischen Helices 1<sub>c</sub> und 2<sub>c</sub> ein, die als „Argininfinger“ bezeichnet wird, weil sie in die GTPase-Domäne des Ras-Proteins hineinragt. Der Arg-Finger liegt nicht in der Ras-Bindungsfurche. Bei diesem Ras-GTPase-Aktivierungsmechanismus bildet sich also das aktive Zentrum für die hydrolytische Reaktion aus Anteilen zweier verschiedener Proteine (Bourne 1997; Noel 1997). Im Neurofibromin nimmt das Arg des „Fingers“ die Position 1276 ein, bei p120GAP ist es Arg789; es handelt sich, wie erwartet, um eine der hoch konservierten Positionen. Das Kodon Arg1276 war wiederholt das Ziel von pathogenen Stoppmutationen und 2 verschiedenen Missense-Mutationen (R1276Q und R1276P). Es handelt sich nicht um das Arginin des ebenfalls invarianten FLR-PA-Motivs (die ersten 2

Aminosäuren im Zwischenraum sind stets unpolar), das im Neurofibromin die Positionen 1389–1396 einnimmt. Nach Scheffzek et al. (1998) übt dieses Arg eine stabilisierende Wirkung auf den Arg-Finger aus. Eine detailliertere Übersicht über die biochemischen Eigenschaften des Neurofibromins, in die auch Aspekte der molekularen Pathologie einbezogen sind, gaben Kim u. Tamanoi (1998).

In der Einleitung wurde darauf hingewiesen, dass nicht nur die „klassischen“ monomeren G-Proteine der Ras-Subfamilie, H-, K- und N-Ras, Substrate des Neurofibromins sind, sondern auch R-Ras und TC21/R-Ras2 (Abb. 5.5). Der Stellenwert des Neurofibromins für die Regulation der von diesen Molekülen vermittelten Wege der Signaltransduktion ist mit Hilfe der wenigen bisher bestimmten kinetischen Parameter kaum zu beurteilen. Dieser Frage mit der notwendigen Sorgfalt nachzugehen, war den Autoren im Rahmen dieser Übersicht nicht möglich. Es erscheint aber notwendig, auch an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass ein zutreffendes Bild der funktionellen Bedeutung des Neurofibromins nur gewonnen werden kann, wenn seine Wechselwirkung mit allen seinen Substraten und Regulatoren berücksichtigt wird.

Ähnliches gilt für die Einbeziehung der anderen Ras-GAP-Spezies in die Betrachtung. Wie eingangs erwähnt, ist der Beitrag des Neurofibromins zur Ras-Regulation im Zusammenhang mit dem der anderen Ras-GAP zu beurteilen, die in der jeweiligen Zellsorte exprimiert sind. Die Frage, ob Neurofibromin über seine Ras-GAP-Aktivität hinaus noch auf andere Weise in Ras-vermittelte Prozesse involviert ist oder sogar Ras-unabhängige Funktionen ausübt, wird in Kapitel 5.2.4.3 „Molekulare Pathologie“ aufgegriffen.

### 5.2.3.3 Regulation der NF1-Gen-Expression und der Neurofibrominaktivität

Das NF1-Gen liegt nicht in einer von geschlechtspezifischer Prägung (imprinting) betroffenen Region des menschlichen Genoms. Bei gesunden Heterozygoten für Sequenzpolymorphismen der kodierenden Region des NF1-Gens ist keine ungleiche Expression der allelischen mRNA-Kopien beobachtet worden. Die (G+C)-reiche Promotorregion beherbergt zahlreiche regulatorisch relevante Sequenzmotive, und auch weiter oberhalb sind Abschnitte gefunden worden, welche die Transkriptionsrate des NF1-Gens beeinflussen können [s. Kapitel 5.2.2.2 „Charakteristika des NF1-Gens“; Viskochil (1998)].

Über die Transfektionsexperimente mit geeigneten Konstrukten hinaus, mit deren Hilfe diese Sequenzen identifiziert wurden (Viskochil 1998), liegt wenig Information über ihre Bedeutung in vivo vor.

Im Hinblick auf die Größe des NF1-Gens sind per Transkriptionsregulation (Induktion, Repression) keine raschen Veränderungen der Menge an NF1-mRNA zu erwarten. Bei einer Transkriptionsgeschwindigkeit von 20–30 Nukleotiden/s dauert die Synthese eines primären NF1-Gentranskripts zwischen 3,1 und 4,65 h; die Translation der reifen NF1-mRNA nimmt mindestens 1,5 h in Anspruch. Wo rasche Veränderungen der Neurofibrominaktivität erforderlich sind, werden diese deshalb eher durch posttranslationale Mechanismen vermittelt. Nach bisherigen Befunden stehen der Zelle hierfür folgende Möglichkeiten zur Verfügung:

- die Regulation des Neurofibrominturnovers;
- die posttranslationale Modifikation, welche ihrerseits den Turnover beeinflussen kann, und
- die Aktivitätsregulation durch Interaktion mit anderen Molekülen wie Tubulin bzw. Lipiden.

Aus Folgendem geht hervor, dass die NF1-Gen-Expression auf unterschiedlichen Ebenen reguliert wird:

Da Ras-Proteine in Abhängigkeit von der Zellsorte entweder als Wachstums- oder als Differenzierungsstimulatoren wirken können (Hall 1993), ist es von Interesse, die Expression des Neurofibromins als eines ihrer negativen Regulatoren in Situationen induzierter Differenzierung zu prüfen. In den 3 etablierten Zelllinien

- Rat-1A,
- C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> und BC<sub>3</sub>H1 sowie
- MT<sub>4</sub>H1

ist die Neurofibrominsynthese offenbar positiv mit der Differenzierung korreliert.

Da der konfluente Zustand bei Fibroblasten mit erhöhter Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix einhergeht, kann der Übergang in die Konfluenz als Differenzierungsprozess betrachtet werden. Norton et al. (1996) verwendeten die fibroblastoide Linie Rat-1A, um zu prüfen, ob es während der Phasen des Zellzyklus zu Veränderungen der NF1-mRNA- und der Neurofibrominkonzentration kommt. Sie unterwarfen die Zellen einer Synchronisation durch Serumentzug im subkonfluenten Zustand. Nach Aufheben des Blocks durchliefen die Zellen den Zellzyklus ohne jegliche Veränderung der NF1-Gen-Expression auf RNA- und Proteinebene. Wurden die Zellen aber im konfluenten Zustand gehalten, stiegen NF1-mRNA und Neurofibromin innerhalb von 72 h auf das 3fache im Vergleich zu proliferierenden Zellen an.

Einen vergleichbaren parallelen Anstieg der beiden NF1-Gen-Produkte beobachteten Gutmann et al. (1994a) 2–3 Tage nach Auslösung der Muskelzellendifferenzierung durch Serumentzug in den Mausmyoblastenlinien C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> und BC<sub>3</sub>H1. Die Zunahme des Neurofibromins folgte dem früher einsetzenden Anstieg des als Differenzierungsmarker verwendeten nikotinischen Azetylcholinrezeptors. Die hohe Neurofibrominexpression war mit einer signifikanten Abnahme des N-Ras-GTP-Anteils verbunden und blieb im differenzierten Zustand der Zellen langfristig erhalten. Dies steht in einem auffälligen Gegensatz zu der geringen bis fehlenden Neurofibrominexpression in der adulten Skelettmuskulatur und im Herzmuskel (Daston et al. 1992).

Für entsprechende Untersuchungen an Schwann-Zellen bot sich die Linie MT<sub>4</sub>H1 an, die durch unphysiologisch hohe Konzentrationen von Forskolin oder cAMP zur Differenzierung gebracht werden kann. Hohe Zelldichte hat eine ähnliche Wirkung. Als Differenzierungsmarker verwendeten Gutmann et al. (1993b) das Myelinprotein P0 und Galaktozerebrosid. Die Induktion der SZ-Differenzierung war schon nach wenigen Stunden mit einem dramatischen Anstieg der NF1-mRNA verbunden, während Neurofibromin erst nach 24 h folgte und sein Maximum nach 72 h erreichte. Dies war das erste Beispiel für eine posttranskriptionale Regulation der Expression des NF1-Gens.

Es liegt nahe, anzunehmen, dass das CRE-Motiv im NF1-Gen-Promotor (s. Kapitel 5.2.2.2 „Charakteristika des NF1-Gens“) die Induktion der NF1-Gen-Transkription durch cAMP vermittelt. Da cAMP über die Phosphorylierung des Ras-Effektors Raf1 an Ser43 durch PKA die Ras-Raf1-Inter-

aktion hemmt (Cook u. McCormick 1993), scheint cAMP durch Stimulation der Neurofibrominsynthese eine dazu synergistische Wirkung auszuüben.

Im Gegensatz zu diesen 3 Beispielen positiver Korrelation zwischen Differenzierung und gesteigerter Neurofibrominexpression ist die durch  $\text{Ca}^{2+}$  induzierte Differenzierung von primären menschlichen Keratinozyten in der Kultur mit einer drastischen Verringerung der Neurofibrominkonzentration verbunden (Hermonen et al. 1995). Dagegen sahen diese Autoren bei immunzytochemischen Untersuchungen eine sehr geringe Neurofibrominmarkierung der Fibroblasten. In der unmittelbaren Umgebung von Schnittwunden jedoch steigt die Neurofibrominexpression in den Dermisfibroblasten signifikant an (Ylä-Outinen et al. 1998). Da der hohe Neurofibromingehalt im Narbengewebe für lange Zeit erhalten bleibt, kann er nicht ausschließlich eine Folge der Fibroblastenproliferation sein. Die Behandlung menschlicher Fibroblasten *in vitro* mit den Wachstumsfaktoren, die wesentlich an der Wundheilung beteiligt sind, PDGF und TGF- $\beta$ 1, führte schon bei geringen physiologischen Mengen der Faktoren zu einem starken Anstieg der NF1-mRNA-Konzentration, jedoch wurde dies nicht quantitativ mit Proliferationsparametern (Mitoseindex; BrdU-Markierung oder dergleichen) korreliert (Ylä-Outinen et al. 1998).

Die gemeinsame Proliferation von SZ und Fibroblasten während des Wachstums von Neurofibromin ist oft mit dem entsprechenden Geschehen bei der Waller-Degeneration verglichen worden. Wrabetz et al. (1995) wählten die nach Axotomie des Ischiasnervs der Ratte einsetzende Waller-Degeneration als Modellsystem für Untersuchungen des Verhaltens der NF1-mRNA und des Neurofibromins in SZ des distalen Stumpfs. Während die Reversion der SZ-Differenzierung an erwartungsgemäßen Veränderungen der P0-mRNA (Abnahme) und der mRNA des niedrig-affinen NGFR (Zunahme) zu erkennen war, veränderte sich der Spiegel der NF1-mRNA zwischen 1 und 24 Tagen nach Axotomie nicht. Weder der Zusammenbruch des genetischen Myelinisierungsprogramms noch die einsetzende SZ-Proliferation beeinflussten demnach den Anteil der NF1-mRNA an der Gesamt-RNA. Neurofibromin hingegen stieg parallel zur SZ-Proliferation am Tag 4 nach Axotomie an und war auch später noch deutlich gegenüber dem Spiegel im ruhenden Ischiasnerv erhöht. Dies ist ein 2. anschauliches Beispiel für die posttranskriptionale Regulation der Neurofibrominsynthese. Es spricht für die Relevanz dieser Beobachtungen,

dass der NF1-mRNA-Gehalt der SZ auch während der physiologischen postnatalen Myelinisierungsphase (P1–P5) konstant blieb.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Griesser et al. (1997) bei Messungen der NF1-mRNA-Konzentrationen und der Halbwertszeit des Neurofibromins in epidermalen Melanozyten. Wachstumsstimulatoren wie bFGF, Cholera toxin und PMA bewirkten eine signifikante Zunahme des Neurofibromins, hatten aber keinen Einfluss auf die NF1-mRNA-Konzentration. Der Anstieg des Neurofibromins konnte auf eine Verlängerung der Halbwertszeit des Neurofibromins von 25 h auf bis zu 80 h zurückgeführt werden (Griesser et al. 1997; Kaufmann et al. 1999a). Da die Hemmung des lysosomalen Abbaus mit Chlorochin in mehreren primären bzw. etablierten Zelllinien zu einer deutlichen Erhöhung des Neurofibromingehalts führt (Kaufmann et al. 1999a), scheinen die oben genannten Wachstumsstimulatoren zu verhindern, dass Neurofibromin dem lysosomalen Abbau anheim fällt. Dies könnte durch eine posttranslationale Modifikation des Neurofibromins geschehen. Tatsächlich korreliert ein höherer Phosphorylierungsgrad des Neurofibromins mit der verlängerten Halbwertszeit in PMA-behandelten Melanozyten (Kaufmann et al. 1999b). Entsprechend verhindern Inhibitoren von Proteinphosphatasen, wie Okadasäure oder Vanadat, die durch Abwesenheit von PMA verursachte Verkürzung der Neurofibrominhalbwertszeit (Kaufmann et al. 1999b).

Stabilisierung des Neurofibromins gegen proteolytischen Abbau wäre eine sinnvolle Funktion seiner von Izawa et al. (1994) *in vitro* und von Boyer et al. (1996) *in vivo* nachgewiesenen Phosphorylierung. Die ersteren Autoren zeigten, dass Neurofibromin durch PKA an Serin und Threonin phosphoryliert werden kann. Die 2. Arbeitsgruppe wies eine kurzlebige Phosphorylierung des Neurofibromins nach, die mit der Aktivierung des B-Zell-Antigen-Rezeptors *in vivo* einhergeht. Ob die Phosphorylierung des Neurofibromins über die Stimulation seines lysosomalen Abbaus hinaus weitere Wirkungen auf seine funktionellen Eigenschaften ausübt, ist nicht bekannt. Es sei darauf hingewiesen, dass die Phosphorylierung des p120GAP nach RTK-Aktivierung zu seiner Inaktivierung führt, eine zur RTK-vermittelten Ras-Aktivierung offensichtlich synergistische Reaktion. Es ist denkbar, dass Neurofibromin neben der Phosphorylierung noch anderen posttranslationalen Modifikationen unterworfen ist.

**Aktivitätsregulation durch Kleinmoleküle.** Die schnellsten Veränderungen der Neurofibrominaktivität sind vermutlich auf dem Weg der Regulation durch Kleinmoleküle zu verwirklichen. Wegen ihrer mitogenen Wirkung wurden in erster Linie bestimmte Lipidmetaboliten in Betracht gezogen. Es wurde dabei an die frühe Beobachtung von Yu et al. (1988) angeknüpft, dass die wachstumsstimulierende Wirkung dieser Verbindungen von der Ras-Aktivität abhängig ist. Hemmung von Ras durch den neutralisierenden Antikörper Y13-259 verhindert den mitogenen Effekt z. B. von Phosphatidsäure (PA). Daraus wurde gefolgert, dass entgegen früheren Vermutungen, wonach diese Lipidmoleküle von Ras-kontrollierten Phospholipasen gebildet werden würden, die Lipide ihrerseits die Ras-Aktivität stimulieren. Es lag nahe anzunehmen, dass dies durch Hemmung Ras-GTPase stimulierender Enzyme, also der negativen Regulatoren von Ras, geschehen könnte. Es wird vermutet, dass an der Grenzfläche der substrathaltigen Plasmamembran und des Zytoplasmas genügend hohe lokale Konzentrationen von Arachidonat und anderen Lipidmetaboliten entstehen können, um die im Folgenden zusammengefassten Wirkungen auf Neurofibromin und p120GAP zu gewährleisten. Obwohl die verschiedenen Autoren unterschiedliche Methoden angewendet haben, um den Einfluss von

Lipiden auf die GAP-Aktivitäten von Neurofibromin, p120GAP und ihren jeweiligen katalytischen Domänen zu bestimmen, wurden die Ergebnisse in Tabelle 5.15 zu einer Übersicht zusammengefasst.

Aus Tabelle 5.15 ist zu entnehmen, dass Neurofibromin und seine GRD gegen Arachidonsäure empfindlicher sind als p120GAP und dessen katalytische Domäne. Phosphatidsäure erwies sich bei beiden Molekülen gegenüber als unwirksam oder schwach inhibitorisch, wobei eine nicht erklärliche Diskrepanz zwischen den Daten von Bollag u. McCormick (1991) und denen von Golubic et al. (1991) hinsichtlich der NF1-GRD besteht. Ein weiterer wirksamer Inhibitor beider GAP ist PIP<sub>2</sub>, die Vorstufe der beiden sekundären Botenstoffe DAG und IP<sub>3</sub>. Keine inhibitorische Wirkung auf p120GAP und Neurofibromin üben die folgenden Lipide aus: DAG (mit unterschiedlichen Fettsäureresten), Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und eine Reihe anderer freier Fettsäuren (Tsai et al. 1989; Bollag u. McCormick 1991). Hinsichtlich der Regulation der Bildung dieser sekundären Lipidbotenstoffe sei auf die Übersicht von Han et al. (1991) verwiesen.

Bei allen beschriebenen Untersuchungen wurde eine Wirkung der verschiedenen Substanzen auf die Ras-Bindungsaffinität und auf die GDP-GTP-

Tabelle 5.15. Hemmung von Neurofibromin und p120GAP durch Phospholipide und Arachidonsäure

Lipide	Konzentration [µM]	Hemmung der Aktivität [%]			
		Neurofibromin		p120GAP	
		Ganzes Molekül	GRD	Ganzes Molekül	Katalytische Domäne
AA	16		100 <sup>a</sup>		ca. 75 <sup>a</sup>
AA	ca. 20	100 <sup>b</sup>		10 <sup>c</sup>	
AA	65		ca. 90 <sup>c</sup>		
AA	100		ca. 95 <sup>c</sup>	ca. 14 <sup>c</sup>	
AA	164			(88) <sup>d</sup>	
AA	328	100 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>		100 <sup>a</sup>
AA	1000		100 <sup>c</sup>	ca. 95 <sup>c</sup>	
PA(A,S)	65		ca. 95 <sup>c</sup>		
PA(A,S)	138	0 <sup>b</sup>	ca. 6 <sup>a</sup>	(100) <sup>d</sup>	12 <sup>a</sup>
PI(A,S)	113			(100) <sup>d</sup>	
PIP(A,S)	103			(100) <sup>d</sup>	
PIP <sub>2</sub> (A,S)	65		ca. 98 <sup>c</sup>	(100) <sup>d</sup>	
PIP <sub>2</sub> (A,S)	95		100 <sup>c</sup>		

AA Arachidonsäure; PA Phosphatidsäure; PI Phosphatidylinositol; PIP Phosphatidylinositol-4-Phosphat; PIP<sub>2</sub> Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat. Zusatz (A,S) mit Arachidonsäure in der β-, Stearinsäure in der γ-Position, *ungefähr* Daten aus Diagrammen abgelesen; keine genaueren Angaben der Autoren.

<sup>a</sup> Golubic et al. (1991).

<sup>b</sup> Golubic et al. (1992).

<sup>c</sup> Bollag u. McCormick (1991).

<sup>d</sup> Tsai et al. (1989). Die von Tsai et al. (1989) erhobenen Befunde wurden in Klammern gesetzt, weil nur die GAP-Aktivität von Zellextrakten (NIH3T3) gemessen wurde, deren größerer Anteil erfahrungsgemäß jedoch auf p120GAP beruht.

Dissoziation ausgeschlossen. Es handelt sich also um Hemmung bzw. Stimulation der Ras-GTPase aktivierenden Reaktion.

## 5.2.4 Mechanismen der Pathogenese bei NF1

### 5.2.4.1 Formale Aspekte des Tumorsuppressorparadigmas

Die Vorstellung, dass Tumorzellen in Folge einer Imbalance zwischen positiven und negativen Wachstumsregulatoren entstehen, geht auf Theodor Boveri (1914) zurück. Ein Mangel oder eine Inaktivierung negativer und/oder ein Überschuss bzw. eine unphysiologische Aktivierung positiver Wachstumsregulatoren tragen, diesem Gedanken entsprechend, entscheidend zur Umwandlung normaler in transformierte Zellen bei und vermögen den vielstufigen Prozess der Tumorgenese einzuleiten. Für den Fall einer defekten negativen Regulation der Zellproliferation wurde diese Hypothese zum ersten Mal am Beispiel des Retinoblastoms epidemiologisch (Knudson 1971) und experimentell (Cavenee et al. 1983) bestätigt. Das Retinoblastomgen (RB1) auf Chromosom 13q14.3 wurde so zum Prototyp eines Tumorsuppressorgens (TSG). In der Folgezeit hat sich das TSG-Paradigma als Leitlinie für die Erforschung vieler hereditärer Tumorkrankheiten mit autosomal-dominantem Erbgang bewährt. Es dient als formales Modell, das auf eine Vielfalt unterschiedlicher molekularer Mechanismen zutrifft. In seiner heutigen Gestalt erlaubt das TSG-Modell die folgenden Voraussagen:

- Dominante Vererbung eines erhöhten Risikos, an einer oder mehreren Arten von Tumoren zu erkranken, welche auch sporadisch vorkommen. Die Patienten aus betroffenen Familien, in welchen die Krankheit seit 2 oder mehreren Generationen segregiert, sind konstitutionell heterozygot für ein Defektallel, das sie vom betroffenen Elter geerbt haben. Patienten mit gesunden Eltern haben eine Neumutation geerbt, die sich in der Keimbahn eines Elters ereignete.
- Der Funktionsverlust beider Allele eines TSG – durch welchen Mechanismus auch immer – ist Voraussetzung für die Entstehung von Progenitorzellen der Tumoren. Homozygot defiziente Zellen entstehen bei heterozygoten Patienten durch den somatischen Funktionsverlust des Wildtypallels, der mit einer (um den Faktor der reziproken somatischen Mutationsrate) höheren Wahrscheinlichkeit auftritt als bei Homozygoten für das Wildtypallel. Bei letzteren sind 2 Mutati-

onsereignisse an dem betreffenden TSG-Locus notwendig, um die homozygote Defizienz herbeizuführen (2-Treffer-Theorie). Auf zellulärer Ebene sind also TSG-Defekte in der Regel rezessiv. Bei bestimmten Mutationsereignissen (große Deletionen, Nondisjunction) bzw. bei somatischer Rekombination ist der Verlust des Wildtypallels in den Tumorzellen oft als Heterozygotieverlust (loss of heterozygosity: LOH) anhand des Genotyps flankierender oder intragener polymorpher Marker nachweisbar.

- Das Erkrankungsalter ist gegenüber dem der spontanen nichthereditären Fälle wesentlich verringert. Die Tumoren treten multifokal, ggf. bilateral auf, während sie bei der sporadischen Erkrankung, sofern sie nicht auf einer Keimbahnneumutation beruht, unifokal bzw. unilateral entstehen. Natürlich gibt es auch bei hereditärer Disposition (Keimbahnmutation) Fälle mit einer Minimalmanifestation im Sinn einer singulären, unilateralen Tumorbildung. Diese repräsentieren entweder das untere Ende der allelischen Variabilität oder lassen auf den Einfluss genetischer und/oder nichtgenetischer Modifikatoren schließen, deren Natur in der Regel noch unbekannt ist.
- Der transformierte zelluläre Phänotyp kann durch Transfektion und Expression des Wildtypallels des jeweiligen TSG zumindest partiell korrigiert werden (experimentum crucis).

Im Folgenden soll näher betrachtet werden, ob und in welcher Weise das NF1-Gen diese Voraussetzungen erfüllt. Wie in Kapitel 5.2.2.1 „Formalgenetik“ beschrieben, segregiert in NF1-Familien das erhöhte Risiko, an bestimmten Tumoren zu erkranken, entsprechend einem autosomal-dominanten Vererbungsmodus mit hoher Penetranz. In Kapitel 5.2.1 „Krankheitsbild“ wurde das Spektrum der Tumoren beschrieben, die für das Krankheitsbild der NF1 charakteristisch sind, bzw. für deren Entstehung bei NF1 ein erhöhtes Risiko besteht. Gegenstand der nun folgenden 3 Abschnitte ist die Frage, ob die Entstehung dieser Tumoren im Sinn des Tumorsuppressorparadigmas verstanden werden kann.

#### *LOH-, Klonalitätsuntersuchungen und Mutationsanalysen bei NF1-assoziierten Tumoren von NF1-Patienten*

**Neurofibrome.** Wie in Kapitel 5.2.1.2 „Kardinalsymptome“ dargelegt wurde, haben die 3 Hauptgruppen dieser benignen Tumoren,

- dermale,
- noduläre und
- plexiforme Neurofibrome,

eine ausgeprägte Heterogenität ihrer zellulären Zusammensetzung gemeinsam. Die Schwann-Zellen, die als die Progenitorzellen der Neurofibrome gelten, stellen jeweils nur einen Anteil der Zellpopulationen dieser Tumoren. Es nimmt deshalb nicht Wunder, wenn in mehreren frühen Studien, in denen allerdings vorwiegend extragene Marker verwendet wurden, kein LOH in der NF1-Gen-Region in Neurofibromen gefunden werden konnte (Lothe et al. 1995; Menon et al. 1990; Skuse et al. 1989, 1991; Stark et al. 1992). Auch die Expression beider Allele des Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Polymorphismus in Neurofibromen von G6PD-A/B-heterozygoten Frauen (Fialkow et al. 1971) lässt sich ebenso im Sinn eines multizellulären Ursprungs der Tumoren deuten wie als Folge ihrer zellulären Heterogenität. Diese Situation veränderte sich durch die Einführung verbesserter Nachweismethoden und durch die Verwendung einer breiteren Palette intragener Marker. Ebenfalls unter dem Eindruck der Zusammensetzung der Neurofibrome aus unterschiedlichen Zellarten wurde das Kriterium des Nachweises von LOH dahingehend abgeschwächt, dass bereits eine signifikante Abweichung des Allelverhältnisses von 1:1 als Zeichen für LOH gewertet werden durfte. So gelang es, sowohl bei dermalen, als auch bei plexiformen Neurofibromen LOH des NF1-Gens nachzuweisen (Tabelle 5.16).

LOH zeigt den Verlust des Wildtypallels an. Durch Verwendung einer ganzen Serie intragener und flankierender Marker können die etwaige Ausdehnung einer Deletion abgeschätzt oder der Verlust des ganzen Chromosoms wahrscheinlich gemacht werden. Der Funktionsverlust des Wildtypallels durch Kleinmutationen wird auf dieser Ebene in

der Regel nicht erfasst. Der Nachweis einer solchen Kleinmutation als somatisches Zweitereignis gelang erstmalig Sawada et al. (1996) in einem Neurofibrom eines NF1-Patienten, dessen konstitutionelle Mutation das gesamte NF1-Gen deletiert hatte; im verbleibenden Allel fanden diese Autoren eine Deletion von 4 bp im Exon 4b. Auch Eisenbarth et al. (2000 a) und John et al. (2000) konnten zeigen, dass Kleinmutationen im NF1-Gen als somatische Zweitereignisse auftreten. Durch getrennte Kultur der Schwann-Zellen und der fibroblastenartigen Zellen eines Neurofibroms gelang es Kluwe et al. (1999 a), zu zeigen, dass nur die Schwann-Zellen LOH am NF1-Gen erlitten hatten. Mit diesem Befund scheint sich die alte These zu bewahren, dass Schwann-Zellen die Progenitorzellen der Neurofibrome sind. Dies fand Bestätigung in einer aspektreichen Arbeit von Rutkowski et al. (2000), die das vollständige Fehlen von NF1-mRNA in S100-positiven SZ aus dermalen Neurofibromen zweier NF1-Patienten bewiesen, die heterozygot für jeweils eine Totaldeletion des NF1-Gens waren.

Da davon ausgegangen werden kann, dass das mutative Zweitereignis in der Subpopulation der potenziellen Progenitorzellen in der Regel nur 1-mal vorkommt, sollten in den meisten Neurofibromen monoklonale Zellpopulationen nachweisbar sein. Diese Erwartung wurde durch die Analyse des X-Inaktivierungsmusters mit Hilfe eines RFLP im Phosphoglyzeratkinasegen und methylierungssensitiver HpaII-Spaltung an Neurofibromen von informativen NF1-Patientinnen bestätigt (Skuse et al. 1991). Den entsprechenden Nachweis der Klonalität der Tumorzellen führten Däschner et al. (1997) an einem plexiformen Neurofibrom mit LOH im NF1-Gen und bei 3 von 7 dermalen Neu-

Tabelle 5.16. LOH in Neurofibromen von NF1-Patienten

Autoren	Anzahl			
	Analytierte Neurofibrome (Patienten)	Plexiforme/dermale Neurofibrome	Tumoren mit LOH [%]	Analytierter Marker (intrageneis)
Colman et al. (1995)	22(5)	-/22	8(36,4)	24(12)
Däschner et al. (1997)	38(26) <sup>a</sup>	5/31	1(3,2) <sup>b</sup>	5(4)
Serra et al. (1997)	60(17)	?	15(25)	11(5)
Rasmussen et al. (1997)	14(7)	14/-	7(50) <sup>b</sup>	10(10)
Kluwe et al. (1999 a,b)	14(10)	14/-	8(57) <sup>b</sup>	4(4)
Eisenbarth et al. (2000 a)	7(4)	1/6	2(28,6) <sup>c</sup>	9(7)
John et al. (2000)	77(40)	3/74	10(13)	13(8)
Gesamt	232(109)	37/133	51(22)	

<sup>a</sup> Ein spinale Neurofibrom und ein Neurofibrom des Plexus brachialis wurden in diese Studie einbezogen.

<sup>b</sup> Plexiforme Tumoren.

<sup>c</sup> Ein Tumor mit LOH war ein plexiformes Neurofibrom.

rofibrinen von 7 informativen NF1-Patientinnen unter Verwendung des polymorphen (CAG)-Repeats im X-chromosomalen Androgenrezeptorgen.

**Optikusgliome.** Da diese Tumoren nur selten exziiert werden, liegen keine umfangreichen Studien über LOH-Analysen vor. Unter den untersuchten 30 benignen Tumoren von NF1-Patienten, die Menon et al. (1990) mit 11 polymorphen Markern des Chromosoms 17 untersuchten, waren auch 3 Optikusgliome, die keinen LOH erkennen ließen. Da jedoch kein intragener Marker verwendet wurde und die analysierte Stichprobe sehr klein war, bleibt die Frage, ob der Verlust des NF1-Gens ursächlich an der Entstehung dieser pilozytischen Astrozytome beteiligt ist, unbeantwortet. Der Nachweis von LOH in der NF1-Gen-Region bei einem pilozytischen Astrozytom im Hypothalamus eines NF1-Patienten (von Deimling et al. 1993) ermutigt jedoch zu weiteren Studien an Optikusgliomen.

**Phäochromozytome.** Hinweise darauf, dass der Verlust des NF1-Gen-Produkts zur Tumorgenese bei Phäochromozytomen beiträgt, gaben die Untersuchungen von Xu et al. (1992b), die in 7 solchen Tumoren von 6 NF1-Patienten LOH mit einem intragenen Marker und verschiedenen anderen Markern auf Chromosom 17 fanden. Die relativ große Zahl der verwendeten Marker und ihre Verteilung auf Chromosom 17 ließen in 5 dieser Tumoren auf den Verlust eines ganzen Chromosoms 17 schließen. In einem der Phäochromozytome war der Verlust auf 17q, in einem anderen auf die NF1-Gen-Region beschränkt. Die Untersuchung der elterlichen Genotypen erlaubte es in 3 Fällen, die im Tumor verbleibenden Allele des Chromosoms 17 als diejenigen zu identifizieren, die vom betroffenen Elter stammten und somit das Chromosom

17 mit der Keimbahnmutation kennzeichneten. Auch Gutmann et al. (1994b) wiesen in einem Phäochromozytom und einem adrenokortikalen Tumor LOH des NF1-Gens nach.

**Maligne Tumoren des ZNS und der peripheren Nervencheiden (MPNST).** Bei malignen Tumoren hat der Funktionsverlust eines einzelnen Tumorsuppressorgens einen anderen Stellenwert als bei benignen, da maligne Tumoren über eine mehrstufige Folge von genetischen Veränderungen entstehen, die in der Regel sowohl eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen als auch eine Aktivierung von Protoonkogen umfasst. Auf die Bedeutung des jeweiligen Tumorsuppressorgens für die Tumoringenese weisen lediglich die erhöhte Häufigkeit der einschlägigen Art maligner Tumoren bei bestehender genetischer Prädisposition (konstitutionelle Heterozygotie am TSG-Locus) und die Beziehung des Tumors zum Herkunftsgewebe hin. Dies schließt aber nicht aus, dass somatische Mutationsereignisse an anderen relevanten Genloci größere Bedeutung für die maligne Transformation gewinnen (s. unten), unabhängig davon, ob am betroffenen Keimbahn-TSG-Locus ein homozygoter Funktionsverlust eingetreten ist.

An 35 malignen Tumoren von NF1-Patienten wurden bisher Untersuchungen zu Allelverlusten verschiedener polymorpher Marker auf Chromosom 17 durchgeführt (Tabelle 5.17). Dabei wurde in 6 Fällen auch LOH intragener Marker nachgewiesen. Die erste tumorspezifische Mutation im NF1-Gen eines Neurofibrosarkoms wiesen Legius et al. (1993) bei einem Patienten mit unbekannter konstitutioneller Mutation nach. Feldkamp et al. (1996) fanden auf RNA- und auf Proteinebene den vollständigen Verlust der Expression des NF1-Gens in einem Neurofibrosarkom, dessen Konzentration

**Tabelle 5.17.** LOH-Untersuchungen bei MPNST (malignant peripheral nerve sheath tumor) und malignen Gehirntumoren von NF1-Patienten

Autoren	Tumoren	Anzahl informativer analysierter Marker auf Chromosom 17 (intrageneisch)	Anzahl der Tumoren mit LOH (intrageneisch)
Skuse et al. (1989)	7 Neurofibrosarkome 1 malignes Schwannom 1 Astrozytom	5	3 1 1
Glover et al. (1991)	8 Neurofibrosarkome 1 Glioblastoma multiforme	13 (1)	2 (2) <sup>a</sup> 1
Menon et al. (1990)	6 Neurofibrosarkome	12	5
Xu et al. (1992)	5 Neurofibrosarkome	14 (1)	3 (1)
Lothe et al. (1993, 1995)	6 MPNST	9 (2)	3 (3)

<sup>a</sup> In einem Fall aus LOH beidseitig flankierender Marker geschlossen.

an aktiviertem, GTP-beladenem Ras auf das 15Fache der Norm erhöht war. Damit bestätigten sich entsprechende Befunde über erhöhte Ras-GTP-Konzentrationen in 3 Zelllinien aus malignen MPNST (DeClue et al. 1992; Basu et al. 1992). Das NF1-Gen verhält sich also in diesen malignen Neoplasien und in davon abgeleiteten Zelllinien wie ein Tumorsuppressorgen.

Es muss jedoch angenommen werden, dass zusätzlich zu der homozygoten NF1-Defizienz Mutationen anderer Gene zur Entstehung und Progression der malignen Tumoren bei NF1 beitragen, da auch Allelverluste auf den Chromosomen 1, 2, 7 und 22 (Menon et al. 1990) und multiple Chromosomenveränderungen insbesondere bei Neurofibrosarkomen (Glover et al. 1991; Decker et al. 1990; Jhanwar et al. 1994; Rao et al. 1996; Lothe et al. 1996) nachgewiesen wurden. Über die Rolle des NF1-Gens bei der Entstehung des Rhabdomyosarkoms, für das bei NF1 im Kindesalter ein erhöhtes Risiko besteht (Matsui et al. 1993; Yang et al. 1995), liegen noch keine LOH- oder Mutationsuntersuchungen vor. Das gilt auch für die duodenalen Karzinoidtumoren.

**Myeloide Leukämien.** Das Spektrum der Leukämien im Kindesalter ist bei NF1 deutlich in Richtung der myeloischen Neoplasien verschoben. Kinder mit NF1 haben ein 200- bis 500fach erhöhtes Risiko, an juveniler myelo-monozytischer Leukämie (JMML) oder akuter myeloischer Leukämie (AML) oder an Monosomie-7-Syndrom zu erkranken.

Molekulargenetische und biochemische Studien haben gerade an diesen malignen myeloproliferativen Krankheiten die Hypothese bestätigt, dass das Proteinprodukt des NF1-Gens Neurofibromin in unreifen Zellen der myeloiden Reihe als ein negativer Regulator der Ras-Protoonkogene und somit als Tumorsuppressor wirkt. Die Ergebnisse der LOH-Studien am Knochenmark betroffener Kinder entsprachen denen, die sich bei einem Teil der malignen soliden Tumoren ergeben hatten. So konnte z. B. bei 9 familiären von 22 Fällen der Verlust des Wildtypallels und der Verbleib des vom betroffenen Elternteil geerbten Allels in den Tumorzellen nachgewiesen werden (Shannon et al. 1994; Miles et al. 1996). Side et al. (1997) gelang es, bei 8 von 18 NF1-Patienten mit verschiedenen Proliferationsstörungen der myeloischen Reihe im Knochenmark 2 direkte und 6 indirekte Stoppmutationen des NF1-Gens zu identifizieren und bei 5 dieser Punktate das Fehlen des Wildtypallels nachzuweisen (die 3 zitierten Arbeiten entstammen derselben Arbeitsgruppe; es handelt sich um überlap-

pende Stichproben). Dies sind überzeugende Belege dafür, dass das NF1-Gen bei der Entstehung der myeloproliferativen Neoplasien jugendlicher NF1-Patienten die Rolle eines TSG spielt.

**Somatische Mutationen des NF1-Gens in NF1-assoziierten Tumoren von Patienten, die nicht an NF1 erkrankt sind.** Gibt es alternative molekulare Mechanismen der Entstehung der mit NF1 assoziierten Tumoren? Mit anderen Worten: Ist der Funktionsverlust des NF1-Gens auch dann maßgeblich an der Entstehung dieser Tumoren beteiligt, wenn keine konstitutionelle NF1-Gen-Mutation als Ausgangsbasis vorliegt? Die Antwort auf diese Frage ist für unser Verständnis der Molekularbiologie dieser Tumoren von Bedeutung. Der Nachweis somatischer Mutationen im NF1-Gen in solchen Tumoren ist ein 1. Schritt zur Lösung dieses Problems.

Molekularbiologische Untersuchungen an sporadischen solitären Neurofibromen gesunder Probanden sind nicht bekannt.

Die erhöhte Häufigkeit von Optikusgliomen bei NF1-Patienten veranlasste von Deimling et al. (1993) zu einer LOH-Studie an 20 pilozytischen Astrozytomen. Die 13 verwendeten Marker waren über das ganze Chromosom 17 verteilt und ließen bei 1 von 4 Tumoren mit LOH den Schluss zu, dass ein ganzes Chromosom 17 verloren gegangen war. Bei 2 weiteren Tumoren war LOH auf die NF1-Gen-Region bzw. auf 17q beschränkt; der 4. Tumor mit LOH war das bereits erwähnte Optikusgliom eines NF1-Patienten (s. oben). Da mit multiplen genetischen Veränderungen, wie sie in Astrozytomen erwachsener Patienten gefunden werden, bei pilozytischen Astrozytomen nicht zu rechnen ist, sind pilozytische Astrozytome ein besonders geeignetes Objekt für die Suche nach Mutationen an beiden Allelen des NF1-Gens mit den verfügbaren genaueren Methoden.

Bei sporadischen Phäochromozytomen und bei solchen von Patienten mit multipler endokriner Neoplasie Typ 2A und 2B bzw. mit Von-Hippel-Lindau-Syndrom haben Gutmann et al. (1994a) und Xu et al. (1992b) eine fehlende bzw. verringerte Expression des NF1-Gens und LOH an intra-genen Markern nachgewiesen (Tabelle 5.18).

Neben ihren Studien an myeloproliferativen Störungen bei Kindern mit NF1 unternahm Side et al. (1998) die Suche nach NF1-Gen-Mutationen im Knochenmark von Kindern mit juveniler myeloischer Leukämie, die keine Stigmata und keine positive Familienanamnese der NF1 aufwiesen. Bei 2 dieser Patienten fanden sich trunkierende Mutatio-



Tabelle 5.18. Expressionsanalysen und LOH-Untersuchungen des NF1-Gens bei Phäochromozytomen von Patienten ohne NF1

Autoren	Anzahl und Herkunft der Phäochromozytome	Anzahl der Tumoren mit reduzierter oder fehlender NF1-Gen-Expression	Anzahl analysierter Chromosom-17-Marker (im NF1-Gen)	Tumoren mit LOH (LOH im NF1-Gen)
Xu et al. (1992)	9 sporadische		19 (1)	1 (1) durch Verlust eines Chromosoms 17
	8 von Patienten mit MEN		19 (1)	
	4 von Patienten mit VHL		19 (1)	
Gutmann et al. (1994)	4 sporadische	1		1 (1) interstitielle Deletion
	10 von Patienten mit MEN 2A	3		
	4 von Patienten mit MEN 2B	2		
	2 von Patienten mit VHL	1		

MEN Multiple endokrine Neoplasie, VHL Von-Hippel-Lindau-Syndrom.

Tabelle 5.19. Mutationsanalyse des NF1-Exons 24 bei nicht mit NF1 assoziierten Tumoren von Patienten ohne NF1

Autoren	Anzahl und Art der untersuchten Tumoren	Anzahl der Tumoren mit Mutationen (Art der Mutation)
Li et al. (1992)	28 Blutproben von Patienten mit MDS	1/28 (Lys1423Glu)
	10 anaplastische Astrozytome	1/10 (Lys1423Gln)
	22 Kolonadenokarzinome	1/22 (Lys1423Glu)
Ludwig et al. (1993)	57 Patienten mit MDS	1/84 (Deletion der Spleißakzeptorstelle des Introns 23)
	27 Fälle Akuter Myeloischer Leukämie	
Tenan et al. (1993)	18 Glioblastome	0/18
Foulkes et al. (1994)	36 sporadische Ovarialkarzinome	0/36
Nakai et al. (1994)	86 CML (45 chronische Phase; 41 akute Phase) und 4 CML-Zelllinien	0/90
Gomez et al. (1995)	44 Sarkome (9 Neurofibrosarkome)	0/44
Jensen et al. (1995)	22 Gliome hohen Malignitätsgrads	0/22
Scheurlen und Senf (1995)	51 Gehirntumoren von Kindern	0/51
Uchida et al. (1995)	31 primäre Blasenkarzinome	0/31
	6 Nierenbeckenkarzinome	0/6
	2 Ureterkarzinome	0/2

MDS Myelodysplastisches Syndrom.

nen des NF1-Gens. Da bei Kindern unter 2 Jahren die Diagnose der NF1 sehr schwierig sein kann und kein normales Vergleichsgewebe zur Verfügung stand, bleibt offen, ob es sich um somatische oder um Keimbahnmutationen handelte. Da aber bei 20–30% der Kinder mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) aktivierende Ras-Mutationen gefunden wurden, ist es wahrscheinlich, dass die Defizienz des negativen Ras-Regulators Neurofibromin auch an der Entstehung dieser Neoplasien bei Patienten beteiligt sein kann, die nicht an NF1 leiden.

Die Entdeckung einer Missense-Mutation in dem phylogenetisch hochkonservierten Lysinoko-

don 1423 in Exon 24 des NF1-Gens bei einem erwachsenen Patienten mit MDS (Li et al. 1992) war der Anlass für 2 umfangreiche Studien an insgesamt 218 Patienten mit MDS oder akuter myeloischer Leukämie (Ludwig et al. 1993; Preudhomme et al. 1993). Die Autoren untersuchten nur das Exon 24, das für einen Teil der funktionellen Domäne des Neurofibromins kodiert, die hochkonservierte Aminosäureabfolge FLR (Phe-Leu-Arg) enthält und deshalb auch FLR-Exon genannt wird. Bei keinem der Patienten konnte eine Mutation in diesem Exon nachgewiesen werden. Es liegt auf der Hand, dass mit der Mutationensuche in einem

so kleinen Anteil des NF1-Gens die Frage nach seiner Bedeutung für die Entstehung adulter myeloischer Leukämien nicht beantwortet werden kann. Die Unergiebigkeit einer solchen Beschränkung der Mutationensuche auf Exon 24 und/oder auf das Lysinkodon 1423 wird durch die negativen Ergebnisse einer Anzahl derartiger Untersuchungen deutlich (Tabelle 5.19). Zwar ist die funktionelle Bedeutung dieses Exons im Rahmen der GRD vielfach belegt, doch stellen Missense-Mutationen nur einen geringen Anteil der zum Funktionsverlust führenden Mutationen des NF1-Gens.

**Mutations- und Expressionsanalyse des NF1-Gens bei Tumoren, die bei NF1 nicht gehäuft auftreten.** Mutations- und Expressionsanalysen an zahlreichen Tumoren unterschiedlicher Genese zeigen, dass die beiden bekanntesten TSG, das Rb1- und das p53-Gen, an der Entstehung einer Vielzahl von Tumoren beteiligt sind, die nicht zum Spektrum der bei konstitutioneller Heterozygotie für Defektmutationen dieser Gene entstehenden Tumoren gehören, also nicht mit hereditärem Retinoblastom bzw. mit Li-Fraumeni-Syndrom assoziiert sind. Trotz seines vergleichsweise stärker eingeschränkten Expressionsspektrums sind entsprechende Analysen auch am NF1-Gen bei einer Anzahl nicht oder nur geringfügig mit NF1 assoziierten Tumoren durchgeführt worden.

**Gliome, Adenokarzinome, Ovarialkarzinome, myeloische Leukämie im Erwachsenenalter.** Nicht nur im Fall des oben erwähnten Patienten mit MDS, sondern auch in einem Kolonadenokarzinom und einem anaplastischen Astrozytom von Patienten ohne NF1 fanden Li et al. (1992) die Mutation Lys1423Glu im Exon 24 des NF1-Gens, die eine 200- bis 400fache Reduktion der GAP-Aktivität zur Folge hat. Über die zahlreichen nicht mit NF1 assoziierten Tumoren, die aufgrund dieser Befunde auf Mutationen dieses Kodons hin untersucht wurden, gibt Tabelle 5.19 einen Überblick. Nur bei einem Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie fanden Ludwig et al. (1993) eine 3-bp-Deletion der Spleißakzeptorstelle des Introns 23, die zu einer aberranten posttranskriptionalen Aufbereitung des Transkripts führt (Ludwig et al. 1995).

Die Assoziation von NF1 mit pilozytischen Astrozytomen im Bereich des N. opticus gab zu der Vermutung Anlass, dass NF1-Gen-Mutationen zur Entstehung von Astrozytomen im Allgemeinen beitragen könnten. Unter Verwendung überlappender NF1-cDNA-Sonden haben Thiel et al. (1995) an 31 Gliomen unterschiedlicher Subtypen und 3 pri-

mitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) Southern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt. Der Vergleich der Hybridisierungsmuster von Blut- und Tumor-DNA zeigte somatische Mutationen in 5 Gliomen (1 Astrozytom, 2 Glioblastomen, 1 Ependymom und 1 PNET mit astrozytärer Komponente). Bei einer LOH-Untersuchung von 22 hochgradigen Astrozytomen mit 4 intragenen Markern fanden Jensen et al. (1995) LOH im NF1-Gen in einem rekurrenten anaplastischen Astrozytom. Diese Befunde legen es nahe, dass der Verlust des NF1-Gens auch an der Genese höhergradiger Gliome beteiligt sein kann. Dies geht auch aus der Arbeit von Muhammad et al. (1997) hervor, die bei 3 anaplastischen Astrozytomen und 4 Glioblastomen LOH an multiplen Chromosom-17-Markern entdeckten, was auf den Verlust eines ganzen Chromosom 17 oder großer Teile desselben schließen ließ. Auf diesem Hintergrund ist die Bedeutung des Verlusts einer NF1-Gen-Kopie für die Tumorgenese schwer zu beurteilen. In 29 Vestibularischnomomen (VS), 10 Meningeomen und 7 Ependymomen wiesen Huynh et al. (1997) Neurofibromin mit intaktem C-Terminus immunhistochemisch nach. Diese 3 Tumorarten sind in hohem Maß für NF2 charakteristisch. Offenbar ist ein homozygoter Funktionsverlust des NF1-Gens nicht häufig mit der Entstehung dieser Tumoren verbunden.

**Melanome und Neuroblastome.** Trotz der für NF1 charakteristischen Pigmentierungsanomalien scheinen NF1-Patienten kein erhöhtes Risiko zu haben, am malignen Melanom zu erkranken (Mastrangelo et al. 1979; Duve u. Rakoski 1994). Dennoch konnten Andersen et al. (1993a) und Johnson et al. (1993) bei insgesamt 7 von 17 Melanomzelllinien eine fehlende bzw. reduzierte Neurofibrominexpression feststellen, wobei Andersen et al. bei einer der Melanomlinien eine homozygote Deletion fanden, die das 5'-Ende und 5'-flankierende Bereiche des NF1-Gens überspannte (Tabelle 5.20). Demgegenüber wurden bei 35 primären Melanomen, 29 metastasierenden Melanomen und 4 kongenitalen Nävi keine Mutationen in der GRD des NF1-Gens gefunden, und bei keinem dieser Tumoren konnte LOH für einen intragenen Marker festgestellt werden (Gomez et al. 1996). Diese Diskrepanz beruht wahrscheinlich darauf, dass an etablierten Zelllinien erhobene genetische Befunde oft nicht repräsentativ für den Genotyp des Herkunftstumorgewebes sind. Es können jedoch erst Studien der Neurofibrominexpression in Melanomen oder Mutationsanalysen, die größere Teile des

**Tabelle 5.20.** Neurofibrominexpressionsanalysen und Mutationsuntersuchungen des NF1-Gens in Tumorzelllinien von Patienten ohne NF1

Autoren	Anzahl und Art der Tumorzelllinien	Anzahl der Tumorzelllinien mit reduzierter Expression	LOH bzw. Mutationen des NF1-Gens (Nachweismethode)
Johnson et al. (1993)	9 Melanomzelllinien	4 (r) 1 (sr)	Heterozygote Deletion (FISH) 1 heterozygote Deletion (FISH)
	14 Neuroblastomzelllinien	2 (sr)  1 (f)	
	8 Ewing-Sarkom-Zelllinien	-	Homozygote Deletion (Southern-Blot)
	3 Gehirntumorzelllinien	-	1 heterozygote Deletion (FISH) <sup>a</sup>
	7 Rhabdomyosarkomlinien	-	0/8
	8 Melanomzelllinien	-	0/3
Andersen et al. (1993)	7 Rhabdomyosarkomlinien	-	0/7
The et al. (1993)	8 Melanomzelllinien	2 (f)	1 homozygote Deletion <sup>b</sup> (Southern-Blot)
	10 Neuroblastomzelllinien	2 (sr) 1 (f)	- Homozygote Deletion (Southern-Blot)
	2 PNET-Zelllinien	-	

*r* reduzierte Neurofibrominexpression, *sr* stark reduziert, *f* fehlende Expression, *PNET* primitive neuroektodermale Tumoren.  
<sup>a</sup> Bei dieser Neuroblastomzelllinie war der Neurofibromingehalt nicht reduziert.

<sup>b</sup> Die Deletion überspannt den 5'-Bereich des NF1-Gens und 5'-flankierende Regionen unbekannter Länge, der distale Bruchpunkt der Deletion liegt im Exon 28 des NF1-Gens.

NF1-Gens einbeziehen, die Frage beantworten, ob NF1-Gen-Mutationen bei der Entstehung dieser Tumoren eine Rolle spielen.

Ähnlich verhält es sich mit den Neuroblastomen. Auch diese zählen nicht zu den mit NF1 assoziierten Tumoren; bei Kindern mit NF1 wurde keine signifikante Erhöhung des Neuroblastomrisikos beobachtet (Matsui et al. 1993). Johnson et al. (1993) und The et al. (1993) fanden jedoch bei 6 von insgesamt 24 Neuroblastomzelllinien keine bzw. nur eine geringe Neurofibrominexpression. Bei 2 dieser Linien war dies auf eine homozygote Deletion des NF1-Gens zurückzuführen. Andererseits ergaben Mutationsanalysen an der NF1-GRD bei insgesamt 76 Neuroblastomen keine Hinweise auf Mutationen in diesem Teil des NF1-Gens (Imamura et al. 1993; Castresana et al. 1995).

**Korrektur von Transformationsparametern durch Expression des Wildtypallels des NF1-Gens.** Während die LOH-, Mutations- und Expressionsanalysen an Tumoren oder davon abgeleiteten Zelllinien den Funktionsverlust eines TSG zum Gegenstand hatten, sind die Transfektionsversuche dem Nachweis der Tumorsuppression durch das Wildtypallel eines TSG gewidmet. Dieses „experimentum crucis“ ist am Beispiel des NF1-Gens noch nicht in bedeutendem Umfang durchgeführt worden, jedoch erfüllte das NF1-Gen in den wenigen einschlägigen

Studien weitgehend die 4. Voraussage des TSG-Modells (s. Kapitel 5.2.4.1 „Formale Aspekte des Tumorsuppressorparadigmas“).

Eine breite Palette von Transformationsparametern testeten Li u. White (1996) in ihren Transfektionsexperimenten an der etablierten Kolonkarzinomlinie HCT116. Die Autoren wählten diese K-ras-transformierte Kolonkarzinomlinie als Modell, weil in mindestens 50% der Kolonkarzinome ein K-ras-Gen aktiviert ist. Transfektion mit der vollständigen NF1-cDNA führt zur erhöhten Adhärenz und einem besser organisierten Wachstumsmuster, also zur Reversion der morphologischen Transformation. Sowohl die vollständige NF1-cDNA als auch die NF1-GRD bewirkten eine dramatische Hemmung des verankerungsunabhängigen Wachstums, eines Transformationsparameters also, der am stärksten mit der Tumorigenität der Zellen korreliert ist. Dementsprechend war auch das durch die Transfektanten ausgelöste Tumorstadium in *nu/nu*-Mäusen hinsichtlich Anzahl und Wachstumsgeschwindigkeit wesentlich reduziert.

An NIH3T3-Zellen, die zunächst nicht mit einem Onkogen der ras-Familie transformiert waren, demonstrierten Johnson et al. (1994) eine Verminderung der Klonierungsausbeute und verzögertes Wachstum nach transients Transfektion mit der vollständigen NF1-cDNA. Neurofibromin war in diesen Zellen 2,2- bis 2,6fach überexprimiert. Auch

diese Studie diene primär der Aufklärung des Mechanismus der Tumorsuppression durch Neurofibromin.

Die Durchführung entsprechender Versuche zur Korrektur von Transformationsparametern an Zellkulturen aus Tumoren, die mit NF1 assoziiert sind, wäre wünschenswert.

#### 5.2.4.2 Mechanismen der Tumorgenese bei NF1

Als eines der Ras-GTPase stimulierenden Enzyme wird Neurofibromin primär als ein negativer Regulator von Ras-Proteinen verstanden. Die Verminderung seiner Funktion bis hin zum vollständigen Funktionsverlust sollte also zu einer Erhöhung der Konzentration GTP-beladener, also aktivierter Ras-Proteine führen (Abb. 5.2, 5.5). Da aktivierte Ras-Proteine in erster Linie als Stimulatoren der Proliferation bekannt sind, liegt es nahe, anzunehmen, dass die Verminderung der Konzentration des Ras-GTP durch Neurofibromin dessen tumorsupprimierende Wirkung erklärt. Es wird später auf die Frage eingegangen werden, ob Neurofibromin zusätzliche Funktionen ausübt. Neben den Folgen des Neurofibrominverlusts werden im Folgenden auch weitere Faktoren diskutiert, die für die Tumorgenese bei NF1 relevant sind.

**Neurofibrosarkome (MPNST).** Die Auswirkungen des Neurofibrominmangels auf die GTP-Beladung und die Aktivität von Ras-Proteinen wurde zunächst an Zelllinien aus Neurofibrosarkomen (malignen Schwannomen; MPNST) von NF1-Patienten geprüft (Basu et al. 1992; DeClue et al. 1992). Beiden Arbeitsgruppen standen die gleichen 3 Neurofibrosarkomlinien zur Verfügung, von denen 1 nur geringe Spuren von Neurofibromin enthielt, während in den 2 anderen kein Neurofibromin nachweisbar war. Der Anteil des GTP an den Ras-gebundenen Guaninnukleotiden war gegenüber einer Reihe von Kontrollzelllinien in den Neurofibrosarkomlinien signifikant erhöht; in der einen Studie im Vergleich zu durchschnittlich 8,7% auf maximal 37,8% (Basu et al. 1992), in der anderen von durchschnittlich etwa 5% auf maximal 46% (DeClue et al. 1992). Solche Werte ähneln denen, die für onkogene, aktivierende Ras-Mutanten charakteristisch sind (z.B. G12V, G13D, A59T, Q61R, E63K) und die intrinsische GTPase-Aktivität dieser Proteine stark reduzieren sowie ihre Empfindlichkeit gegen p120GAP und Neurofibromin praktisch eliminieren. Auch verursachen diese Mutationen, die im Durchschnitt bei 30% der Tumoren des Menschen gefunden werden (Bos 1988), eine Ver-

minderung der Affinität zu den Guaninnukleotiden, was ebenfalls zur erhöhten GTP-Beladung der onkogenen Ras-Proteine beiträgt, da nicht mehr in erster Linie die katalysierte GDP-Dissoziation, sondern das hohe GTP-GDP-Konzentrationsverhältnis die GTP-Beladung bestimmt. Mit Hilfe der Messung eben dieser Parameter:

- intrinsische GTPase-Aktivität,
- Dissoziation von GDP/GTP und
- Empfindlichkeit gegenüber den GTPase-stimulierenden Proteinen,

schlossen die Autoren aus, dass onkogene Mutationen der Ras-Gene die erhöhte Aktivierung der Ras-Proteine in den Neurofibrosarkomlinien verursacht haben könnten. Das Fehlen aktiven Neurofibromins wurde auch anhand von Immunpräzipitaten nachgewiesen, die mit einem nichtneutralisierenden Antikörper (welcher die GAP-Aktivität nicht beeinträchtigt) aus Lysaten der Neurofibrosarkomlinien gewonnen wurden. Solche Präzipitate vermochten die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras-GTP nicht zu stimulieren, während in Kontrollzelllinien die Neurofibrominaktivität auf diese Weise gemessen werden konnte. Analoge Versuche dienten dazu, in den Neurofibrosarkomlinien normale Aktivität des p120GAP nachzuweisen.

Die aufgrund des Neurofibrominmangels erhöhte Ras-Aktivität ist ursächlich mit der malignen Transformation verknüpft. Mikroinjektion des neutralisierenden Anti-Ras-Antikörpers Y13-259, der gegen die Effektor-domäne von Ras gerichtet ist, in Zellen einer Neurofibrosarkomlinie hemmte deren Proliferation (Basu et al. 1992). Überexpression von p120GAP durch stabile Transfektion derselben Zelllinie mit einem Expressionskonstrukt der katalytischen Domäne von p120GAP hatte die Reversion von Transformationsparametern zur Folge: flache, weniger refraktile Morphologie, von der Zelldichte abhängige Wachstumshemmung (Monolayer), 5- bis 10-mal geringere Fähigkeit zu verankerungsunabhängigem Wachstum (Koloniebildung in Weichagar). Die GTP-Beladung des Ras sank fast auf Kontrollwerte (DeClue et al. 1992).

In Gewebeproben aus Neurofibrosarkomen von 2 NF1-Patienten maßen Guha et al. (1996) etwa 3-fach erhöhte prozentuale Ras-GTP-Anteile (wenn auf die Werte der erwähnten Kontrollzelllinien Bezug genommen wird) bei deutlich verminderten Neurofibromin-mRNA-Konzentrationen bzw. fehlendem Neurofibromin (in 1 Fall). Damit haben die Zellkulturbefunde eine Bestätigung am in vivo System gefunden.

Die Aktivierung von Ras-Proteinen infolge von Neurofibromindefizienz kann jedoch nicht die alleinige Ursache der Entstehung von Neurofibrosarkomen sein. Wie bei anderen malignen Tumoren (Kinzler u. Vogelstein 1996) muss vielmehr davon ausgegangen werden, dass diese besonders aggressiven Tumoren über eine oder mehrere mögliche Folgen von Mutationsereignissen entstehen. Ein untrügliches Anzeichen hierfür ist die Vielzahl der zytogenetischen Anomalien, die in Neurofibrosarkomen zuerst von Riccardi u. Elder (1986) und in der Folgezeit von zahlreichen Autoren nachgewiesen wurde [Literatur zitiert in Plaat et al. (1999)].

Der Verlust oder Zugewinn von für diese Tumoren charakteristischen Chromosomensegmenten lässt sich nur schwer abgrenzen; LOH und zytogenetisch nachweisbare Verluste in der Region 17q11.2 sind eher seltene Ereignisse (Menon et al. 1990; Plaat et al. 1999). Demgegenüber beobachteten diese Autoren häufiger Verluste auf 17p, was in Kombination mit inaktivierenden Mutationen des verbleibenden Allels des p53-Gens (17p13.1) zu dessen homozygotem Verlust führt. Dies wurde an 5 von 11 MPNST beobachtet (Menon et al. 1990; Legius et al. 1994). Auch in der Studie von Lothe et al. (1995) ist der vollständige Verlust von p53 nur in einem Teil der Neurofibrosarkome nachgewiesen worden.

Das Tumorsuppressorprotein p53 kann seine Funktion aber auch auf einem anderen Weg einbüßen, nämlich durch Stabilisierung seines Antagonisten MDM2, welcher – analog zum Papillomaviruskoprotein E6 – den raschen proteolytischen Abbau des p53 stimuliert. MDM2 unterliegt aber auch selbst dieser Form einer posttranslationalen Regulation; sein proteolytischer Abbau wird durch das ARF-Protein (*alternative reading frame*) stimuliert (Zhang et al. 1998 a). Der Verlust von ARF wird also über eine Stabilisierung des p53-Antagonisten MDM2 zu einem raschen Abbau von p53 führen. Das komplexe Gen p16<sup>INK4a</sup>/ARF, das für den Inhibitor der CDK4 und 6 und für das ARF-Protein kodiert, liegt in dem kleinsten gemeinsamen Segment der Deletionen von 9p, die bei vielen malignen Tumoren einschließlich der MPNST nachgewiesen wurden (Berner et al. 1999; Plaat et al. 1999). Vom homozygoten Verlust beider Produkte dieses Gens ist somit die Inaktivierung der wichtigen Tumorsuppressoren Rb1 und p53 zu erwarten, Rb1 infolge seiner permanenten Phosphorylierung durch CDK4/6, p53 infolge seines ungehemmten Abbaus. Diese Betrachtungen betreffen jedoch lediglich die Zellzyklusregulation. Ein für die Progression von MPNST vermutlich entschei-

dender Schritt ist die Expression des EGFR in den neurofibromindefizienten SZ dieser Tumoren sowie auch in den spontan transformierten SZ aus Nf1(-/-)-Mausembryonen (DeClue et al. 2000). Die genetischen Veränderungen, welche die Invasivität und Metastasierung dieser Tumoren hervorrufen, sind noch nicht identifiziert worden.

**Neurofibrome.** Die Aussagekraft von Messungen des Ras-GTP-Gehalts an benignen Neurofibromen von NF1-Patienten ist wegen der zellulären Heterogenität dieser Tumoren problematisch. LOH am NF1-Locus und Zweitmutationen (Kapitel 5.2.4.1 „Formale Aspekte des Tumorsuppressorparadigmas“, Unterkapitel „LOH-, Klonalitätsuntersuchungen und Mutationsanalysen bei NF1-assoziierten Tumoren von NF1-Patienten“) betreffen immer nur einen variablen Anteil der Zellen von Neurofibromen. Kluwe et al. (1999 a) nahmen Schwann-Zellen und fibroblastenartige Zellen eines Neurofibroms in Kultur und fanden eine Zweitmutation nur in ersteren, ein Befund, der diese Schwierigkeit unterstreicht, da gerade der Anteil an Schwann-Zellen in Neurofibromen über einen breiten Bereich streut. Ein gesundes Gewebe vergleichbarer zellulärer Zusammensetzung ist weder von NF1-Patienten (nicht betroffene Haut?, N. suralis?) noch von Gesunden zu erhalten. Es wäre aber von Interesse, herauszufinden, in welcher Weise sich bereits die konstitutionelle Mutation der NF1-Patienten auf den Ras-GTP-Gehalt auswirkt. Trotz dieser Schwierigkeiten haben Guha et al. (1998) 4 benigne Neurofibrome von 4 verschiedenen NF1-Patienten in ihre Bestimmungen des Ras-GTP-Anteils einbezogen (s. oben). Der gefundene Wert von etwa 6% liegt im Bereich der bei primären Zellkulturen oder gesunden Geweben ermittelten Ergebnisse (z.B. Griesser et al. 1995). Die von den Autoren konstatierte Erhöhung dieses Parameters beruht daher lediglich auf dem Vergleich mit 4 sporadischen Schwannomen von Personen, die nicht an NF1 oder NF2 litten, und bei denen sich ein Ras-GTP-Anteil von nur 1,3% ergab.

Aufschlussreicher sind Messungen an Zellkulturen, die jedoch noch nicht in größerem Umfang durchgeführt wurden. Im Hinblick auf die zelluläre Heterogenität von Neurofibromen ist die Kenntnis der Zellarten von Interesse, in denen es durch Neurofibromindefizienz zu einer gestörten Ras-Regulation kommt. Um in frischen, primären Zellkulturen aus Neurofibromen die Zellen mit erhöhtem Ras-GTP-Gehalt zu identifizieren, verwendeten Ratner et al. (1999) den immunzytochemischen Nachweis der Bindung eines Fusionsproteins aus

der Ras-Bindungsdomäne des Ras-Effektors Raf1 und der Glutathion-S-Transferase (RBD-GST) an Ras-GTP. Variable Anteile der Neurofibrom-Schwann-Zellen (12–62%) erwiesen sich als positiv, während die fibroblastenartigen Zellen (FLC) nicht reagierten. Da nicht alle Schwann-Zellen einen erhöhten Ras-GTP-Gehalt zeigten, belegen diese Experimente auch die Heterogenität der Schwann-Zellen in Neurofibromen. Dieses Ergebnis zeigt nicht nur, dass Schwann-Zellen die Progenitorzellen von Neurofibromen sind, sondern weist auch auf die Rolle parakriner Stimulationsmechanismen beim Wachstum dieser benignen Tumoren hin, denn ein großer, wenn auch variabler Anteil der Zellen in Neurofibromen ist mesenchymalen Ursprungs. Da auch in Neurofibromen somatische Zweitmutationen des NF1-Gens nachgewiesen wurden (s. Kapitel 5.2.4.1 „Formale Aspekte des Tumorsuppressorparadigmas“, Unterkapitel „LOH-, Klonalitätsuntersuchungen und Mutationsanalysen bei NF1-assoziierten Tumoren von NF1-Patienten“), kann davon ausgegangen werden, dass die Ursprungszellen dieser benignen Tumoren entsprechend dem 2-Treffer-Modell, dem Tumorsuppressionsparadigma, entstehen. Es stellt sich nun die Frage, welche Kette von Ereignissen zur Proliferation der Schwann-Zellen und zum Wachstum eines Neurofibroms führt. Um zu einer Vorstellung darüber zu gelangen, müssen verschiedene Parameter in Betracht gezogen werden:

a.) Unterschiede zwischen Schwann-Zellen (SZ) aus Neurofibromen und solchen aus gesundem Gewebe

Nur eine kleine Minorität von SZ der Neurofibrome befindet sich in Kontakt mit Axonen; in Neurofibromen besteht SZ-Hyperplasie, und diese gilt es im Sinn der partiellen (+/-) und/oder vollständigen (-/-) Neurofibromindefizienz zu erklären. Die Erforschung der Eigenschaften von SZ aus Tumoren von NF-Patienten wurde durch die Entwicklung von Methoden zur Gewinnung und Propagierung reiner Schwann-Zell-Populationen ermöglicht (Rutkowski et al. 1995). Hierzu war zum einen die Eliminierung von FLC erforderlich, zum anderen die spezifische Stimulation der Schwann-Zell-Proliferation. Dies gelang durch die Kombination von Aktivatoren der Adenylatzyklase (wie Cholera-Toxin oder Forskolin) mit dem Gliawachstumsfaktor (GGF2) im Kulturmedium. Letzterer ist das Herregulin, der Ligand der Rezeptortyrosinkinase Her2 (auch Neu genannt) aus der Familie der EGF-Rezeptoren. Zuerst haben Sheela et al. (1990) 2 typische Eigenschaften von Tumorzellen,

- die Induktion der Angiogenese und
- die Invasivität,

an nativen Neurofibromfragmenten sowie an FLC und SZ aus Neurofibromen von NF1-Patienten getestet. Sie benutzten dazu die Chorioallantoismembran des befruchteten Hühnereis, auf die die Gewebefragmente oder die Zellpopulationen aufgebracht wurden. Von den Gewebefragmenten zeigten nur diejenigen aus Neurofibromen, nicht aber solche aus normalem Suralisnerv angiogene und invasive Eigenschaften. Unter den Zellpopulationen reagierten nur die hoch angereicherten SZ aus Neurofibromen positiv, während die FLC und normale Ratten-SZ weder invasiv noch angiogen waren. Als Positivkontrollen dienten eine etablierte Ratten-SZ-Linie, eine menschliche Neurofibrosarkomlinie und bFGE. Ob die invadierenden und angiogenen SZ den konstitutionellen Genotyp des Patienten hatten (NF1+/-), oder eine Subpopulation mit der Zweitmutation (NF1-/-) darstellten, blieb unbekannt.

Die Verfügbarkeit von Mausstämmen mit gezielt mutativ inaktiviertem NF1-Gen (so genannte NF1-Knockout-Maus; Brannan et al. 1994; Jacks et al. 1994a), ermöglichte es, vergleichende Studien an Zellpopulationen definierten NF1-Genotyps durchzuführen. Da die Mäuse mit homozygoter Neurofibromindefizienz zwischen Tag E12.5 und E14.5 sterben [Kapitel 5.2.5.2 „Eigenschaften der Nf1(-/-)-Mausembryonen“], müssen die zu untersuchenden Zellpopulationen beim Genotyp Nf1(-/-) vor diesem Stadium aus Embryonen gewonnen werden.

Die Invasivität und Angiogenität der Nf1(-/-)-SZ bestätigten sich in diesem System, wobei in der Ausprägung beider Eigenschaften ein deutlicher Gendosisseffekt erkennbar war. Durch den Verlust des Neurofibromins kommt es zu einem von der NF1-Gendosis abhängigen Anstieg des Anteils an Ras-GTP, woraus auf eine vorrangige Bedeutung des Neurofibromins als Ras-GTPase-stimulierendes Protein in Maus-SZ geschlossen werden kann. Diese Befunde, erhoben an SZ aus Nf1(-/-)-Embryonen, stehen jedoch im Widerspruch zu der Beobachtung, dass SZ zu den Zellarten gehören, bei welchen eine erhöhte Ras-Aktivität die Differenzierung fördert und nicht die Proliferation (Ridley et al. 1988; Kim et al. 1995). Auch Ratten-SZ, die v-Ha-Ras überexprimieren, proliferieren nicht im gleichen Ausmaß nach Stimulation mit GGF und Forskolin wie SZ mit normal reguliertem Ras. Hinweise auf eine negative Wachstumsregulation erga-

ben sich auch aufgrund der Bestimmungen der Proliferationsrate bei SZ aus NF1-Knockout-Mäusen. Nach GGF-Stimulation zeigen die Wildtyp-SZ eine höhere Proliferationsrate als Nf1(+/-)-SZ, und deren Wachstumsrate lag wiederum höher als die der Nf1(-/-)-SZ. Dementsprechend verringerte sich mit abnehmender NF1-Gendosis der <sup>3</sup>H-TdR-Einbau, und die SZ bildeten in zunehmendem Maß lange Fortsätze aus. Diese Veränderungen sind unabhängig davon, ob die Proliferation der SZ durch Herregulin (GGF) oder durch Kokultur mit Neuronen stimuliert wird (welche u.a. durch Herregulin auf SZ einwirken). Die Wachstumshemmung ist jedoch weder bei Nf1(-/-)-SZ noch bei v-H-Ras exprimierenden Ratten-SZ vollständig, und ihr verlangsamtes Wachstum bleibt abhängig von GGF. Auch wirkt sich die verringerte NF1-Gendosis in Nf1(+/-)- und Nf1(-/-)-SZ dann in der erwarteten Weise auf den Anteil an Ras-GTP (also als Anstieg desselben) im Vergleich zum Wildtyp aus, wenn die Proliferation mit GGF stimuliert wird (Kim et al. 1995).

Aufgrund des bisher beschriebenen Verhaltens der SZ aus NF1-Knockout-Embryonen [Nf1(+/-); Nf1(-/-)] ist die Hyperplasie der humanen SZ in Neurofibromen nicht erklärbar. Es müssen vielmehr weitere stimulierende Faktoren angenommen werden, welche unter den in vivo vorherrschenden Bedingungen das vermehrte Wachstum der SZ begünstigen, und/oder zusätzliche genetische Ereignisse in den SZ selbst. Eine kleine Subpopulation von S100-positiven SZ in benignen Neurofibromen exprimiert den EGF-Rezeptor (DeClue et al. 2000). Wie bereits erwähnt, erfährt die Proliferation von SZ durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration eine signifikante Steigerung. Ein besonders hohes Maß an Abhängigkeit des SZ-Wachstums von Agenzien wie Forskolin besteht, wenn der Serumzusatz zum Kulturmedium durch einen der Wachstumsfaktoren FGF1, PDGF oder GGF ersetzt wird (Stewart et al. 1991; Kim et al. 1995, 1997). Interessanterweise stimuliert Forskolin allein (ohne GGF) unter diesen Bedingungen nur die Proliferation der Nf1(-/-)-Maus-SZ, nicht aber die der Nf1(+/-)- und Nf1(+/+)-Tiere. Es sei daran erinnert, dass die Nf1(-/-)-SZ unter den 3 Genotypen den höchsten Grad der Ras-Aktivierung zeigen. Bei GGF-stimulierten Ratten-SZ blockiert der hochspezifische PKA-Inhibitor H89 die GGF-induzierte Proliferation dieser Zellen, die zugleich mit einer Erhöhung der cAMP-Konzentration einhergeht (Kim et al. 1997).

In welcher Weise die durch aktiviertes Ras vermittelte MAPK-Kaskade und die durch aktivierte PKA ausgelösten Reaktionen bei der Wachstumsstimulation von SZ zusammenwirken, ist noch nicht geklärt; sicher ist, dass beide Wege involviert sind. Die Hemmung der Interaktion von Ras mit seinem Effektor Raf1 durch dessen PKA-katalysierte Phosphorylierung an Ser43 scheint keine entscheidende Rolle zu spielen (Kim et al. 1997).

b.) Unterschiede zwischen den anderen Zellarten der Neurofibrome, insbesondere den fibroblastenartigen Zellen (FLC: fibroblast-like cells), und ihren normalen Entsprechungen.

Die FLC der Neurofibrome können sich aus Epi-, Peri- und Endoneuralfibroblasten und auch aus den eigentlichen Perineuralzellen rekrutieren. Letztere bilden die aus 3–15 Zellschichten bestehende bindegewebige Hülle der Nervenfaszikel. Im Gewebeverband des Perineuriums sind sie durch eine flache epitheloide Gestalt, zahlreiche pinozytische Vesikel und eine Basallamina gekennzeichnet. Bei der Waller-Degeneration nehmen sie den Phänotyp proliferierender Fibroblasten an, der auch in der subkonfluenten Zellkultur vorherrscht. Im konfluenten Stadium bilden Perineuralzellen einen flachen Monolayer und erweisen sich als stärker adhären als Fibroblasten (Kaufmann und Krone, unveröffentlicht). Den Beweis dafür, dass sich das Perineurium aus FLC bilden kann, erbrachten Bartlett Bunge et al. (1989) mit Hilfe eines In-vitro-Rekonstitutionssystems, in dem sie die Entstehung eines markierten Perineuriums bei der Kokultur von Neuronen, SZ und markierten Fibroblasten beobachteten. Das Vorkommen von Perineurinomen berechtigt zu der Hypothese, dass Perineuralzellen als eine 2. Art von Progenitorzellen aktiv zur Entstehung von Neurofibromen beitragen. Ihr zahlreiches Vorhandensein in Neurofibromen ist durch den immunzytochemischen Nachweis von Kollagen IV belegt (Peltonen et al. 1988).

Es waren aber nicht Fibroblasten aus Neurofibromen, sondern solche der heterozygoten bzw. homozygoten NF1-Knockout-Maus, die mit Fibroblasten des Wildtyps hinsichtlich ihrer Fähigkeit verglichen wurden, Perineurium zu bilden (Rosenbaum et al. 1995). In einem ähnlichen Kokultursystem, wie oben beschrieben, erwiesen sich die Nf1(-/-)-Fibroblasten (aus E12.5-Embryonen) als unfähig, mit den angebotenen Neuronen-SZ-Aggregaten Faszikel auszubilden, während die Nf1(+/-)- und die Nf1(+/+)-Fibroblasten dies vermochten.

Bei diesen Versuchen fiel zugleich eine ausgeprägte Tendenz der Nf1(-/-)-Fibroblasten zur Hyperproliferation auf. Da Fibroblasten in entstehenden Neurofibromen die Zweitmutation am NF1-Locus ebenso erleiden können wie SZ, ist auch diese Beobachtung mit einem aktiven Beitrag dieser Zellen zum Tumorwachstum vereinbar. Das Wachstumsverhalten von FLC-Kulturen aus Neurofibromen von NF1-Patienten variiert innerhalb der gleichen weiten Grenzen wie das von FLC aus gesunder Haut der Patienten oder von Vergleichsprobanden (Krone et al. 1986). In einer Reihe gegenteiliger Berichte wurde die extreme inter- und intraindividuelle Variabilität aller qualitativen und quantitativen Parameter von FLC-Kulturen des Menschen zu wenig beachtet. Eine Vergrößerung der Stichproben der zu vergleichenden Kollektive lässt in der Regel erkennen, dass die zur Frage stehende Eigenschaft nicht dazu geeignet ist, eine Neurofibromkultur von einer solchen aus gesunder Haut zu unterscheiden. Eine Ausnahme scheint jedoch die Zellgestalt zu sein, die von vielen Autoren als deutlich von derjenigen typischer Hautfibroblasten in der Kultur abweichend beschrieben wird. Neurofibrom-FLC zeigen oft eine weniger gleichmäßige, quasi „ausgefranzte“ Begrenzung und eine höhere Anzahl von Fortsätzen gegenüber den meist bi- oder tripolaren normalen FLC aus der Haut (z. B. Peltonen et al. 1984; Krone et al. 1986; Hayashi et al. 1990). Welchen Veränderungen der Form gebenden Elemente des Zytoskeletts dieser morphologische Unterschied entspricht, ist noch nicht bekannt.

#### c.) Voraussetzungen der auto- und/oder parakrinen Wachstumsstimulation in Neurofibromen

Die Bedeutung para- und autokriner Mechanismen für das Tumorwachstum steht heute außer Zweifel. Neurofibrome scheinen hiervon keine Ausnahme zu sein, da die Voraussetzungen für die Wirksamkeit solcher Mechanismen gegeben sind.

Als erster prüfte Riccardi (1986) Rohextrakte aus Neurofibromen auf ihre wachstumsfördernde Wirkung an Neurofibromzellkulturen und fand eine signifikante und dosisabhängige Stimulation von Fibroblasten und von kleinen „Spindelzellen“ mit Schwann-Zell-Morphologie. Hansson et al. (1988) wiesen immunhistochemisch IGF1 (Somatomedin C) in SZ, benachbarten FLC und in Gefäßen von Neurofibromen nach. Aus der Verteilung des Wachstumsfaktors schlossen die Autoren, dass er von den SZ produziert und sezerniert wird. In fraktionierten Extrakten aus Neurofibromen fan-

den Ratner et al. (1990) FGF2 und einen Wachstumsfaktor für SZ, dessen chromatografisches Verhalten dem des Neuregulin (GGF) ähnelte. Damit bestätigten sich frühere Befunde von Brockes et al. (1986), die GGF-ähnliche Aktivität nicht nur in Schwannomen von NF2-Patienten, sondern auch in Neurofibromen von NF1-Patienten nachgewiesen hatten. Krasnoselsky et al. (1994) entdeckten, dass der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) ein potentes Mitogen für SZ ist und seine Wirkung ohne den Zusatz von Agenzien entfaltet, welche die Adenylatzyklase stimulieren. Sie zeigten, dass ein hoher Anteil der von Forskolin unabhängigen Stimulation der Schwann-Zell-Proliferation durch Neurofibromextrakte auf HGF beruht. Die zugehörigen Rezeptoren der 3 genannten Wachstumsfaktoren, IGF1, GGF und FGF2, werden von SZ bzw. FLC exprimiert.

An primären Ratten-SZ wurde das Bestehen einer autokrinen Schleife zwischen Neuregulin (GGF) und erbB3, einem der GGF-Rezeptoren, nachgewiesen (Rosenbaum et al. 1997). Para- und autokrine Mechanismen können also wesentlich zur Stimulation des Neurofibromwachstums beitragen. Eine weitere mögliche Quelle von Wachstumsstimulanzien in Neurofibromen sind die zahlreichen Mastzellen, die in diesen Tumoren gefunden werden. Manche Autoren sehen die hohe Mastzellbesiedlung von Neurofibromen als pathognomonisch für diese Tumoren an. Unter den zahlreichen Komponenten der Mastzellgranula sind Histamin, TNF- $\alpha$  und Proteasen als Mediatoren der Fibroblasten- und/oder Endothelzellenproliferation bekannt. Mastzelldegranulation und das Phänomen der Transgranulation, d. h. des unmittelbaren Zell-zu-Zell-Transfers der Granula von Mastzellen in Fibroblasten, sind im Neurofibromingewebe häufiger als in der gesunden Haut. Eine detaillierte Diskussion der möglichen Bedeutung von Mastzellen für die Entstehung und das Wachstum von Neurofibromen findet sich in der Monografie von Riccardi (1992).

#### d.) Proteolytische Aktivität in Neurofibromen und extrazelluläre Matrix

Die Initiation und die Progression von Tumoren gehen mit tief greifenden Veränderungen der Interaktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) einher. Sie manifestieren sich als Veränderungen der Zellgestalt, der molekularen Restrukturierung der ECM und funktionell in aberranten Verlaufsformen der wechselseitigen Signalübertragung zwischen ECM und intrazellulären Prozessen [Übersicht, z. B. Lukashev u. Werb



(1998)]. Auf molekularer Ebene sind daran neben den verschiedenen Komponenten der ECM und ihren jeweiligen Rezeptoren zahlreiche Proteasen beteiligt, die wegen ihres Wirkungsbereichs auch als perizelluläre Proteasen bezeichnet werden. Dazu gehören in erster Linie Matrixmetalloproteinasen (MMP) und die beiden Plasminogenaktivatoren, Urokinase (uPA) und Gewebepasminogenaktivator (tPA) (Johnson et al. 1996; Werb 1997). In invasiven und metastasierenden Tumoren wird eine mehr oder minder spezifische Gruppe dieser Enzyme, oft auch im Zusammenspiel mit ihren Inhibitoren TIMP1 und 2 (tissue inhibitor of metalloproteinases), exprimiert (Lukes et al. 1999).

Für Astrozytome, anaplastische Astrozytome, Glioblastome und davon abgeleitete Zelllinien zeigten Nakano et al. (1995), dass die Expression von Gelatinase A (MMP2), B (MMP9) und Matrilysin (MMP7) für deren Invasivität von Bedeutung ist. Bei vergleichenden Messungen der proteolytischen Aktivität an Rohextrakten ergaben sich im Mittel 10fach höhere Werte in den Extrakten aus Neurofibromen und der tumornahen Haut im Vergleich zu solchen aus Haut von Gesunden bzw. peripherem Nervengewebe (Krone et al. 1986). Die Anwendung spezifischer Inhibitoren bzw. Substrate ließ erkennen, dass diese proteolytische Aktivität nicht allein auf Urokinase (uPA) zurückgeführt werden konnte. Clark et al. (1991) zeigten, dass Kulturen primärer Ratten-SZ tPA sezernieren. Die produzierte Menge und das Spektrum der tPA-Isomere werden in hohem Maß von der Gegenwart von Neuronen beeinflusst. Werden Neuronen aus Kokulturen mit SZ entfernt, steigt die von den SZ sezernierte Menge an tPA zeitabhängig auf mehr als das 10fache an (Clark et al. 1991).

Neuronen sind in Neurofibromen relativ selten anzutreffen, sodass sich die überwiegende Mehrzahl der Neurofibrom-SZ nicht im Kontakt mit Axonen befindet (Lassmann et al. 1976). Es ist also denkbar, dass die tPA-Synthese in Neurofibrom-SZ nicht durch Kontakt mit Axonen herunterreguliert wird und somit wesentlich zur erhöhten proteolytischen Aktivität des Tumorgewebes beiträgt.

Normale menschliche SZ aus adultem Nervengewebe sezernieren die Matrixmetalloproteinasen MMP2 und MMP3 (Stromelysin 1). Letztere übt eine wachstumshemmende Wirkung aus, indem sie ein inhibitorisches Peptid vom Fibronectin der ECM abspaltet (Muir u. Manthorpe 1992; Muir 1995).

Neurofibrome sind reich an ECM, die in Arealen geringer Zelligkeit als dichte Kollagenablagerung

imponiert. Die ECM der Neurofibrome enthält die Kollagene I, III, V und VI, Fibronectin und die Komponenten der Basallamina Laminin, Nidogen und Kollagen IV (Peltonen et al. 1984; Fleischmajer et al. 1985). Letztere werden von SZ und Perineuralzellen synthetisiert (Peltonen et al. 1988; Jaakkola et al. 1989). Qualitativ ähnelt die Zusammensetzung der ECM der Neurofibrome derjenigen peripheren Nervengewebes, jedoch ist der Anteil an den fibrillären Kollagenen I und III in Neurofibromen im Vergleich mit dem des Endoneuriums deutlich erhöht (Peltonen et al. 1986). Erhöhte Kollagensyntheseraten im Vergleich mit denen der Haut wurden auch an Neurofibromgewebeschnitten nachgewiesen (Peltonen et al. 1981). Fibroblastenkulturen von Nf1(-/-)-Mausembryonen (s. Kapitel 5.2.5.3 „Untersuchungen zur Funktion des Neurofibromins in spezifischen Zellen der Knockout-Mäuse“, Unterkapitel „Fibroblasten“) deponieren mindestens 2-mal so viel Kollagen wie Nf1(+/-)- bzw. Nf1(+/+)-Fibroblasten (Atit et al. 1999). Der funktionelle Zusammenhang zwischen der Neurofibromindefizienz und einer erhöhten Produktion der fibrillären Kollagene ist unbekannt.

e.) Einwirkungen exogener Faktoren auf das Wachstum von Neurofibromen

Zahlreiche Einzelbeobachtungen sprechen dafür, dass lokale äußere Einwirkungen auf die Haut die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines Neurofibroms am betroffenen Ort erhöhen (Riccardi 1992). Verletzungen, permanenter Druck oder Irritationen anderer Art (Juckreiz) werden von Patienten als Einfluss genannt, die dem Erscheinen von Neurofibromen vorausgehen. Es liegt nahe, dieses Phänomen im Sinn eines Zusammenwirkens konstitutionell labiler Zytoarchitektur der Hautnerven mit exogen ausgelöster Einwanderung inflammatorischer hämatogener Zellen und Mastzelldegranulation zu erklären.

Die unter Punkt 1–5 diskutierten Aspekte sind auch für plexiforme Neurofibrome relevant. In welcher Weise sich die Entstehung nodulärer und fusiformer Neurofibrome und deren Umwandlung in diffuse plexiforme Neurofibrome von der Entstehung dermalen Neurofibrome unterscheidet, ist unbekannt. Histopathologisch gehen diese Tumoren von intrafasikulären Wachstumsprozessen aus und bleiben deshalb zunächst eng mit Nervenbahnen oder Nervenplexus verbunden (s. Wiestler u. Radner 1994). Ihre Tendenz zur malignen Entartung und die Tatsache, dass in den so entstehenden Neurofibrosarkomen (MPNST) inaktivierende

Mutationen des p53-Gens nachweisbar sind (Memon et al. 1990; Greenblatt et al. 1994; Legius et al. 1994), veranlassten Kluwe et al. (1999b) zur Suche nach Mutationen in den Exons 5-8 dieses Gens in 14 plexiformen Neurofibromen. Die Autoren fanden keine Mutationen im p53-Gen. Wahrscheinlich ist die Inaktivierung dieses Gens dem Stadium der Progression plexiformer Neurofibrome zu MPNST vorbehalten. Ein weiteres häufiges Ereignis auf dem Weg zu MPNST ist der homozygote Verlust des Gens für den Inhibitor von zyklinabhängigen Proteinkinasen CDKN2A/p16, womit sich diese Tumoren in die wachsende Gruppe maligner Tumoren mit dieser Läsion einreihen lassen (Nielsen et al. 1999).

**Astrozytome.** Wie in Kapitel 5.2.4.1 „Formale Aspekte des Tumorsuppressorparadigmas“, Unterkapitel „LOH-, Klonalitätsuntersuchungen und Mutationsanalysen bei NF1-assoziierten Tumoren von NF1-Patienten“, beschrieben, ist NF1 mit einer erhöhten Häufigkeit von pilozytischen Astrozytomen des N. opticus und des Hirnstamms assoziiert. Beide Tumorarten werden bei NF1-Patienten selten nach dem 6. Lebensjahr auffällig. Etwa 1/3 der Optikusgliome und mindestens die Hälfte der Stammhirnastrozytome verursachen Symptome, aber nur ein kleiner Anteil bedarf der chirurgischen Intervention. Beide Arten von Tumoren nehmen bei NF1-Patienten einen weniger gefährlichen Verlauf als in sporadischen Fällen. Repräsentative molekularbiologische Studien liegen aus diesen Gründen über solche Tumoren noch nicht vor. Auch gibt es noch keine Erklärung für ihr Vorkommen in den beiden Prädilektionsarealen Sehnerv und Hirnstamm.

Schwann-Zellen finden in der Glia des ZNS ihre funktionelle Entsprechung in den Oligodendrozyten. Es ist deshalb überraschend, dass Astrozyten, die im Gegensatz zu Oligodendrozyten normalerweise kein Neurofibromin exprimieren (Daston et al. 1992), die Progenitorzellen der intrakraniellen Tumoren bei NF1 sind. Die Entstehung dieser Astrozytome muss vielleicht vor dem Hintergrund der bei NF1-Patienten beobachteten Astroglia gesehen werden (Nordlund et al. 1995), hinter der sich eine erhöhte Proliferationsbereitschaft der Astrozyten verbirgt. Die Astroglia im Gehirn von NF1-Patienten stellt sich histologisch als Hyperplasie und Hypertrophie der Astrozyten in der weißen und grauen Substanz dar; ihr auffälligstes immunzytochemisches Kennzeichen ist die erhöhte Bildung des für Astrozyten charakteristischen Intermediärfilamentproteins GFAP. Sie ähneln darin

den bei Verletzungen oder bei Ischämie auftretenden reaktiven Astrozyten. Ob die aktivierten Astrozyten im Gehirn von NF1-Patienten auch darin den reaktiven Astrozyten entsprechen, dass die Expression und/oder Aktivität zahlreicher anderer Moleküle erhöht ist (Neurotrophine und ihre Rezeptoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle, Proteasen), bleibt zu erforschen (Ridet et al. 1997). Da Neurofibromin auch in den hyperplastischen und hypertrophen Astrozyten der 3 von Nordlund et al. (1995) analysierten Gehirne von NF1-Patienten immunzytochemisch nicht nachweisbar war, ist ein Kausalzusammenhang zwischen NF1 und Astroglia nicht unmittelbar einsichtig. Das Phänomen wurde aber auch in bestimmten Hirnregionen der Nf1(+/-)-Maus beobachtet [s. Kapitel 5.2.5.3 „Untersuchungen zur Funktion des Neurofibromins in spezifischen Zellen der Knockout-Mäuse“, Unterkapitel „Astrozyten von Nf1(+/-)-Mäusen“], sodass vom Bestehen eines solchen Zusammenhanges ausgegangen werden kann.

Kleine Mengen von NF1-mRNA und Neurofibromin haben Hewett et al. (1995) in kortikalen Astrozyten der Maus in der Zellkultur nachgewiesen. Wurden die Kulturen Bedingungen unterworfen, welche die Situation posttraumatisch reaktiver Astrozyten simulieren (z.B. Stimulation mit cAMP oder mit Interferon  $\gamma$ +IL-1 $\beta$ ), kam es zu einem deutlichen Anstieg der NF1-mRNA. Ähnlich verhielt es sich mit Astrozyten des Rattenhirns, wenn experimentell eine fokale oder globale Ischämie herbeigeführt wurde; nach dem ischämischen Insult stieg in den Astrozyten die Menge des Neurofibromins parallel zu der des GFAP an (Giordano et al. 1996). Es liegt nahe, anzunehmen, dass die erhöhte Expression des NF1-Gens unter diesen Bedingungen mit dem Eintritt der zuvor ruhenden Astrozyten in den Zellzyklus korreliert ist.

Die Beobachtung von LOH in der NF1-Gen-Region bei 2 sporadischen pilozytischen Astrozytomen (PA) und am NF1-Gen bei einem solchen Tumor eines NF1-Patienten und einem weiteren sporadischen Tumor (von Deimling et al. 1993) lässt eine verringerte Expression des NF1-Gens in diesen niedergradigen Astrozytomen erwarten. Es war daher überraschend, dass in 6 PA 1,6- bis 2,8fach erhöhte NF1-mRNA gefunden wurde (Platten et al. 1996). Homozygotie für Protein trunkierende Mutationen konnte durch den immunzytochemischen Nachweis hoher Neurofibrominexpression in den Tumorzellen ausgeschlossen werden. Es kommt also wie in den reaktiven Astrozyten der oben beschriebenen experimentellen Systeme

auch in Astrozyten niedergradiger Astrozytome zu einem Anstieg der Neurofibrominkonzentration. Diese an sporadischen PA erhobenen Daten stehen aber im Gegensatz zu den LOH-Befunden an PA von NF1-Patienten (von Deimling et al. 1993; Gutmann et al. 2000). Letztere Autoren haben zudem das völlige Fehlen der Neurofibrominexpression an 8 PA von 6 NF1-Patienten nachgewiesen. Diese Ergebnisse legen es nahe, anzunehmen, dass auch für die Entstehung dieser benignen oder langsam progredienten Tumoren das Tumorsuppressionsparadigma gilt, mit Neurofibromin als dem betroffenen TSG-Produkt.

Auch in höhergradigen Astrozytomen und in davon abgeleiteten Zelllinien ist der Neurofibromin Spiegel gegenüber dem normaler Astrozyten signifikant erhöht (Gutmann et al. 1996). Damit sollte eine Verminderung des Anteils an aktiviertem Ras einhergehen, da Astrozytome in der Regel nicht durch aktivierende Mutationen der Ras-Gene entstehen. Der Anteil an aktiviertem Ras erweist sich jedoch in Astrozytomen der Grade II, III und IV (Glioblastoma multiforme) und den daraus propagierten Zelllinien (Guha et al. 1997) als erhöht, und zwar in vergleichbarem Maß zu dem von v-Ras transformierten Linien (20–35% Ras-GTP). Aufgrund dieser Ergebnisse prüften Gutmann et al. (1996), ob die Erhöhung des Neurofibromingehalts mit dem hohen Grad der Ras-Aktivierung in einem ursächlichen Zusammenhang steht. In NIH3T3-Zellen mit einem induzierbaren v-ras-Konstrukt stieg der Neurofibromingehalt nach Induktion proportional zur jeweils erzielten Ras-Aktivität an. Wurde die hohe Ras-Aktivität in einer menschlichen Astrozytomlinie durch Transfektion mit der dominant-negativen Mutante rasN17 gehemmt, sank auch der Neurofibromingehalt entsprechend. Ob es sich hierbei um eine Induktion der NF1-Gen-Aktivität über einen der Ras-vermittelten Wege der Signaltransduktion handelt oder um posttranskriptionale Regulation, ist noch nicht geklärt. Das Wachstum von Zelllinien, die von malignen Astrozytomen gewonnen wurden, ist abhängig von der Aktivierung von Ras, die in diesen Tumoren und Zelllinien durch auto- oder parakrine Stimulation der Rezeptortyrosinkinasen PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  und EGFR erfolgt. Wenn Neurofibromin in Zellen höhergradiger Astrozytome nicht als negativer Regulator, sondern als Effektor von Ras fungierte, müsste das Tumorstadium nicht nur von der Ras-Aktivierung, sondern auch von Neurofibromin abhängig sein. In diesem Fall wäre dessen erhöhte Konzentration in Astrozytomen (s. oben) sinnvoll. Eine solche Funktion des Neurofi-

bromins in Astrozytomzellen würde auch die Seltenheit anaplastischer und maligner Astrozytome bei NF1 erklären und verständlich machen, dass die im Kindesalter von NF1-Patienten vermehrt auftretenden pilozytischen Astrozytome so selten zu höhergradigen Stadien fortschreiten.

Die Kette der molekularen Ereignisse, die zur Entstehung der bei NF1 seltenen anaplastischen (Grad II) bzw. malignen Astrozytome (Grad III und IV) führen, ist aber noch nicht entschlüsselt worden. Folgende Schritte spielen dabei eine Rolle:

- Überexpression von PDGF und des PDGF $\alpha$ -Rezeptors,
- Verluste der Tumorsuppressorgene Rb1 und p53,
- Verlust des multiplen Tumorsuppressors MTS-1 (p16) und im späten Stadium,
- Verlust von PTEN,
- Amplifikation oder mutative Aktivierung des EGFR.

Auch Verluste unbekannter Genloci auf 19q und 22q tragen zur Progression dieser Tumoren bei (Guha et al. 1997).

**Juvenile myeloische Leukämien.** Wie in Kapitel 5.2.4.1 „Formale Aspekte des Tumorsuppressorparadigmas“, Unterkapitel „LOH-, Klonalitätsuntersuchungen und Mutationsanalysen bei NF1-assoziierten Tumoren von NF1-Patienten“, beschrieben besteht bei Kindern mit NF1 ein signifikant erhöhtes Risiko, an juveniler myelo-monozytischer Leukämie (JMML), auch bekannt als juvenile chronisch-myeloische Leukämie (JCML) oder einer verwandten Proliferationsstörung der myeloischen Reihe zu erkranken.

Bei einem bedeutenden Anteil der Fälle konnte der Verlust des NF1-Wildtypallels in den leukämischen Zellen nachgewiesen werden (LOH). Die Befunde von Miles et al. (1996) weisen darauf hin, dass sich der Verlust des Wildtypallels in einer frühen erythromyeloischen Progenitorzelle ereignet, gefolgt von der klonalen Expansion der neoplastischen Zellen. Dementsprechend ist die Ras-GTPase-stimulierende Aktivität des Neurofibromins in den leukämischen Zellen im Vergleich mit derjenigen in gesundem Knochenmark signifikant verringert. Um dies nachzuweisen, maßen Bollag et al. (1996) die GAP-Aktivität in Gegenwart und in Abwesenheit des für Neurofibromin spezifischen Inhibitors *n*-Dodecylmaltosid und konnten auf diese Weise den für Neurofibromin spezifischen Anteil erfassen. Die Folge dieser Aktivitätsminderung des Neurofibromins ist eine durchschnittliche Zunahme des Ras-GTP-Anteils auf das 2,8Fache. Da-

mit ist Neurofibromin als negativer Regulator der Ras-Aktivität in diesem Teil des hämatopoetischen Gewebes ausgewiesen. Die Alternative zu dieser Form der Ras-Aktivierung sind onkogene Ras-Mutationen, die bei mindestens 20% der JCML gefunden werden, jedoch – wie erwartet – nicht bei NF1-Patienten mit dieser Erkrankung (Kalra et al. 1994).

Der die Granulopoese regulierende Wachstumsfaktor GM-CSF wirkt über einen Ras-aktivierenden Rezeptor. Eine spezifische Hypersensitivität der leukämischen Zellen gegenüber diesem Faktor war schon früher bei JCML anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven nachgewiesen worden. Bollag et al. (1996) und Largaespada et al. (1996) vermochten diese Hypersensitivität an hämatopoetischen Präkursorzellen aus der Leber des etwa 13 Tage alten, neurofibromindefizienten Mausembryos zu reproduzieren. Die Dosis-Wirkungs-Kurve der Koloniebildung in halbfesten Medien (Weichagar oder Methylzellulose) war bei myeloiden Progenitorzellen aus  $Nf1(-/-)$ -Embryonen zu wesentlich geringeren GM-CSF-Konzentrationen verschoben. Zum Vergleich dienten myeloide Progenitorzellen aus  $Nf1(+/-)$ - und  $Nf1(+/+)$ -Embryonen, die sich in ihrer Stimulierbarkeit durch GM-CSF nicht voneinander unterschieden. In diesem System erweist sich also das Wildtypallel des NF1-Gens als vollständig dominant.

Largaespada et al. (1996) untersuchten den Einfluss der Neurofibromindefizienz auf den Ras-GTP-Anteil in myeloiden Progenitorzellen aus NF1-Knockout-Embryonen im Vergleich zu Zellen von Wildtypmäusen. Hierfür verwendeten die Autoren myeloide Präkursorzellen, die mit onkogenaktiviertem Myb immortalisiert worden waren. Diese Immortalisierung ist nötig, da für die Messungen des Ras-GTP-Gehalts große Mengen an metabolisch aktiven Zellen benötigt werden. Durch Myb immortalisierte  $Nf1(-/-)$ -Zellen wachsen schneller, bleiben aber GM-CSF-hypersensitiv. Unter permanenter GM-CSF-Stimulation (im Steady state) war sowohl bei Myb-transformierten Zellen des Wildtyps als auch bei den  $Nf1(-/-)$ -Zellen ein normaler Wert von 10% Ras-GTP festzustellen. Wurde jedoch eine Periode des Wachstumsfaktorentzugs vorgelegt und kurz nach der Restimulation gemessen, erreichten die  $Nf1(-/-)$ -Zellen viel höhere (30%) und länger persistierende Werte als die  $Nf1(+/+)$ -Zellen.

Die Rekonstitution des Knochenmarks letal bestrahlter Mäuse mit hämatopoetischen Präkursorzellen aus Wildtyp- oder  $Nf1(-/-)$ -Embryonen führt nur bei Verwendung der Letzteren zur CML-

Symptomatik bei den Empfängertieren (Largaespada et al. 1996). Der Kausalzusammenhang zwischen homozygoter Neurofibromindefizienz und der Entstehung dieser Krankheit ist somit im Mausmodell bestätigt, jedoch bleibt ungeklärt, warum erwachsene NF1-Patienten kein erhöhtes Risiko haben, an CML zu erkranken. Möglicherweise ist die Empfindlichkeit myeloider Progenitorzellen gegenüber GM-CSF oder anderen Wachstumsfaktorenentwicklungsspezifisch reguliert und betrifft nur myeloide Progenitorzellen innerhalb eines bestimmten zeitlichen Fensters.

Obwohl Kinder mit NF1 ein 200- bis 500fach erhöhtes Risiko haben, an malignen myeloproliferativen Erkrankungen wie JCML oder juveniler myelo-monozytärer Leukämie (JMML) zu erkranken, ist die Inzidenz nicht so hoch wie erwartet werden müsste, wenn es nur des Verlusts des Wildtypallels am NF1-Gen-Locus bedürfte. Gründe hierfür könnten zum einen in Erhebungsfehlern zu suchen sein. Der Anteil von Kindern mit NF1 unter den JMML-Patienten wird vermutlich unterschätzt, da in diesem Alter NF1 als zugrunde liegende Krankheit oft übersehen wird, insbesondere, wenn es sich um einen sporadischen Fall (Neumutation) handelt. Zum anderen muss angenommen werden, dass zur Pathogenese der JMML multiple Veränderungen beitragen, nicht nur der Verlust des Wildtypallels des NF1-Gens. Hierauf weisen nichtzufällige Chromosomenanomalien hin, wie die Monosomie 7, die bei einigen Kindern mit NF1 und myeloproliferativen Erkrankungen in den leukämischen Zellen nachgewiesen wurde. Welche Genverluste in diesen Fällen zur Neoplasie beitragen, ist unklar, ebenso wie der Grund dafür, dass vornehmlich Jungen an myeloproliferativen Syndromen des Kindesalters erkranken. Miles et al. (1996) stellten auch fest, dass bei Kindern mit NF1 und JMML das mutante NF1-Allel signifikant häufiger von der Mutter vererbt wurde.

Dass Mutationen des p53-Gens bei der Entstehung der JMML von NF1-Patienten ebenfalls eine Rolle spielen könnten, ist durch den Nachweis des Genotyps  $NF1(+/-)p53(+/-)$  in den leukämischen Zellen eines Patienten in der chronischen Phase belegt (Luria et al. 1997). In der Blastenkrise kam es zum Verlust des p53-Wildtypallels. Aber auch in der chronischen Phase kann bereits eine homozygote Defizienz des p53-Gens vorgefunden werden (Miyachi et al. 1999).

### 5.2.4.3 Molekulare Pathologie

Die Funktion eines Ras-GTPase aktivierenden Proteins (GAP) für die 3 monomeren Ras-Proteine H-Ras, K-Ras und N-Ras verleiht dem Neurofibromin potenziell eine Schlüsselstellung innerhalb der ubiquitären Regulationsmechanismen, in welche diese GTPasen als eine Art molekularer Schalter für irreversible Prozesse integriert sind. Ein Blick auf die Vielfalt der den Ras-Proteinen vor- und nachgeordneten Regulatoren und Effektoren (Abb. 5.5) lässt erkennen, dass eine Voraussage der Folgen einer Funktionsminderung oder des Funktionsverlusts *einer* Komponente offenbar unmöglich ist. Dem stehen u. a. die vielfältige Vernetzung der verschiedenen Signalwege (cross-talk) und die zelltyp- und differenzierungsstadienspezifische Signalauslösung und Übertragung in ihrer Abhängigkeit von den variablen Expressionsmustern der verschiedenen Komponenten entgegen. Deshalb können solche Schemata der Realität auch nicht gerecht werden; sie bieten lediglich eine Übersicht über die beteiligten Moleküle und ihre erwiesenen oder hypothetischen Wechselwirkungen miteinander. Unberücksichtigt bleiben u. a. ihre intrazellulären Konzentrationen in vivo und ihre kinetischen Parameter (z. B. Affinitäten und Geschwindigkeitskonstanten).

Es stellt sich die Frage, ob, und – wenn ja – wie die Symptome der NF1 auf der Grundlage der Funktionsminderung oder des Funktionsverlusts des Neurofibromins erklärt werden können. Hier stoßen wir nun auf eine insofern schwierige Situation, als die wesentlichen Symptome der NF1 sich an primären, diploiden Zellen manifestieren. Die fibroblastenartigen Zellen der Neurofibrome sind ebenso wie die Melanozyten aus CALF (Kehrer u. Krone 1994), Gefäßendothelzellen, Osteoblasten und Astrozyten euploid und haben in vitro eine begrenzte Lebensspanne. Die überwiegende Mehrzahl der Forschungsarbeiten über die Ras-vermittelte Signalübertragung ist aber an immortalen etablierten Zelllinien durchgeführt worden, wie z. B. an der Mauszelllinie NIH3T3 mit fibroblastoider Morphologie und der Phäochromozytomlinie PC12. Wenn primäre Zellkulturen herangezogen wurden, waren es mit wenigen Ausnahmen embryonale Nagerzellen, die zur spontanen Immortalisierung in vitro neigen. Dies gilt es zu bedenken, wenn die aus solchen z. T. sehr detaillierten Studien gewonnenen Erkenntnisse auf die Verhältnisse angewendet werden, die in euploiden Zellen vorherrschen.

Im Folgenden werden zunächst die Grundzüge der Ras-vermittelten Signaltransduktion beschrie-

ben. Auf dieser Grundlage soll sodann der Frage nachgegangen werden, in welcher Weise NF1-Genmutationen die Wechselwirkung zwischen Neurofibromin und Ras-Proteinen beeinflussen.

**Proteine der Ras-Subfamilie und von ihnen vermittelte Signalübertragung.** Innerhalb der mehr als 50 Mitglieder der Superfamilie monomerer GTPasen (Bourne et al. 1991) bilden die Ras-artigen GTPasen eine Subfamilie mit zurzeit 16 Komponenten (Reuther u. Der 2000). Es sind dies

- die 4 bekannten Ras-Proteine
  - a H-Ras,
  - b N-Ras,
  - c K-Ras4A und
  - d K-Ras4B,
- 3 R-Ras-Proteine,
- 4 Rap-Proteine,
- 2 Ral-Proteine sowie
- Rheb,
- Rin und
- Rit.

Die beiden Formen von K-Ras sind Translationsprodukte zweier Spleißisoformen des Transkripts des K-Ras-Gens. Sie werden im Folgenden unter der Bezeichnung K-Ras zusammengefasst. Substrate des Neurofibromins als eines Ras-GTPase aktivierenden Proteins sind H-, K-, N-, R-Ras und TC21 (R-Ras2) (Abb. 5.5).

Die Mitglieder der Ras-Familie sind kleine Proteine mit 189 (H-, K- und N-Ras) bzw. 218 Aminosäuren (R-Ras und TC21) vor der mehrstufigen posttranslationalen Modifikation. Letztere vermittelt nach endoproteolytischer Abspaltung der letzten 3 Aminosäuren, Prenylierung des dann C-terminalen Cysteins und Methylierung von dessen Karboxylgruppe die Membranverankerung der Ras-GTPasen. In alternativen Konformationen binden diese Proteine GDP oder GTP. Die GTP-beladene Form besitzt die Aktivität als eine Art molekularer Schalter für irreversible Prozesse. Es existiert eine große Vielfalt von Aktivatoren verschiedener Natur, die über ihre jeweiligen Rezeptoren die Überführung von Ras-GTPasen in den aktiven, GTP-gebundenen Zustand bewirken können. Diese Aktivatoren sind z. B. Hormone (z. B. Insulin), Zytokine (z. B. IL-2, IL-3 etc.), Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (EGF, PDGF, FGF1 und 2, IGF1, NGF und andere Neurotrophine), Moleküle der extrazellulären Matrix (Vitronektin, Fibronektin und andere das RGD-Tripeptid enthaltende Proteine) sowie Antigene bei der Aktivierung der T-Zell-Rezeptoren. Eine Liste von 25 Faktoren und

der von ihnen in verschiedenen Zellsorten bewirkten Erhöhung der GTP-Beladung von Ras-GTPasen findet sich in der Übersicht von Pronk u. Bos (1994). Auch manche, aber keineswegs alle heterotrimeren G-Proteine können nach Stimulation der jeweils mit ihnen gekoppelten Rezeptoren meist mittels ihrer  $\beta\gamma$ -Untereinheit die Aktivierung von Ras-Proteinen auslösen (Dhanasekaran et al. 1998; Gutkind 1999). Den Prototyp der ligandenabhängigen Ras-Aktivierung stellen aber die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) dar, also z.B. die Rezeptoren für EGF, PDGF, IGF-1, Insulin u.a. Die durch Bindung ihres jeweiligen Liganden dimerisierten Rezeptoren werden durch meist wechselseitige Phosphorylierung bestimmter Tyrosine der intrazellulären Domänen aktiviert. Dies versetzt die Rezeptoren in die Lage, die Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEF) zu aktivieren, welche die GTP-Beladung der Ras-Proteine katalysieren. Da intrazellulär in der Regel ein großer Überschuss an GTP über GDP vorherrscht, kann der Austausch des GDP gegen GTP, also die Aktivierung des Ras-Proteins, bereits durch eine Verminderung seiner Affinität zu GDP bewerkstelligt werden. Darin besteht die Funktion der aktivierten GEF.

Die GEF heißen deshalb auch „guanine nucleotide releasing“ oder „dissociation factor“ (GRF oder GDF). Bei den monomeren G-Proteinen der Familien Rho und Rab ist der Aktivitätszustand zusätzlich von Guaninnukleotiddissoziationsinhibitoren (GDI) abhängig.

Zwischen die Rezeptoren und die GEF sind 1 oder 2 Adaptorproteine geschaltet, deren Bedeutung dadurch unterstrichen wird, dass ihre konstitutionell aktiven Varianten zur Transformation führen können. Die Interaktion zwischen den Phosphotyrosinmotiven der aktivierten Rezeptoren und dem Adaptorprotein wird über dessen SH2-Domäne ermöglicht, diejenige zwischen dem Adaptorprotein und dem GEF oft über SH3-Domänen des Ersteren und prolinreiche Motive des Letzteren. Die Adaptorproteine zeigen eine gewisse Zelltypspezifität. Da die GEF von H-, K- und N-Ras auch unter der Bezeichnung Sos (son of sevenless) bekannt sind, sei diese wegen ihrer paradigmatischen Bedeutung hier in Kürze erklärt.

Sevenless ist die Bezeichnung für eine RTK, die von der Vorläuferzelle der 7. von 8 Photorezeptorzellen (R7) in jedem Ommatidium des Facettenauges von *Drosophila melanogaster* exprimiert wird. Durch Bindung des membranständigen Liganden Boss (bride of sevenless) der Nachbarzelle R8 wird diese RTK aktiviert und die zur Differenzierung von R7 führende Signalkette ausgelöst.

Der 1. Schritt dieser Kette ist die Aktivierung des GEF Sos durch den aktivierten Rezeptor Sevenless (Sev), und infolgedessen die GTP-Beladung von Ras. Im Fall dieser Kette  $Boss \rightarrow Sev \rightarrow Sos$ , also zwischen dem aktivierten Rezeptor Sev und dem GEF Sos, erfüllt das Protein Drk (downstream of receptor kinase) die Funktion eines Adaptors. Beim Säuger sind es u.a. die Proteine Shc (src homology domains containing) und, diesem folgend, Grb2 (guanine nucleotide releasing factor binding) (Abb. 5.2). Die intrinsische GTPase-Aktivität der kleinen G-Proteine der Ras-Subfamilie ist meistens sehr gering. Sie wird um 2–3 Größenordnungen durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP), wie p120GAP und Neurofibromin, stimuliert. GAP sind spezifisch für Einzelne oder für Gruppen monomerer GTPasen.

Die monomeren G-Proteine verfügen über eine Effektor-domäne, über die sie im aktiven, d.h. GTP-gebundenen Zustand auf Effektorproteine einwirken, wodurch Signalübertragungskaskaden in Gang gesetzt werden, an deren Enden bedeutsame Veränderungen des Genexpressionsmusters erfolgen. Von den meisten monomeren G-Proteinen gibt es konstitutionell aktive Mutanten, die der Inaktivierung durch GAP unzugänglich sind und als dominante Onkogene wirken. Bei GTPasen der Ras-Subfamilie können die onkogenen Varianten je 1 oder 2 der folgenden Aminosäureaustausche (Missense-Mutationen) haben: G12V, G13V, A59T, Q61L, E63K, N116I und D119A. GTPasen anderer Subgruppen werden durch Mutationen an homologen Positionen in die entsprechenden konstitutionell aktiven onkogenen Varianten umgewandelt.

Die 3 klassischen Ras-GTPasen wirken in ihrer GTP-beladenen Konformation auf mindestens 7 verschiedene Effektoren, von denen unterschiedliche Signalübertragungskaskaden ausgelöst werden, aktivierend ein (Abb. 5.5). R-Ras und TC21 aktivieren nur je eine Subgruppe dieser Effektoren. Der zuerst entdeckte Effektor von Ras-GTP war die Serin-Threonin-Kinase Raf-1. Sie steht am Anfang der bekannten Kaskade der durch Mitogene aktivierten Proteinkinasen (MAPK-Kaskade) (Abb. 5.2). Eine der Voraussetzungen für die Aktivierung von Raf-1 durch Ras-GTP ist die Membranverankerung des Letzteren. Entgegen früheren Vorstellungen, wonach die Funktion von Ras-GTP darin bestehe, Raf-1 an die Zellmembran zu rekrutieren, ist Ras-GTP auch direkt an der Aktivierung von Raf-1 beteiligt, und darüber hinaus tragen zu diesem außerordentlich komplexen Vorgang noch andere Proteine bei (Morrison u. Cutler 1997; Campbell et al. 1998). Für eine realistische Beurteilung

des Stellenwerts der negativen Regulation von Ras durch Neurofibromin müssen aber noch 2 weitere Umstände berücksichtigt werden.

1. Es gibt neben Raf-1 die nahe verwandten S/T-Kinasen A-Raf und B-Raf, und diese 3 Mitglieder der Familie unterscheiden sich voneinander in funktionellen Parametern.
2. Raf-Proteine können auch auf anderem Weg aktiviert werden als durch ihre Interaktion mit Ras-GTP, z.B. durch verschiedene Proteinkinasen (Src; PKC-Varianten). Schon auf dieser 1. Stufe der so oft als lineare Signalkaskade (Ras → Raf → MEK → ERK) dargestellten Reaktionsfolge ergeben sich also Verzweigungsmöglichkeiten, die in ihrer jeweils zelltypspezifischen Realisation zu berücksichtigen wären.

In ihrer aktivierten Form vermögen Raf-Proteine die bifunktionellen Proteinkinasen der MEK-Familie zu phosphorylieren und dadurch zu aktivieren (MEK: durch Mitogene aktivierte Kinasen für die durch extrazelluläre Signale regulierten MAPK, z.B. Erk-1 und Erk-2). Auch MEK-1 und MEK-2 können auf alternativen Wegen durch andere Kinasen aktiviert werden. Als bifunktionelle Proteinkinasen phosphorylieren MEK sowohl Threonin- als auch Tyrosinreste, und diese beiden Formen posttranslationaler Modifikation sind für die vollständige Aktivierung der MAP-Kinasen, z.B. Erk-1 und Erk-2 (auch p44<sup>MAPK</sup> und p42<sup>MAPK</sup> genannt), erforderlich (Abb. 5.2). Entsprechend ihrer Stellung in der Folge der Proteinkinase-Reaktionen werden die Raf-Proteine auch als MAPK-Kinase-Kinase und die MEK-Proteine als MAPK-Kinase bezeichnet.

Die Aktivierung der MAPK durch Phosphorylierung demaskiert ihre Kernlokalisierungssignale und ermöglicht den Transport in den Zellkern. Zahlreiche Transkriptionsfaktoren werden durch MAPK reguliert, sodass es letztlich durch RTK-abhängige Aktivierung von Ras-Proteinen zu tief greifenden Veränderungen des Genexpressionsspektrums kommt. Auch für die MAPK gibt es alternative Wege der Aktivierung, und sie sind z.T. positiv mit den MEK rückgekoppelt und mit anderen ihnen vorgeschalteten Regulatoren, bis hin zu den RTK und den GEF selbst (Seeger u. Krebs 1995; Campbell et al. 1998). Neben einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren mit unterschiedlichen Spezifitäten (Treisman 1996) gibt es auch zusätzliche zytoplasmatische Substrate der Erks, z.B. eine Reihe mikrotubuliassoziierter Proteine. Ras-Aktivierung bedeutet also eine tief greifende Veränderung auf mehreren Ebenen zellulärer Regulationsmecha-

nismen. Je nach Zelltyp können diese im Dienst des Eintritts in den Zellzyklus, also der Proliferation, stehen oder in Differenzierungsprozesse involviert sein; Apoptose und Seneszenz sind weitere Optionen.

In Abb. 5.2 wurde versucht, das beschriebene Geschehen schematisch darzustellen. Das Kernstück, die eigentliche MAPK-Kaskade, kann als eine Art Modul betrachtet werden, das in vielen verschiedenen Zusammenhängen verwendet wird. Für die Stimulation der Proliferation ist die Aktivierung der frühen Zellzyklusgene entscheidend, die über diesen Weg erfolgen kann (Kerkhoff u. Rapp 1998).

Dass Ras-GTP aber noch andere Effektoren als Raf-Proteine bedient, wurde deutlich, als der Phänotyp von Ras-transformierten Zellen mit dem von Zellen verglichen wurde, die von einer nachgeordneten Stufe aus transformiert wurden, nämlich durch konstitutiv aktive MAPKK (MEK). Dieser letztere Weg der Transformation erzeugt zwar den tumorigenen Phänotyp bei NIH3T3-Zellen, nicht aber die dramatischen morphologischen Veränderungen, welche diese Zellen bei der Ras-Transformation erleiden, wie Membrankrausen und Verminderung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, also die Reorganisation des submembranären Aktinzytoskeletts. Dieser Prozess wird von monomeren G-Proteinen der Rho-Familie vermittelt. Es gibt mehrere Verbindungen zwischen der rezeptorabhängigen Ras-Aktivierung und den Rho-Proteinen. Eine davon verläuft über die Ras-abhängige Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) und die von dieser phosphorylierten Phosphatidylinositide (Corvera u. Czech 1998), welche ihrerseits die RhoGTPase Rac aktivieren (Rodriguez-Viciano et al. 1996). Es liegt nahe, anzunehmen, dass die an Kulturen primärer Zellen von NF1-Patienten und in vivo beobachteten zellulären Formveränderungen auf diesem Weg durch eine erhöhte Ras-Aktivität infolge Neurofibrominmangels hervorgerufen werden (s. Kapitel 5.2.4.2 „Mechanismen der Tumorgenese bei NF1“, Unterkapitel „Neurofibrome“). PI3-K übt als einer der Effektoren von Ras-GTP in manchen Zellsystemen aber auch eine antiapoptotische Wirkung aus, sodass eine erhöhte Ras-Aktivität nicht nur die Zellproliferation, sondern auch das Überleben der Zellen fördert (Jarpe et al. 1998). Ein solcher Effekt mag dem neurotrophinunabhängigen Überleben bestimmter neuronaler Zellpopulationen in den Nf1(-/-)-Mausembryonen zugrunde liegen (s. Kapitel 5.2.5.3 „Untersuchungen zur Funktion des Neurofibromins in spezifischen Zellen der Knock-out-Mäuse“).

Mit diesen Betrachtungen sollte die Richtung angedeutet werden, in welcher die molekulare Pathologie der NF1 vermutlich aufzuklären wäre. Dies erfordert aber die Berücksichtigung des gesamten Netzwerks der Signaltransduktion, soweit Neurofibromin und seine Ras-Substrate darin involviert sind.

Es ist nun immer wieder die Frage gestellt worden, ob Neurofibromin über seine Funktion als Ras-GAP hinaus noch andere Funktionen ausübt, seien es von Ras abhängige oder völlig unabhängige Funktionen. Einer der Anlässe zu dieser Frage ist der geringe Anteil der GRD (maximal 367 von 2867 Aminosäuren, 12,8%) am Neurofibromin im Verhältnis zu der erstaunlichen phylogenetischen Konservierung der großen flankierenden Anteile bis zu den IRA-Proteinen von *Saccharomyces cerevisiae* mit noch 30% Sequenzidentität. Über die funktionelle Bedeutung dieser Abschnitte können nur Vermutungen angestellt werden.

Je 3 der PKA-Phosphorylierungsmotive liegen in der N- bzw. C-terminalen GRD-flankierenden Region. Auf die regulatorische Relevanz der Neurofibrominphosphorylierung wurde bereits in Kapitel 5.2.3.3 „Regulation der NF1-Gen-Expression und der Neurofibrominaktivität“ hingewiesen. Neben dem Turnover könnte durch Phosphorylierung auch die intrazelluläre Lokalisation des Neurofibromins beeinflusst werden. Durch Phosphorylierung verursachte Veränderungen der Tertiärstruktur könnten die Zugänglichkeit der GRD für Ras-GTP und damit die Affinität des Neurofibromins zu seinen Substraten regulieren. Während die Interaktion von Neurofibromin mit Mikrotubuli durch ein Sequenzmotiv am Anfang der GRD vermittelt wird, sind die Sequenzen, über die Neurofibromin mit Mitochondrien (Roudebush et al. 1997) oder mit Zytokeratinen (Koivunen et al. 2000) in Wechselwirkung tritt, noch nicht bekannt; dafür könnten Abschnitte der GRD flankierenden Regionen beansprucht werden. Schließlich sei in diesem Zusammenhang noch einmal auf den neben der GRD durch Häufung von Missense-Mutationen auffällenden Abschnitt (Exons 11–17) hingewiesen (Fahsold et al. 2000, s. Kapitel 5.2.2.5 „Mutationen“), in dem eine 2. funktionell bedeutsame Domäne vermutet werden darf.

Andere Hinweise auf Funktionen des Neurofibromins, welche die Ras-GTPase-Aktivierung nicht in Anspruch nehmen, ergaben sich aus Experimenten, bei denen der Anteil des Ras-GTP nicht erwartungsgemäß auf natürliche oder experimentell herbeigeführte Veränderungen der intrazellulären Neurofibrominkonzentration reagierte. Die

einschlägige Diskussion wurde durch 2 in diesem Zusammenhang fast rituell zitierte Arbeiten von Johnson et al. (1993, 1994) in Gang gebracht, die an etablierten Tumorzelllinien durchgeführt wurden. Bei der Analyse des Ras-GTP-Anteils (Verhältnis Ras-GTP zu Ras-GDP+Ras-GTP) in Melanom- und Neuroblastomlinien mit partieller oder vollständiger Neurofibromindefizienz fanden die Autoren keine Unterschiede zum Ras-GTP-Anteil in NIH3T3-Zellen bzw. in einer der Neuroblastomlinien mit normalem Neurofibromingehalt. Bezüglich des Gehalts an p120GAP bestanden keine Unterschiede zwischen diesen Linien. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass Neurofibromin in solchen Zellen, im Gegensatz zu seiner Funktion in der als Positivkontrolle mitgeführten NF1-MPNST-Linie, nicht mittels der Ras-GTPase-Aktivierung als negativer Regulator von Ras fungiert. Diese Deutung setzt voraus, dass das Wachstum dieser Tumorzelllinien in dem Maß von Ras abhängig ist, in dem die Neurofibromindefizienz durch die Verminderung der negativen Regulation von Ras zur Wachstumsstimulation beiträgt. Als andere Möglichkeiten der negativen Regulation von Ras wurden in Betracht gezogen:

- a.) Neurofibromin hemmt positive Ras-Regulatoren kompetitiv an der Effektordomäne.
- b.) Neurofibromin ist ein negativ wirkender Effektor von Ras.

Die Autoren erwogen jedoch auch die interessante Möglichkeit, dass Neurofibromin eine von Ras-Proteinen gänzlich unabhängige Funktion ausüben könnte. Es ist in diesem Kontext zu erwägen, dass Neurofibromin in Analogie zu p120GAP (Toque et al. 1997) auch in manchen Zusammenhängen die Funktion eines positiven Effektors von Ras ausüben könnte (Krone et al. 1998).

Um die Wirkungsweise des Neurofibromins genauer zu bestimmen, transfizierten Johnson et al. (1994) NIH3T3-Zellen bzw. neurofibromindefiziente Melanomzelllinien stabil mit einem Expressionsvektor mit vollständiger NF1-cDNA als Transgen. Die 2,2- bis 2,6fache Überexpression von Neurofibromin führte bei den NIH3T3-Zellen zur Wachstumshemmung (klonal und in Massenkulturen), ohne dass damit eine wesentliche Verringerung des Ras-GTP-Anteils verbunden gewesen wäre. Im Fall der Melanomlinien induzierte Neurofibromin die Differenzierung bei praktisch vollständiger Wachstumshemmung. Um das überexprimierte Neurofibromin in stärkerem Maß mit Ras zu konfrontieren, wurde einer der transfizierten NIH3T3-Klone in Massenkultur mit onkogen-



aktivierten v-ras-Mutanten transfiziert und seine Fähigkeit zur Bildung transformierter Foci im Vergleich mit der nicht-NF1-transfizierten Kontrolle bestimmt. Die eindrucksvolle Hemmung der Focusbildung in den Neurofibromin überexprimierenden Kulturen berechtigte zu der Schlussfolgerung, dass Neurofibromin auch hier als negativer Regulator von Ras wirkt, ohne allerdings seine Ras-GTPase aktivierende Funktion einzusetzen, denn erstens war keine Reaktion der Ras-GTP-Beladung auf die Neurofibrominüberexpression festgestellt worden und zweitens sind die verwendeten v-ras-Mutanten resistent gegen Neurofibromin.

Wird der Test auf Bildung transformierter Foci nicht mit v-ras, sondern mit v-raf durchgeführt, vermag die Neurofibrominüberexpression die Ausbeute an Foci nicht zu reduzieren. Obwohl nicht beweisend, legen es diese Ergebnisse nahe, dass eine der beiden unter a und b genannten Hypothesen zutrifft. Die Vorstellung, dass Neurofibromin außer einem Ras-GAP auch ein Effektor von Ras sein könnte (b), wird indirekt durch die Argumente unterstützt, die für eine Effektorfunktion von p120GAP sprechen (Tocque 1997). Jedoch stehen dem p120GAP in seiner N-terminalen Hälfte 5 Proteinbindungsdomänen für die Ausübung einer solchen Funktion zur Verfügung, während die GRD-flankierenden Regionen des Neurofibromins solche vermissen lassen.

Ein anderes Zellsystem, in dem die vollständige Neurofibromindefizienz nicht zur erwarteten Erhöhung von Ras-GTP führt, sind Leukämiezelllinien der Maus, bei der das NF1-Gen durch Integration des BHX-2-Retrovirus am EVI-2-Gen-Locus („ecotropic virus integration site“ innerhalb von Intron 27b des NF1-Gens) inaktiviert ist (Largaespada et al. 1995). Auch diese Autoren schlossen daraus auf eine von der GAP-Aktivität unabhängige Funktion des Neurofibromins. Diese Mausleukämie ist allerdings kein gutes Modell für die juvenile myelomonozytäre Leukämie bei NF1-Patienten, da bei dieser die Neurofibromindefizienz in den leukämischen Zellen durchaus zur erwarteten Erhöhung des Ras-GTP-Anteils führt (Bollag et al. 1996, s. Kapitel 5.2.4.2 „Mechanismen der Tumorgenese bei NF1“, Unterkapitel „Juvenile myeloische Leukämien“).

Die bisher diskutierten, nicht erwartungsgemäßen Ergebnisse wurden an etablierten, immortalen Zelllinien erhoben. Ähnliche Verhältnisse kommen auch bei primären, euploiden Zellkulturen von NF1-Patienten vor. In epidermalen Melanozyten aus CALF und nicht betroffener Haut von NF1-Pa-

tienten ist der Neurofibromingehalt auf die Hälfte des normalen Werts reduziert, der Ras-GTP-Anteil unterscheidet sich jedoch nicht von dem bei epidermalen Melanozyten gesunder Probanden gemessenen Werten (Griesser et al. 1995). Da die Verringerung des Neurofibromins in epidermalen Melanozyten von NF1-Patienten keineswegs ohne Wirkung ist, sondern morphologische und quantitative Veränderungen der Melanogenese verursacht (Kaufmann et al. 1989, 1991), scheint auch in diesem Fall eine gestörte Regulation der Ras-Aktivität nicht der entscheidende Mechanismus zu sein. In einer ähnlichen Studie zeigten Boeddrich et al. (1995), dass sich fibroblastenartige Zellen aus einem Neurofibrom eines NF1-Patienten mit Neurofibrominhaploinsuffizienz in ihrem Ras-GTP-Gehalt von fibroblastenartigen Zellen aus normalen Nervenfaszikeln bzw. aus normalem Epineurium nicht unterscheiden.

Einen mehr topografisch begründeten Hinweis auf unabhängiges Verhalten von p21Ras und Neurofibromin haben Boyer et al. (1994) gegeben. Immunglobuline, die bei der Aktivierung von B-Lymphozyten als Antigenrezeptoren fungieren, werden durch gegen sie gerichtete Antikörper durch Aggregation neu auf der Zelloberfläche verteilt. Dies geschieht im Sinn einer Kappenbildung (capping). Das in ruhenden Lymphozyten gleichmäßig submembranär verteilte p21Ras folgt dieser Kappenbildung ebenso wie Neurofibromin, das zuvor gleichmäßig im Zytoplasma und unter der Plasmamembran verteilt ist. Wird die Membranverankerung des Ras-Proteins durch Hemmung der Farnesylproteintransferase verhindert, vermag es der Kappenbildung nicht mehr zu folgen und wird gleichmäßig zytoplasmatisch verteilt, während sich Neurofibromin weiterhin in den Aggregaten der Antigenrezeptoren und sodann in der durch Konfluenz dieser Aggregate gebildeten Kappe anreichert. Die sehr wahrscheinlich über Komponenten des Zytoskeletts vermittelte Assoziation des Neurofibromins mit den Antigenrezeptoren erfolgt also unabhängig von Ras.

Es gibt – das sei abschließend festgehalten – erst zu nehmende Hinweise auf Funktionen des Neurofibromins, die unabhängig von seiner Ras-GTPase-aktivierenden Funktion sind. Es ist sehr wahrscheinlich, dass wesentliche Teile der die GRD flankierenden Abschnitte des Neurofibromins in solche Funktionen involviert sind.

**Funktionsanalysen von NF1-Gen-Mutationen.** Mit großer Wahrscheinlichkeit kann aufgrund des gegenwärtigen Kenntnisstands davon ausgegangen wer-

den, dass der für die Entstehung der NF1-Neoplasien entscheidende Schritt der Verlust des NF1-Wildtypallels in den Progenitorzellen der Tumoren ist, obwohl bei einem Teil der benignen Neurofibrome der Prozentsatz der NF1(-/-)-Zellen unter der Nachweisgrenze liegt. Die nichtneoplastischen Symptome der NF1 scheinen hingegen im Wesentlichen auf einer Haploinsuffizienz des Neurofibromins zu beruhen. Diese wird in erster Linie durch den hohen Anteil Protein trunkierender Mutationen (ungefähr 90%) verursacht, aber auch dadurch, dass selbst bei verkürztem, aber nicht unterbrochenem Leseraster das Proteinprodukt des mutierten Allels nicht oder nur in sehr geringen Mengen produziert wird. Dem liegt oft eine ungleiche Expression von Wildtyp- und Defektallel schon auf der Ebene der mRNA (nicht aber der HnRNA!) zugrunde (Hoffmeyer et al. 1995, 1998) sowie vermutlich der rasche Abbau verkürzter Neurofibrominvarianten. Da bisher noch in keinem Fall einer trunkierenden Mutation ein verkürztes Neurofibromin hat nachgewiesen werden können, ist nicht zu erwarten, dass diese aberranten Neurofibrominvarianten pathologische Funktionen ausüben.

Bezüglich der Methoden für die Messung der Ras-GTPase aktivierenden Aktivität des Neurofibromins, seiner Affinität zu Ras-GTP sowie des GTP beladenen Anteils der Ras-Proteine sei auf Kapitel 5.2.3.2 „Struktur-Funktions-Beziehungen“ verwiesen. Da Neurofibromin und die NF1-GRD *ira*<sup>-</sup>-Mutanten der Hefe (*Sc*) zu komplementieren vermögen, sind verschiedene Methoden der Funktionsanalyse von Neurofibromin auch an geeigneten Transfektanten der Hefe entwickelt worden:

- Bei *Saccharomyces* regulieren die Ras-Proteine Ras1 und Ras2 die Aktivität der Adenylatzyklase. Die Aktivierung von Ras führt also zu einem hohen cAMP-Spiegel und zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die ihrerseits die Glykogenolyse und die Glykolyse stimuliert. Darüber hinaus bewirkt PKA die Induktion von Proliferationsgenen durch die Aktivierung einschlägiger Transkriptionsfaktoren. Der Phänotyp von Mutanten der *ira*-Gene (*ira*<sup>-</sup>) ähnelt erwartungsgemäß dem durch konstitutiv aktive Ras-Mutationen verursachten Phänotyp. Es kommt zum raschen Verbrauch der Speicherkohlenhydrate, zu einer Überempfindlichkeit gegen Hungermedium und – besonders leicht nachweisbar – zur Hitzeschockempfindlichkeit. Mit Hilfe der Korrektur dieses Phänotyps als Indikator können also Neurofibrominvarianten oder Varianten der GRD auf ihre Fähigkeit geprüft wer-

den, die erhöhte Ras-Aktivität der *ira1*<sup>-</sup>*ira2*<sup>-</sup>-Mutanten zu hemmen. Auch durch gezielte oder ungezielte Mutagenese gewonnene Varianten können diesem Test unterworfen werden.

- Eine 2., an *Sc* entwickelte Methode der Funktionsanalyse des Neurofibromins konfrontiert Ras mit Neurofibromin in Doppeltransfektanten. Als Wirt wird eine Mutante mit temperatursensitivem GEF (*cdc25*<sup>ts</sup>) verwendet, sodass die Hefe-Ras-Proteine bei der restriktiven Temperatur nicht mit GTP beladen werden können. Unter diesen Bedingungen ist das Wachstum also von dem Produkt des transfizierten Ras-Gens abhängig. Dieses bedarf keines GEF, weil es spontan mit GTP beladen wird. Es ist auch bei der permissiven Temperatur kein Substrat des CDC25-Austauschfaktors. Wird nun ein Wildtypallel des NF1-Gens (meist cDNA) oder eines GRD-Konstrukts kotransfiziert, wird das Säuger-Ras-Protein inaktiviert, und es findet kein Wachstum statt. Eine Transfektion mit inaktivierenden Mutanten der NF1-Sequenzen jedoch wird Wachstum bei der restriktiven Temperatur zulassen. Als Kontrolle der Wachstumsfähigkeit der Doppeltransfektanten dient die Anwendung der permissiven Temperatur, bei der ja die eigenen Ras-Proteine der Hefe durch ihr GEF (das nunmehr aktive *cdc25*<sup>ts</sup>) beladen werden können (Ishioka et al. 1995).

In Kombination mit den biochemischen Methoden der Aktivitäts- und Affinitätsmessung und der Bestimmung des Ras-GTP-Anteils sind mit Hilfe dieser Methoden einige Mutationen funktionell gut charakterisiert worden.

Eine der ersten spezielleren Anwendungen der erstgenannten Methode (*ira*<sup>-</sup>-Komplementation) war der Nachweis, dass auch die NF1-GRD Typ-II-Ras-GAP-Aktivität besitzt, obwohl die Insertion des Exons 23a die Homologie zwischen Neurofibromin und den *ira*<sup>-</sup>-Proteinen unterbricht (Andersen et al. 1993b). Von besonderem Interesse war die Bedeutung der 19 hochkonservierten Aminosäurepositionen, von denen 15 in den 4 homologen Sequenzblöcken aller GRD liegen (s. Kapitel 5.2.3.2 „Struktur-Funktions-Beziehungen“; Abb. 5.4). Für das in den GRD aller Ras-GAP vorhandene Lysin in Position 1423 des Neurofibromins zeigten Pouillet et al. (1994) mit Hilfe des *ira*<sup>-</sup>-Komplementationstests, dass es ohne signifikanten Funktionsverlust durch keine andere Aminosäure ersetzt werden kann. Aktivitäts- und Ras-Affinitätsmessungen ergaben, dass der geringste Funktions-

verlust (1:123) durch den Austausch gegen das gleichsinnig geladene Arginin (K1423R) verursacht wurde. Mutationen an dieser Position (1423) waren zuvor schon bei einem NF1-Patienten und als somatische Mutationen bei einer Reihe von Tumoren gefunden worden (Li et al. 1992). Sie erwiesen sich in den Untersuchungen von Poulet et al. (1994) als hochgradig inaktivierend mit Funktionsverlusten von 1:800 (K1423E) bzw. 1:400 (K1423Q). Durch Zufall fanden diese Autoren einige Mutationen des Phenylalaninkodons 1434, welche die inaktivierende Wirkung der Mutationen an K1423 supprimieren; Doppelmutanten wie K1423S/F1434S oder K1423G/F1434L überstehen also die Hitzeschockbehandlung, welche für jede der beiden Einzelmutanten tödlich ist, da diese erhöhte Ras-Aktivitäten zulassen. Messungen der GAP-Aktivitäten an den aufgereinigten Proteinen ergaben, dass dies in der Tat auf der partiellen Restauration dieser Funktion durch die Zweitmutation beruht.

Im Zug solcher Funktionsanalysen wurden Mutationen mit erhöhter Affinität zu Ras-Proteinen gefunden und solche, die sogar konstitutiv aktivierte Ras-Mutanten zu hemmen vermochten. Die Affinität der Letzteren gegenüber Ras-GTP war 5- bis 10fach im Vergleich mit jener der Wildtyp-NF1-GRD erhöht. Eine Transfektion dieser NF1-GRD-Mutanten in NIH3T3-Zellen, welche mit der onkogenen K-ras-Doppelmutante G12S/A59T transformiert worden waren, verursachte die Reversion des transformierten Phänotyps in einem signifikanten Anteil der Klone (Nakafuku et al. 1993). Diese überraschenden Ergebnisse wurden im Sinn einer Hemmung der Interaktion des Ras-GTP mit einem Ras-Effektor infolge der hochaffinen Bindung der mutierten NF1-GRD gedeutet. Diese Hypothese wurde von Mori et al. (1995) bestätigt, die die kompetitive Hemmung der Ras-GTP/Raf1-Bindung durch solche Mutanten experimentell nachweisen konnten. Es gibt also Mutanten in der GRD des Neurofibromins, welche onkogene Ras-Varianten hemmen können, ohne deren intrinsische GTPase-Aktivität zu beeinflussen. Überraschenderweise hat die Wildtyp-NF1-GRD einen gewissen korrigierenden Einfluss auf den hitzeschockempfindlichen Phänotyp einer anderen aktivierten Ras2-Mutante, Ras2(Q68L). Auch diese unerwartete Aktivität scheint durch eine erhöhte Affinität vermittelt zu werden, denn dies wurde bei der entsprechenden Säugermutante Ras(Q61L) nachgewiesen (Bollag u. McCormick 1991). Bezüglich der Eigenschaften weiterer hochaffiner Mutanten der NF1-GRD sei auf die Studie von Morcos et al. (1996) hingewiesen.

Was nun die bei NF1-Patienten an 9 Positionen vorgefundenen 12 Missense-Mutationen der GRD (hier NF1-333) betrifft (Abb. 5.4), wurden 8 von diesen von Kim u. Tamanoi (1998) und 1 von Klose et al. (1998) einer Analyse ihrer kinetischen Funktionsparameter unterzogen. Unter ihnen kommen solche mit drastisch reduzierter GAP-Aktivität und fehlender Ras-Interaktion vor (Nullmutanten), aber auch solche mit Restaktivität. 2 der Mutationen (S1468G und N1504S) zeigen normale Affinität zu Ras-GTP und normale GAP-Aktivität, sodass angenommen werden muss, dass die an der GRD in vitro gemessenen Parameter die Eigenschaften des vollständigen Neurofibromins in vivo nicht repräsentieren oder dass diese Patienten unentdeckte Zweitmutationen an anderen Positionen tragen. Die extremste Aktivitätsminderung (1:20000) unter den Nullmutanten ist bei L1339R nachzuweisen, obwohl dieses Leucin außerhalb der 4 konservierten Blöcke liegt. An dieser Position ist offenbar nur ein unpolare Rest mit der Funktionsfähigkeit des Neurofibromins vereinbar (L auch bei DmGAP und p120GAP, F bei Iral und 2). R1391 ist das Arginin des für Ras-GAP charakteristischen FLR-PA-P-Motivs in Block 3A (die jeweils ersten 2 Positionen der Lücken sind mit unpolaren Aminosäuren besetzt). An dieser Position ist ein langer basischer Rest erforderlich, denn die R1391K-Mutante ist in der Lage, mit Ras-GTP zu interagieren. Hingegen verursacht die bei einem NF1-Patienten nachgewiesene Mutation R1391S (Upadhyaya et al. 1997), wie jede der übrigen 17 Aminosäuren in dieser Position, den Verlust der Affinität zu Ras-GTP und der Ras-GAP-Aktivität (Kim u. Tamanoi 1998). Aus den an der p120GAP-GRD erhobenen strukturanalytischen Beobachtungen geht hervor, dass das zu Position 1391 des Neurofibromins homologe R903 die Ausrichtung des Argininfingers (hier R789) stabilisiert und somit dessen effiziente Interaktion mit Ras-GTP ermöglicht (Ahmadian et al. 1997). Am Argininfinger selbst sind bei NF1-Patienten 2 verschiedene Missense-Mutationen nachgewiesen worden: R1276P und R1276Q. Die Erste dieser Mutationen und ihre Auswirkungen in der betroffenen NF1-Familie haben Klose et al. (1998) im Detail analysiert. Das bemerkenswerte an dieser Mutation (R1276P) ist die hohe Spezifität dieses Aminosäureaustausches hinsichtlich seiner Auswirkungen auf die NF1-GRD (NF1-333): Die GAP-Aktivität ist der einzige dramatisch beeinträchtigte Parameter, sie ist im Verhältnis 1:8000 verringert, während die Affinität zu Ras nur um das 6,6fache vermindert ist. Mit physikalischen Methoden gemessene

Parameter der Tertiärstruktur bleiben unverändert. Bei der betroffenen Familie ist, von der Altersabhängigkeit der Neurofibromentstehung abgesehen, ein geringes Maß an variabler Expressivität festzustellen; die Patienten manifestieren das typische Spektrum der vielfältigen Symptome der NF1. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das komplexe Krankheitsbild der NF1 allein durch die Aktivitätsminderung des Neurofibromins entstehen kann (Klose et al. 1998). Ob dieser Schluss in seiner ganzen Tragweite gerechtfertigt ist, wird sich erst erweisen, wenn auch die GRD flankierenden Segmente des Neurofibromins der Funktionsanalyse unterworfen worden sind.

#### 5.2.4.4 Pathogenese der nichtneoplastischen Symptome der NF1

Durch die systemische Ausprägung der NF1 sehen wir uns mit der Frage konfrontiert, in welcher Weise die nicht mit Raumfordernder Zellproliferation einhergehenden Symptome auf die partielle Neurofibromindefizienz zurückgeführt werden können. Die Beantwortung dieser Frage erfordert die Kenntnis der molekularen und zellulären Mechanismen der Ontogenese und der Aufrechterhaltung der betroffenen Zellpopulationen und Organsysteme, also der epidermalen Melanozyten und Melanogenese, des Skelettsystems, des Gefäßsystems und bestimmter Strukturen des Gehirns. Diese Voraussetzungen sind nicht erfüllt, und die vollständige Ausschöpfung des gegenwärtigen Kenntnisstands ist im Rahmen dieser Übersicht nicht zu leisten. Im Folgenden wird deshalb lediglich versucht, auf die jeweilige Problemlage aufmerksam zu machen.

**Pigmentierungsanomalien.** CALF und gesprenkelte Hyperpigmentierung zeichnen sich gegen eine insgesamt dunklere Pigmentierung der NF1-Patienten ab, die wahrscheinlich auf die zugunsten der Melanozyten verschobene Zusammensetzung der „Melanineinheit“ zurückgeht (s. Kapitel 5.2.1.2 „Kardinalsymptome“, Unterkapitel „Pigmentierungsanomalien“). Hier manifestiert sich also bereits der NF1(+/-)-Genotyp in Form eines generalisierten Merkmals. Besonders deutlich ist dieses Merkmal bei Patienten mit segmentaler Ausprägung des Mosaikstatus am Kontrast zwischen dem betroffenen und dem nicht betroffenen Areal zu erkennen (Ruggieri u. Huson 1999). Die disseminierte Natur der CALF wäre am einfachsten im Sinn des Tumorsuppressionsschemas zu erklären, also durch die Zufälligkeit inaktivierender Mutationen des

Wildtypallels des NF1-Gens in Melanozyten und anschließende Besiedelung begrenzter Areale der Epidermis mit NF1(-/-)-Melanozyten. In Analogie zu den Verhältnissen bei Tumoren müsste sich ein solcher Mechanismus durch LOH am NF1-Gen-Locus zu erkennen geben. Eisenbarth et al. (1997) untersuchten primäre Melanozytenkulturen aus CALF von 11 NF1-Patienten auf LOH an 4 intragenen und 1 flankierenden polymorphen Marker. Informativ für mindestens einen dieser Polymorphismen waren 10, sie erwiesen sich als heterozygot an allen informativen Markern. Da die verwendeten Marker eine Region von Exon 5 bis 3'-distal des NF1-Gens überspannten, schließen diese Befunde den Verlust des Wildtypallels durch große Deletionen, Nondisjunction, somatische Rekombination und Rearrangements aus. Haploinsuffizienz des Neurofibromins ist die Konsequenz der meisten NF1-Gen-Mutationen. Deshalb legt das durch Immunpräzipitation und Western-Blot nachgewiesene Vorhandensein des Neurofibromins in CALF-Melanozyten (Griesser et al. 1995) ebenfalls die Erhaltung eines funktionellen Wildtypallels nahe. Ein beweiskräftiger Ausschluss von somatischen Zweitmutationen würde eine Mutationsanalyse mit allen verfügbaren Methoden erfordern. Auch muss die Einschränkung gemacht werden, dass Melanozytenkulturen für diese Untersuchungen herangezogen wurden, bei denen eine Selektion gegen eine NF1(-/-)-Subpopulation von Melanozyten nicht ausgeschlossen werden kann.

Andererseits ist Neurofibromin auch immunzytochemisch an Melanozyten der CALF-Epidermis in situ nachweisbar (Malhotra u. Ratner 1994). Es erscheint also wenig plausibel, dass der Funktionsverlust des NF1-Wildtypallels in epidermalen Melanozyten oder ihren Präkursoren die Ursache für die Entstehung der CALF ist. CALF könnten jedoch hinsichtlich des NF1-Genotyps der Melanozyten heterogen sein; eine kleine Subpopulation von NF1(-/-)-Zellen könnte NF1(+/-)-Melanozyten zur Bildung eines CALF z. B. durch parakrine Stimulation rekrutieren. In diesem Fall sollte die Melanozytenpopulation eines CALF polyklonal zusammengesetzt sein. Leider ist diese Frage anhand des X-Inaktivierungsmusters nicht entscheidbar, denn die Melanozytenpopulation von Hautexzisten bis zu einer Größe von 2 cm<sup>2</sup> erwiesen sich als monoklonal, unabhängig davon, ob solche aus CALF oder aus der nicht betroffenen Haut analysiert wurden (Eisenbarth et al. 1997).

Ein möglicher Weg zur Erschließung des molekularen Mechanismus der Entstehung von CALF ist durch die Ergebnisse der Kreuzung von

Nf1(+/-)-Mäusen mit Homozygoten für das Allel W<sup>41</sup> des W-Gens eröffnet worden [s. Kapitel 5.2.5.4 „Analyse von Doppelmutanten aus Nf1(+/-)- u. a. Knockout-Mausstämmen“, Unterkapitel „Knockout-Mäuse mit Mutationen des NF1- und c-kit-Rezeptor-Gens“]. Das Proteinprodukt des W-Gens, dessen Mutationen den Phänotyp „dominant white spotting“ hervorbringen, ist c-Kit, eine RTK, welche durch den Steel-Faktor (auch Stammzellfaktor genannt) aktiviert wird. Steel und c-Kit spielen eine wichtige Rolle bei der Migration und Differenzierung von Melanoblasten, hämatopoetischen Stammzellen und Keimzellen während der Ontogenese. Der größte Teil des Fells von Nf1(+/-)-W<sup>41</sup>W<sup>41</sup>-Mäusen ist weiß. Die Färbung der Extremitäten und am Kopf zeigt, dass die Missense-Mutation W<sup>41</sup> (V831M) eine Restaktivität des mutanten c-Kit zulässt. Beim Genotyp Nf1(+/-)W<sup>41</sup>W<sup>41</sup> ist die Pigmentierung zu 60–70% restauriert (Ingram et al. 2000). Dieser Effekt wird mit großer Wahrscheinlichkeit durch die infolge der Neurofibrominhaploinsuffizienz erhöhte Ras-Aktivierung hervorgerufen. Denn c-Kit aktiviert nach Bindung von Steel-Faktor Ras, und am Ende der dadurch ausgelösten Signalkaskade steht die aktivierende Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Mi durch die MAPK ERK-2 (Mi, von Mikrophthalmie bei der Maus; entspricht dem Waardenburg-Syndrom Typ II beim Menschen) (Hemesath et al. 1998). Der aktivierte Transkriptionsfaktor Mi stimuliert die Transkription des Tyrosinasegens, also des Gens für das Schlüsselenzym der Melaninsynthese. Obwohl dieser Mechanismus die disseminierte Verteilung der CALF und der Sprekelung nicht erklärt, bietet er doch den Ansatzpunkt für die unbekannt Randbedingungen, aus denen die zufällige Verteilung dieser Pigmentierungsanomalien resultiert. Der Mechanismus ist mit der erhöhten Melanogenese vereinbar, die an Melanozytenkulturen von NF1-Patienten nachgewiesen wurde (Kaufmann et al. 1989, 1991). Ein mathematisches Modell, das zufällige Konzentrationsunterschiede einer unbekannt Substanz, laterale Diffusion dieser Substanz in der Epidermis und eine jeweils kritische lokale Konzentration für die Entstehung eines CALF voraussetzt, vermag die Zufallsverteilung der CALF und ihren häufig ovalen Umriss zu simulieren (Kestler und Haschka 1999).

**Skelettanomalien.** Übersichten über die bei NF1 auftretenden Anomalien des Skeletts und ihre Häufigkeit gaben Fairbank (1994) und Riccardi (1999). Es muss grundsätzlich zwischen den durch benachbarte, meist plexiforme Neurofibrome be-

dingten Schädigungen und den autochthonen Anomalien des Skeletts unterschieden werden. Die Knochenerosionen der ersteren Art mögen durch parakrine Stimulation der Osteoklasten durch Zytokine verursacht sein, die von Tumorzellen oder von tumorständigen Makrophagen (IL-1, TNF als bekannte Osteoklastenstimulatoren) sezerniert werden. Nur die autochthonen Anomalien sollen Gegenstand der folgenden Betrachtungen sein. Dazu gehören auch multiple Fibrome innerhalb der Knochensubstanz, welche zystische Rarefaktionen verursachen [Literatur bei Fairbank (1994)].

Da die Knochenanomalien bei NF1-Patienten allgemein als dysplastisch beschrieben werden, liegen ihnen vermutlich Störungen des Gleichgewichts zwischen Osteogenese und Osteolyse zugrunde. Diese können durch einen aberranten Verlauf der Osteogenese während der Ontogenese oder beim Erhaltungsstoffwechsel der Knochensubstanz zustande kommen oder durch gesteigerte Osteolyse. An beiden Vorgängen sind zahlreiche regulatorisch wirksame Faktoren beteiligt. Es erhebt sich die Frage, ob dem Neurofibrominmangel bei NF1 im komplizierten Netzwerk des Geschehens eine Bedeutung zugemessen werden kann. Die Analyse dieses Netzwerks auf molekularer Ebene hat ergeben, dass beide Prozesse – Osteogenese und Osteolyse – von Ras beeinflusst werden können. Unter den zahlreichen an der Osteogenese beteiligten Faktoren spielen 9 morphogenetische Faktoren (BMP: bone morphogenetic protein) und die nahe verwandte Gruppe von 10 Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDF<sup>2</sup>) eine herausragende Rolle [Übersicht: Schmitt et al. (1999)]. Außer BMP1 gehören diese Zytokine alle der TGF $\beta$ -Superfamilie an. Wie die 3 paralogen Formen von TGF $\beta$  wirken auch die BMP über Rezeptoren, die zur Klasse der Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren gehören. Die durch Ligandenbindung zu Heterotetrameren vereinigten und aktivierten BMP-Rezeptoren (ALK, Typ I und II; „activin-receptor like kinases“) aktivieren jeweils eine oder mehrere Komponenten einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, welche die Bezeichnung Smad erhalten haben (Erklärung s. Abkürzungsverzeichnis). Bestimmte Heterodimere aus 2 Smad-Proteinen translozieren sodann in den Zellkern, wo sie entweder direkt oder in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren die Aktivierung von Genen hervorrufen. Mindestens 2 antagonistische Smad-Proteine unterbinden die Kerntranslokation oder

<sup>2</sup> Bedauerlicherweise ist diese Abkürzung gleich lautend mit derjenigen für „Guaninnukleotiddissoziationsfaktoren“.

die Aktivierung anderer Mitglieder dieser Effektorgruppe. Details dieses Signaltransduktionsmechanismus werden in folgenden Übersichten beschrieben: Wozney u. Rosen (1998), Schmitt et al. (1999), Christian u. Nakayama (1999), Karsenty (1999), Zhang u. Derynck (1999). Dieser Signaltransduktionsweg ist mit anderen Wegen in der Weise vernetzt, dass Smad-Proteine auch durch andere Kinasen phosphoryliert werden können, z. B. durch die MAPK Erk1/2, die im Zug der Ras-Aktivierung durch bestimmte RTK aktiviert werden oder durch die stressaktivierten Kinasen SAPK/JNK. Hier zeichnet sich also die Möglichkeit ab, dass erhöhte Ras-Aktivität infolge von Neurofibrominmangel hemmend auf die Osteogenese einwirken könnte.

Synergistisch zu einem solchen, noch hypothetischen Mechanismus wäre erhöhte Osteolyse entweder infolge vermehrter Bildung von Osteoklasten, oder durch verstärkte Stimulation ihrer Aktivität. Reife Osteoklasten sind hämatogene, mehrkernige Riesenzellen, die aus myeloiden Vorläuferzellen entstehen. Der Wachstumsfaktor M-CSF und sein Rezeptor c-fms und eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (Pu. 1, c-fos, NF $\kappa$ B, Mi und AP1) sind neben mehreren anderen Faktoren an diesem Differenzierungsvorgang beteiligt (Karsenty 1999). Die Ras-vermittelte Signaltransduktion kommt hierbei durch die RTK-c-fms ins Spiel, deren Aktivierung durch M-CSF nicht nur für die Differenzierung und Reifung der Osteoklasten wichtig ist, sondern auch für die Aufrechterhaltung einer normalen mittleren Lebensdauer dieser kurzlebigen Zellen. In der Tat fanden Miyazaki et al. (2000) eine dramatisch verkürzte Überlebensdauer von Osteoklasten, die mit dem Gen für das dominant-negative RasN17-Protein transfiziert worden waren. Erhöhte Ras-Aktivität infolge von Neurofibrominmangel kann also die Osteolyse gegenüber der Osteogenese begünstigen. In der gleichen Richtung wirkt die Beteiligung der Ras-vermittelten Signalkette an der Induktion der interstitiellen Kollagenase (MMP1) durch Interleukin-1 $\beta$  in Chondrozyten der Wachstumsfuge. Grumbles et al. (1997) zeigten, dass auch dieser Vorgang durch die dominant-negative Ras-Variante RasN17 gehemmt wird. Von erhöhter Ras-Aktivität wäre also auch in diesem Zusammenhang eine Begünstigung der Osteolyse gegenüber der Osteogenese zu erwarten.

Da nur ein Teil der NF1-Patienten von Skelettanomalien betroffen ist, wirken die hier besprochenen Faktoren wahrscheinlich eher in Form einer Prädisposition, und es bedarf jeweils lokaler, auslösender Faktoren, um eine dieser Manifestatio-

nen hervorzurufen. Aber auch modifizierende Gene können in diesem Bereich ihren Einfluss entfalten (s. Kapitel 5.2.4.5 „Ursachen der variablen Expressivität der NF1“).

**NF1-Vaskulopathie.** Die mit NF1 assoziierten Gefäßanomalien manifestieren sich, wie beschrieben (s. Kapitel 5.2.1.3 „Komplikationen“), in Form von Aortenkoarktation und Aneurismen der Aorta, Stenosen und/oder Aneurismen der Nierenarterien und zerebraler Arterien sowie Verengung des Lumens kleiner Arterien und Arteriolen. Histopathologische Befunde sind mit der Hypothese vereinbar, dass alle diese Störungen auf einer lokalen Hyperproliferation von Endothelzellen der Intima und/oder glatten Muskelzellen der Media beruhen. Es können aber auch alle 3 Schichten der Gefäßwand in Mitleidenschaft gezogen werden. Heilungsprozesse können zu fibrotischen Veränderungen führen. Abkömmlinge der Neuralleiste sind lediglich am Aufbau der Media großer Arterien als glatte Muskelzellen ektomesenchymalen Ursprungs beteiligt, und dies mag den Unterschied zwischen der Neurofibrominexpression in der Aortenwand und dem Fehlen derselben in der Media der Nieren- und Gehirnarterien erklären (Norton et al. 1995). Dass Letztere häufig von der NF1-Vaskulopathie betroffen sind, weist erneut auf die Bedeutung des Neurofibromins in mesenchymalen Geweben hin. Auch die Herzfehlbildungen der Nf1(-/-)-Mausembryonen sind nicht allein auf die in das entstehende Zielorgan eingewanderten Subpopulationen von Neuralleistenzellen zurückzuführen (Brannan et al. 1994).

Wegen ihrer häufig spindelförmigen Morphologie wurden die proliferierenden Zellen in den Gefäßwänden zunächst für SZ gehalten. Sie exprimieren jedoch keine immunzytochemischen SZ-Marker, sondern Kennzeichen glatter Muskelzellen (Norton et al. 1995). Auch die polygonen Endothelzellen sind an der fokalen Proliferation beteiligt. Die Verteilung in Form von Proliferationsfoci legt den Gedanken nahe, dass auch auf diesen Prozess das Tumorsuppressionsparadigma anwendbar sein könnte, dass also die Proliferation durch die Inaktivierung des Wildtypallels des NF1-Gens ausgelöst werden würde. Aus nahe liegenden Gründen gibt es hierzu keine Untersuchungen an NF1-Patienten, wohl aber an der Knockout-Maus mit homozygotem Verlust der Funktion des p120GAP-Gens und an einer solchen mit doppelter Homozygotie für den Verlust beider GAP, p120GAP und Neurofibromin. Wie in Kapitel 5.2.5.4 „Analyse von Doppelmütanten aus Nf1(+/-) und anderen

Knockout-Mausstämmen“ beschrieben, sterben p120GAP (-/-)-Mausembryonen am Tag 10,5 der Gestation an multiplen Fehlbildungen des kardiovaskulären Systems. Zusätzliche Neurofibromindefizienz [Genotyp: p120GAP(-/-); Nf1(-/-)] hat schwerere multiple Missbildungen mit Letalität zwischen Tag 7,5 und 8,5 zur Folge. In Kombination mit an den jeweiligen Einzelmutanten [GAP(-/-) bzw. NF1(-/-)] erhobenen Befunden lassen diese Daten auf eine verheerende Wirkung erhöhter, ungezügelter Ras-Aktivität während der Embryogenese schließen, mit dem kardiovaskulären System als einem der wesentlichen Zielorgane. Die während der Vaskulo- und Angiogenese besonders relevanten Signaltransduktionswege werden in Gefäßendothelzellen und ihren Präkursoren durch den vaskulären Endothelwachstumsfaktor VEGF und verwandte Faktoren ausgelöst. Die VEGF wirken über eine Gruppe von mindestens 5 RTK, deren jeweilige homozygote Defizienzen in Knockout-Mäusen je spezifische letale Phänotypen erzeugen, sodass anscheinend nur eine geringfügige Redundanz ihrer Wirkungsspektren besteht (Merenmies et al. 1997). Die Art und die Anzahl der über die aktivierten Rezeptoren stimulierten Zielproteine reflektieren diese relative Spezifität z. T. (Petrova et al. 1999). Obwohl ligandeninduzierte Rezeptorphosphorylierung und Assoziation der so aktivierten RTK mit Adaptorproteinen wie Grb2, Shc und Nck nachgewiesen wurde, ist noch nicht bekannt, ob die darauf folgenden Schritte die Aktivierung von Ras-GTPasen beinhalten. Zwar ist die Aktivierung der Raf-MEK-MAPK-Kaskade nach VEGF-Stimulation von Endothelzellen wiederholt beschrieben worden, doch scheint besonders die durch VEGF-VEGFR-2 ausgelöste mitogene Reaktion über die direkte Aktivierung von PLC $\gamma$  und die dadurch bedingte Stimulation von bestimmten PKC-Subspezies zu verlaufen (Takahashi et al. 1999), ein Weg, der ebenfalls mit der Aktivierung der MAP-Kinasen verbunden sein kann (Kroll u. Waltenberger 1997). Es ist also nicht leicht, dem Neurofibromin eine bestimmte regulatorische Funktion in den von VEGF über seine Rezeptoren in Endothelzellen ausgelösten Signaltransduktionskaskaden zuzuweisen.

Ein in diesem Zusammenhang besonders interessanter Aspekt ist, dass unter den infolge der Stimulation von Endothelzellen mit VEGF phosphorylierten Proteinen auch die Komponenten des Komplexes aus p120GAP, p190 und p62 sind, über welche der Ras-vermittelte Signaltransduktionsweg mit der Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie verbunden ist. Letztere sind in die Regulation der

Ausformung der für Zelladhäsion und Zellmigration erforderlichen Membranstrukturen beteiligt und damit an Prozessen, deren Dysregulation ursächlich mit den Anomalien der Vaskulo- und Angiogenese verbunden ist, die bei den oben genannten Knockout-Mäusen beobachtet werden.

**Lern- und Verhaltensstörungen.** Die relativ hohe Häufigkeit dieser Symptome bei NF1-Patienten lässt auf eine wichtige Funktion des Neurofibromins bei der Aufrechterhaltung bestimmter Gehirnfunktionen schließen. Dies wird auf das anschaulichste durch die Störungen des Lernverhaltens und der Raumorientierung bei der Nf1(+/-)-Maus und durch analoge Anomalien bei der NF1(-/-)-*Drosophila melanogaster* belegt. Es liegt nahe, anzunehmen, dass die in Gehirnen von NF1-Patienten postmortal nachgewiesenen glialen und neuronalen Heterotopien und die Störungen der kortikalen Zytoarchitektur histologische Korrelate der zerebralen Funktionsstörungen sind. Der Beantwortung solcher Fragen stehen beim Menschen die größten Schwierigkeiten entgegen. Das gilt auch für die Astrogliosis. In 3 Gehirnen von NF1-Patienten dokumentierten Nordlund et al. (1995) einen um 40% erhöhten Astrozytengehalt und eine Hypertrophie der Astrozyten mit erhöhter GFAP-Expression. Die Verallgemeinerungsfähigkeit dieses Befunds wird durch das analoge Phänomen in Gehirnen der Nf1(+/-)-Maus nahe gelegt (Nordlund et al. 1995; Gutmann et al. 1999b). Bei diesem Genotyp beruht die Astrogliosis auf einer erhöhten Proliferationstendenz der Astrozyten nach Stimulation durch neuronale Faktoren. Rizvi et al. (1999) fanden bei 60% der Gehirne von Nf1(+/-)-Mäusen erhöhte Astrozytendichte und GFAP-Expression im Hippocampus. Da im Hippocampus Zentren für die räumliche Orientierung und das Langzeitgedächtnis lokalisiert sind, ist es möglicherweise kein Zufall, dass 60%-65% der Nf1(+/-)-Mäuse im Raumorientierungs- und Gedächtnistest von Morris (hidden platform water maze) eine signifikante Lernschwäche zeigen (Silva et al. 1997). Andere Komponenten des Lernvermögens der Nf1(+/-)-Mäuse sind von denen des Wildtyps nicht zu unterscheiden.

Die Aminosäuresequenz des Neurofibromins von *Drosophila melanogaster* ist zu 60% identisch mit der des menschlichen Neurofibromins (The et al. 1997). Die Inaktivierung des NF1-Gens von *Drosophila* gelang durch Mobilisierung eines nahe gelegenen P-Element-Transposons, wodurch bei einem der erhaltenen Allele (P1) eine große Deletion und beim anderen eine Insertion (P2) erzielt wur-

de (The et al. 1997). Im Gegensatz zu *Nf1(-/-)*-Mäusen sind die homozygot (*P1/P1* oder *P2/P2*) oder komplex-heterozygot (*P1/P2*) defizienten Fliegen lebensfähig. Vom Wildtyp und *NF1(+/-)*-Fliegen unterscheiden sie sich nur durch eine um etwa 25% verringerte Größe in allen postembryonalen Lebensstadien. Sie zeigen jedoch eine Verhaltensanomalie in der Form einer verzögerten Fluchtreaktion (Bernards 1998). Auch das olfaktorisch konditionierte Lernen ist bei den neurofibromindefizienten Fliegen in hohem Maß beeinträchtigt (Guo et al. 2000). Auf die Spur der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen haben Experimente über die Möglichkeiten zur Korrektur dieser Defizite geführt. Nicht nur die Expression eines *NF1*-Transgens vermag erwartungsgemäß diese Verhaltensstörungen zu revertieren, sondern auch die Expression einer konstitutiv aktiven katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Damit bestätigten sich früher erhobene Befunde, wonach Neurofibromin bei *Drosophila* an der Regulation der Aktivierung der Adenylatzyklase beteiligt ist (Guo et al. 1997; The et al. 1997). Diese verläuft bekanntlich über Rezeptoren, die mit heterotrimeren G-Proteinen gekoppelt sind, aber nicht nur cAMP-abhängige, sondern auch Ras-vermittelte Signalwege regulieren. In diesem Bereich könnte das Drosophilaneurofibromin seine Wirkung entfalten, während die von den RTK Torso und Sevenless vermittelten Signaltransduktionskaskaden offenbar unempfindlich gegen Neurofibromindefizienz sind, obwohl diese Prozesse ebenfalls Ras-abhängig sind. Demgegenüber interferiert der *NF1(-/-)*-Genotyp mit der Wirkung eines Neuropeptids, welches einen G-Protein gekoppelten Rezeptor beansprucht, der die Adenylatzyklase stimuliert. Dies kann aber durch Erhöhung der cAMP-Konzentration (Forskolin, Überexpression von Adenylatzyklase) korrigiert werden (Guo et al. 1997; The et al. 1997). Auch der Zwergwuchs der *NF1(-/-)*-Fliegen ist auf diesem Weg korrigierbar.

Als sekundärer Botenstoff beeinflusst cAMP über PKA die Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die entweder der Gruppe der an cAMP-responsive Sequenzelemente (CRE) bindenden Proteine (CREB) angehören oder mit solchen interagieren. In 4 verschiedenen Systemen, an denen Mechanismen von Lernprozessen molekular analysiert werden können, ist inzwischen die große Bedeutung der cAMP-regulierten Genexpression für solche Lernprozesse, insbesondere für das Langzeitgedächtnis, nachgewiesen worden; es handelt sich um

- die Meeresschnecke *Aplysia*,
- *Drosophila*,
- die Maus und
- die Ratte [Übersicht: Silva et al. (1998)].

Vermutlich übt Neurofibromin auch im ZNS der Säuger einen Teil seiner Funktionen über die Regulation der Aktivierung von Adenylatzyklase aus.

#### 5.2.4.5 Ursachen der variablen Expressivität der NF1

Unter variabler Expressivität ist im strengen Sinn die intrafamiliäre Variabilität der Manifestation eines genetisch bedingten, möglichst monofaktoriellen Merkmals oder Merkmalskomplexes zu verstehen. Die Beschränkung auf intrafamiliäre Variabilität liegt darin begründet, dass interfamiliäre Variabilität genetisch bedingter Merkmale trivial ist, weil stets mit multipler Allelie oder Locusheterogenität zu rechnen ist, also damit, dass in verschiedenen Familien unterschiedliche genetische Ereignisse am gleichen oder einem anderen Genlocus segregieren. Auch variiert der Einfluss des genetischen Hintergrunds interfamiliär in weiteren Grenzen als intrafamiliär. Bei dominant erblichen Krankheiten geht variable Expressivität oft mit unvollständiger Penetranz einher. *NF1* ist exemplarisch für eine Krankheit mit vermutlich vollständiger Penetranz und einem hohen Maß an variabler Expressivität. Im Zusammenhang mit diesem Phänomen wurde oft auf die Rolle des genetischen Hintergrunds hingewiesen, ohne dass konkrete ursächliche Faktoren benannt werden konnten. Fortschritte bei der Identifizierung von Mutationen einerseits und in unserem Verständnis der Regulation der Genexpression andererseits haben Wege zur Diskussion möglicher Ursachen der variablen Expressivität eröffnet, die einer empirischen Überprüfung zugänglich sind.

Eine leicht verständliche Ursache der variablen Expressivität ist das Vorkommen von Mosaiken. Die Konstellation einer segmentalen oder einer milden generalisierten Manifestation bei einem Elternteil und eines vollständigen *NF1*-Krankheitsbilds bei den betroffenen Nachkommen weist auf einen gonadosomatischen Mosaikstatus des Elternteils hin. Der umgekehrte Fall, Mosaik beim Kind eines Betroffenen mit dem vollständigen Krankheitsbild, würde eine postzygotische Rückmutation beim Kind erfordern. Diese außerordentlich seltene Ursache der letzteren Familienkonstellation ist beim Menschen noch nicht nachgewiesen worden (s. auch Kapitel 5.2.1.4 „Varianten“). Die erstgenannte Konstellation ist also ein Beispiel von va-



riabler Expressivität, die in dem bekannten Phänomen des Mosaizismus ihre einfache Erklärung findet.

Eine Reihe von epigenetischen Einflüssen auf die Expressivität setzt deren stochastische Natur voraus, es sei denn, sie würden ihrerseits durch modifizierende Gene (s. unten) beeinflusst werden. Solche Mechanismen können z.B. die Art, die Lokalisation und den ontogenetischen Zeitpunkt von somatischen Zweitereignissen am NF1-Genlocus betreffen. Auch die Möglichkeit der interindividuellen Variabilität der DNA-Methylierung, des mRNA-Editing und vermutlich auch die Variabilität des illegitimen Spleißens sind in diesem Zusammenhang zu berücksichtigen.

Die Entdeckung, dass Tumorsuppressorgene nicht nur durch Mutationen, sondern auch durch Hypermethylierung CpG-reicher Promotorregionen inaktiviert werden können (Jones 1996), hat allgemeines Interesse an der Bedeutung epigenetischer Mechanismen für die Tumorgenese und -progression geweckt (Jones u. Laird 1999). Die Möglichkeit der Aktivierung von Protoonkogenen durch De- oder Hypomethylierung ihrer Promotoren ist ebenfalls in Betracht zu ziehen. Es ist inzwischen an zahlreichen Beispielen gezeigt worden, dass die Kanzerogenese mit einer DNA-Methylierungsimbalance einhergeht; ihre Kennzeichen sind:

- Demethylierung großer Bereiche des Genoms,
  - erhöhte Aktivität der DNA-Methyltransferasen (DNA-MT) und
  - eine Reihe lokaler Hypermethylierungen.
- Letztere wurden z.B. in den Promotoren der Gene folgender Tumorsuppressoren nachgewiesen:
- VHL,
  - Rb,
  - APC,
  - BRCA1,
  - CDKN2A(p16),
  - CDKN2B(p15) und
  - E-Cadherin.

In jedem dieser Fälle führt die Hypermethylierung zur Inaktivierung des Gens [Literatur bei Baylin et al. (1998)]. Das gleichzeitige Vorhandensein inaktivierender Mutationen in dem durch Promotormethylierung reprimierten Allel wurde jeweils weitgehend ausgeschlossen. Hypermethylierung der Promotorregion des Wildtypallels kann also bei konstitutioneller Heterozygotie für eine Defektmutation eines Tumorsuppressorgens das Zweitereignis sein, welches zur vollständigen funktionellen Defizienz führt. Der Schweregrad einer solchen Tumorkrankheit wird also davon abhängen, in

welchem Anteil der Zellen dieses somatische Ereignis eintritt. Obwohl die Repression des NF1-Gens als Zweitereignis in Tumorzellen bei NF1 noch nicht nachgewiesen wurde, sei im Folgenden kurz auf die Ergebnisse von Methylierungsstudien am NF1-Gen hingewiesen.

Methylierungsanalysen am NF1-Gen und seiner Umgebung gingen zuerst von der Frage aus, in welchem Ausmaß die hohe Mutationsrate des 5-Methylcytosins zu dem hohen Anteil sporadischer Fälle unter NF1-Patienten und zum Mutationenspektrum des NF1-Gens beiträgt. Mit Hilfe von Paaren isoschizomerer Restriktionsenzyme, von denen das eine jeweils die methylierte Schnittstelle nicht zu spalten vermag, fanden Rodenhiser et al. (1993) methylierte CpG-Positionen in Exons 28 und 29 sowie innerhalb der bekannten Markersequenzen, welche das NF1-Gen beidseits in Abständen von mehr als 2 Mb flankieren, D17S33 (HHH202) und D17S73 (EW207). Die sehr viel aussagekräftigere Methode der selektiven Konversion von Cytosin zu Uracil mit Bisulfit und anschließender Sequenzierung ermöglichte die genaue Identifizierung der methylierten CpG- und CpNpG-Positionen sowie der <sup>m</sup>Cs außerhalb dieser Vorzugsmotive (Andrews et al. 1996) in Exons 28, 29 und 31. Dabei bestätigte sich die Vermutung, dass die häufig beobachtete Stoppmutation C5839T (R1947X) in Exon 31 auf der Desaminierung von 5-Methylcytosin beruht. Im gegenwärtigen Zusammenhang ist von besonderem Interesse, dass sich in jedem dieser analysierten Exons 1 oder 2 Positionen fanden, deren Methylierungsmuster variierten. Dies kann im Sinn von unterschiedlicher Methylierung der Allele eines Spenders gedeutet werden.

Erst nachdem die Bedeutung der Methylierung regulatorischer Sequenzen für die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erkannt worden war, wurde auch die das NF1-Gen unmittelbar 5'-flankierende Region in die Methylierungsanalyse einbezogen (Mancini et al. 1999). Das grobe Methylierungsmuster ähnelt dem, das auch bei anderen Genen gefunden wurde, in deren Promotorbereich eine CpG-Insel liegt:

- hohe konstitutive Methylierung an CpG- und CpNpG-Motiven und an anderen Cytosinen in einem Segment, das sich von etwa 4 kb bis etwa 250 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunkts erstreckt;
- sehr geringe Methylierung innerhalb der CpG-Insel, die etwa zwischen -250 und -150 bp beginnt und bis über Exon 1 hinausragt;

- hohe konstitutive Methylierung in der kodierenden Region.

Das nicht methylierte Segment enthält ein cAMP-reaktives Element CRE und ein Sp1-Bindungs-motiv GGGCGG (s. Kapitel 5.2.2.2 „Charakteristika des NF1-Gens“). Dies bot die Möglichkeit, den Einfluss der Methylierung auf das Bindungsvermögen dieser Sequenzelemente für Proteine aus Kern-extrakten an methylierten und unmethylierten In-vitro-Konstrukten zu prüfen (Mancini et al. 1999). Es gelang, zu zeigen, dass die Methylierung des CpG im CRE die Proteinbindung vereitelt, während im Fall des Sp1-Motivs, wie erwartet (Clark et al. 1997), die Methylierung beider Cytosine der CpCpG-Sequenz auf dem Gegenstrang für die Hemmung der Proteinbindung erforderlich war (EMSA-Experimente). Damit ist die funktionelle Relevanz der Methylierung derartiger Sequenz-motive in der Promotorregion des NF1-Gens auch in vivo als sehr wahrscheinlich anzusehen. Im Zusammenhang mit der variablen Expressivität bei NF1 ist es nun erneut von Interesse, dass sich nur wenige der CpG-Motive in der konstitutiv methylierten Region als zu 100% methyliert erwiesen. Im distalen Bereich wurden Methylierungshäufigkeiten zwischen 75% und 100% beobachtet, in mehr proximal liegenden Motiven zwischen 86% und 100%. Sehr viel geringer und somit variabler ist das Methylierungsniveau an den einzigen 3 CpG, die in der CpG-Insel nahe ihrem Beginn methyliert gefunden wurden: 16%, 42% und 16%. Es erscheint also durchaus möglich, dass eine interindividuelle Variabilität der Methylierung von Promotor- und/oder Enhancersequenzen hinsichtlich der Häufigkeit und der Verteilung der methylierten Motive zur variablen Expressivität der NF1 beiträgt. Interindividuelle Variabilität des geringen Methylierungsniveaus von CpG-Motiven in der CpG-Insel des CDKN2B-Gens (auch als p15<sup>INK4B</sup> bezeichnet) von Lymphozyten gesunder Personen beobachteten Cameron et al. (1999) im Zug ihrer Untersuchungen zur Inaktivierung dieses Tumorsuppressorgens bei akuten Leukämien.

Ähnliche Erwägungen können über den möglichen Einfluss des mRNA-Editings auf die Menge intakter NF1-mRNA angestellt werden, die in den haploinsuffizienten Zellen [NF1(+/-)] noch verfügbar ist. Wie in Kapitel 5.2.2.4 „Transkriptionsprodukte“ ausgeführt wurde, kann durch modifizierendes Editing (C→U) an der ersten Basenposition des Kodons 1306 ein Stoppkodon in Exon 23-1 entstehen (R1306X). Seine Lage am Beginn der GRD bedingt deren vollständigen funktionellen Verlust,

was durch das Vorkommen dieser Veränderung als Punktmutation bei einer NF1-Patientin zweifelsfrei belegt ist (Skuse et al. 1996; Cappione et al. 1997). Während sich der ursprüngliche Befund erhöhter edierter NF1-mRNA in Tumoren nicht durchgängig bestätigt hat, besteht doch offensichtlich ein Ausmaß an interindividueller und intraindividuel-ler Variabilität ihres Anteils, das die Hypothese eines Beitrags dieses Mechanismus zur variablen Expressivität der NF1 rechtfertigt (Skuse u. Cappione 1997). Die Kenntnis von inneren und äußeren nichtgenetischen Faktoren, die DNA-Methylierung und/oder mRNA-Editing beeinflussen, wären in diesem Zusammenhang von großem Interesse.

Der komplexeste posttranskriptionale Modifikationsprozess primärer Transkripte ist ohne Zweifel das Spleißen. Mehrere unterschiedliche *cis*-wirk-same Sequenzmotive (auch über die 5'- und 3'-Spleißorte und die Verzweigungssequenz hinaus), eine Gruppe kleiner nukleärer RNA-Moleküle (snRNA) und etwa 40 verschiedene Proteine sind am Spleißvorgang beteiligt (Krämer 1996). In einem derartig multifaktoriellen System wird die Auswirkung von Mutationen des für die jeweilige Prä-mRNA kodierenden Gens auf die Art und Anzahl entstehender Spleißprodukte nicht voraussag-bar sein. Ein erstaunlich hoher Anteil der Mutationen des NF1-Gens ist mit Spleißaberrationen verbunden. Das ist nur z.T. durch die große Anzahl vulnerabler Spleißkonsensussequenzen im NF1-Gen bedingt. Mutationen außerhalb dieser Sequenzmotive tragen in erheblichem Ausmaß zur Entstehung aberranter Spleißmuster bei (Ars et al. 2000; Fahsold et al. 2000). Ähnliches ist auch beim ATM-Gen (Ataxia telangiectasia) beobachtet worden (Teraoka et al. 1999). Die Identifizierung solch unerwarteter Spleißstörungen erfordert Analysen auf RNA-Ebene (s. Kapitel 5.2.2.5 „Mutationen“). Bei detaillierter Erfassung der Spleißprodukte erweisen sich viele Spleißmutationen als „leaky“, d.h., sie eliminieren das normale Spleißprodukt nicht vollständig. Dabei ist immer wieder aufgefallen, dass die Anteile an normalen und aberranten Spleißprodukten interindividueller Variabilität unterworfen sind: Träger der gleichen Mutation, seien sie blutsverwandt oder aus verschiedenen Familien, können sehr unterschiedliche Mengen an normal gespleißten Transkripten produzieren. Die Relevanz dieses Phänomens für die variable Expressivität einer genetisch bedingten Krankheit ist zuerst an Spleißmutationen des CFTR-Gens (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) nachgewiesen worden. Bei 2 verschiedenen Spleißmutanten (dem so genannten „5T“-Allel bzw. dem so genann-

ten „3849+10 kb C→T“-Allel) variiert der Anteil an aberrantem Spleißprodukt in weiten Grenzen, und es besteht eine positive Korrelation dieses Anteils mit dem gut messbaren Schweregrad der Störung der Lungenfunktion (Kerem et al. 1997; Chiba-Falek et al. 1998). Fehlerquellen, wie zusätzliche Mutationen an Spleißkonsensussequenzen oder „exon skipping“, wurden jeweils ausgeschlossen.

Ein derartig klarer Nachweis der „leakiness“ von Spleißmutationen als eine der Ursachen variabler Expressivität ist bei NF1 noch nicht erbracht worden. Die steigende Anzahl von pathogenen und nicht pathogenen Spleißaberrationen, die in letzter Zeit an den Transkriptionsprodukten des NF1-Gens beobachtet wurde, berechtigt jedoch zu der Hypothese, dass solche Mechanismen auch bei NF1 eine Rolle spielen (Ars et al. 2000). Chiba-Falek et al. (1998) erweiterten diese Hypothese dahingehend, dass allelische Varianten der Gene, die für Spleißfaktoren z. B. der SR-Familie kodieren, in den Familien mit variabler Expressivität segregieren und die unterschiedliche Spleißeffizienz bei Trägern der gleichen Spleißmutation bedingen. Ein solcher Mechanismus erfüllt die Kriterien für die Wirkung modifizierender Gene.

Die Frage, ob die variable Expressivität bei NF1 als Folge der Wirkung modifizierender Gene verstanden werden kann, ist oft gestellt worden, aber erst Easton et al. (1993) haben sie zum Gegenstand einer umfangreichen Familienstudie gemacht. Geprüft wurde die Voraussage, dass sich im Fall eines wesentlichen Einflusses modifizierender Gene die Korrelation zwischen dem Grad der Ausprägung des Phänotyps der Patienten innerhalb einer Familie mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad verringern sollte. Für die Erhebung der Manifestationsform können entweder

- quantitativ bestimmbare Merkmale oder
- die Alternative „Vorhandensein vs. Fehlen“ eines Merkmals (alternative oder binäre Merkmale) herangezogen werden.

Hinsichtlich der Anzahl von CALF ergaben sich signifikante Korrelationen zwischen monozygoten Zwillingen sowie zwischen Geschwistern bzw. Eltern und Kindern. Bei der Anzahl der Neurofibrome bestand eine hohe Konkordanz zwischen monozygoten Zwillingen und eine sehr viel geringere Korrelation zwischen Verwandten I. Grads. Zwischen dem Modell eines modifizierenden Gens mit additiver Wirkung und einem Modell multifaktorieller Modifikation konnte bei beiden Merkmalen statistisch nicht unterschieden werden. Auch im Fall des Kopfumfangs bestand eine signifikante

Korrelation zwischen eineiigen Zwillingen und Verwandten I. Grads.

Als binäre Merkmale wurden das Vorhandensein bzw. das Fehlen von plexiformen Neurofibromen, Optikusgliomen, Skoliose, Epilepsie und der Notwendigkeit von Sonderschulziehung bestimmt. Die Prävalenz aller dieser Merkmale bei Verwandten von Merkmalsträgern sank mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad, wie es die Wirkung modifizierender genetischer Faktoren erwarten ließ. Jedoch fand sich im Fall der plexiformen Neurofibrome keine nachweisbar familiäre Häufung.

Diese Ergebnisse sind im Sinn der Wirkung nicht mit dem NF1-Gen gekoppelter modifizierender Gene auf die Ausprägung der genannten Merkmale zu deuten. Obwohl die Daten keinen sicheren Rückschluss auf ein bestimmtes genetisches Modell zulassen, bevorzugten die Autoren Mechanismen der polygenen Modifikation (Easton et al. 1993). Da intraindividuell weder eine Korrelation zwischen der Anzahl von Neurofibromen und derjenigen von CALF noch eine solche zwischen diesen Parametern und dem Auftreten der anderen getesteten Merkmale bestand, kann angenommen werden, dass unterschiedliche Gruppen modifizierender Gene in die Ausprägung dieser Merkmale eingreifen.

Eine deutliche Korrelation besteht jedoch bei NF1-Patienten zwischen dem Auftreten eines Optikusglioms und der Entstehung anderer ZNS-Tumoren (Friedman u. Birch 1997). In einer kritischen Stellungnahme zu der Arbeit von Easton et al. (1993) wies Riccardi (1993) darauf hin, dass angesichts der Altersabhängigkeit vieler Symptome von NF1-Patienten, die hohe Konkordanz der eineiigen Zwillinge ganz wesentlich durch ihre exakte Altersgleichheit mitbedingt sein kann. Seine Vorschläge alternativer Erklärungen für diese Daten halten sich z. T. nicht an die strengere Definition des modifizierenden Gens und entbehren der empirischen Grundlage.

Folgende Definition des modifizierenden Gens sei hier vorgeschlagen:

Ein Keimbahngen, von dem es Allele gibt, welche die Expression und/oder die Wirkung eines oder mehrerer Gene quantitativ und/oder qualitativ beeinflussen können, heißt modifizierendes Gen.

Diese Definition bezieht den Einfluss von Varianten des 2. Allels mit ein. Ausgeschlossen sind hingegen:

- komplexe Heterozygotie für 2 Defektallele,
- 2 nichtallelische Gene, deren normale Funktion darin besteht, ein digenes Merkmal zu determinieren (Beispiel: Hh-Locus und AB0-Locus)
- alle Arten modifizierender somatischer Mutationen, es sei denn, sie sind die Folgen des Vorhandenseins von Defektallelen eines Mutatorgens in der Keimbahn.

Wird die Möglichkeit mehrerer modifizierender Gene in diese Definition mit einbezogen, trifft sie auch für die Modifikation durch den genetischen Hintergrund und durch das (genetisch determinierte) Geschlecht zu.

Ein modifizierender Einfluss des genetischen Hintergrunds ist anhand ethnischer Unterschiede der Krankheitsmanifestation zu ermitteln, jedoch bedürfte es des Vergleichs der Ethnien auch unter vertauschten Lebensbedingungen, um die genetische Bedingtheit der Unterschiede zu begründen. Abgesehen von einer geringeren Häufigkeit des Optikusglioms bei negriden NF1-Patienten (Saal et al. 1995; Pletcher et al. 1996) und dem häufigeren Vorkommen von Tierfellnävi bei asiatischen NF1-Patienten sind keine bedeutenderen ethnischen Unterschiede der NF1-Manifestation mitgeteilt worden.

Wenn modifizierende Gene einen großen Anteil an der variablen Expressivität der NF1 haben, sollten sie angesichts der pleiotropen Wirkung der NF1-Gen-Defekte in unterschiedlichen funktionellen Kategorien zu finden sein. Polymorphe Variabilität in der Population mit nicht zu selten vorkommenden grenzwertig hypomorphen Allelen bzw. rezessiven Defektallelen ist eine Voraussetzung für die interindividuelle Variabilität der modifizierenden Wirkung. Viele Gene, die als Modifikatoren von NF1 in Betracht gezogen werden können, sind auf diese Eigenschaft hin (multiallelische polymorphe Variabilität) noch nicht geprüft worden. Bei den folgenden 4 Gruppen von Proteinen besteht eine gewisse Plausibilität dafür, dass ihre genetisch bedingten Variationen modifizierend auf die Manifestation des Krankheitsbilds einwirken können:

- andere positive und negative Wachstumsregulatoren, also die Proteinprodukte von Protoonkogenen und anderen Tumorsuppressorgenen,
- Proteinasen und Proteinaseinhibitoren, insbesondere die Familie der Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren,
- Komponenten der DNA-Reparaturmechanismen: Enzyme der Exzisionsreparaturmechanismen, der Rekombinationsreparatur und der Fehlpaarungsreparatur (mismatch repair: MMR)

- Enzyme des Stoffwechsels der Kleinmoleküle, die mit Neurofibromin regulierend interagieren, wie Phosphatidylinositide, Phosphoinositide und ungesättigte Fettsäuren.

Jede dieser Kategorien bedürfte einer ausführlichen Erörterung ihrer jeweiligen potenziellen oder faktischen Beziehung zum Krankheitsbild der NF1. Dies würde Gegenstand einer eigenen Übersicht sein können. Eine weitere Kategorie potenziell modifizierender Genprodukte, die Komponenten des Ras-vermittelten Signaltransduktionsnetzes, wurde wegen ihrer Vielzahl und der Unterschiedlichkeit ihrer Funktionen nicht genannt, zumal es angesichts der phylogenetischen Konservierung dieser Moleküle wenig wahrscheinlich ist, dass sie einer polymorphen Variabilität unterliegen. Im Folgenden soll beispielhaft nur auf die mögliche Bedeutung von Genen für Komponenten von DNA-Reparaturmechanismen hingewiesen werden.

Seit Swift et al. (1976) die erhöhte Häufigkeit von Neoplasien bei Heterozygoten für ATM-Gen-Defekte entdeckten, ist der Gedanke lebendig geblieben, dass die polymorphe Variabilität von Genen, die für DNA-Reparaturenzyme kodieren, das individuelle Krebsrisiko beeinflusst. Durch die Verfügbarkeit von Methoden der Bestimmung der Reparaturkapazität an Lymphozyten- oder Fibroblastenkulturen ist in der Folgezeit eine Fülle von Belegen für diesen Zusammenhang erbracht worden [Monografie: Vos (1995)]. Es wurde erkannt, dass unter Krebspatienten Personen mit 65–80% der normalen Reparaturkapazität häufiger vorkommen als unter gesunden Probanden. Die genetische Natur dieses Zusammenhangs kommt darin zur Geltung, dass auch bei Blutsverwandten von Krebspatienten häufiger eine reduzierte Reparaturkapazität angetroffen wird als bei nicht verwandten gesunden Personen (Perera 1997; Mohrenweiser u. Jones 1998). Solche epidemiologischen Erkenntnisse waren der Anlass zur Suche nach interindividueller polymorpher Variabilität an bekannten Genloci, wie z.B. den Genen, welche den verschiedenen Komplementationsgruppen von Xeroderma pigmentosum zugrunde liegen. Shen et al. (1998) untersuchten 5 Gene dieser Art (3-mal Exzisions-, 1-mal Rekombinations- und 1-mal Basenexzisionsreparatur) einem Screening auf polymorphe Sequenzvariabilität der kodierenden Regionen und fanden 9 Aminosäuresubstitutionen (Missense-Mutationen) z.T. an konservierten Positionen, von denen 6 als nichtkonservativ und deshalb vermutlich funktionell relevant einzustufen waren. Weiter solche Erhebungen werden im Zusammenhang mit

der funktionellen Charakterisierung der gefundenen Varianten die Tragweite dieser polymorphen Variabilität für das individuelle Krebsrisiko zu erkennen geben. Sollten sich solche Polymorphismen in Reparaturgenen als relevant für das Risiko sporadischer Krebserkrankungen erweisen, steht auch ihre Bedeutung für die variable Expressivität bei hereditären Tumorerkrankungen außer Frage.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Komponenten von DNA-Reparatursystemen ist bei der Gruppe der MMR-Gene, deren Proteinprodukte in die postreplikative Fehlpaarungsreparatur involviert sind, noch kein überzeugendes Beispiel für eine funktionell relevante polymorphe Variabilität gefunden worden. Bekanntlich beruhen etwa 90% der Erkrankungen an dominanten hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinomen (HNPCC) auf inaktivierenden Mutationen eines der beiden MMR-Gene, MLH1 oder MSH2 (Lynch et al. 1999). Ihre Bedeutung als rezessive Mutatorgene wird im Zusammenhang mit NF1 dadurch verdeutlicht, dass das NF1-Gen eines der Zielgene dieser Mutatorwirkung zu sein scheint. Obwohl dem Konzept modifizierender Genwirkung nicht entsprechend, sei dies im Folgenden kurz erläutert.

Ricciardone et al. (1999) und Wang et al. (1999) berichteten über HNPCC-Familien, in denen aus Verwandtenehen homozygote Kinder für eine MLH1-Mutation hervorgingen. Diese entwickelten im frühen Kindesalter verschiedene hämatologische Neoplasien und manifestierten multiple CALF und Neurofibrome. Bei 1 der Kinder waren die NF1-Symptome unilateral ausgeprägt, es hatte also segmentale NF1. Die Autoren zitierten weitere Berichte über HNPCC-Familien mit Kosanguinität und Nachkommen mit der obigen Merkmalskombination, bei denen aber die MMR-Gen-Mutationen nicht identifiziert wurden. Dieser drastische Effekt der homozygoten MLH1-Defizienz auf eine frühe Manifestation der NF1 lässt erwarten, dass geringere Aktivitätsminderungen durch hypomorphe Allele mit polymorphen Häufigkeiten in der Population modifizierend auf die Manifestation der NF1 einwirken könnten.

## 5.2.5 Künstliche Tiermodelle der NF1

### 5.2.5.1 Eigenschaften der Knockout-Mäuse mit Mutationen im NF1-Gen

**Phänotypische Merkmale der heterozygoten Nf1(+/-)-Mäuse.** Nach gezielter Mutagenese embryonaler Stammzellen wurden Mäuse gezüchtet, die wie

NF1-Patienten eine Mutation im NF1-Gen besitzen und im Folgenden kurz als Nf1(+/-)-Mäuse bezeichnet werden. Solche Mäuse sind von 2 Arbeitsgruppen unabhängig voneinander hergestellt worden, wobei Jacks et al. (1994a) den Mausinzuchtstamm 129/sv als Empfänger der Nf1(+/-)-Stammzellen verwendeten und Brannan et al. (1994) Mäuse des Stamms C57Bl/6. Bei den Nf1(+/-)-Mäusen der Arbeitsgruppe von Jacks entsteht eine stabile mutante mRNA, die aber nicht in ein funktionsfähiges Protein translatiert werden kann. Im Gegensatz hierzu ist die mutante mRNA der Nf1(+/-)-Mäuse von Brannan et al. (1994) instabil und kann durch Northern-Blot-Hybridisierungen nicht nachgewiesen werden. Unter den Merkmalen, welche die Nf1(+/-)-Mäuse beider Arbeitsgruppen entwickeln (Tabelle 5.21), ist besonders die erhöhte Inzidenz von Phäochromozytomen und myeloiden Leukämien hervorzuheben. In diesen Neoplasien ist der Verlust des Wildtypallels des NF1-Gens nachgewiesen worden, in Analogie zu Phäochromozytomen und der JMCL bei NF1-Patienten (Kapitel 5.2.4.1 „Formale Aspekte des Tumorsuppressorparadigmas“, Unterkapitel „LOH-, Klonalitätsuntersuchungen und Mutationsanalysen bei NF1-assoziierten Tumoren von NF1-Patienten“, Kapitel 5.2.4.2 „Mechanismen der Tumorgenese bei NF1“, Unterkapitel „Juvenile myeloische Leukämien“). Bemerkenswert ist auch, dass bei 60–70% der Nf1(+/-)-Mäuse Lernschwierigkeiten und Gedächtnisprobleme hinsichtlich der räumlichen Orientierung auftreten (Silva et al. 1997). Durch zu-

Tabelle 5.21. Folgen der gezielten Inaktivierung des NF1-Gens bei heterozygoten Mäusen [Nf1(+/-)]

Nummer	Folgen
1.	5fache Erhöhung der Häufigkeit und frühere Entstehung von Tumoren als beim Wildtyp [Nf1(+/-)] <sup>a</sup>
2.	Signifikant erhöhte Inzidenz von Phäochromozytomen und myeloischer Leukämie
3.	Es fehlen die Kardinalsymptome der NF1: Pigmentierungsanomalien (CALF, LN) und Neurofibrome
4.	Verlangsamtes Erlernen von Aufgaben der Raumorientierung (hidden platform water maze)
5.	Persistierende Astroglia im Gehirn
6.	Vermehrte Anzahl an Astrozyten in der Hippocampusregion CA1, dem Corpus callosum, Gyrus dentatus, Nucleus accumbens, periaquäduktalem Grau und dem Zerebellum

<sup>a</sup> Zu den Tumoren, die auch bei Wildtypmäusen auftreten, zählen Lymphome, Lungenadenokarzinome, Hepatome, Fibrosarkome und lymphoide Leukämien.

sätzliche Übungen können die *Nf1(+/-)*-Mäuse lernen, sich wie die Wildtypmäuse räumlich zu orientieren, ein Hinweis darauf, dass die verringerte Neurofibrominmenge bei diesen Mäusen die Geschwindigkeit des Lernens beeinflusst. Auch bei 30–45% der *NF1*-Patienten sind Lernschwierigkeiten beobachtet worden, die auf einer Verminderung des Intelligenzquotienten, auf visoperzeptuellen Defiziten und eingeschränkter räumlicher Orientierungsfähigkeiten beruhen (Varnhagen et al. 1988; Eldridge et al. 1989; North et al. 1995).

In diesem Zusammenhang sei noch einmal auf die von Gutmann et al. (1999b) und Rizvi et al. (1999) nachgewiesene Astrogliosis im Hippocampus von 60% der Gehirne von *Nf1(+/-)*-Mäusen hingewiesen. Die klassischen *NF1*-Symptome wie Neurofibrome und Pigmentierungsanomalien sind bei den *Nf1(+/-)*-Mäusen nicht zu beobachten, sodass sie nicht als echte *NF1*-Modellorganismen angesehen werden können. Die Untersuchung spezifischer Zelltypen, wie beispielsweise der Schwann-Zellen dieser heterozygoten Mäuse ist jedoch von großem Nutzen (s. Kapitel 5.2.4.2 „Mechanismen der Tumorgenese bei *NF1*“, Unterkapitel „Neurofibrome“ und Kapitel 5.2.5.3 „Untersuchungen zur Funktion des Neurofibromins in spezifischen Zellen der Knockout-Mäuse“).

### 5.2.5.2 Eigenschaften der *Nf1(-/-)*-Mausembryonen

Durch Kreuzung der *Nf1(+/-)*-Mäuse miteinander wurde versucht, Mäuse mit homozygoter Neurofibromindefizienz zu erhalten, jedoch hat der vollständige Neurofibrominverlust das Absterben der Feten zwischen dem Tag E12.5 und dem Tag E14 der Gestation zur Folge. Tabelle 5.22 gibt einen Überblick über die Anomalien, die bei den *Nf1(-/-)*-Embryonen gefunden wurden.

Zu den Ursachen, die zum frühzeitigen Absterben der Embryonen führen, zählen Herzfehlbildungen. Besonders auffällig ist hierbei eine Anomalie, die als „double-outlet-right-ventricle“ (Dorv) bezeichnet wird und auf einer Fehlanordnung der Aorta und der Pulmonalarterie beruht. Bei den *Nf1(-/-)*-Embryonen verlassen beide Gefäße den rechten Ventrikel. Wie Brannan et al. (1994) beschrieben, liegt dem Dorv bei den von dieser Gruppe hergestellten *Nf1(-/-)*-Embryonen ein persistierender Truncus arteriosus zugrunde, dessen Entstehung durch die Neurofibromindefizienz der Neuralleistenzellen bedingt sein könnte, die in den Austrittsbereich des Truncus arteriosus eingewandert sind und dort die Septation des Truncus arteriosus in Aorta und Pulmonalarterie

Tabelle 5.22. Phänotyp der *Nf1(-/-)*-Embryonen

Nummer	Phänotyp
1.	Embryonale Letalität zwischen E12.5 und E14
2.	Generalisiertes Ödem
3.	Ventrikel-Septum-Defekte
4.	Double-outlet right ventricle (Dorv)
5.	Hyperproliferation von Endokardialpolsterzellen des atrioventrikulären Kanals und des ventrikulären Ausflusstrakts
6.	Gestörte Zytoarchitektur des Myokards
7.	Verzögerte Entwicklung der Nieren, Hypoplasie der Leber und der Skelettmuskulatur
8.	Hyperplasie der prä- und paravertebralen Ganglien sowie des Ganglion cervicale superius (SCG) mit erhöhter Zellzahl und Mitoserate. Andere von der Neuralleiste abgeleitete Ganglien, wie dorsale Wurzelganglien, das Trigeminalganglion und das von der Plakode abgeleitete Ganglion nodosum, zeigen normale Zellzahlen (Brannan et al. 1994)
9.	Vergrößerte Dorsalwurzelganglien mit erhöhter Zellzahl bei 50% (Jacks et al. 1994a; Lakkis et al. 1999)
10.	Sensorische und sympathische Neuronen überleben in vitro unabhängig von Neurotrophinen
11.	12,5% zeigen strukturelle Anomalien v.a. des Prosencephalons und Exenzephalie (nur bei weiblichen Embryonen) (Jacks et al. 1994a; Lakkis et al. 1999)
12.	Vermehrte Zellzahl primitiver myeloider Präkursorzellen in der fetalen Leber

steuern (Brannan et al. 1994; Kirby et al. 1983). Die *Nf1(-/-)*-Embryonen von Jacks et al. (1994a) weisen ebenfalls die Anomalie des Dorv auf, die jedoch bei diesen Embryonen nicht mit einem persistierenden Truncus arteriosus einhergeht, sondern auf einer defekten konotrunkalen Rotation der Aorta und der Pulmonalarterie beruht (Lakkis et al. 1998). Der Unterschied könnte durch den verschiedenartigen genetischen Hintergrund (129/sv vs. C57Bl/6) bedingt sein. Dafür spricht auch, dass noch weitere Unterschiede zwischen den homozygot defizienten Embryonen der beiden Knockout-Stämme beobachtet wurden. Während Brannan et al. (1994) keine Veränderungen der Spinalganglien ihrer Knockout-Embryonen bemerkten, bestand eine Hyperplasie derselben bei den *Nf1(-/-)*-Embryonen von Jacks et al. (1994a) (Lakkis et al. 1998). Außerdem zeigten 12,5% der weiblichen *Nf1(-/-)*-Embryonen von Jacks et al. (1994a) schwere kraniale Neuralrohrverschlussdefekte wie Exenzephalie.

Das genaue anatomische Studium der *Nf1(-/-)*- (129/sv)-Embryonen ermöglichte es Lakkis et al. (1999), nachzuweisen, dass Neurofibromin in der

Embryogenese der Maus bei der Differenzierung der Herzklappen eine wichtige Rolle spielt. Die Herzklappen entstehen aus Endokardialzellen, die im Bereich des atrioventrikulären Kanals und des ventrikulären Ausflusstrakts in die extrazelluläre Matrix zwischen Endokard und Myokard am 9. Tag der Gestation einwandern und sich in mesenchymale Zellen umwandeln. Diese mesenchymal transformierten Endokardialpolsterzellen proliferieren und treten danach in eine Differenzierungsphase ein, die auch von Apoptose begleitet ist. Bei *Nf1(-/-)*-Embryonen sind eine gesteigerte, mesenchymale Transformation, Hyperproliferation der Endokardialpolsterzellen bei ausbleibender Differenzierung und Apoptose zu beobachten, wodurch in schweren Fällen sogar der Bluteinstrom in das Herz verhindert wird. Die epithelial-mesenchymale Transformation der Endokardialzellen, ihre Proliferation und Differenzierung sind von der Ras-Aktivität abhängig, und Neurofibromin als negativer Ras-Regulator fungiert als Modulator dieser Prozesse. Die Hyperproliferation der Endokardialzellen ist bei *Nf1(-/-)*-Embryonen bereits am Tag E10.5 nachzuweisen, zu einem Zeitpunkt, an dem noch keine Neuralleistenzellen in die Bereiche der Endokardialpolsterbildung eingewandert sind (Lakkis et al. 1998). Somit ist die Hyperplasie der Endokardialpolster auf eine Neurofibromindefizienz in endothelialen und/oder mesenchymalen Zellen zurückzuführen.

### 5.2.5.3 Untersuchungen zur Funktion des Neurofibromins in spezifischen Zellen der Knockout-Mäuse

Im Folgenden werden die Erkenntnisse zusammengefasst, die durch Experimente mit verschiedenen Zellsorten der *Nf1(-/-)*-Embryonen oder der *Nf1(+/-)*-Tiere gewonnen wurden und für das Verständnis der Funktionen des Neurofibromins von großer Bedeutung sind.

**Astrozyten von *Nf1(+/-)*-Mäusen.** Bei *Nf1(+/-)*-Mäusen ist in den medialen Regionen der periaquäduktalen grauen Substanz und im Bereich des Nucleus accumbens Astrogliose zu beobachten, die durch erhöhte GFAP-Expression gekennzeichnet ist. Normalerweise ist die Aktivierung von Astrozyten eine Folge von Gehirnverletzungen und geht mit neuronaler Degeneration einher. Bei den *Nf1(+/-)*-Mäusen jedoch ist die Astrogliose ein persistierender Prozess, keine Reaktion auf akute Ereignisse. Eine Degeneration von Neuronen konnte bei *Nf1(+/-)*-Mäusen nicht festgestellt werden

(Rizvi et al. 1999). Bei *NF1*-Patienten ist Astrogliose nicht, wie bei den *Nf1(+/-)*-Mäusen, auf bestimmte Gehirnareale beschränkt, sondern in vielen Bereichen des Gehirns zu beobachten (Nordlund et al. 1995). Gutmann et al. (1999b) sahen neben der erhöhten GFAP-Expression in Typ-1-Astrozyten im Gehirn von *Nf1(+/-)*-Mäusen, dass auch die Anzahl der Astrozyten in der Hippocampusregion CA1, im Corpus callosum, im Gyrus dentatus und im Zerebellum im Vergleich zu den Wildtypmäusen erhöht ist. In vitro wachsen zerebrale *Nf1(+/-)*-Astrozyten nur in Gegenwart neuronaler Zellen. Es ist denkbar, dass die Astrozytenproliferation im Gehirn von *Nf1(+/-)*-Mäusen kein zellautonomer Vorgang ist, sondern der Steuerung durch externe Stimuli bedarf. Im Gegensatz zu den *Nf1(+/-)*-Astrozyten zeigen jene der Wildtypmäuse bei Kokultivierung mit neuronalen Zellen keine erhöhte Proliferationsrate. Die Reduktion der Neurofibrominmenge in *Nf1(+/-)*-Astrozyten führt also bei externen Wachstumsstimuli, wie Kontakt zu Neuronen, zu einer gesteigerten Proliferation. Die Rolle des Neurofibromins als eines negativen Wachstumsregulators in Astrozyten wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die Neurofibrominmenge stark ansteigt, wenn die Zellen in Kultur ein konfluentes Stadium erreichen und ihr Wachstum einstellen. Diese Wirkung des Neurofibromins wird offenbar über die Hemmung der Ras-vermittelten Signaltransduktionskaskade ausgeübt, denn die erhöhte Proliferation der *Nf1(+/-)*-Astrozyten in Gegenwart neuronaler Zellen wird durch MEK-Inhibitoren gehemmt (Abb. 5.2). Dabei kommt Neurofibromin in Astrozyten eine sehr spezifische Rolle zu, da es nicht durch ein anderes Ras-GAP wie p120GAP ersetzt werden kann. Hierfür sprechen auch die Beobachtungen an Knockout-Mäusen mit einer Mutation in einem Allel des p120GAP-Gens (*p120GAP(+/-)*), bei denen die Menge an GFAP-immunreaktiven Astrozyten im Gehirn nicht erhöht ist (Henkemeyer et al. 1995; Gutmann et al. 1999b) [Kapitel 5.2.5.4 „Analyse von Doppelmутanten aus *Nf1(+/-)*- u.a. Knockout-Mausstämmen“, Unterkapitel „Knockout-Mäuse mit Mutationen im *NF1*- und *p120GAP*-Gen“].

**Fibroblasten.** Die Untersuchungen von Fibroblasten aus dem Wundbereich verletzter *Nf1(+/-)*-Mäuse zeigen, dass Neurofibromin auch eine Rolle bei der Wundheilung spielt. Dies findet auch darin Bestätigung, dass die Neurofibrominexpression in menschlichen Fibroblasten nach Verletzung der Haut stark erhöht ist (Atit et al. 1999; Ylä-Outinen et al. 1998). Wird die Haut von *Nf1(+/-)*-Mäusen

durch Ausschneiden eines Hautstücks mit Anteilen des darunter liegenden Gewebes verletzt, bilden die Fibroblasten im Wundbereich bei 60% der Tiere vermehrt kollagenreiches Granulationsgewebe, das zudem eine andersartige Struktur aufweist als bei Wildtypmäusen. Dies hat zur Folge, dass die Narben der *Nfl(+/-)*-Mäuse tiefer und größer sind. Außerdem proliferieren *Nfl(+/-)*-Fibroblasten im Wundbereich auch über den Zeitpunkt hinaus, zu welchem die Proliferationsphase im Rahmen der Wundheilung abgeschlossen sein sollte. Auch *in vitro* in Gegenwart von 10% Serum zeigen die *Nfl(+/-)*- und *Nfl(-/-)*-Fibroblasten eine höhere Proliferationsrate als der Wildtyp. Wird dem Kulturmedium (mit 10% Serum) der epidermale Wachstumsfaktor EGF oder konditioniertes Medium aus Kulturüberständen aktivierter Makrophagen zugesetzt, reagieren nur die *Nfl(+/-)*- und die *Nfl(-/-)*-Fibroblasten mit einer erhöhten Proliferationsrate, nicht aber die Fibroblasten der Wildtypmäuse. Fibroblasten aus *Nfl(+/-)*-Mäusen und *Nfl(-/-)*-Embryonen reagieren also durch gesteigerte Proliferation auf den Einfluss von EGF und Zytokinen, die beispielsweise bei Trauma oder Verwundung von aktivierten Makrophagen sezerniert werden. Das Granulationsgewebe im Wundbereich von *Nfl(+/-)*-Mäusen ist besonders kollagenreich. Jedoch kann *in vitro* nur bei *Nfl(-/-)*-Fibroblasten, nicht bei *Nfl(+/-)*-Fibroblasten eine erhöhte Kollagenproduktion nachgewiesen werden. In den *Nfl(-/-)*-Fibroblasten wird die erhöhte Kollagenausscheidung aber nicht durch fehlregulierte Ras-Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, da die Zugabe von Farnesyltransferaseinhibitoren oder des Inhibitors MEKKI (Inhibitor des Raf-MAPK-Signaltransduktionswegs der Ras-Kaskade) die Kollagenablagerung nicht beeinflusst (Atit et al. 1999).

Die vermehrte Bildung von kollagenreichem Granulationsgewebe in den Narben ist sehr wahrscheinlich wie die Hyperproliferation von *Nfl(+/-)*-Fibroblasten durch eine veränderte Reaktion auf Wachstumsfaktoren und Zytokine bedingt, wie sie von Makrophagen sezerniert werden und normalerweise im Wundbett zur Regeneration beitragen. Das Verhalten der Fibroblasten bei der Wundheilung von *Nfl(+/-)*-Mäusen gleicht in gewisser Weise dem der Fibroblasten in Neurofibromen, da auch in diesen Tumoren eine Hyperproliferation von Fibroblasten und eine gesteigerte Kollagensynthese festgestellt wurden (Peltonen et al. 1981, 1986; Uitto et al. 1986; Sasaki et al. 1992).

**Schwann-Zellen.** Die Erkenntnisse, die durch Untersuchungen an SZ von *Nfl(+/-)*-Mäusen bzw. von

*Nfl(-/-)*-Mausembryonen gewonnen wurden, sind bereits in Kapitel 5.2.4.2 „Mechanismen der Tumorgenese bei NF1“, Unterkapitel „Neurofibrome“, unter dem Aspekt der Unterschiede zwischen SZ von NF1-Patienten und solchen gesunder Probanden behandelt worden.

**Hämatopoetische Progenitorzellen.** Die Ras-vermittelte Signaltransduktion spielt bei der Regulation der normalen Granulopoese eine zentrale Rolle. Heterozygote *Nfl(+/-)*-Mäuse entwickeln spontan Leukämien, die der JCML bei Kindern mit NF1 entsprechen. Aus der Leber von *Nfl(-/-)*-Embryonen (E13) lassen sich hämatopoetische Progenitorzellen isolieren, die in Gegenwart von GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) mehr Kolonien bilden als die entsprechenden *Nfl(+/-)*- oder *Nfl(+/+)*-Zellen (s. Kapitel 5.2.4.2 „Mechanismen der Tumorgenese bei NF1“, Unterkapitel „Juvenile myeloische Leukämien“). Diese hypersensitive Reaktion auf GM-CSF haben die *Nfl(-/-)*-myeloiden Progenitorzellen mit den leukämischen Zellen bei JCML gemein (Largaespa-da et al. 1996; Bollag et al. 1996). Auf diesem Hintergrund stellen die Zelllinien der NF1-Knockout-Mäuse ein ideales Modellsystem dar, mit welchem sich die Auswirkungen der Neurofibromindefizienz auf die Signaltransduktionswege untersuchen lassen, die durch GM-CSF u.a. Faktoren reguliert werden. Wichtige Befunde hierzu lieferten die Arbeiten von Zhang et al. (1998b), die den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Koloniebildungsrate myeloider Vorläuferzellen der granulozytären und der monozytären Linie untersuchten. *Nfl(-/-)*-Zellen bilden in Gegenwart von GM-CSF mehr Kolonien als *Nfl(+/-)*- oder *Nfl(+/+)*-Zellen. Der stimulierende Effekt von GM-CSF auf *Nfl(-/-)*-Zellen wird durch die Zugabe von SCF (stem-cell factor), dem Liganden des c-kit-Rezeptors, noch verstärkt. Auch SCF allein zeigt in diesem Versuchsansatz eine stimulierende Wirkung. Da SCF auf frühere Stadien der Progenitorzellpopulation wirkt als GM-CSF, zeigen diese Daten, dass der Verlust des Neurofibromins eine erhöhte wachstumsfaktorstimulierte Proliferation sowohl der frühen Stammzellen als auch der Progenitorzellen der granulozytären und monozytären Reihe bewirkt.

Zhang et al. (1998b) konnten ebenfalls zeigen, dass in der Leber von *Nfl(-/-)*-Embryonen mehr primitive myeloide Präkursorzellen vorliegen als bei *Nfl(+/-)*- oder Wildtypembryonen.

Hämatopoetische Progenitorzellen aus der Leber von *Nfl(-/-)*-Embryonen, die den SCF-Rezeptor



c-kit exprimieren, zeigen eine 3fache Erhöhung der MAPK-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die MAPK-Aktivität kann bei den *Nf1(-/-)*-Zellen durch den Einfluss von SCF und GM-CSF auch wesentlich stärker und nachhaltiger erhöht werden als bei den *Nf1(+/+)*-Zellen. Daraus ist zu folgern, dass durch die Neurofibromindefizienz die Ras-MAPK-Kaskade konstitutiv aktiviert ist und durch Zytokine noch stärker aktiviert werden kann. Durch Inhibitoren der MAP Kinasen kann diese Fehlregulation des Ras-MAP-Kinase-Wegs in *Nf1(-/-)*-Progenitorzellen unterdrückt werden (Zhang et al. 1998b).

**Auswirkungen der Neurofibromindefizienz auf sensorische und sympathische Neuronen.** Sensorische Neuronen der kranialen Ganglien und der Spinalganglien (SG) stammen vom plakodalen Ektoderm bzw. von der Neuralleiste ab. Nach der Proliferationsphase dieser Neuronen setzt die Reifungsphase ein, die mit der Innervation der Zielgewebe einhergeht. Hierbei sterben zahlreiche, evtl. überflüssige oder nicht korrekt innervierende Neuronen ab, wenn der Einfluss exogener Neurotrophine fehlt, die von den Zielgeweben sezerniert werden. Aus den im Folgenden diskutierten Experimenten von Vogel et al. (1995) an Neuronen aus *Nf1(-/-)*-Embryonen geht hervor, dass Neurofibromin während der Ontogenese am Erwerb der Neurotrophinabhängigkeit sensorischer und sympathischer Neuronen beteiligt ist.

Das Überleben von sensorischen Neuronen der Spinalganglien (SG) und des Trigeminalganglions (TG) hängt normalerweise vom Tag E12.5–13.5 an von der Präsenz des NGF ab. SG-Neuronen von *Nf1(-/-)*-Embryonen, isoliert am Tag E13.5, reifen in Kultur und überleben ohne den Einfluss von NGF. Dies ist nur bei einem sehr geringen Anteil der Wildtypneuronen zu beobachten. Vogel et al. (1995) zeigten, dass konditioniertes Medium von *Nf1(-/-)*-SG-Neuronenkulturen keine Faktoren enthält, die den Wildtypneuronen das Überleben ermöglichen könnten. Dieser Befund schließt aus, dass die *Nf1(-/-)*-Neuronen durch autokrine NGF-Produktion *in vitro* überleben. Auch TG-Neuronen von *Nf1(-/-)*-Embryonen, isoliert am Tag E12.5, zu einer Zeit, zu der ihr Überleben von der NGF-Expression in den Zielzellen abhängt, sterben im Gegensatz zu den Wildtypneuronen in Kultur nicht ab, sondern überleben mehrere Tage und bilden Neuriten aus. Dies gilt auch für unreife neurofibromindefiziente TG-Neuronen, die ihre Zielzellen noch nicht erreicht haben. Das neurotrophinunabhängige Überleben der sensorischen

*Nf1(-/-)*-Neuronen ist also nicht mit einer verzögerten Reifung derselben oder mit einer Störung der Innervation von Zielzellen zu erklären. Neuronen des Ganglion nodosum (GN) stammen nicht von der Neuralleiste ab, sondern vom Ektoderm der Plakode. Auch bei diesen Neuronen hängt das Überleben in Kultur, wenn sie am Tag E12.5 isoliert worden sind, von einem Neurotrophin, in diesem Fall von exogenem BDNF ab (brain derived neurotrophic factor). GN-Neuronen der *Nf1(-/-)*-Embryonen überleben ohne BDNF und bilden Neuriten aus. Die Neurofibromindefizienz bewirkt also in Neuronen, die von der Neuralleiste und solchen, die vom plakodalen Ektoderm abstammen, neurotrophinunabhängiges Überleben.

Kulturen unreifer sensorischer Neuronen reagieren nicht auf die Zugabe von Neurotrophinen. Aber in Kulturen aus Neuronen, die während der Innervationsphase isoliert wurden, finden sich Zellen, die auf NGF reagieren. Diese NGF-abhängigen Neuronen aus *Nf1(-/-)*-Embryonen sind 10-mal sensitiver gegenüber NGF als die des Wildtyps (Vogel et al. 1995).

Sympathische Neuronen reifen später in der Embryonalentwicklung als sensorische Neuronen. Vor dem Tag E16 liegen in den superioren zervikalen Ganglien (SCG) von Wildtypembryonen unreife proliferierende Neuronen vor. Da die *Nf1(-/-)*-Embryonen vor der Reifungsphase der SCG-Neuronen sterben, konnten Vogel et al. (1995) nur das Verhalten der unreifen SCG-Neuronen untersuchen. Während SCG-Neuronen der Wildtypembryonen, isoliert am Tag E13.5, ohne Neurotrophine nach 48 h in Kultur größtenteils sterben, bilden gleichaltrige SCG-*Nf1(-/-)*-Neuronen in Kultur Neuriten aus und überleben ohne NGF oder Neurotrophin 3 mehrere Wochen. Auch bei den SCG-Neuronen konnte eine autokrine NGF-Produktion der *Nf1(-/-)*-Zellen ausgeschlossen werden. Brannan et al. (1994) beobachteten bei den *Nf1(-/-)*-Embryonen erhöhte Zellzahlen in paravertebralen und sympathischen Ganglien. In allen diesen Fällen resultiert also die erhöhte Zellzahl aus dem von Neurotrophinen unabhängigen Überleben der Neuronen (Vogel et al. 1995).

Aktiviertes Ras kann die Effekte von Neurotrophinen, also Neuritenbildung und Überleben von Neuronen imitieren, wie an sensorischen Neuronen des Hühnchens gezeigt wurde (Borasio et al. 1989). Neurotrophine, die an die Rezeptorkinase Trk binden, erhöhen den Anteil an Ras-GTP in diesen Neuronen (Ng u. Shooter 1993). Neurofibromin ist also als negativer Ras-Regulator an dem Reifungsprozess beteiligt, der zur Abhängigkeit von Neurotrophinen führt. Interessanterweise

ist hierbei nicht Raf, sondern die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) der wirksame Effektor von Ras. Dies konnten Klesse u. Parada (1998) beweisen, indem sie embryonale SG-Neuronen der Maus mit verschiedenen rekombinanten adenoviralen Expressionsvektoren transfizierten. Diese rekombinanten Adenoviren exprimierten jeweils dominant-negative, konstitutiv aktive oder die Wildtypformen der Kinasen Raf, Mek oder Erk. Keines dieser Konstrukte vermochte das NGF-abhängige Überleben der Wildtypneuronen oder das neurotrophinunabhängige Überleben der *Nf1(-/-)*-Neuronen zu beeinflussen, was zeigt, dass die Differenzierung sensorischer Neuronen nicht über den Raf-Mek-Erk-Weg reguliert wird. Nur die Expression von dominant-negativem Ras in den SG-Neuronen von Wildtypembryonen beeinträchtigte das Überleben der Neuronen trotz Neurotrophingabe in hohem Maß. Dies entspricht der Erwartung, da dominant-negative Ras-Mutanten die allen Ras-Effektor-Interaktionen vorgeschaltete Ras-Aktivierung hemmen. Durch Inhibitoren der PI3K sterben sowohl die Neuronen der *Nf1(-/-)*-Embryonen als auch die des Wildtyps in weniger als 24 h, was die Bedeutung dieses Ras-Effektors für die Signaltransduktionskaskade, die das Überleben von Neuronen steuert, unterstreicht. Aus diesen Untersuchungen an *Nf1(-/-)*-Neuronen geht zweifelsfrei hervor, dass im Zug des durch Ras regulierten Erwerbs der Neurotrophinabhängigkeit hauptsächlich Neurofibromin als negativer Ras-Regulator wirkt.

#### 5.2.5.4 Analyse von Doppelmutanten aus *Nf1(+/-)*- u. a. Knockout-Mausstämmen

**Knockout-Mäuse mit Mutationen im NF1- und im p53-Gen.** Der hohe Anteil von Tumoren mit homozygotem Verlust der Funktion des p53-Gens (Nigro et al. 1989; Hollstein et al. 1994) und die Tatsache, dass auch in malignen Nervenscheidentumoren (MPNST) von NF1-Patienten inaktivierende p53-Gen-Mutationen nachgewiesen worden sind (Menon et al. 1990; Greenblatt et al. 1994; Legius et al. 1994) gaben Anlass, die Bedeutung des Verlusts des p53-Gens für die Tumorgenese bei NF1 an Mäusen zu erforschen, die Defekte im NF1- und im p53-Gen tragen.

Durch die Kreuzung von *Nf1(+/-)*-Mäusen mit *p53(+/-)*-Mäusen wurden doppelt heterozygote Tiere [*Nf1(+/-);p53(+/-)*] oder doppelt homozygot defiziente Embryonen [*Nf1(-/-);p53(-/-)*] gewonnen. Im Voraus sei erwähnt, dass im Gegensatz zu den *Nf1(-/-)*-Embryonen, die Mehrzahl der homozygot *p53*-defizienten Mäuse überleben kann

(Jacks et al. 1994b). Jedoch sterben etwa 20% der *p53(-/-)*-Embryonen an Verschlussfehlbildungen des kranialen Neuralrohrs. Exenzephalie wird bei 15–18% dieser Embryonen beobachtet (Armstrong et al. 1995; Sah et al. 1995). Doppelt homozygote Embryonen mit dem Genotyp *Nf1(-/-);p53(-/-)* sterben während der Embryonalentwicklung und zeigen häufig Exenzephalie (Vogel u. Parada 1998). Die kooperative Wirkung von Defekten des NF1- und des p53-Gens bei der Tumorentwicklung der Maus wurde von Vogel et al. (1999) und Cichowski et al. (1999) eingehend untersucht. Wie in Kapitel 5.2.5.1 „Eigenschaften der Knockout-Mäuse mit Mutationen im NF1-Gen“ angesprochen, entwickeln *Nf1(+/-)*-Mäuse mit 18–28 Monaten vornehmlich Phäochromozytome und myeloide Leukämien. *p53(-/-)*-Mäuse entwickeln im Alter von 6 Monaten v.a. Lymphome und Hämangiosarkome, während *p53(+/-)*-Mäuse mit erhöhter Inzidenz an Osteosarkomen leiden, die sie durchschnittlich im Alter von 9 Monaten manifestieren. Die doppelt heterozygoten Mäuse [*Nf1(+/-);p53(+/-)*], bei welchen die jeweiligen Defektallele auf unterschiedlichen Chromosomen 11 liegen (*trans*-Stellung), zeigen eine verminderte Überlebensrate im Vergleich zu Mäusen mit dem Genotyp *Nf1(+/-);p53(+/+)* oder *Nf1(+/+);p53(+/-)*, überleben aber ein Alter von 10 Monaten und entwickeln solche Tumoren, wie sie auch bei den Mäusen mit jeweils nur einem Defektallel beobachtet wurden. Die Analyse dieser Tumoren im Southern-Blot zeigte den Verlust entweder des Wildtyp-NF1-Allels oder des Wildtyp-p53-Allels. Im Gegensatz hierzu überleben die doppelt heterozygoten Mäuse mit beiden mutanten Allelen auf einem Chromosom 11 (*cis*-Stellung) den 10. Lebensmonat nicht, ihre durchschnittliche Lebenserwartung beträgt nur 5 Monate, und sie entwickeln eine signifikant erhöhte Rate an Weichteilsarkomen (81%), die etwa 2,3-mal höher ist als die Inzidenz dieser Tumoren bei den doppelt heterozygoten Tieren mit *trans*-Stellung der Defektallele. Mindestens 30% der Tumoren der Mäuse mit *cis*-Konfiguration sind S100-positiv und als maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST) einzuordnen. Da in den MPNST der doppelt heterozygoten Mäuse mit *cis*-Stellung der Defektallele der Verlust der Wildtypallele des NF1- und des p53-Gens nachgewiesen werden konnte, legen diese Befunde eine kooperative Wirkung beider Defekte bei der Entstehung von MPNST nahe. Es ist nicht auszuschließen, dass auch ein Teil der doppelt heterozygoten Tiere mit den Defektallelen in *trans*-Stellung an MPNST stirbt. Ihre im Vergleich mit den Tieren mit *cis*-Stellung mehr als

doppelt so lange 50%-Überlebenszeit (Vogel et al. 1999; Cichowski et al. 1999) reflektiert die Seltenheit der hierfür höchstwahrscheinlich notwendigen Kombination von Ereignissen: somatische Rekombination und Verlust des rekombinanten Chromosoms mit den beiden Wildtypallelen.

Auch bei NF1-Patienten ist davon auszugehen, dass die maligne Progression durch p53-Gen-Mutationen ausgelöst werden kann [Kapitel 5.2.4.2 „Mechanismen der Tumorgenese bei NF1“, Unterkapitel „Neurofibrosarkome (MPNST)“]. NF1-Patienten leiden unter einem drastisch erhöhten Risiko, an MPNST zu erkranken, die häufig aus benignen, plexiiformen Neurofibromen entstehen (Riccardi 1992; Woodruff 1999). Somit eignen sich die doppelt heterozygoten  $Nf1(+/-);p53(+/-)$ -Mäuse als ein Modellsystem für die Entwicklung von MPNST.

Die kooperative Wirkung von Defekten des NF1- und des p53-Gens spiegelt sich auch auf anderer Ebene wider. Sympathische Neuronen der superioren zervikalen Ganglien (SCG) aus  $p53(-/-)$ -Embryonen proliferieren stärker und überleben in Kultur ohne Neurotrophine länger als die der Wildtypmäuse oder als Neuronen aus  $p53(+/-)$ -Embryonen. Diese Unterschiede sind nur in einem bestimmten Entwicklungszeitraum zwischen E12.5 und E14.5 festzustellen, danach differieren die Überlebenskurven der Neuronen unterschiedlicher p53-Genotypen nicht mehr. Ab etwa E15–E16 endet normalerweise die Proliferationsphase der SCG, und die Neuronen treten mit ihren peripheren Zielzellen in Kontakt, wobei sie differenzieren und von Neurotrophinen abhängig werden. Wie die sympathischen Neuronen des Wildtyps brauchen die  $p53(-/-)$ -Neuronen NGF, um vollständig morphologisch zu reifen und zu überleben. Die p53-Defizienz steigert die Proliferation von sympathischen Neuronen in einem zeitlich begrenzten Fenster zwischen E12.5 und E16. Diese Effekte wurden bei sensorischen Neuronen nicht beobachtet. Ganz im Gegensatz hierzu reifen sympathische und sensorische Neuronen von  $Nf1(-/-)$ -Embryonen auch morphologisch und überleben mehrere Wochen ohne NGF. Dies ist auch bei SCG-Neuronen doppelt defizienter Embryonen mit dem Genotyp  $Nf1(-/-);p53(-/-)$  zu beobachten, wobei aber im Sinn eines additiven Effekts die Proliferationsrate bei diesen Neuronen noch stärker erhöht ist. Die Embryonen dieses Genotyps sterben wie die  $Nf1(-/-)$ -Embryonen etwa am Tag E13.5, und mehr als 60% zeigen Exenzephalie. Durch die Neurofibromindefizienz wird die Inzidenz von kranialen Neuralrohrverschlussdefekten bei p53-defizienten Mäusen stark erhöht. Die Mu-

tationen des NF1- bzw. p53-Gens zeigen also auch auf homozygot defizientem Hintergrund des jeweils anderen Gens einen kooperativen Effekt (Vogel u. Parada 1998).

#### **Knockout-Mäuse mit Mutationen im NF1- und p120GAP-Gen.**

Ein synergistischer Effekt der Neurofibromin- und der p120GAP-Defizienz bezüglich der Auswirkungen auf den Phänotyp wurde bei Mausembryonen beobachtet, die den Genotyp  $Nf1(-/-);p120GAP(-/-)$  aufweisen. Embryonen, die nur p120GAP-defizient sind, sterben vor dem Tag E10.5 an den Folgen schwerer Anomalien der Organisation und des Migrationsverhaltens endothelialer Zellen. Bis zum 12-Somiten-Stadium sind die  $p120GAP(-/-)$ -Embryonen unauffällig. Im 16-Somiten-Stadium jedoch werden trotz korrekter Verzweigung der intersegmentalen Arterien ungewöhnliche ventrale Verzweigungen der dorsalen Aorta beobachtet, deren Durchmesser darüber hinaus kleiner ist als bei Wildtypembryonen. Zum frühzeitigen Tod dieser Embryonen führen multiple innere Blutungen durch brüchige Gefäße und eine stark eingeschränkte Blutzirkulation. Außerdem sind massive Apoptosis vornehmlich neuronaler Zellen und Verschlussfehlbildungen im Bereich des dorsalen Stammhirns zu beobachten. Embryonen mit dem Genotyp  $Nf1(-/-);p120GAP(-/-)$  sterben bereits am Tag E7.5 und weisen noch schwerere Fehlbildungen auf als die Embryonen, die jeweils nur an einem der beiden Gene homozygot defizient sind. Eine besondere Auffälligkeit, die nur bei den doppelt homozygot mutanten Embryonen auftritt, sind große Areale hyperproliferierender neuronaler Zellen im Neuroepithel des Stammhirns. Die schweren Entwicklungsstörungen der  $Nf1(-/-);p120GAP(-/-)$ -Mäuse, welche bereits bei der Anlage der Somiten auftreten, zeigen, dass der Verlust zweier negativer Ras-Regulatoren massive Störungen in multiplen Organanlagen zur Folge hat. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass p120GAP auch als Effektor von aktiviertem Ras fungieren kann.

Überraschenderweise sind die heterozygoten  $p120GAP(+/-)$ -Mäuse phänotypisch unauffällig und leiden im Gegensatz zu den  $Nf1(+/-)$ -Mäusen nicht unter einem erhöhten Tumorrisiko. Neurofibromin und GAP üben also während der Ontogenese der Maus nichtredundante Funktionen aus (Henkemeyer et al. 1995).

#### **Knockout-Mäuse mit Mutationen des NF1- und c-kit-Rezeptor-Gens.**

Der Einfluss von Mutationen des NF1-Gens auf den Phänotyp von Mäusen mit ho-

mozygot mutantern c-kit-Rezeptor wurde von Ingram et al. (2000) untersucht. Das c-kit-Gen kodiert für eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) vom PDGF-Rezeptor-Typ. Die Wahl des c-kit-Gens für die Konfrontation mit dem NF1-Gen-Defekt der NF1-Knockout-Maus darf insofern besonderes Interesse beanspruchen, als c-kit und sein Ligand, der Steel- oder Stammzellfaktor (SCF) die Entwicklung dreier migratorischer Zellpopulationen steuern:

- primordiale Keimzellen,
- Melanoblasten und
- hämatopoetische Stammzellen.

Bei der Maus sind zahlreiche Allele des c-kit-Gens bekannt, die an Hypopigmentierung zu erkennen sind und unterschiedliche Grade von Anämie, Mastzellhypoplasie und Sterilität verursachen. Defekte des menschlichen c-kit-Gens liegen autosomal-dominanten Pigmentierungsstörungen vom Typ des Piebaldismus zugrunde (s. MIM 164920 und 172800). Die partielle Hypopigmentierung der Mausmutanten am c-kit-Locus trägt die Bezeichnung „dominant white spotting“ und wird durch „W<sup>s</sup>“ symbolisiert. Ingram et al. (2000) verwendeten heterozygote Mäuse mit dem bekannten W-Allel W<sup>41</sup>(W<sup>41</sup>/+), das zu einer partiellen Inaktivierung der c-kit-RTK führt. Die durch Kreuzung mit Nf1(+/-)-Mäusen erhaltenen Mäuse des Genotyps Nf1(+/-);W<sup>41</sup>/W<sup>41</sup> zeigen eine 60–70% stärkere Pigmentierung des Fells im Vergleich zu Mäusen des Genotyps Nf1(+/+);W<sup>41</sup>/W<sup>41</sup>. Diese signifikante Korrektur des Pigmentierungsdefekts der W<sup>41</sup>/W<sup>41</sup>-Mäuse durch Neurofibrominhaploinsuffizienz ist mit der Hypothese vereinbar, dass eine erhöhte Ras-Aktivität an der Entstehung der Pigmentierungsanomalien bei NF1 beteiligt ist (s. Kapitel 5.2.4.4 „Pathogenese der nichtneoplastischen Symptome der NF1“, Unterkapitel „Pigmentierungsanomalien“).

Bei den Nf1(+/-);W<sup>41</sup>/W<sup>41</sup> ist die Anzahl der peritonealen und der kutanen Mastzellen erhöht, und Mastzellen dieser Mäuse reagieren mit stärker als normal erhöhter Proliferation, Klonierungsausbeute und Überlebensrate auf Stimulation mit Steel-Faktor, dem Liganden der c-kit-RTK. Dies ist nicht nur bei Mastzellen der Nf1(+/-);W<sup>41</sup>/W<sup>41</sup>-Mäuse, sondern auch bei Homozygoten für das Wildtypallel der c-kit-RTK zu beobachten. Da die aktivierte c-kit-RTK über die Ras-vermittelte Signaltransduktionskaskade wirkt, sollten diese Effekte der Neurofibrominhaploinsuffizienz auf einer erhöhten Ras-Aktivität beruhen. Tatsächlich kommt es durch Stimulation von Mastzellen der Nf1(+/-);

W<sup>41</sup>/W<sup>41</sup>-Mäuse mit Steel-Faktor zu einer 5-mal höheren Aktivierung der p42MAP-Kinase (Erk2) als bei Mastzellen von Nf1(+/+);W<sup>41</sup>/W<sup>41</sup>-Mäusen. Neurofibrominhaploinsuffizienz wirkt also hinsichtlich der Ras-Aktivierung der bei W<sup>41</sup>/W<sup>41</sup>-Genotyp bestehenden partiellen c-kit-Rezeptor-Defizienz entgegen. An diesem System der Nf1(+/-);W<sup>41</sup>/W<sup>41</sup>-Mäuse wird deutlich, dass Neurofibromin als negativer Regulator von Ras bei der von aktiviertem c-kit ausgelösten Signaltransduktion wirkt. Außerdem lassen diese Befunde vermuten, dass bereits die Haploinsuffizienz des NF1-Gens Konsequenzen in Bezug auf die Eigenschaften bestimmter Zellsorten hat, denn Mastzellen heterozygoter Nf1(+/-)-Mäuse, die keine Mutationen des c-kit-RTK-Gens aufweisen, reagieren aberrant auf Stimulation durch Steel-Faktor. Sie hyperproliferieren, überleben länger und zeigen eine deutliche Erhöhung der MAP-Kinase-Aktivität in Gegenwart des c-kit-Liganden. Da Neurofibrome von NF1-Patienten einen erhöhten Mastzellgehalt haben, könnte deren Fehlregulation durch Haploinsuffizienz des NF1-Gens beim Tumorwachstum eine wichtige Rolle spielen.

Dass Neurofibrominmangel auch zur Entstehung von Lymphomen beitragen kann, geht aus den Versuchen an Mäusen hervor, die N-Ras überexprimieren und eine Mutation des NF1-Gens tragen (Mangues et al. 1998).

### 5.2.5.5 Chimäre Mäuse mit Mutationen im NF1-Gen

Da Nf1(-/-)-Embryonen in utero sterben, wurden chimäre Tiere hergestellt, die es erlauben sollen, die Effekte der vollständigen Neurofibromindefizienz im adulten Organismus zu untersuchen. Zu diesem Zweck sind Nf1(-/-)-embryonale Stammzellen in Blastozysten von Wildtypmäusen injiziert worden (Cichowski et al. 1999). Die daraus resultierenden chimären adulten Tiere konnten in 3 Phänotypkategorien eingeteilt werden. Etwa 20% der untersuchten Tiere, welche den höchsten Anteil an Nf1(-/-)-Zellen aufwiesen, starben im 1. Lebensmonat aus unbekanntem Ursachen. Die beiden Mäuse mit dem Anteil von nur 15% neurofibromindefizienten Zellen hatten keine reduzierte Lebensspanne und wiesen keine pathologischen Veränderungen auf. Die meisten Tiere waren der Kategorie von mittlerem Chimärismusgrad zuzuordnen. Diese Tiere entwickelten häufig Myelodysplasien und progressive neuromotorische Defekte. Ihre Überlebensrate war reduziert und variierte zwischen 2 und 26 Monaten. Alle Tiere dieser Kategorie entwickelten plexiforme Neurofibrome periphe-

rer Nerven oder der Spinalganglien, aber keine subkutanen oder dermalen Neurofibrome. Die plexiformen Neurofibrome dieser Mäuse ähnelten vom histologischen Bild her den entsprechenden menschlichen Tumoren. Der Anteil neurofibromindefizienter Zellen in den plexiformen Neurofibromen erwies sich als sehr hoch. Die Schwann-Zellen dieser Neurofibrome zeigten aber keine S100-Expression, wie sie in Neurofibrom-Schwann-Zellen der NF1-Patienten nachgewiesen werden kann. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass Neurofibromin für die vollständige Differenzierung von Neuralleistenzellen zu S100-positiven Schwann-Zellen benötigt wird. Die Expression des Neurofibromins setzt in Schwann-Zellen während der Mausontogenese bereits 2–3 Tage vor der S100-Expression ein. Die Vorläuferzellen der Neurofibrome bei den chimären Mäusen sind von Anfang an neurofibromindefizient, während die Präkursorzellen der humanen NF1-assoziierten Tumoren heterozygot sind und sich die somatische Mutation, die zur Neurofibromindefizienz führt, wahrscheinlich erst nach dem Einsetzen der S100-Expression ereignet. Dies würde den hohen Prozentsatz S100-positiver Zellen in humanen Neurofibromen erklären. Diese Beobachtungen, dass chimäre Mäuse mit einem moderaten Anteil an neurofibromindefizienten Zellen Neurofibrome entwickeln, nicht aber heterozygote *Nf*(+/-)-Knockout-Mäuse, weisen daraufhin, dass die Mutationsrate des Wildtyp-NF1-Allels der limitierende Schritt bei der Neurofibromentwicklung der *Nf*(+/-)-Mäuse ist. Die Gründe für die geringere Präsenz von *Nf*(-/-)-Schwann-Zellen in heterozygoten Mäusen im Vergleich zu humanen NF1-Patienten sind unbekannt. Mögliche Ursachen sind:

- Unterschiede der Lebensdauer und der Anzahl der peripheren Schwann-Zellen als Targetzellen für somatische Mutationen,
- verschiedene Wachstumseigenschaften der neurofibromindefizienten Zellen oder
- Differenzen der somatischen Mutationsrate.

#### 5.2.5.6 Transgene Mäuse

Nicht nur chimäre Mäuse mit moderaten Anteilen neurofibromindefizienter Zellen, sondern auch transgene Mäuse sind beschrieben worden, die Neurofibrome entwickeln. Durch die Insertion des *tax*-Gens (trans regulatory factor) des humanen T-Zell-lymphotropen Virus Typ 1 (HTLV-1) unter der Kontrolle seines eigenen Promotors in die Keimbahn von CD1-Mäusen wurden transgene Tiere erhalten, die das *tax*-Gen exprimieren und Neu-

rofibrone entwickeln, welche sich in maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST) umwandeln können (Hinrichs et al. 1987). Prädispositionsstellen für die Entstehung dieser Tumoren sind unbehaarte Körperareale sowie das kraniale Nervensystem.

Obwohl diese Tumoren eine ähnliche zelluläre Zusammensetzung aufweisen wie NF1-assoziierte Neurofibrome, sind bei den Neurofibromen der HTLV-*tax*-Mäuse Perineuralzellen die vorherrschende Zellsorte und die Anteile S100-positiver Schwann-Zellen sind nur sehr gering. Bei 68% der transgenen Mäuse wurden auch Tumoren der adrenalen Medulla beobachtet, und etwa die Hälfte der Tiere wies fibroblastische Irläsionen auf. Beide Anomalien sind aber aus histopathologischer Sicht nicht mit den bei NF1-Patienten auftretenden Phäochromozytomen bzw. Lisch-Knötchen vergleichbar (Green et al. 1992).

Die Entstehung der Neurofibrome in diesen HTLV-*tax*-transgenen Mäusen steht mit der Fähigkeit des *tax*-Gen-Produkts in Zusammenhang, an regulatorische Sequenzen im Promotor des NF1-Gens zu binden und das NF1-Gen zu reprimieren, wie dies Feigenbaum et al. (1996) *in vitro* zeigen konnten (s. Kapitel 5.2.2.2 „Charakteristika des NF1-Gens“).

Die stabile Transfektion des *tax*-Gens in die Mauszelllinie NIH3T3 führte zu einer drastischen Reduktion der endogenen Neurofibrominexpression. Jedoch fanden Feigenbaum et al. (1996) auch *in vivo* deutliche Hinweise auf eine negative Regulation der NF1-Gen-Expression durch das *tax*-Protein, da in Trigeminalganglien der HTLV-1-Mäuse die Menge der NF1-mRNA im Vergleich zu den CD1-Wildtypmäusen stark reduziert ist. Trotz dieser Zusammenhänge sind die HTLV-1-Mäuse nur sehr eingeschränkt als Tiermodell für NF1 einzustufen, da das *tax*-Gen-Produkt die Expression multipler Gene beeinflusst, und so die Entstehung der Tumoren in diesen Tieren auch entsprechend komplexe Ursachen haben kann, die nicht oder nur indirekt mit den Ursachen in Zusammenhang gebracht werden können, die zur Entstehung von Tumoren bei NF1-Patienten führen.

### 5.3 Genetische Beratung, Patientenbetreuung und Therapie

#### 5.3.1 Neurofibromatose Typ 1

Für Kinder eines NF1-Patienten besteht in der Regel ein Risiko von 50%, auch an NF1 zu erkranken. Das erstmalige Auftreten von NF1 in einer Familie wirft die Frage nach dem Wiederholungsrisiko auf. Eine kompetente Antwort auf diese Frage setzt das Ergebnis einer gründlichen dermatologischen und ophthalmologischen Untersuchung beider Eltern eines sporadischen Patienten voraus. Erweisen sich die Eltern als frei von jeglicher NF1-Symptomatik, wird in der Regel davon ausgegangen, dass das Risiko eines 2. Kinds für NF1 dem des Bevölkerungsdurchschnitts entspricht, d.h. der Mutationsrate von maximal 1:10 000. Dabei bleiben reine gonadale Mosaik ohne jede somatische Manifestation unberücksichtigt. In welchem Ausmaß das Vorkommen solcher Mosaik das Wiederholungsrisiko gegenüber diesem Basiswert erhöht, ist nicht bekannt. Für die Ermittlung eines empirischen Risikos bedürfte es eines großen Kollektivs sporadischer Patienten und ihrer auf oben beschriebene Weise untersuchten Eltern. Aufgrund der außerordentlichen Seltenheit von Familien mit 2 oder mehr betroffenen Kindern von gesunden Eltern kann davon ausgegangen werden, dass das reine gonadale Mosaik bei NF1 von geringer Bedeutung ist. Findet sich eine geringfügige oder segmentale Ausprägung des Krankheitsbilds bei einem der Eltern, ist das Bestehen eines gonadosomatischen Mosaiks prinzipiell nicht auszuschließen, und der Berater wird von einem erhöhten Risiko ausgehen müssen. Dessen Ausmaß hängt wiederum von einer unbekanntem Größe ab: dem Anteil mutierter Gameten in der Keimbahn. Auch in diesem Fall müsste ein empirisches Risiko angegeben werden, dessen Bestimmung an genügend umfangreichen Stichproben noch aussteht.

Eine pränatale molekulare NF1-Diagnose ist im Prinzip mit fast 100%iger sicherer Aussage möglich, wenn die in der betreffenden Familie segregierende Mutation oder ein mit der Krankheit kosegregierender Markerhaplotyp aus der NF1-Gen-Region schon bekannt sind. Die Verwendung der Kosegregation polymorpher Marker erfordert eine informative Familienkonstellation möglichst mit betroffenen und gesunden Verwandten I. Grads. NF1-Patienten mit Kinderwunsch nehmen – nach bisherigen Erfahrungen – die DNA-Diagnose selten

in Anspruch. Soll sie durchgeführt werden, ist es zweckmäßig, vor Beginn der Schwangerschaft zu ermitteln, ob in der Familie eine informative Konstellation der Markergenotypen besteht. Sowohl die Entscheidung, die pränatale DNA-Diagnose durchführen zu lassen, als auch die Entscheidung für oder gegen einen Schwangerschaftsabbruch ist durch die Unsicherheit der Prognose des Krankheitsverlaufs belastet. Etwa 2/3 der NF1-Patienten bleibt ein schwer beeinträchtigender Krankheitsverlauf erspart; sie können für Jahrzehnte ein weitgehend normales Leben führen. Befragungen haben ergeben, dass die pränatale Diagnose von NF1 anhand bekannter Mutationen häufiger gefordert werden würde, wenn der Krankheitsverlauf aufgrund des Ergebnisses prognostiziert werden könnte (Huson u. Upadhyaya 1994). Dies ist wegen der variablen Expressivität der NF1 ausgeschlossen. Die obigen Entscheidungen werden verständlicherweise auch vom Schweregrad der Erkrankung des betroffenen Elternteils beeinflusst.

Obwohl NF1 bei einem hohen Anteil der Patienten schon im frühen Kindesalter diagnostizierbar ist, besteht ein gewisser Bedarf an postnataler, präsymptomatischer Diagnose. Diese dient dem Zweck, bei positivem Befund die notwendige engmaschige Kontrolle des Krankheitsverlaufs zu gewährleisten und ggf. präventive Maßnahmen einzuleiten. Die Komplikationen der NF1, welche eine solche regelmäßige Konsultation eines erfahrenen Kinderarztes dringend erfordern, sind u.a. die orthopädischen Symptome, plexiforme Neurofibrome und progrediente Optikusgliome. Es gehört zu den Aufgaben des genetischen Beraters, den Familien die Notwendigkeit der engmaschigen Überwachung der Entwicklung betroffener Kinder nahe zu bringen. Dabei sind im Lauf der Zeit andere Fachdisziplinen, wie Neurologie, Orthopädie, Ophthalmologie und Dermatologie, einzubeziehen. Es ist letztlich die Koordination der Behandlung von NF1-Patienten durch Ärzte verschiedener Disziplinen, die allein ihre optimale medizinische Versorgung garantiert. Angeboten wird dies leider noch an zu wenigen deutschen Universitätskliniken in der Form interdisziplinärer NF-Sprechstunden, die von den betroffenen Familien sehr gut angenommen werden (in den USA: NF-clinics).

NF1-Patienten und ihre Angehörigen sind vielfältigen Belastungen ausgesetzt. Die Einstellungen durch multiple diffuse oder durch plexiforme Neurofibrome, die orthopädischen Komplikationen und die mehr oder minder ausgeprägten Lernstörungen und Verhaltensanomalien können ihr Leben überschatten. Hinzukommen die Sorge um

das Schicksal der betroffenen Kinder und die Ängste im Zusammenhang mit der Progredienz der Krankheit und dem Malignitätsrisiko. Der Anblick eines schwer betroffenen NF1-Patienten kann bei jugendlichen Patienten und bei gesunden oder leicht betroffenen Erwachsenen mit betroffenen Kindern eine starke emotionale Belastung auslösen. Dies geschieht oft bei den Treffen der Selbsthilfgruppen. Gerade von den lebendigen und oft sehr tatkräftig geführten Selbsthilfgruppen wird andererseits ein Teil der psychosozialen Bürde, die auf NF-Familien lastet, aufgefangen. Generell sind bei den Neurofibromatosefamilien die psychotherapeutischen Fähigkeiten der genetischen Berater in besonderer Weise gefragt, umso mehr, als sich NF1-Patienten oft von anderen Ärzten im Stich gelassen fühlen. Noch heute wird die Krankheit oft erst im 3. oder 4. Lebensjahrzehnt diagnostiziert.

Die Ziele kausaler Therapien definieren sich von den besonders belastenden Symptomen her:

- Verhinderung des Wachstums der Neurofibrome und der malignen Entartung ihrer plexiformen Varianten;
- Erhaltung der normalen Ultrastruktur der Knorpelsubstanz;
- Erhaltung der normalen Zytoarchitektur der arteriellen Gefäßwände und
- Korrektur der Folgen der Migrations- und Proliferationsanomalien von Neuronen und Astroglia im Gehirn.

Wären alle diese Ziele erreicht, wenn es gelänge, rechtzeitig (d. h. vermutlich perinatal) die intrazelluläre Neurofibrominkonzentration zu korrigieren? Vieles von dem in dieser Übersicht Diskutierten spricht dafür. Dies erfordert keineswegs unbedingt den Ersatz des Defektallels am NF1-Locus durch ein normales Allel in vielen Körperzellen – ein utopischer Ansatz. Vielmehr müsste versucht werden, die Neurofibrominproduktion des normalen Allels hoch zu regulieren oder, posttranslational den Abbau des Neurofibromins zu hemmen (Kaufmann et al. 1999). Hinweise auf eine posttranslationale Regulation des Neurofibrominspiegels wurden in Kapitel 5.2.3.3 „Regulation der NF1-Gen-Expression und der Neurofibrominaktivität“ diskutiert.

Andere mögliche Strategien einer kausalen Therapie der NF1 zielen auf die Verminderung der durch Neurofibrominhaploinsuffizienz erhöhten Ras-Aktivität oder ihrer Folgereaktionen. Farnesyltransferaseinhibitoren (FTI), welche die posttranslationale Prenylierung von Ras und damit ihre Membranverankerung verhindern, üben an neuro-

fibromindefizienten Zelllinien in vitro die erwartete wachstumshemmende Wirkung aus [Übersicht: Weiss et al. (1999)]. Auch durch spezifische Inhibitoren von MEK können in vitro Transformationsparameter von Zelllinien revertiert werden. Schließlich ist auch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) als einer der Ras-Effektoren ein potenzielles Zielmolekül für Inhibitoren gesteigerter Ras-Aktivität. Durch aktivierte PI3K gebildete 3'-phosphorylierte Phosphoinositide aktivieren die antiapoptotisch wirkende Proteinkinase B (auch als Akt bezeichnet). Somit bewirkt eine Hemmung der PI3K eine Aktivierung der Apoptose.

Der Genterapie z. B. durch Korrektur von Punktmutationen oder durch spezifischen Austausch von Defektallelen durch das Wildtypallel stehen bei NF1 erhebliche Schwierigkeiten entgegen. Die Größe des Gens, die Erreichbarkeit großer Anteile der betroffenen Zellpopulationen, die jeweilige zelltypspezifische Einbindung des Neurofibromins in die Ras-Regulation sind nur einige der Hürden, die zu überwinden wären.

### 5.3.2 Neurofibromatose Typ 2

Auch NF2 wird mit nahezu vollständiger Penetranz vererbt; Nachkommen von NF2-Patienten haben ein Risiko von 50%, an NF2 zu erkranken. Eine Einschränkung dieser Regel ist auch hier durch den Mosaikstatus eines leicht oder segmental betroffenen Patienten gegeben, dessen kleineres Risiko, an NF2 erkrankte Kinder zu bekommen, quantitativ nicht abschätzbar ist. Die variable Expressivität ist bei NF2 nicht so extrem ausgeprägt wie bei NF1; es besteht eine größere Ähnlichkeit des Krankheitsverlaufs innerhalb betroffener Familien als interfamiliär. Schweregrad und Manifestationsalter sind also bei der NF2 eher prognostisch ergiebige Faktoren als bei der NF1. Retrospektive Studien zeigen, dass zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens erster Symptome und der Diagnose „NF2“ in der Regel viele Jahre vergehen. Angesichts der infausten Prognose ist dies eine beklagenswerte Situation, die naturgemäß besonders die sporadischen Patienten trifft. Obwohl 98% der NF2-Patienten Vestibularisschwannome bekommen (85% bilateral), macht sich NF2 oft zuerst durch die okulären Anomalien (oft asymptomatisch, aber nachweisbar) oder durch einzelne kutane Schwannome oder (seltener) Neurofibrome bemerkbar. Diese Anzeichen können eine Verdachtsdiagnose auf NF2 im frühen bis mittleren Kindesalter begründen, auf die hin die Überwachung des ZNS

mit leistungsfähigen bildgebenden Verfahren in regelmäßigen Abständen erfolgen sollte. Nur kleine Vestibularisschwannome sind Gehör erhaltend operabel. Bei asymptomatischen spinalen Tumoren ist vor dem Einsatz aggressiver neurochirurgischer Verfahren die Progredienz zu prüfen, da manche dieser Tumoren für lange Zeit asymptomatisch bleiben und mit operativen Eingriffen größerer Schaden angerichtet werden kann. Patienten mit unilateralem sporadischem VS haben eine umso höhere Wahrscheinlichkeit, später an NF2 zu leiden, je jünger sie sind [ungefähr 50% mit 15, ungefähr 2% mit 55 Jahren; Evans et al. (1993)]. Folglich sind auch solche jugendlichen Patienten der engmaschigen Überwachung zuzuführen.

Als Alternative zur klinischen steht die molekulare NF2-Diagnose zur Verfügung, die – wie bei NF1 – aufgrund bekannter Mutation oder informativer Familienkonstellation an polymorphen DNA-Markern mit fast 100%iger Sicherheit durchgeführt werden kann. Die Suche nach der Mutation ist auch bei NF2 noch bei 20–30% der Patienten erfolglos, jedoch sind noch keine Studien bekannt, in denen alle verfügbaren Methoden eingesetzt worden wären. Bei einem durchschnittlichen Sterbealter von 36 Jahren und einer mittleren Überlebenszeit nach der Diagnose von 15 Jahren ist die pränatale Diagnose mit der Option einer Interruption bei NF2 von größerer Bedeutung als bei NF1. Entsprechend werden diese Möglichkeiten von NF2-Patienten und ihren Angehörigen eher in Betracht gezogen. Allgemein ist zu beachten, dass die sachgemäße medizinische Versorgung und Betreuung von NF2-Patienten der Zusammenarbeit von Otolaryngologen, Audiologen, Neurochirurgen und Humangenetikern bedürfen.

## 5.4 Neurofibromatose Typ 2 (NF2)

### 5.4.1 Geschichte

Eine „zentrale“ oder „intrakraniale Form“ der NF wurde kurz vor Beginn des 20. Jahrhunderts von der peripheren Neurofibromatose abgegrenzt, jedoch wurden beide Formen noch für lange Zeit als Varianten der Von-Recklinghausen-Neurofibromatose angesehen. Die Geschichte der Abgrenzung der NF2 von NF1 ist von Ahn et al. (1996) zusammengefasst worden.

Schon 1920 war wiederholt auf die hereditäre Natur der Prädisposition zu „Akustikusneurino-

men“ hingewiesen worden, bei denen es sich in Wirklichkeit um Vestibularisschwannome handelt. Der autosomal-dominante Erbgang der NF2 ergab sich eindeutig aus der Analyse der berühmten 5-Generationen-Familie, über die Gardner u. Frazier (1930) berichteten, nach denen später die leichtere Verlaufsform der NF2 benannt wurde. Das in dieser Familie beobachtete Segregationsverhältnis ließ auf eine hohe Penetranz des Gendefekts schließen. Durch zahlreiche Studien wurde dies in den Folgejahren bestätigt, sodass von Seiten der Formalgenetik eine solide Basis für die Kopplungsanalyse gegeben war. Es waren aber zuerst tumorzytogenetische Untersuchungen, welche die Aufmerksamkeit auf das Chromosom 22 lenkten. Am Anfang stand die Entdeckung des Verlusts eines Chromosoms 22 oder von Teilen seines langen Arms (22q) in etwa 50% der Meningeome (Zang 1982). Dieser erste Nachweis einer definierten Chromosomenanomalie in soliden Tumoren und die häufige Assoziation von Meningeomen mit VS bei der zentralen Form der NF veranlassten Seizinger et al. (1986) zu einer umfangreichen Suche nach LOH für 3 Marker auf 22q und weitere 20 Sequenzpolymorphismen auf 11 anderen Chromosomen an 21 VS. Allelverluste an mindestens 1 der 3 polymorphen Marker des Chromosoms 22 zeigten 7 dieser Tumoren, während solche Verluste auf keinem der anderen Chromosomenarme nachgewiesen werden konnten. Damit war die Kopplungsanalyse auf den langen Arm des Chromosoms 22 verwiesen. Mit Hilfe eines der Marker von 22q, eines BglII-RFLP, bewiesen Rouleau et al. (1987) an einer 5-Generationen-Familie die Kopplung des NF2-Gens mit diesem Marker innerhalb eines Intervalls von 20 cM auf 22q nach. Damit war NF2 als gesonderte genetische Entität etabliert und es konnte mit den Bemühungen um die positionelle Klonierung des NF2-Gens begonnen werden. Dies nahm fast 6 Jahre in Anspruch; die Ergebnisse werden in Kapitel 5.4.3 „Das menschliche NF2-Gen“ besprochen.

### 5.4.2 Krankheitsbild der NF2

Eines der Ziele der Standardisierung der diagnostischen Kriterien für NF1 war es, die früher als „zentrale Neurofibromatose“ bezeichnete NF2 exakt von NF1 abzugrenzen. Es bedurfte deshalb auch der verbindlichen Definition der Kriterien für NF2. Im Gegensatz zu den Bestimmungen, die für NF1 getroffen wurden, wurden bei NF2 die Kriterien für die Diagnose des „vollständigen



Krankheitsbilds“ von solchen für den „Verdacht auf NF2“ unterschieden. Diese beiden Anweisungen der NIH Consensus Conference (1987) sind in der durch Gutmann et al. (1997a) revidierten Form in Tabelle 5.23 aufgeführt.

NF2 (MIM 101000) ist etwa 10-mal seltener als NF1; die Inzidenz liegt bei 1:40000. Das Leitsymptom der NF2 ist das bilaterale Vestibularisschwannom, ein Tumor, der bis zur Festlegung der diagnostischen Kriterien allgemein als Akustikusneurinom bezeichnet wurde. Nicht erst durch die modernen bildgebenden Verfahren ist jedoch erkannt worden, dass dieser Tumor vom vestibulären Zweig des VIII. Hirnnervs ausgeht. Mindestens 85% der NF2-Patienten haben in der 2. Hälfte ihres 3. Lebensjahrzehnts bilaterale Vestibularisschwannome. Werden auch unilaterale VS berücksichtigt, leiden 98% der NF2-Patienten an diesem Tumor.

Wie bei Heterozygotie für einen Tumorsuppressorgendefekt zu erwarten, werden VS bei NF2-Patienten in einem früheren Alter symptomatisch als sporadische unilaterale VS. Nach einer Studie an englischen Patienten (Evans et al. 1992a,b) war das durchschnittliche Alter des Auftretens erster Symptome 21,6 Jahre, das der Diagnose NF2 27 Jahre, während die sporadischen Tumoren erst nach der 4. Lebensdekade diagnostiziert wurden. Die Symptome sind:

- sensorineuraler Hörverlust mit Tinnitus und/oder Vertigo, bedingt durch Druck auf den N. vestibulo-cochlearis,
- Gangunsicherheit in Folge von Gleichgewichtsstörungen.

Größere VS können auch den N. facialis in Mitleidenschaft ziehen, wodurch es zu

- veränderter Sensorik,
- Verzerrungen und Schwäche der Gesichtsmuskulatur kommt.

VS von NF2-Patienten unterscheiden sich oft morphologisch von sporadischen VS durch ihre lobuläre Struktur und durch in den Tumor einbezogene Nervenfasern. Die VS von NF2-Patienten, wie auch die sporadischen VS, bilden sich bevorzugt am inneren Gehörgang (Meatus acusticus internus). Ihre Wachstumsgeschwindigkeit variiert sowohl intra- als auch interindividuell erheblich. Dies erfordert eine lückenlose Kontrolle des Krankheitsverlaufs. Mit Ausnahme des ersten kranialen Nervs können Schwannome bei NF2 an allen kranialen und peripheren Nerven entstehen. Die erhöhte Proliferationstendenz der Schwann-Zellen bei NF2 äußert sich in dem Phänomen der Schwannosis, worunter multiple, lokale Verdickun-

**Tabelle 5.23.** Die von Gutmann et al. (1997a) revidierten diagnostischen Kriterien für Neurofibromatose Typ 2 (NF2) der NIH Consensus Development Conference (1987) und für die Verdachtsdiagnose auf NF2

*Die Diagnose der NF2 ist zu stellen, wenn ein Patient Folgendes aufweist*

- Bilaterale vestibuläre Schwannome (VS) dargestellt durch entsprechende bildgebende Verfahren wie CT bzw. NMR mit Gadoliniumkontrast oder
- Einen Verwandten I. Grads mit NF2 und ein unilaterales VS im Alter <30 Jahre oder zwei der folgenden Kennzeichen: Meningeom, Gliom, Schwannom, juvenile posteriore subkapsuläre Linsentrübungen/juvenile kortikale Katarakt

*Verdacht auf NF2 besteht bei Personen mit den folgenden klinischen Kennzeichen*

- Unilaterales VS im Alter <30 Jahre und mindestens 1 der folgenden Zeichen: Meningeom, Gliom, Schwannom, juvenile posteriore subkapsuläre Linsentrübungen/juvenile kortikale Katarakt
- Multiple Meningeome (2 oder mehr) und unilaterales VS im Alter von <30 Jahre oder eines der folgenden Zeichen: Gliom, Schwannom, juvenile posteriore subkapsuläre Linsentrübungen/juvenile kortikale Katarakt

gen peripherer Nervenfasern zu verstehen sind, hinter denen sich lokale, mikroskopische Ansammlungen von Schwann-Zellen verbergen.

Für lange Zeit unbeachtet blieben bei NF2 die multiplen spinalen Tumoren, die nach einer Studie von Mautner et al. (1995) bei 89% (76/85) der Patienten nachgewiesen wurden. Parry et al. (1994) sahen spinale Tumoren bei 75% derjenigen Patienten, bei denen alle 3 Segmente der Wirbelsäule untersucht wurden; die durchschnittliche Anzahl pro Patient lag bei 8. Es handelt sich um Schwannome, Ependynome, Meningeome und Neurofibrome. Diese Tumoren tragen wesentlich zur Morbidität und Mortalität der NF2 bei (Mautner et al. 1996a).

Auch bei den multiplen kranialen und spinalen Meningeomen der NF2-Patienten sind Erkrankungs- und Diagnosealter gegenüber denen der sporadischen Meningeome zu jüngeren Jahren verschoben. Die von diesen in der Regel benignen Tumoren verursachte Symptomatik reicht – je nach Lokalisation – von allgemeiner Schwäche, Krämpfen, sensorischen Störungen bis zu Gedächtnisstörungen und Persönlichkeitsveränderungen. Spinale Meningeome können Parästhesien, Schwächegefühl in den Beinen und Miktionsstörungen hervorrufen. Mindestens 50% der NF2-Patienten ha-

ben Meningeome (Evans et al. 1992b; Parry et al. 1994). Gelegentlich ist auch der N. opticus von einem Meningeom befallen, was im Zusammenhang mit den kutanen Manifestationen der NF2 (s. unten) zur Fehldiagnose „NF1“ Anlass geben kann, wenn der Tumor irrtümlich als Optikusgliom gedeutet wird.

Eine seltenere Komplikation der NF2 entsteht durch Tumoren der zentralen Glia (Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependynome), von denen die Ependynome mit bis zu 75% den größten Anteil stellen. Auch diese Tumoren treten meistens multipel auf und befallen vorrangig das Rückenmark intramedullär. An die oben erwähnte periphere Schwannosis erinnern die Mikrohamartome der zentralen Glia, die bei einem hohen Anteil der NF2-Patienten im zerebralen Kortex und intramedullär im Hinterhorn liegen. Sie bestehen aus atypischen Zellen vermutlich astrozytischen Ursprungs und fungieren nicht als präneoplastische Läsionen (Wiestler et al. 1989).

Dass sich ein Teil der spinalen Tumoren bei NF2 als Neurofibrome erweist, deutet auf eine unscharfe Abgrenzung der beiden Formen der NF hin. Eine stärker ausgeprägte Überlappung der Symptomatik von NF2 und NF1 wird an den Hautmanifestationen erkennbar. Werden die von Evans et al. (1992a,b) und von Parry et al. (1994) untersuchten Patientenkollektive vereinigt, hatten 72 von 161 NF2-Patienten CALF (44,7%); das diagnostische NF1-Kriterium von mindestens 6 CALF erreichten allerdings nur 2 dieser Patienten (1-mal 6, 1-mal 8). Die Häufigkeit von CALF bei Personen ohne tastbare Tumoren wurde von Crowe u. Schull (1953) an mehr als 6800 Personen zu 10,1% bestimmt. Zwar unterscheiden sich die CALF der NF2-Patienten dadurch von denen der NF1-Patienten, dass die Anzahl von Melaninmakroglobuli in den Melanozyten nicht erhöht ist (Martuza et al. 1985), doch ist bei NF1 und NF2 offenbar die gleiche Zielzelle betroffen, epidermale Melanozyten, und die Anzahl der Personen mit 1 oder mehr CALF ist bei NF2-Patienten um den Faktor 4,4, die der Personen mit mehr als 3 CALF auf das 28fache erhöht. So scheinen die beiden Gene, wenn auch auf unterschiedliche Weise, am Zustandekommen dieser Pigmentierungsanomalien beteiligt zu sein. Gesprenkelte Hyperpigmentierung in feuchtwarmen Hautfalten ist bei NF2 nicht beobachtet worden; Lisch-Knötchen der Iris sind bei NF2-Patienten eine Seltenheit. Diese Unterschiede lassen ebenfalls eine gewisse Spezifität der Auswirkungen von NF1- und NF2-Gen-Mutationen auf Pigmentierungsmechanismen erkennen.

Multiple Hauttumoren sind die andere Form der Hautmanifestationen der NF2. Die abermalige Zusammenfassung der beiden oben genannten Studien ergibt, dass Hauttumoren bei 110 von 162 Patienten auftraten (67,9%), mit durchschnittlich 7–8 Tumoren pro Patient. Mautner et al. (1997) beobachteten Hauttumoren bei 52 von 88 NF2-Patienten (59,1%) und fanden im Mittel 8–9 Tumoren pro Patient. Die höchste Anzahl von Hauttumoren, die in diesen 3 Studien bei einem Patient gezählt wurden, war 38. Das Vorhandensein und die Anzahl von Hauttumoren waren mit dem Schweregrad des Krankheitsbilds korreliert, wobei die Anzahl der von VS verschiedenen intrakraniellen ( $\geq 2$ : schwer betroffen) und spinalen Tumoren ( $\geq 4$ : schwer betroffen) zur Klassifizierung diente (Mautner et al. 1997). Hiernach hatten 24% der leicht und 71% der schwer betroffenen NF2-Patienten Hauttumoren. Die große Mehrzahl derselben sind kapselbegrenzte Schwannome. Bis zu 20% der Hauttumoren haben das äußere Erscheinungsbild typischer kutaner Neurofibrome (Evans et al. 1992b). Histopathologisch wurde dies an einem Anteil der Tumoren bestätigt (Parry et al. 1994). In einer Serie von 29 typisierten Hauttumoren der NF2-Patienten erwiesen sich 5 als Neurofibrome und 2 als gemischte Tumoren mit Anteilen von Schwannom- und Neurofibromgewebe. Eine gewisse Überschneidung der Symptomatik von NF1 und NF2 besteht also nicht nur im Bereich der Pigmentierungsanomalien, sondern auch in dem der spinalen und kutanen Tumoren.

Das gilt in geringerem Ausmaß auch für die okulären Anomalien, auch wenn die vereinzelt Beobachtungen von wenigen Lisch-Knötchen bei NF2-Patienten außer acht gelassen werden. In 2 Studien hatten insgesamt 94 von 107 NF2-Patienten okuläre Anomalien, in manchen Fällen waren diese die Erstmanifestation der Krankheit (Parry et al. 1994; Ragge et al. 1995). Linsentrübungen und Retinahamartome stellen den größten Anteil der Augensymptome; darüber hinaus kann es durch epiretinale Membranen, Gliome der Fovea oder durch Meningeome am N. opticus zu Beeinträchtigungen des Visus kommen. Die Linsentrübungen sind von dreierlei Art:

- posteriore subkapsuläre Katarakt,
- kapsuläre Katarakt und
- kortikale Katarakt.

Diese 3 Formen der Katarakt können auch in Kombination miteinander vorkommen. Die Hamartome der Retina können von der Retina selbst oder vom Pigmentepithel ausgehen. Sie ähneln denen, die bei NF1 oder bei der tuberösen Sklerose

(TSC) beobachtet werden, erreichen aber nicht das für Letztere charakteristische Stadium der Maulbeertumoren. NF2-Patienten mit Retinahamartomen zeigen in der Regel eine früh manifestierende, schwere Verlaufsform der Krankheit.

Als weitere Anomalien, die im Symptomenspektrum der NF2 angetroffen werden, sind zu nennen:

- Meningeangiomatose, manifestierend in Form lokaler Herde begrenzter Hyperproliferation von Meningeothelzellen mit variabler Gefäßbeteiligung, als isolierte Läsionen oder räumlich assoziiert mit Meningeomen oder Gliohamartomen.

Louis et al. (1995) sahen in diesen hamartösen benignen Wucherungen den Ausdruck einer erhöhten Proliferationstendenz der Meningeothelzellen infolge der Heterozygotie für Defektmutationen des NF2-Gens.

- Kalziumablagerungen im Gehirn, die denen ähneln, welche bei TSC regelmäßig beobachtet werden. Zu Tumoren oder hamartösen Veränderungen besteht keine Korrelation.
- Kombiniert sensorische und motorische periphere Neuropathie der distalen Extremitäten, wie sie gelegentlich auch bei NF1 gefunden wird. Diese Komplikation steht vermutlich in einem ursächlichen Zusammenhang mit der oben beschriebenen Schwannosis.

### 5.4.3 Das menschliche NF2-Gen

Durch Kopplungsstudien wurde das NF2-Gen auf Chromosom 22 lokalisiert (Rouleau et al. 1987). Hierfür sprachen auch der häufig zu beobachtende Verlust von Chromosom 22 oder die partielle Deletion dieses Chromosoms in Meningeomen und Schwannomen (Seizinger et al. 1986, 1987c; Dumanski et al. 1987). Segregationsstudien in betroffenen Familien und die Analyse von NF2-Patienten mit Deletionen der NF2-Gen-Region ermöglichten eine Eingrenzung der Kandidatenregion und danach die positionelle Klonierung des NF2-Gens (Trofatter et al. 1993; Rouleau et al. 1993). Mittlerweile sind zahlreiche Mutationen dieses Gens bei NF2-Patienten (s. Kapitel 5.4.4.1 „Mutationenspektrum des NF2-Gens“) und als somatische Defekte in sporadischen Tumoren beschrieben worden.

Das NF2-Gen liegt im Bereich der Bande 22q12.2 zwischen dem NEFH- (NEFH: neurofilament heavy subunit) und dem MTMR3-Gen (MTMR3: myotubularin related protein 3). Es wird in Richtung 22cen → 22qter transkribiert. Die abge-

leitete Proteinsequenz zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu den Proteinen Ezrin, Radixin und Moesin (ERM-Proteine), was dazu veranlasste, das NF2-Protein als Merlin zu bezeichnen (*moesin ezrin radixin like protein*) (Abb. 5.6, 5.7). In der Literatur wird für das NF2-Protein auch der Name Schwannomin verwendet, da der Funktionsverlust zur Entstehung von Schwannomen führt und Vestibularisschwannome die charakteristischen Tumoren der NF2 sind.

Auf genomischer Ebene überspannt es etwa 120 kb und kodiert für einen Leserahmen von 1785 Nukleotiden, gerechnet vom Translationsstart bis

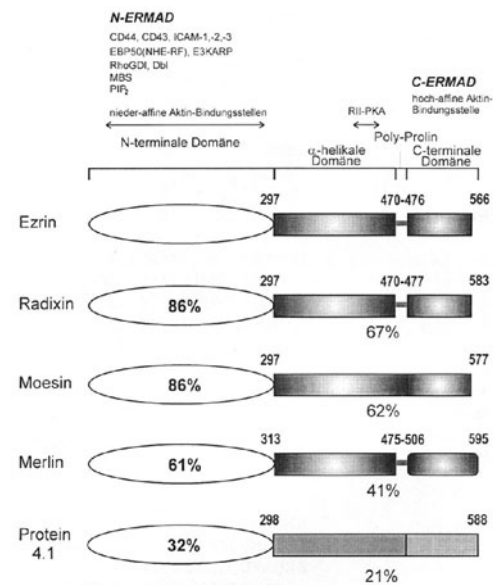
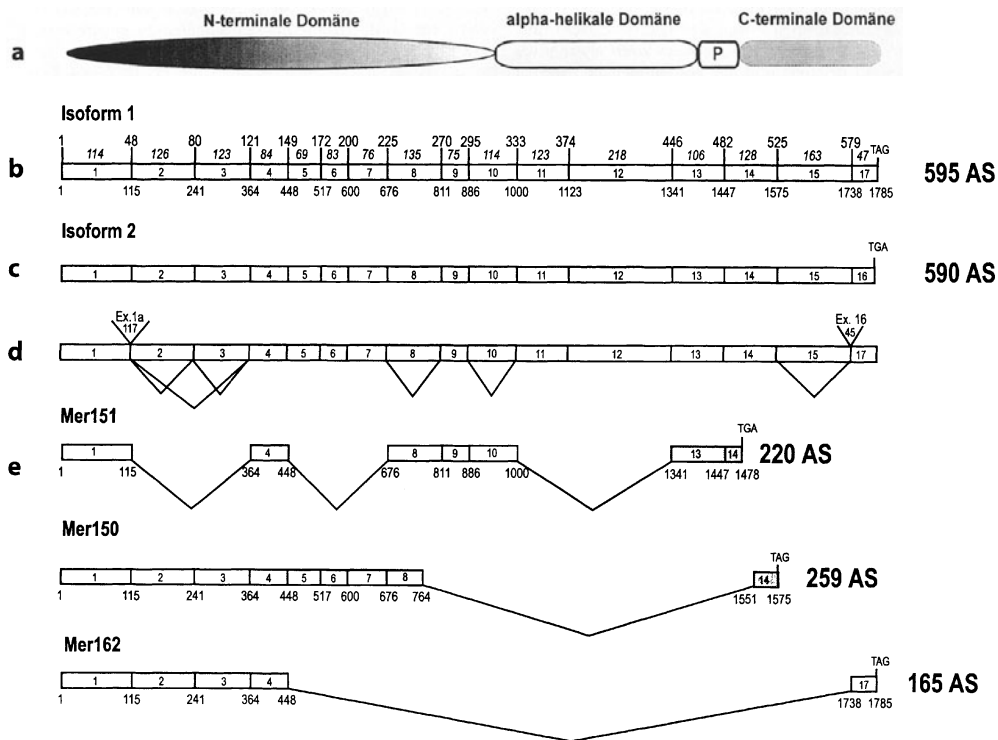


Abb. 5.6. Vergleich der Mitglieder der ERM-Familie, Ezrin, Radixin und Moesin, mit Merlin und dem Bande-4.1-Protein. Bei den ERM-Proteinen und Merlin können eine globuläre N-terminale Domäne, eine  $\alpha$ -helikale und eine C-terminale Domäne unterschieden werden. Ein Abschnitt mit mehreren Prolinresten trennt die  $\alpha$ -helikale von der C-terminalen Domäne bei Ezrin, Radixin und Merlin. Im Bereich der N-terminalen Assoziationsdomäne (N-ERMAD) binden verschiedene Interaktionspartner der ERM-Proteine, wie CD44, CD43, ICAM-1, -2, -3, MBS (Myosin bindende Untereinheit der Myosinphosphatase), PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) usw. Ezrin weist im  $\alpha$ -helikalen Bereich eine Bindungsstelle für die RII-Untereinheit der Proteinkinase A auf. In der C-terminalen Domäne (C-ERMAD) liegt die hochaffine Aktinbindungsstelle der ERM-Proteine. Bei der Angabe der Länge der jeweiligen Proteine wurde auch das Methionin in Position 1 berücksichtigt, obwohl es bei Ezrin und Moesin posttranslational abgespalten wird. Die Aminosäuresequenzidentität in Bezug auf Ezrin ist für die N-terminale Domäne und den Rest des Proteins in % angegeben

Radixin	-----MKKPINVRVTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKTVGLREVW	43
Moesin	-----MKPTISVRVTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKTIGLREVW	43
Ezrin	-----MKKPINVRVTMDAELEFAIQPNTTGKQLFDQVVKTIGLREVW	43
Merlin	MAGAIASRMSFSSLRKQEKFTFIVRIVTMDAEMEFNCEMKWKGDLEFDLVCRTLGLRETW	60
Radixin	FFGLQYVDKGYSTWIKLNNKVTQDDVKKENLQFKFRAKFFPEDVSEELIQEITQRLEF	103
Moesin	FFGLQYQDTKGFSTWIKLNNKVTQDDVRKESPLLKFRAKFYPEDVSEELIQDITQRLEF	103
Ezrin	YFGLHYVDNKGFPFTWIKLDDKVSQAQEVVRKENLQFKFRAKFYPEDVAEELIQDITQKLEF	103
Merlin	FFGLQYT-IKDTVAWLKMDKKVLDHDSKEEVPVTFHFLAKFYPENAEELVQBITQHLEF	119
	$\uparrow$ $\uparrow$ $\uparrow$ $\uparrow$ (M/S, nk) S P (U, nk) V (I, k) G (S, nk)	
Radixin	LQVKEALLNDEIYCPEPETAVLLASYAVQAKYGDYNKEIHKPGYLANDRLLPQRVLEQHKL	163
Moesin	LQVKEGILNDDIYCPEPETAVLLASYAVQSKYGFNKEVHKSGYLAGDKLLPQRVLEQHKL	163
Ezrin	LQVKEGILSDEIYCPEPETAVLLGSYAVQAKFGDYNKEVHKSGYLSSEERLIPQRVMDQHKL	163
Merlin	LQVKKQILLDEKIYCPEASVLLASYAVQAKYGDYDPSVHKRGFLAQEELLPKRVINLYQM	179
	$\uparrow$ P (U, nk)	
Radixin	TKEQWEERIQNWHEEHRGMLREDSMMEYLKIAQDLEMYGVNYFEIKNKKGTLEWLGVDAI	223
Moesin	NKDQWEERIQVWHEEHRGMLREDAVLEYLKIAQDLEMYGVNYFSIKNKKGSELWLGVDAI	223
Ezrin	TRDQWEDRIQVWHAHEHRGMLKDNAMLEYLKIAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGVDAI	223
Merlin	TPMEWEEIRITAWYAEHRGRARDEAEMEYLKIAQDLEMYGVNYFAIRNKKGTLELLGVDAI	239
	$\uparrow$ $\uparrow$ ungleich Y (M, nk) gleich R (S, nk)	
Radixin	GLNIYEHDDKLTPKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVYAPRLRINKRIILAL	283
Moesin	GLNIYEONDRLTPKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVYAPRLRINKRIILAL	283
Ezrin	GLNIYEKDDKLTPKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKKAPDFVYAPRLRINKRIILQL	283
Merlin	GLHIYDPENRLTPKISFPWNEIRNISYSDKETFIKPLDKKIDVFKFNSSKLRVYNKLLQL	299
Radixin	CMGNHELYMRRRKPDTIEVQOMKAQAREEKHKQKLERAQLENEKKKREIAEKEKERIERE	343
Moesin	CMGNHELYMRRRKPDTIEVQOMKAQAREEKHKQKQMERAMLENEKKKREMAEKEKEKIERE	343
Ezrin	CMGNHELYMRRRKPDTIEVQOMKAQAREEKHKQKLERQOLETEKKRRETVEREKEQMRE	343
Merlin	CIGNHDLFMRRRKADSLVQOMKAQAREEKARKQMERQRLAREKQMRREEAERTDELER-	358
	$\uparrow$ $\uparrow$ (U, nk) W/F (U, k) M (S, nk)	
Radixin	KEELMERLQKIEEQTIKAQKELEEQTRKALELDQERKRAKEEAERLEKERRAAEBAKSAI	403
Moesin	KEELMERLQKIEEQTKKAQKELEEQTRRALELEQERKRAQSEAEKLAKERQEAEEAKEAL	403
Ezrin	KEELMLRLQDYEEKTKKAERELSEQIQRALQLEERKRAQEEAERLEADRMAALRAKEEL	403
Merlin	-----R-ILQMKEEATMANEALMRSEETADLLAEKAQITEEEAKLQAQKAAEAQEMQRI	412
	$\uparrow$ gleich P/P (M, nk)	
Radixin	AKQAADQMKNQEQLAELAEFTAKIALLEAKKKKEEAATEWQHKAFAAQEDLEKTKEEL	463
Moesin	LQASRDQKKTQEQLALEMAELTARISQLEMARQKKESEAVEWQKQAMVQEDLEKTRAEL	463
Ezrin	ERQAVDQIKSQEQLAELAEYTAKIALLEEARRRKEDVEEWQHRAKEAQDDLKVTKEEL	463
Merlin	KATAIRTEEEKRLMEQKVLAEVLAALKMAEESERRAKEADQLKQDLQEAAREARRAKQKL	472
	$\uparrow$ $\uparrow$ E (M, k) C (M, nk)	
Radixin	KTVMASPPPPPP---PPVPIPTENEHDEHDENNAEASAELSNEGVMNHRSEEERTVETQK	520
Moesin	KTAMSTP-----HVAEPAENEQDEQDENGAEASADLRADAMAKDRSEERTTEAEK	514
Ezrin	HLVMTAPPPPPPVYEPVSYHVQESLQDEGAEPYSAELSSSEGRDRNEEKRIITEAEK	523
Merlin	LEIATKPTYPMPN-FIPAPLPDIPSFNLIGDLSLDFDKDTDMKRLSMEIEKEKVEYMEK	531
	$\uparrow$ P (M, nk)	
Radixin	NERVKKIQALSSLELAQARDETKKTONDVLHAEN-VKAGRDKYKTLRQIRQGNTKQRIDE	579
Moesin	NERVQKHLKALTSELANARDESKKTANDMIHAEN-MRLGRDKYKTLRQIRQGNTKQRIDE	573
Ezrin	NERVQRLVTLSSLELSQARDENKRTHNDIIHNEN-MRQGRDKYKTLRQIRQGNTKQRIDE	582
Merlin	SKHLQQLNEIKTEIEALKKERETALDILHNENSDRGSSKHNTIKKLTLOSAKSRVAF	591
	$\uparrow$ $\uparrow$ $\uparrow$ P (M) P (I, nk) gleich	
	$\uparrow$ H (M/U, nk)	
Radixin	FEAM	583
Moesin	FEEM	577
Ezrin	FEAL	586
Merlin	FEEL	595

◀ **Abb. 5.7.** Vergleich der Aminosäuresequenzen von Merlin (Protein Information Ressource Accession no. S33809), Ezrin (A34400), Moesin (A41289) und Radixin (A46127), *graue Unterlegungen* Aminosäuren, die bei allen MERM-Proteinen konserviert sind, *schwarze Pfeilspitzen* Positionen der Missense-Mutationen ( $n=20$ ) in der Aminosäuresequenz des Merlins, unter diesen sind die durch den Austausch kodierten Aminosäuren angegeben. In den *Klammern* neben den Symbolen der durch die Mutation kodierten Aminosäuren sind Angaben zum Schweregrad der NF2 vermerkt, *M* milder Phänotyp, *I* intermediär, *S* schwer, *U* unbekannt. In den Klammern ist auch die Art des Aminosäureaustausches angegeben, *k* konservativ, *nk* nichtkonservativ. Bei 4 Missense-Mutationen wurde die allelische Expression erhoben; diese sind durch die Vermerke „gleich“ (gleiche Expression des mutanten und des Wildtypallels) und „ungleich“ (verringerte Expression des mutanten Allels gemessen auf mRNA-Ebene) gekennzeichnet. Nach Jacoby et al. (1999) und MacCollin (1996)

zum Stoppkodon der Isoform 1, welche zuerst entdeckt wurde. Diese Isoform 1 des NF2-Transkripts besteht aus 16 Exons (Exon 1–15 und 17) und kodiert für ein Protein aus 595 Aminosäuren (Abb. 5.8). Neben der Isoform 1 zählt die Isoform 2 zu den am häufigsten exprimierten Transkripten des NF2-Gens. Sie unterscheidet sich von der Isoform 1 dadurch, dass Exon 16 infolge normalen Spleißens der Introns 15, 16 und 17 erhalten bleibt. Da jedoch das 12. Kodon in Exon 16 ein Stoppkodon ist, entsteht bei der Translation dieses Transkripts ein um 5 Aminosäuren verkürzter C-Terminus (Abb. 5.9). Neben den Isoformen 1 und 2 existie-



**Abb. 5.8 a–e.** Schematische Darstellung der Organisation kodierender Exons der Transkriptisoformen des NF2-Gens in Relation zur Lage der Proteindomänen (a). Die Isoform 1 (b) besteht aus 16 Exons, die als *weiße Rechtecke* mit den entsprechenden Exonbezeichnungen dargestellt sind. Unterhalb dieser Darstellung sind die Nukleotidpositionen wiedergegeben, welche die Exons begrenzen, wobei das Adeninukleotid des Startkodons als 1 gesetzt wurde. Die Größen der jeweiligen Exons sind oberhalb der Rechtecke in kursiven Zahlen angegeben. Isoform 1 (b) kodiert für 595 Aminosäuren (AS), die jeweils ersten und letzten Aminosäurepositionen jedes Exons sind oberhalb dargestellt. c Die Iso-

form 2 mit verkürztem C-Terminus durch die Insertion von Exon 16 kodiert für 590 AS. **d** Zusammenfassung der verschiedenen alternativen Spleißereignisse, die zu Deletionen der Exons 2, 3, 8, 10 und 15, bzw. der Insertion von Exon 1a und Exon 16 führen. In welcher Kombination diese alternativ gespleißten Exons in entsprechenden Transkripten auftreten bzw. fehlen, kann nur für die Isoformen Mer151, Mer150 und Mer162 angegeben werden (e), da die entsprechenden cDNA-Formen vollständig charakterisiert worden sind. Bei den Isoformen Mer151 und Mer150 kommt es durch alternatives Spleißen zu einer Veränderung des Leserahmens in den Exons 13 und 14 (*grau*)

**Isoform 1**

Ex. 15  
1735 AAG CTC ACC TTG CAG AGC GCC AAG TCC CGA GTG GCC TTC TTT GAA GAG CTC TAGCAGGTG  
K L T L Q S A K S R V A F F E E L \*

**Isoform 2**

Ex. 15 Ex. 16  
1735 AAG CCT CAA GCC CAA GGC AGA AGA CCT ATC TGC ATT TGAGCCCTCAAACTCACCTTGACAGAGCGCCAAGTCCCAGTGGCC  
K P Q A Q G R R P I C I \*

**Spleiß-Isoform D208**

Ex. 14 Ex. 17  
1567 AAA GAA AAC TCA CCT TGC AGA GCG CCA AGT CCC GAG TGG CCT TCT TTG AAG AGC TCT AGC AGG TGA  
K E N S P C R A P S P E W P S L K S S S R \*

Abb. 5.9. Vergleich der C-terminalen Nukleotid- und daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Transkriptisoformen 1, 2 und der Variante D208, bei welcher durch alternatives Spleißen Exon 15 deletiert und der Leserahmen in Exon 17

verändert wird. Bei der Merlinisoform 2 führt die Insertion von Exon 16 durch alternatives Spleißen zu einem vorzeitigen Stoppkodon nach 11 Aminosäuren

ren noch zusätzliche Transkriptvarianten des NF2-Gens, die durch alternatives Spleißen entstehen und die im Zusammenhang mit der Struktur der durch sie kodierten Proteine in Kapitel 5.4.5.2 „Spleißbedingte Isoformen des Merlins“ vorgestellt werden.

**5.4.3.1 Interspeziesvergleiche des NF2-Gens**

Das Transkript eines zum menschlichen NF2-Gen homologen Gens ist sowohl bei der Maus und der Ratte als auch bei der Fruchtfliege *Drosophila* charakterisiert worden. Dies ermöglichte es, den Grad der phylogenetischen Konservierung des NF2-Gens und das Expressionsspektrum des Merlins in diesen Organismen zu erfassen. Die Analyse der Transkripte und der davon abgeleiteten Proteine ist auch eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung möglicher Tiermodelle der NF2. Wie im Fall des humanen NF2-Gens, existieren auch bei der Maus die Isoformen 1 und 2 des NF2-Transkripts, die sich durch die Insertion von Exon 16 in Isoform 2 voneinander unterscheiden. Werden die kodierenden Anteile der Transkriptisoform 1 bei Mensch und Maus verglichen, sind diese zu 90% identisch. Auf der Ebene der abgeleiteten Aminosäuren ist eine 98,3%ige Identität zu beobachten, was einen hohen Grad an funktioneller Konservierung des Proteins anzeigt (Claudio et al. 1994). Die Identität des durch Exon 16 kodierten C-terminalen Bereichs bei Mensch und Maus weist auf eine essenzielle Bedeutung dieses Segments für die Funktion der Isoform 2 des Merlins hin. Auch

im Bereich der 5' und 3' nichttranslatierten Regionen ist eine beachtliche Identität von 80% bzw. 62% zu beobachten, die auf konservierte regulatorische Elemente schließen lässt.

Aber nicht nur innerhalb der Vertebraten scheint der kodierende Anteil des Merlingens hoch konserviert zu sein. Eine erstaunlich hohe Ähnlichkeit des Merlins besteht auch zwischen Mensch und *Drosophila*. Das Transkript des *Drosophilamerlins* überspannt 1905 Nukleotide und kodiert für 635 Aminosäuren, die im Vergleich zum humanen Merlin zu 50,3% identisch sind (McCartney u. Fehon 1996). Der Verlust der Merlinexpression führt bei *Drosophila* zu einer Hyperproliferation betroffener Gewebe, ohne die Differenzierung gravierend zu beeinflussen. Das *Drosophilamerlin* wird während der Entwicklung in zahlreichen Geweben exprimiert. Wie in Kapitel 5.4.7.7 „Funktionsanalyse des Merlins bei *Drosophila*“ dargestellt, kommt dem *Drosophilamerlin* eine wichtige Rolle bei der Larvalentwicklung zu.

**5.4.4 Formalgenetik**

Die autosomal-dominante Vererbung mit vollständiger Penetranz ist bei NF2 durch zahlreiche Familienstudien belegt. Ausnahmen von diesem Vererbungsmodus werden gelegentlich durch spät manifestierende Patienten vorgetäuscht, jedoch ist uns keine 3-Generationen-Familie mit übersprungenen Generationen bekannt. Etwa 50% der Patienten stammen von gesunden Eltern ab, haben also eine

Neumutation geerbt, die in der Keimbahn eines der Eltern eingetreten ist. Entsteht aufgrund eines frühen Mutationsereignisses ein Keimbahnmosaik, kann ein phänotypisch Gesunder 2 oder mehrere Kinder mit NF2 bekommen – solche Familien sind beobachtet worden; sie stellen den genetischen Berater vor eine schwierige Aufgabe. Die Mutationsrate des NF2-Gens wird auf  $6,5 \times 10^{-6}$  pro Gamete geschätzt (Evans et al. 1992a) und ist somit um etwa eine Zehnerpotenz kleiner als die des NF1-Gens. Sie liegt in derselben Größenordnung wie die des Retinoblastomgens.

Geschlechtsspezifische Unterschiede im Krankheitsverlauf der NF2 konnten nicht beobachtet werden. Das durchschnittliche Erkrankungsalter von Frauen liegt bei 21,6 Jahren, das der Männer bei 21,1 Jahren. Nach den Untersuchungen von Evans et al. (1992b) ertauben Männer und Frauen durchschnittlich im Alter von 24 Jahren. Im Gegensatz hierzu scheint das Geschlecht des betroffenen Elters einen Einfluss auf das mittlere Erkrankungsalter und den Schweregrad bei betroffenen Nachkommen zu haben. Die Differenz des Erkrankungsalters bei mütterlicher vs. väterlicher Vererbung beträgt etwa 6 Jahre (18 vs. 24 Jahre) und die Krankheit nimmt einen schwereren Verlauf, wenn das Defektallel von der Mutter stammt (Kanter u. Eldridge 1978, Kanter et al. 1980, Evans et al. 1992a,b). Dieser Einfluss des Geschlechts des betroffenen Elters konnte von Parry et al. (1994) nicht bestätigt werden, allerdings umfasste ihre Studie weniger Patienten. Möglicherweise erfahren Erhebungen zum Einfluss des Geschlechts des betroffenen Elters auf den Schweregrad und das mittlere Erkrankungsalter der Nachkommen eine gewisse Verzerrung aufgrund der niedrigeren genetischen Fitness bei Männern mit NF2 (Evans et al. 1992a). Untersuchungen zum parentalen Ursprung von Neumutationen zeigen, dass sich diese häufiger in der männlichen als in der weiblichen Keimbahn ereignen. Bei 31 von 45 sporadischen Patienten mit NF2 (69%) konnte die Mutation dem paternalen NF2-Allel zugeordnet werden (Kluwe et al. 2000).

Die Expressivität der NF2 ist nicht in dem hohen Maß variabel wie bei der NF1. Es gibt die regelmäßige Vererbung einer schweren Verlaufsform, die zuerst von Wishart (1822) beschrieben wurde und durch frühes Erkrankungsalter (<25 Jahre) und rasche Progredienz gekennzeichnet ist. Entsprechend wird auch eine milde Verlaufsform mit späterem Erkrankungsalter und langsamem Fortschreiten als regelmäßig segregierendes Merkmal beobachtet, wie es beispielhaft an der 5-Generatio-

nen-Familie von Gardner u. Frazier (1930) demonstriert wurde [s. auch Sainio et al. (1995)]. Im Allgemeinen ist der Schweregrad der Krankheit innerhalb der Familien recht einheitlich, in letzter Zeit mehrten sich jedoch die Berichte über das Vorkommen sehr unterschiedlicher Schweregrade in der gleichen Familie mit nachweislich einheitlicher NF2-Mutation (Kluwe et al. 1995; 1996; Kluwe u. Mautner 1996; Mautner et al. 1996b; Scoles et al. 1996). Die variable Expressivität der NF2 zeigt sich auch beim Vergleich eineiiger Zwillinge. Es bestand zwar Konkordanz hinsichtlich des Schweregrads, nicht jedoch in Bezug auf das Vorhandensein von CALF, zusätzlichen intrakraniellen Tumoren und (bei 2 der 3 untersuchten Paare) hinsichtlich der Art der okulären Anomalien (Baser et al. 1996).

Ein nahe liegender Grund für variable Expressivität ist der Mosaikstatus bei einem sporadischen Patienten, in dessen Folgegenerationen das vollständige Krankheitsbild segregiert. Ein Mosaik entsteht durch postzygotische Mutation während der Ontogenese. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt dieses Ereignisses kann die Keimbahn in den Mosaikstatus einbezogen sein oder nicht. Eine auffällig leichte und oft auch segmentale Manifestation beim ersten (also sporadischen) Patienten einer Familie deutet auf einen Mosaikstatus hin. Der Anteil betroffener Kinder in der F1 eines solchen Patienten ist vom Anteil der Keimzellen abhängig, welche das Defektallel tragen, liegt aber erwartungsgemäß im Durchschnitt <50%. Bei einem Teil der gesunden Kinder eines Mosaikpatienten kann mit Hilfe von Markerstudien der Haplotyp desjenigen Chromosoms nachgewiesen werden, das bei den betroffenen Geschwistern die Mutation trägt (Bijlsma et al. 1997). Die Genotypen der Hälfte der Kinder eines Mosaikpatienten (gleicher Markerhaplotyp mit bzw. ohne NF2-Defektallel) reflektieren also unmittelbar das Keimbahnmosaik ihres betroffenen Elters. Mosaikpatienten scheinen bei den Tumorsuppressorgendefekten häufiger zu sein als erwartet. Bei Kombination der Serien von Kluwe u. Mautner (1998) und von Evans et al. (1998a), finden sich unter 216 Patienten 11 Mosaikpatienten (5,1%). Da die Effizienz der Mutationsnachweise <100% liegt und die Wahrscheinlichkeit der Mosaikerkenntnis naturgemäß verringert ist, kann von einer höheren Häufigkeit von Mosaikpatienten unter sporadischen NF2-Patienten ausgegangen werden. Bei 2 der 6 Mosaikpatienten von Kluwe u. Mautner (1998) war z. B. der Anteil mutierter Zellen an den Leukozyten so gering, dass die Mutation an DNA aus peripherem Blut nicht nachgewiesen werden

konnte. Die Mutationen dieser Patienten gaben sich jedoch dadurch zu erkennen, dass jeweils mehrere Tumoren die gleiche Läsion aufwiesen, wobei die Tatsache, dass je einer der Tumoren zugleich das Wildtypallel verloren hatte (Zweitereignis, LOH), den Schluss zuließ, dass es sich jeweils um die konstitutionelle Mutation handelte. Der sichere Nachweis des Mosaikstatus hätte die Suche nach der Mutation in verschiedenen Zellsorten der Patienten erfordert, z. B. in:

- Fibroblasten aus Hautbiopsien von kontralateralen Körperarealen,
- Haarwurzeln,
- Wangenschleimhautabstrich,
- Blasenschleimhautzellen aus dem Harnsediment und
- Ejakulat.

Als Ursache der variablen Expressivität weniger trivial ist die Mehrdeutigkeit eines Teils der Mutationen, welche den Spleißprozess beeinträchtigen, also Spleißortmutationen. Dieses Thema steht nun bereits in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Problem der Genotyp-Phänotyp-Korrelation, dessen Behandlung seinerseits durch die Kenntnis des Mutationenspektrums des NF2-Gens vorbereitet werden sollte.

#### 5.4.4.1 Mutationenspektrum des NF2-Gens

Das Mutationenspektrum des NF2-Gens ist hinsichtlich der Anteile der verschiedenen Mutationstypen nicht wesentlich verschieden von dem des NF1-Gens. In Tabelle 5.24 sind die bis 1999 identifizierten, von MacCollin (1996) zusammengefassten Keimbahnmutationen des NF2-Gens nach dem Mutationstyp aufgelistet. Diese Zusammenstellung umfasst 298 Mutationen, wobei direkte Stoppmutationen den häufigsten Mutationstyp (34%) darstellen. Zusammen mit kleinen Deletionen und Insertionen, die das Leseraster unterbrechen, und einem Großteil der Spleißmutationen kodieren sie für verkürzte Proteine, die sehr instabil sind (Huynh et al. 1997; Gutmann et al. 1998). Aber bereits die Stabilität der mutanten mRNA mit einem vorzeitigen Stoppkodon kann im Vergleich zum Wildtyp reduziert sein, wie die Untersuchungen von Jacoby et al. (1999) zeigen. Der größte Teil der Keimbahnmutationen verursacht also die Entstehung verkürzter instabiler Merlinmoleküle oder das vollständige Fehlen eines Proteinprodukts des jeweiligen Defektallels. Ein vergleichbares Spektrum wird auch bei somatischen Mutationen des NF2-Gens in Tumoren beobachtet.

Tabelle 5.24. Zusammenfassung von 298 konstitutionellen Mutationen des NF2-Gens nach Mutationstypen geordnet

Mutationstyp	Anzahl [%]
Strukturelle Chromosomenanomalien <sup>a</sup>	2
Komplexe Rearrangements	4
Große Deletionen (einzelne Exons bis zum ganzen Gen) <sup>b</sup>	13
Kleine Deletionen	63 (21)
Insertionen	21 (7)
Direkte Stoppmutationen (Nonsense)	101 (34)
Aminosäuresubstitutionen (Missense)	20 (7)
Spleißmutationen	72 (24)
3'-UTR-Mutationen	2

Nach MacCollin (1996) „NF2 mutation map“ in der Version vom 26.8.1999. Zusätzlich wurden strukturelle Chromosomenanomalien und große Deletionen in diese Zusammenfassung einbezogen.

<sup>a</sup> Bruder et al. (1999); Arai et al. (1994).

<sup>b</sup> Sanson et al. (1993); Kluwe et al. (1995); Parry et al. (1996); Welling et al. (1996); Evans et al. (1998); Zucman-Rossi et al. (1998); Legoix et al. (1999).

Im Vergleich zu den Protein trunkierenden Mutationen sind Missense-Mutationen auffällig unterrepräsentiert (7%). Von insgesamt 20 Missense-Mutationen ereigneten sich 10 an im Vergleich zu den ERM-Protein konservierten Aminosäurepositionen und führen zu nicht konservativen Austauschen (Abb. 5.7). Die Verteilung der Mutationen über die Länge der Protein kodierenden Region des NF2-Gens ist in Abb. 5.10 dargestellt. Auffällig ist, dass die Exons 9, sowie 16 und 17 am 3'-Ende von Mutationen ausgespart bleiben. Es lässt sich kein ausgeprägter Vorzugsort (Hot spot) für Mutationen erkennen, jedoch sind rekurrente C:T-Transitionen in CGA-Kodons beobachtet worden, welche diese Stellen zu Warm spots für Mutationen des NF2-Gens werden lassen. So sind die Stoppmutationen C1021T (Kodon 341), C586T (Kodon 196), C169T (Kodon 57), C784T (Kodon 262) und C1396T (Kodon 466) jeweils 18-, 14-, 11-, 10- und 8-mal festgestellt worden. Die Hypermutabilität der Dinukleotidfolge CpG spiegelt sich auch darin wider, dass sich unter den 80 Protein trunkierenden C:T-Transitionen 61 (76%) in CGA-Kodons ereigneten. Das NF2-Gen enthält 6 CGA-Kodons (Arg), jedoch sind im Kodon 588, das 8 Kodons vor dem Stoppkodon des Wildtypmerlins liegt, noch keine Stoppmutationen gefunden worden. Möglicherweise ist ein um 8 Aminosäuren verkürztes Merlin in seiner Funktion nicht wesentlich eingeschränkt.

Generell bemerkenswert ist der hohe Anteil der C:T-Transitionen unter den direkten Stoppmutationen



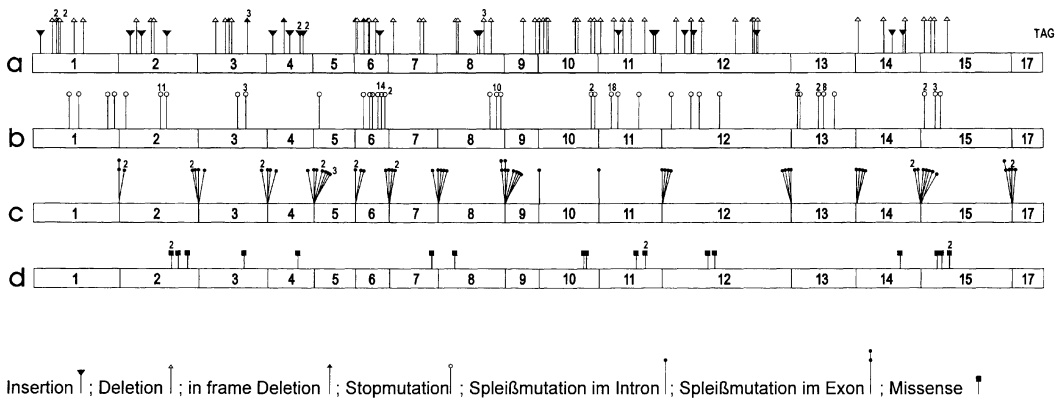


Abb. 5.10. Übersicht über Art und Lage von 277 Kleinmutationen des NF2-Gens. Erkennbar: Fehlen von Vorzugspositionen (Hot spots) und die große Häufigkeit von Spleißmutationen

nen (79%; 80/101). Insgesamt sind unter den 298 Mutationen 83 C:T-Transitionen zu finden (27%). Die häufigste Ursache für diesen Mutationstyp ist die Desaminierung von 5-Methylcytosin. Da in der paternalen Keimbahn stärker methyliert wird als in der maternalen, könnte ein direkter Zusammenhang zwischen der hohen Rate an C:T-Transitionen und der Häufung von Neumutationen im NF2-Gen in der paternalen Keimbahn bestehen (Kluwe et al. 2000).

#### 5.4.4.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die klinische Heterogenität der NF2 wird sicherlich durch multiple Faktoren beeinflusst. Umfangreiche Studien zur Frage des Zusammenhangs zwischen der Art der Mutation und dem Schweregrad der Krankheit zeigen, dass Protein trunkierende Mutationen häufig mit einem schweren Phänotyp assoziiert sind (Evans et al. 1998b; Parry et al. 1996; Ruttledge et al. 1996). Zu den Protein trunkierenden Defekten zählen neben Stoppmutationen und Leserastermutationen (Frameshift-Mutationen) auch Basenaustausche oder Deletionen an Spleißstellen, die reguläres Spleißen verhindern und bei welchen, beispielsweise durch die Einbeziehung intronischer Sequenzen, ein vorzeitiges Stoppkodon eingeführt wird.

Die Studie von Evans et al. (1998b) belegt anhand der Analyse von 125 Familien, dass Protein trunkierende Mutationen statistisch signifikant mit einem früheren Erkrankungsalter und mit verringerter genetischer Fitness korreliert sind. Entsprechend wird bei NF2-Patienten mit Mutationen, die nicht zu einem vorzeitigen Stoppkodon führen,

häufig eine mildere Verlaufsform beobachtet. Zu diesen Mutationstypen zählen Missense-Mutationen, z.T. auch kleine Deletionen oder Insertionen im Leseraster, die keine gravierenden Störungen der Sekundärstruktur des Merlins bedingen, und Spleißmutationen, die zur Insertion eines kleinen Introns ohne Stoppmutationen führen oder zu Deletionen eines Exons, wobei das Leseraster nicht verändert wird. Aber nicht nur solche Mutationen, die zu einem leicht veränderten, aber größtenteils intakten Merlin führen, sondern auch große Deletionen des NF2-Gens sind häufig mit einem milden Phänotyp assoziiert (Bourn et al. 1994; Evans et al. 1998b; Lopez-Correa et al. 2000).

Unter den 298 NF2-Patienten, deren Keimbahnmutationen in Tabelle 5.24 aufgeführt sind, weisen 215 Patienten (72%) Protein trunkierende Mutationen auf. Innerhalb dieser Gruppe ist bei 167 Patienten eine Kategorisierung des Schweregrads in leicht, intermediär und schwer betroffen möglich (MacCollin 1996). Bei 71% dieser Patienten mit trunkierenden Mutationen ist eine schwere Manifestation der NF2 zu beobachten. Nur etwa 16% dieser 167 Patienten zeigten eine milde Verlaufsform der Krankheit und weitere 13% werden mit intermediärem Phänotyp eingestuft.

Unter den 20 NF2-Patienten mit Missense-Mutationen konnten 14 Patienten hinsichtlich des Manifestationsgrads eingeordnet werden. In dieser Gruppe waren 5 Patienten mit schwerer Manifestation (36%), 8 Patienten mit mildem und ein Patient mit intermediärem Phänotyp.

Diese Zahlen belegen die häufigere Assoziation von trunkierenden Mutationen mit einer schweren Verlaufsform. Die Verteilung der Mutationen

über die Länge des NF2-Gens zeigt, dass es zwischen dem Ort der Mutation und dem Schweregrad der Erkrankung keine Korrelation gibt. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass Mutation im 3'-Bereich des NF2-Gens mit einem milderem Phänotyp assoziiert wäre, jedoch fällt auf, dass in den kodierenden Bereichen der C-terminalen Exons 16 und 17 noch keine Mutationen gefunden worden sind.

Trotz der gehäuften Assoziation Protein trunkierender Mutationen mit schwerem Phänotyp sei an dieser Stelle hervorgehoben, dass es sich dabei nur um eine Tendenz handelt und dass eine direkte Genotyp-Phänotyp-Korrelation nicht gilt, zumal gleiche Mutationen bei Patienten mit milder und schwerer Manifestation beobachtet wurden (Kluwe u. Mautner 1996; Scoles et al. 1996). Vor allem intrafamiliäre Variabilität, die Frequenz neuraler Tumoren betreffend, kann die Signifikanz einer Assoziation stark einschränken (Parry et al. 1996). Dasselbe gilt auch für die Manifestation der okulären Anomalien. Obwohl in der Studie von Parry et al. (1996), die 47 Patienten aus 21 Familien umfasste, alle 9 Patienten mit retinalen Hamartomen und/oder epiretinalen Membranen Stopp- oder Frameshift-Mutationen aufwiesen, ist eine direkte Korrelation nicht möglich, da weitere 11 Patienten mit Mutationen dieser Art keine retinalen Anomalien hatten. Gegen eine Assoziation retinaler Anomalien mit Protein trunkierenden Mutationen sprechen auch die Befunde von Baser et al. (1999), die bei der Mutationsanalyse von 5 Patienten mit retinalen Anomalien 2 Stopp- bzw. Frameshift-Mutationen, 2 Spleißmutationen und eine Missense-Mutation identifizierten. Auch der Schweregrad der Erkrankung, gemessen an der Anzahl der neuralen Tumoren und dem Alter beim Ausbruch der Krankheit, korreliert nicht signifikant mit der Manifestation okulärer Anomalien. So hatten 6/18 Patienten mit diesen Läsionen einen milden Phänotyp (33%) (Baser et al. 1999). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Faktoren wie der genetische Hintergrund, modifizierende Gene, epigenetische Faktoren und stochastische Ereignisse einen Einfluss auf die Manifestation der NF2 ausüben.

**Allelische Expression.** Mit Hilfe eines exprimierten Polymorphismus in der 3'-UTR des NF2-Gens konnten Jacoby et al. (1999) zeigen, dass Protein trunkierende Mutationen unabhängig von ihrer Lage im Gen häufig mit einer verringerten Expression des mutanten Allels einhergehen. Diese inaktivierenden Mutationen beeinflussen also offenbar

die Stabilität oder die Aufbereitung (Processing) der mRNA (Jacoby et al. 1999). Die Instabilität der mRNA ist demnach einer der Gründe, weshalb trunkierte Merlinformen häufig im Western-Blot nicht nachgewiesen werden konnten.

Gleiche Expression der mutanten und der normalen Allele wurde bei 2 unterschiedlichen Deletionen beobachtet, die nicht zu einer Veränderung des Leserasters führen und bei 3 von 4 Missense-Mutationen, deren Position in Abb. 5.7 wiedergegeben ist. Die geringe Zahl der auf die allelische Expression hin untersuchten Mutationen dieser Art lässt noch keine Aussagen darüber zu, wie häufig diese mit einer verringerten Expression des mutanten Allels einhergehen.

Bei einer nicht konservativen Missense-Mutation (N→Y) in dem im Vergleich zu den ERM-Proteinen konservierten Kodon 220 wurde eine reduzierte Expression des mutanten Allels beobachtet, zugleich aber ein milder Phänotyp bei den betroffenen Patienten (Abb. 5.7). Demgegenüber beeinträchtigt die Missense-Mutation (L→R) im ebenfalls konservierten Kodon 234 die Expression nicht, geht aber mit einem schweren Phänotyp des Betroffenen einher. Es erscheint möglich, dass das mutante Merlin in diesem Fall dominant-negative Effekte ausübt. Gleiche Expression des mutanten und des normalen Allels wurde auch bei einer Missense-Mutation (L→P) im konservierten Kodon 360 festgestellt, bei mildem Phänotyp des Patienten. In diesem Fall könnte die Translation trotz nichtkonservativem Austausch zu einem zumindest partiell funktionsfähigen Merlin führen.

Ausführlichere Studien werden die Frage beantworten können, ob bei Patienten mit gleicher Expression der NF2-Allele und geringen Veränderungen im mutanten Merlin die Tumorgenese reduziert ist. Obwohl erst 18 der 298 charakterisierten Mutationen hinsichtlich der allelischen Expression untersucht worden sind, zeichnet sich doch ab, dass Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stoppkodon führen, eine verringerte Expression des mutanten Allels zur Folge haben. In der Studie von Jacoby et al. (1999) waren dies 6/6 Nonsense- bzw. Leserastermutationen. Die häufige Assoziation dieser Mutationstypen mit einem schweren Grad der Erkrankung könnte mit der verringerten Stabilität der jeweiligen Transkripte zusammenhängen. Jedoch ist es auf diesem Hintergrund schwierig zu erklären, weshalb bei manchen Familien mit großen Deletionen im NF2-Gen eine milde Verlaufsfom beobachtet wird (Evans et al. 1998 b).

**Variable Expressivität.** Im Gegensatz zur NF1 ist die intrafamiliäre Variabilität der NF2 im Allgemeinen wesentlich geringer. Dennoch sind einige Familien mit variabler Expression des Krankheitsbilds beschrieben worden. Zu diesen intrafamiliären Manifestationsunterschieden könnten die komplexen Effekte mancher Mutationen beitragen. So ist variable Expression z. B. in Familien mit Spleißmutationen beobachtet worden (Mautner et al. 1996b; Kluwe et al. 1998).

Mutationen an Spleißstellen können „leaky“ sein, d. h. zu einem gewissen Prozentsatz wird trotz der Mutation der Spleißstelle regulär gespleißt. Eine andere Möglichkeit der komplexen Auswirkungen von Spleißmutationen ergibt sich, wenn durch eine Mutation unterschiedliche mutante mRNA-Moleküle entstehen können. Beispielsweise könnte die Mutation einer Spleißakzeptorstelle bei einem Teil der Spleißprozesse die Deletion des nachfolgenden Exons oder, zu einem gewissen Prozentsatz, den Gebrauch einer kryptischen Spleißakzeptorstelle verursachen. Letzteres hätte zur Folge, dass Anteile des nachfolgenden Exons und/oder des darauf folgenden Introns in die reife mRNA eingefügt werden. Wie häufig es zur Nutzung kryptischer Spleißstellen kommt, wenn die reguläre Spleißstelle mutiert ist, könnte durch die äußeren Bedingungen und durch intranukleäre Faktoren beeinflusst werden. Schwankungen dieser Faktoren oder Bedingungen würden also unmittelbar zur interindividuellen Variabilität beitragen.

Nicht nur Spleißmutationen, sondern auch manche Stoppmutationen können mit komplexen Effekten assoziiert sein. Im Übrigen sei auf die im Zusammenhang mit der variablen Expressivität der NF1 angestellten Betrachtungen verwiesen (s. Kapitel 5.2.4.5 „Ursachen der variablen Expressivität der NF1“).

#### 5.4.5 Proteinprodukt des NF2-Gens: Schwannomin/Merlin

##### 5.4.5.1 Struktur des Merlins

Das Proteinprodukt des NF2-Gens weist sich aufgrund seiner Struktur als zur Familie der Bande-4.1-Proteine zugehörig aus. Der Name des 4.1-Proteins beruht auf der Verwendung einer Laborbezeichnung, der Nummer einer elektrophoretischen Fraktion, die neben Proteinen ähnlichen Molekulargewichts zwischen den Spektrinen  $\alpha$  und  $\beta$  und dem Aktin zu liegen kommt. Mutative Veränderungen des 4.1-Proteins sowie auch sein voll-

ständiges Fehlen sind die Ursache der mit Rhesus gekoppelten Form der Elliptozytose (MIM 130500), was auf eine Beteiligung des 4.1-Proteins an der Aufrechterhaltung der Form der Erythrozyten schließen lässt. In der Tat erwies sich das 4.1-Protein als eines der Proteine, welche die Aktin- und Spektrinfilamente des submembranären Zytoskeletts der Erythrozyten über eine Bindung an das integrale Membranprotein Glykophorin C an der Plasmamembran verankern. Die Stabilisierung der Zellgestalt und die Regulation ihrer Veränderungen sind die Funktion vieler Mitglieder der Bande-4.1-Proteinfamilie.

Die nächsten Verwandten des Merlins konstituieren die Subfamilie der ERM-Proteine, Ezrin, Radixin und Moesin. Diese nahe Verwandtschaft war ausschlaggebend für die Bezeichnung des NF2-Proteins als „*moesin-ezrin-radixin-like protein*“. Die ERM-Proteine finden sich v. a. angereichert in spezialisierten, an F-Aktin reichen Strukturen unterhalb der Plasmamembran, wie Mikrovilli, Membranausstülpungen und Membrankrausen, Adhäsionsfoci (während ihrer Bildung zwischen Zellen oder zwischen diesen und der extrazellulären Matrix; weniger in den fertigen Strukturen) und in der Teilungsfurche. Auch Merlin konnte in solchen an F-Aktin reichen Strukturen nachgewiesen werden, die ja einem ständigen Wandel unterworfen sind, sodass die durch die ERM-Proteine unter Beteiligung von Merlin vermittelte Verknüpfung zwischen integralen Membranproteinen und dem Membranzytoskelett als ein dynamischer Prozess zu verstehen ist.

Aufgrund der strukturellen und wahrscheinlich auch funktionellen Verwandtschaft des Merlins mit den ERM-Proteinen werden im Folgenden die Eigenschaften der 4 Proteine im Zusammenhang besprochen. Das gemeinsame Strukturprinzip der auch als MERM-Gruppe bezeichneten Proteine ist Abb. 5.6 zu entnehmen. Es handelt sich um eine Struktur aus 3 Domänen: Auf eine globuläre N-terminale Domäne folgt ein stark geladenes  $\alpha$ -helikales Segment, an welches sich die polare C-terminale Domäne anschließt. Bei Ezrin, Radixin und Merlin folgt unmittelbar auf die  $\alpha$ -helikale Domäne ein Oligopeptid aus 7–8 Prolinresten, dem als Scharniersegment (*hinge-region*) eine Bedeutung für die intramolekulare Wechselwirkung dieser Proteine zugewiesen wird. Die höchste Ähnlichkeit des Merlins zu den ERM-Proteinen ist in der N-terminalen Domäne festzustellen. Diese auch als FERM-Domäne bezeichnete Region ist für die Mitglieder der Protein-4.1-Familie charakteristisch (F von four).

Innerhalb der N- und C-terminalen Domänen der MERM-Proteine sind Assoziationsdomänen (AD) lokalisiert worden, welche inter- und intramolekulare Interaktionen vermitteln. Diese Regionen werden als N-ERMAD und C-ERMAD bezeichnet, je nach Lage im N- oder im C-Terminus. Mittels der N-terminalen Bindungsstellen interagieren die MERM-Proteine mit integralen Membranproteinen oder submembranär lokalisierten Adaptorproteinen, die ihrerseits mit Membranproteinen assoziiert sind. In Abb. 5.6 sind einige der Interaktionspartner aufgeführt, die im Bereich der N-ERMAD mit Ezrin interagieren (s. Kapitel 5.4.5.6 „Interaktionspartner des Merlins und der ERM-Proteine“). Die MERM-Proteine können durch Interaktion zwischen den N- und C-ERMAD auch inter- und intramolekulare Assoziationen eingehen, dies wird in Kapitel 5.4.5.5 „Interdomänenassoziation des Merlins“ näher erläutert.

Bei den ERM-Proteinen endet die C-terminale Domäne in einem etwa 30 Aminosäuren langen Segment mit hoher Affinität zu F-Aktin. Beim Merlin fehlt diese C-terminale hochaffine Aktinbindungsstelle, obwohl Merlin, wie die Mitglieder der ERM-Familie assoziiert mit F-Aktin in Mikrovilli und Membrankräuselungen lokalisiert werden konnte (Huang et al. 1998). Statt der für die ERM-Proteine typischen C-terminalen besitzt Merlin eine N-terminale Aktinbindungsstelle, die dem Bereich der Aminosäuren 178–367 zuzuordnen ist, wie durch Bindungsexperimente mit F-Aktin *in vitro* gezeigt werden konnte (Xu u. Gutmann et al. 1998). Auch Ezrin verfügt über zusätzliche, N-terminal lokalisierte Aktin bindende Sequenzen. Roy et al. (1997) konnten im N-Terminus von Ezrin 2 niederaffine Aktinbindungsstellen eingrenzen. Eine der beiden Regionen des Ezrins, im Bereich der Aminosäuren 280–300, zeigt hohe Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz des Merlins von Position 298–318. Daher ist anzunehmen, dass dieser Abschnitt, der in einer hoch konservierten Region liegt, die Aktinbindungsdomäne des Merlins darstellt (Xu u. Gutmann et al. 1998).

Die beschriebenen Daten sind mit der Vorstellung vereinbar, dass die MERM-Proteine über die N-terminale Assoziationsdomäne mit den intrazellulären Domänen integraler Membranproteine und/oder mit bestimmten membranständigen Adaptorproteinen in Wechselwirkung treten. Zusätzlich binden sie auch an Elemente des Aktinzytoskeletts. Auf diese Weise stellen die MERM-Proteine in Analogie zur Funktion des Proteins-4.1 eine Verbindung zwischen der Plasmamembran und dem submembranären Aktinzytoskelett her.

#### 5.4.5.2 Spleißbedingte Isoformen des Merlins

Die Isoform 1 repräsentiert das so genannte Full-length-NF2-Protein aus 595 Aminosäuren, das in zahlreichen Geweben exprimiert wird. Das entsprechende Transkript überspannt die Exons 1–15 und 17, seine Struktur ist in Abb. 5.8b schematisch und in Relation zur Lage der Proteindomänen dargestellt. Die Isoform 2 des NF2-Transkripts unterscheidet sich von der Isoform 1 nur durch die Insertion von 45 Nt des Exons 16 an der Nukleotidposition 1738 (Abb. 5.8c, 5.9). Durch diese Insertion folgt ein Stoppkodon nach 33 Nukleotiden, sodass der Bereich, der durch Exon 17 kodiert ist, zu einem Teil des nichttranslatierten Bereichs wird und die Isoformen 1 und 2 über divergente C-Termini verfügen. Die 11 Aminosäuren der Isoform 2 bedingen eine nichthelikale Struktur mit hydrophilen Eigenschaften. Dagegen hat der C-Terminus der Isoform 1 eine helikale Konformation und ist hydrophober (Bianchi et al. 1994). Auch bei der Maus ist die Existenz dieser Isoform 2 nachgewiesen worden, wobei die von Exon 16 kodierte Aminosäuresequenz zwischen Mensch und Maus identisch ist. Pykett et al. (1994) beobachteten eine 3. Spleißvariante im C-Terminus des NF2-Gentranskripts (D208), die zu einer Deletion von Exon 15 führt und den Leserahmen in Exon 17 verändert (Abb. 5.9).

Neben Exon 16 werden auch die Exons 1a, 2, 3, 8, 10, 11, 12 und 15 alternativ gespleißt (Abb. 5.8d,e) (Arakawa et al. 1994; Pykett et al. 1994; Hara et al. 1994; Hitotsumatsu et al. 1994; Schmucker et al. 1999). Leider ist unklar, in welchen Kombinationen diese alternativ gespleißten Exons auftreten, da bei diesen Beschreibungen keine vollständigen Transkripte bzw. cDNA-Klone analysiert worden sind. Im Gegensatz hierzu sind die Transkriptisoformen Mer151, Mer150 und Mer162 als vollständige Transkripte isoliert und charakterisiert worden (Abb. 5.8e) (Schmucker et al. 1999). Diese alternativen Spleißreaktionen führen zur Expression verkürzter Varianten des Merlins. Ohne Veränderung des Leserahmens werden im Mer151-Transkript die Exons 2, 3, 5, 6 und 7 durch alternatives Spleißen eliminiert. Das Spleißen von der Donorstelle am Anfang des Introns 10 zur Akzeptorstelle vor Exon 13 führt jedoch zu einer Veränderung des Leserahmens und zu einem vorzeitigen Stoppkodon in Exon 14 bei diesem Transkript Mer151, das für 220 AS kodiert. Die Isoform Mer150 ist dadurch gekennzeichnet, dass eine kryptische Spleißakzeptorstelle im Exon 8 und eine kryptische Donorstelle im Exon 14 akti-

viert werden. Auf diese Weise werden Teile von Exon 8 und 14 sowie die Exons 9–13 aus dem Transkript eliminiert. Auch diese Transkriptisoform hat einen verkürzten C-Terminus, denn ein Stoppkodon folgt nach dem 12. Nukleotid im Exon 14, sodass diese Isoform nur 259 AS umfasst. Die 3. vollständig sequenzierte Isoform ist Mer162, bei welcher ein Segment von Exon 5 bis zum Beginn des Exons 17 ausgespleißt wird. Bei dieser Isoform werden 72% der kodierenden Sequenz (bezogen auf Isoform 1) entfernt, sodass eine mRNA entsteht, die nur für 165 AS kodiert. Bei diesen 3 Spleißisoformen werden die gesamte  $\alpha$ -helikale Domäne und variable Anteile der ERM-homologen Regionen eliminiert.

#### 5.4.5.3 Expression des Merlins

**Expression in Zellkulturen.** Die Expression des Merlins ist in zahlreichen Tumorzelllinien, primären Fibroblastenkulturen und lymphoblastoiden Zelllinien nachgewiesen worden. In Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen N- und C-terminale Epitope der Isoform 1 des Merlins beobachteten einige Autoren multiple Banden. Die Doublet-Bande im Molekulargewichtsbereich von 70–80 kDa repräsentiert die Isoform 1 des Merlins. Diese Doppelbande besteht aus der etwas schneller wandernden, nichtphosphorylierten und der verzögert wandernden, phosphorylierten Isoform 1 (Shaw et al. 1998a). Daneben werden aber auch Banden höheren Molekulargewichts (MG) gefunden, die vermutlich durch Homodimerisierung des Merlins oder durch Heterodimerisierung des Merlins mit anderen Mitgliedern der ERM-Proteine entstehen. Zusätzlich treten bei Western-Blot-Nachweisen des Merlins auch Proteinbanden mit niedrigerem Molekulargewicht auf, welche als die Produkte alternativen Spleißens oder posttranslationaler Modifikationen gewertet werden. In Proteinextrakten aus einer lymphoblastoiden Zelllinie konnten niedermolekulare Merlinbanden identifiziert werden, die vermutlich den Isoformen Mer162 (MG=19 kDa), Mer150 (MG=30 kDa) und Mer151 (MG=26 kDa) zuzuordnen sind (Schmucker et al. 1997, 1998).

**Expression des Merlins in Geweben.** Das Expressionsmuster des Merlins im adulten Säugerorganismus ist beim Menschen, der Ratte und der Maus ähnlich, aber nicht identisch. In allen Fällen besteht Konkordanz zwischen dem Vorhandensein der mRNA (bestimmt durch RT-PCR oder RNA-in-situ-Hybridisierung) und des Proteins (Western-Blot, Immunhistochemie), wenn von Sensitivitäts-

unterschieden zwischen den Methoden abgesehen wird. Als Organe und Gewebe, welche Merlin exprimieren, werden von zahlreichen Autoren genannt:

- Gehirn und Rückenmark,
- Lunge,
- Niere,
- Leber,
- Milz,
- Testis,
- Ovar,
- Nebenniere,
- Plazenta,
- Pankreas,
- Magen,
- Ileum,
- Kolon,
- Haut,
- Herz und
- Skelettmuskulatur.

Diese Vielfalt der Gewebe, in denen Merlin nachgewiesen werden konnte, bedeutet jedoch keineswegs ubiquitäre Expression, da Merlin innerhalb von Organen oft nur bestimmten Zellsorten zugeordnet werden kann. So war z.B. die Merlinfärbung in der Gefäßintima auf die glatten Muskelzellen beschränkt, während das Gefäßendothel ungefärbt blieb. Auch die viszerale glatten Muskelzellen sind, im Gegensatz zum Darmepithel, durch hohe Merlineexpression charakterisiert. Dieser Gegensatz zwischen Epithelzellen und glatten Muskelzellen besteht allgemein (den Bakker et al. 1995a).

Im Gegensatz zur Merlineexpression in primären menschlichen Fibroblastenkulturen (Gonzalez-Agosti et al. 1996; Schmucker et al. 1997) wird Merlin in der Dermis in vivo nicht exprimiert. In der Epidermis ist der Merlingehalt mit dem Differenzierungsgrad der Keratinozyten korreliert: Die höchste Immunreaktivität besteht im Stratum granulosum; die Intensität geht über das Stratum spinosum bis hin zum Stratum basale stark zurück.

Besonders ausgeprägt ist die Zelltyp- und Gewebespezifität der Merlineexpression im ZNS und PNS (Stemmer-Rachamimov et al. 1997). Im Zerebrum zeigen bestimmte Nuklei, z.B. im Thalamus und im Hirnstamm, eine besonders hohe Markierung. Im Zerebellum fällt das Neuropil der Purkinje-Zellen durch starke Merlineexpression auf, während sich die Granularzellschicht u.a. zerebelläre Neuronen als negativ erweisen. Unter den zentralen Gliazellen exprimieren Astrozyten, Oligodendrozyten und, in schwächerem Maß, das Ependym Merlin. Die Schwann-Zellen und Meningeothelzel-

len des PNS sind durchweg schwächer Merlin exprimierend als zentrale Gliazellen. Dies kann jedoch nicht im Sinn einer geringeren Bedeutung des Merlins für diese Zellsorten interpretiert werden, da der Verlust des Merlins in ihnen ja gerade die Entstehung der für NF2 charakteristischen Tumoren auslöst. Ähnliche, aber keineswegs vollkommen übereinstimmende Expressionsmuster des Merlins wurden im ZNS, PNS u. a. Organen der Ratte (Gutmann et al. 1995 c) und der Maus (Claudio et al. 1995) nachgewiesen.

**Entwicklungsspezifische Expression.** Von ganz besonderem Interesse sind die Veränderungen der Expression eines negativen Wachstumsregulators wie Merlin während der Ontogenese. In einer gründlichen Studie der Merlinexpression während der Ontogenese der Maus vermochten Huynh et al. (1996) das Protein vom Tag 8 (E8) an in zahlreichen Geweben nachzuweisen. Dabei bestand im Verlauf der Entwicklung die Tendenz, dass Merlin stärker in schon differenzierten als in rasch proliferierenden Geweben exprimiert war. Als merlin-negativ erwiesen sich zwischen E8 und E16 lediglich Neuroblasten des Neuroepithels, das Ependym des ZNS, die Dermis, also der mesenchymale Anteil der Haut, und kernhaltige Erythrozytenvorstufen. Einen interessanten, weil gegenläufigen Verlauf nimmt die Merlinexpression im superioren Zervikalganglion (SCG) und den Spinalganglien bei der Ratte während der letzten Stadien der Ontogenese und den ersten 2 postnatalen Wochen: Während die Merlinmenge in den Spinalganglien ansteigt, sinkt sie zur gleichen Zeit im SCG auf nicht mehr nachweisbare Werte (Gutmann et al. 1995 c). Auf welche Weise dieser gegensätzliche Verlauf in der sehr unterschiedlichen Zytoarchitektur und Funktionsstruktur dieser beiden Arten von Ganglien eine Erklärung finden wird, bleibt abzuwarten. Aufschlussreich waren auch die Beobachtungen an den Schichten des sich entwickelnden Neokortex der Maus (E15–E16): Im proliferierenden Neuroepithel der Ventrikelzone einerseits und in der Kortikalplatte bestanden sehr geringe Merlinexpressionen, wohingegen die postmitotischen Neuronen, welche die Intermediärzone durchwandern, und die dort befindlichen Gliazellen eine starke Merlinreaktivität zeigten. Dieses Muster weist unmittelbar auf eine Bedeutung des Merlins während der Zellmigration hin. Im Hinblick auf die Symptomatik der NF2 ist es interessant, dass neben Schwann-Zellen auch die kochlearen und vestibulären Ganglien und verschiedene Anteile der Augenlinse Merlin exprimieren.

RT-PCR-Analysen weisen daraufhin, dass die Expression der Merlinisoformen Mer150, 151 und 162 entwicklungspezifisch reguliert sein könnte. Bis auf die adulte humane Retina ist die Expression dieser Isoformen in keinem der in Tabelle 5.25 aufgeführten adulten humanen Geweben nachzuweisen. Mer162 wird jedoch in verschiedenen embryonalen Geweben exprimiert und alle 3 Isoformen, wie auch die Isoform 1, finden sich in fetalem Thymus.

#### 5.4.5.4 Intrazelluläre Lokalisation des Merlins

Im Gewebeverband zeigen Zellen in der Regel eine granuläre, seltener eine diffuse Verteilung im Zytoplasma mit einer Tendenz zur perinukleären Konzentration. Dabei kann ein bestimmter Zelltyp unterschiedliche Verteilungsmuster aufweisen. So beobachteten Stemmer-Rachamimov et al. (1997) in Astrozyten je nach Hirnregion

- eine grobkörnig-verklumpte,
- eine feinkörnige, auch die Zellfortsätze einbeziehende oder
- eine fädig-netzförmige Verteilung des Merlins.

Es besteht offenbar eine Abhängigkeit der Lokalisation des Proteins vom Funktionszustand der Zelle, was z. B. auch durch ein verändertes Verteilungsmuster in fibrillären reaktiven Astrozyten aus infarktgeschädigten Gehirnen belegt wurde. In nichtdifferenzierten Schwann-Zellen ist Merlin hauptsächlich im perinukleären Zytoplasma lokalisiert, während es in differenzierten Schwann-Zellen submembranär in Assoziation mit dem Zytoskelett und dem transmembranären  $\beta$ -Integrin nachzuweisen ist (Obremski et al. 1998).

Sehr aufschlussreich im Hinblick auf die Funktion des Merlins sind die zahlreichen Studien an Zellkulturen, bei denen die intrazelluläre Lokalisation des Merlins und der ERM-Proteine unter verschiedenen experimentellen Bedingungen erforscht werden konnte. Hierfür wurden vorrangig etablierte Linien herangezogen, nur wenige Untersuchungen waren primären Zellkulturen wie Fibroblasten und Schwann-Zellen gewidmet. Unter Zellkulturbedingungen erfährt Merlin eine Verlagerung in dynamische Strukturen der Plasmamembran, wie Membrankrausen (ruffles), Filopodien, Lamellipodien und, weniger häufig beobachtet, in Mikrovilli (Sainio et al. 1994; Gonzalez-Agosti et al. 1996; Schmucker et al. 1997). Als Lamellipodium wurde hier auch der in Bewegungsrichtung vordere Rand (Frontkante, „leading edge“) wandernder Zellen bezeichnet. Merlin wird auch in Adhäsionsfoci gefunden, die zwischen der Plasmamembran und der

Tabelle 5.25. Expressionsmuster der Merlinisoforamen 1, 2, Mer151, Mer150 und Mer162

Herkunft der RNA		Expression der Isoformen analysiert durch RT-PCR			
		Isoform 1 und 2 (595 bzw. 590 AS)	Mer151 (220 AS)	Mer150 (259 AS)	Mer162 (165 AS)
Adult	Retina	+		+	
	Gehirn	+			
	Niere	+			
	Leber	+			
	Lunge	+			
	Skelettmuskel	+			
	Pankreas	+			
	Plazenta	+			
Fetal	Gehirn	+			+
	Herz	+			+
	Lunge	+			+
	Skelettmuskel	+			+
	Milz	+			+
	Thymus	+	+	+	+
Zelllinien	Lymphoblastoid	+	+	+	
	Primäre Fibroblasten	+		+	+
	SKHep1 (Leberkarzinomlinie)	+	+		
	A431 (epidermale Karzinomlinie)	+			+
	Intrazelluläre Lokalisation nach Transfektion	Submembranär, Filopodien, gekräuselte Membranen	Submembranär in Filopodien, zytosolisch und intranukleär	In zytoplasmatischen Granula, perinukleär und in peripheren Fortsätzen	

extrazellulären Matrix bestehen. Neben der diskreten submembranären Lokalisation des Merlins im Bereich des kortikalen Zytoskeletts kann eine diffuse oder granuläre zytoplasmatische Lokalisation des Merlins bestehen bleiben. In HeLa- und in NIH3T3-Zellen konnte Merlin nach transients Transfektion seiner cDNA mit einem Expressionsvektor auch in der Teilungsfurche nachgewiesen werden (Shaw et al. 1998b).

Die genannten Membranausstülpungen, die Teilungsfurche und möglicherweise auch die Zell-Matrix-Adhäsionsfoci sind Orte der Anreicherung der ERM-Proteine [Übersicht: Bretscher et al. (1997)]. Es sind zugleich Areale der Reorganisation des submembranären Zytoskeletts, insbesondere des F-Aktins. Die Kolokalisation der ERM-Proteine und des Merlins mit dem  $\beta$ -Aktin der membranassoziierten Mikrofilamente ist immunzytochemisch durch Doppelmarkierung mit den jeweiligen Antikörpern und fluoreszenzmarkiertem Phalloidin vielfach nachgewiesen worden.

Jedoch gibt es auch wichtige Hinweise auf zelltypspezifische Unterschiede hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation des Merlins und der ERM-Proteine (Maeda et al. 1999). Nach Transfektion von Expressionsvektoren mit NF2-cDNA (Isoform

1 und 2) in HeLa-Zellen ist eine vornehmlich submembranäre Lokalisation besonders in F-Aktin reichen Membranvorstülpungen wie Mikrovilli zu beobachten, aber keine Assoziation mit Stressfasern. Wird Merlin transient in epithelialen Zelllinien exprimiert, ist es in lateralen Membranen kolokalisierend mit E-Cadherin nachzuweisen, im Gegensatz zu endogenen ERM-Proteinen, die an Zell-Zell-Grenzen, in Mikrovilli und in apikalen Membranen lokalisiert sind.

Untersuchungen zur Lokalisation des Merlins und des Ezrins in Kulturen einer humanen Gliomzelllinie zeigten, dass sich bei Konfluenz die intrazelluläre Lokalisation beider Proteine verändert. Während in subkonfluenten Kulturen Merlin und Ezrin eine überlappende submembranäre Lokalisation im Bereich von Membrankrausen und Mikrovilli zeigten, war bei Konfluenz vornehmlich eine diffuse oder punktförmige Verteilung im Zytoplasma zu beobachten. Unterschiedliche Wachstumsbedingungen beeinflussen also die intrazelluläre Verteilung des Merlins und des Ezrins (Grönholm et al. 1999).

Die intrazelluläre Lokalisation der Spleißisoformen Mer151, 150 und 162 wurde durch Transfektionsexperimente mit entsprechenden Expressions-

vektoren erhoben. Diese Vektoren sind so konstruiert worden, dass bei Expression der klonierten Transkriptisoformen am 3'-Ende ein Epitop von 6 Histidinen eingebaut wird. Mit Hilfe eines Antikörpers, der dieses Polyhistidinepitop erkennt, ist dann ein immunhistochemischer Nachweis der ektopisch exprimierten Merlinisoformen möglich.

Die Full-length-Isoform 1 des Merlins war bei diesen Experimenten in NIH3T3-Zellen submembranär, besonders in Filopodien und gekräuselten Membranen nachzuweisen (Den Bakker et al. 1995b; Schmucker et al. 1997; Gonzalez-Agosti et al. 1996). Auch die Isoform Mer151 war in Filopodien und Membrankrausen festzustellen, zusätzlich aber auch perinukleär in einem nicht näher definierten Kompartiment. Bei einem gewissen Anteil der transfizierten Zellen war auch eine intranukleäre Lokalisation der Isoform Mer151 zu beobachten. Dies ist besonders bemerkenswert, da bei dieser Isoform durch alternatives Spleißen ein putatives Kernlokalisationssignal entsteht (KNKK), das in der Sequenz der anderen Merlinformen nicht auftritt. Die Merlinisoformen 150 und 162 wurden ausschließlich in zytoplasmatischen Granula lokalisiert, nicht submembranär (Tabelle 5.25) (Schmucker et al. 1999). Bei beiden Isoformen wird der Bereich der Aminosäuren 298–318, dem die Aktinbindungsdomäne des Merlins zugeschrieben wird, durch alternatives Spleißen eliminiert. Das Fehlen dieser Bindungsdomäne könnte bedingen, dass beide Isoformen nicht mit dem Aktinzytoskelett interagieren, sondern in zytoplasmatischen Granula zu finden sind.

Die Arbeiten von Deguen et al. (1998) und Koga et al. (1998) zeigten, dass bei transienter Expression von cDNA-Konstrukten, die im Bereich der Exons 2 und 3 deletiert sind, das mutante Merlin nicht submembranär, sondern in zytoplasmatischen Granula zu finden ist. Dies steht im Widerspruch zu der Beobachtung, dass die Isoformen Mer150 und 162 in zytoplasmatischen Granula lokalisiert sind, da beide die Aminosäuresequenz enthalten, die durch Exon 2 und 3 kodiert wird. Die Isoform Mer151, bei welcher der durch die Exons 2 und 3 kodierte Bereich infolge alternativen Spleißens eliminiert wird, ist auch submembranär zu finden. Wie die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der verschiedenen Merlinisoformen reguliert wird oder von welchen Proteinsequenzen sie abhängt, ist noch unklar.

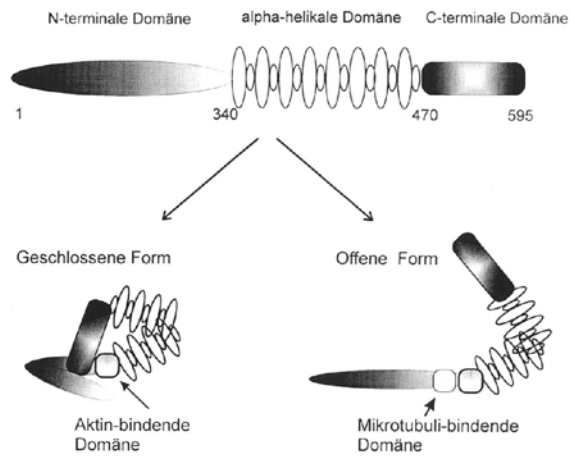
#### 5.4.5.5 Interdomänenassoziation des Merlins

**Intramolekulare und homotypische Interaktion.** Merlin der Isoform 1, nicht jedoch der Isoform 2, ist, wie die Mitglieder der ERM-Familie, fähig, intramolekulare Assoziationen zwischen dem N- und dem C-Terminus einzugehen. Diese Assoziation wird also höchstwahrscheinlich von C-terminalen Motiven der Isoform 1 vermittelt. In der Tat zeigen zahlreiche Experimente mit C-terminal deletierten Merlinmutanten, dass die Aminosäuren in Position 580–595, kodiert durch Exon 17, für die Interdomäneninteraktion essenziell sind. In Abb. 5.11 ist die intramolekulare Assoziation zwischen N- und C-Terminus des Merlins schematisch dargestellt. Es gibt Hinweise darauf, dass bei Merlin auch innerhalb des N-Terminus eine Assoziation stattfinden muss, damit eine Interaktion mit dem C-Terminus möglich ist oder stabilisiert wird (Gutmann et al. 1999c). Trotz der geschlossenen Konformation des Merlins, welche durch die Interaktion der N- mit der C-terminalen Domäne zustande kommt, bleibt die Aktinbindungsstelle im N-Terminus unmaskiert, sodass Merlin auch in dieser Form mit F-Aktin interagieren kann.

Versuche an Zellkulturen haben gezeigt, dass bei Koexpression von C- und N-terminal trunkierten Merlinformen eine Interaktion dieser Domänen auch in *trans* möglich ist, also nicht nur in *cis* innerhalb eines vollständigen Merlinproteins. Daher wird diese Form der Interaktion des Merlins mit sich selbst (in *cis* oder in *trans*) auch homotypische Interaktion genannt. Bei Interaktionsstudien mit Hilfe des 2-Hybrid-Tests stellte sich heraus, dass auch vollständige Isoformen 1 des Merlins miteinander interagieren können, was Merlin deutlich von Ezrin unterscheidet, da vollständige Ezrinproteine bei entsprechenden Untersuchungen keine Dimere bilden. Merlinmoleküle voller Länge binden stärker aneinander als an die N- oder C-terminale Domäne allein, ganz im Gegensatz zu den ERM-Proteinen (Magendantz et al. 1995; Stokowski et al. 2000). Dies weist zum einen darauf hin, dass Merlin im Vergleich zu den ERM-Proteinen funktionell divergent reguliert werden könnte, und zum anderen, dass die Stabilität der intramolekularen Assoziation bei Merlin und den ERM-Proteinen unterschiedlich ist (Grönholm et al. 1999).

Es wird angenommen, dass die ERM-Proteine in der geschlossenen Form nicht mit bestimmten Interaktionspartnern assoziieren können, da relevante Bindungsstellen maskiert sind und es aktivierender Ereignisse bedarf, damit sie eine offene





**Abb. 5.11.** Schematische Darstellung der intramolekularen Assoziation des Merlins. Merlin geht nach diesem Modell 2 Arten intramolekularer Assoziationen ein. Zum einen interagiert der durch Exon 17 kodierte Bereich mit Sequenzen der N-terminalen Domäne, zum anderen findet innerhalb dieser Domäne eine Assoziation statt, welche die geschlossene Form stabilisiert. Es wird angenommen, dass Merlin nur in der geschlossenen Form wachstumssupprimierende Eigenschaften aufweist; bei dieser Form ist die Mikrotubuli bindende Region durch die intramolekulare Assoziation verdeckt. Sowohl in der offenen als auch in der geschlossenen Form kann Merlin an Aktin binden

Konformation mit veränderten Bindungseigenschaften einnehmen können. An dieser Stelle soll nun kurz angesprochen werden, welche Vorstellung davon besteht, wie ein möglicher Wechsel zwischen offener und geschlossener Konformation der ERM-Proteine reguliert wird und welche Effekte diese Konformationsänderung hat:

Die Aktivierung der ERM-Proteine wird indirekt durch die RhoAGTPase, dem Prototyp der kleinen G-Proteine der Rho-Familie, gesteuert. GTP-beladenes, aktives RhoA aktiviert seinerseits die Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase (PI4P5K), die zur Entstehung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) beiträgt. PIP<sub>2</sub> bindet an den N-Terminus der ERM-Proteine und ermöglicht dadurch wahrscheinlich die Konformationsänderung in die geöffnete Form, die durch Phosphorylierung eines Threonins in der C-terminalen Domäne durch die Proteinkinase C  $\theta$  (PKC $\theta$ ) aktiviert und stabilisiert wird. Nur in der offenen Form ist Ligandenbindung möglich. In dieser aktiven, C-terminal phosphorylierten Form (als CPERM bezeichnet, s. Abb. 5.12) werden die ERM-Proteine an die Plasmamembran rekrutiert und sind dort durch die Verbindung des Aktinzytoskellts mit der Plasmamembran an der Bildung von Mikrovilli beteiligt (Simons et al. 1998; Matsui et al. 1999).

Auch Merlin besitzt an der entsprechenden Stelle im C-Terminus ein Threonin. Es ist jedoch noch unklar, ob eine Konformationsänderung bzw. Aktivierung des Merlins in Isoform 1 ebenfalls durch eine Phosphorylierung dieses Threonins stabilisiert wird. Da die Interaktion zwischen der Merlinisoform 1 und einem seiner Interaktionspartner, der

regulatorischen Untereinheit des Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauschproteins (NHE-RF) in Gegenwart des Phosphoinositids PIP<sub>2</sub> erleichtert wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch Merlin, wie die ERM-Proteine, über diese Reaktionskette (Rho-AGTP → PI4P5K → PKC $\theta$ ) aktiviert wird (Gonzalez-Agosti et al. 1999).

**Heterotypische Interaktion des Merlins mit den ERM-Proteinen.** Merlinisoform 1 tritt aber nicht nur mit sich selbst in Wechselwirkung, sondern auch heterotypisch mit Moesin oder auch Ezrin (Gonzalez-Agosti et al. 1999; Grönholm et al. 1999). Die Assoziation des Merlins mit Ezrin oder Moesin erfolgt, wie die homotypische Interaktion, über eine Assoziation des C-Terminus mit dem N-Terminus des heterotypischen Partners oder vice versa. Diese heterotypische Interaktion findet aber nicht zwischen den Proteinen vollständiger Länge statt, was erkennen lässt, dass durch intramolekulare Interaktionen entsprechende Bindungsstellen für heterotypische Assoziation maskiert werden.

Die Untersuchungen darüber, welche Region des Ezrins und des Merlins für diese Heterodimerisierung verantwortlich sind, zeigten, dass die letzten 109 AS des Ezrins ausreichen, damit eine Interaktion mit dem N-Terminus des Merlins zustande kommt. Während die C-ERMAD (C-terminale ERM-Assoziationsdomäne) des Ezrins auf den Bereich zwischen den Aminosäuren 479 und 585 eingegrenzt werden konnte, steht bei Merlin eine solche Eingrenzung noch aus. Für inter- und auch intramolekulare Interaktionen ist der Bereich des Merlins zwischen den Aminosäurepositionen 252 und 595 nötig, die Assoziationsvorgänge bedürfen also

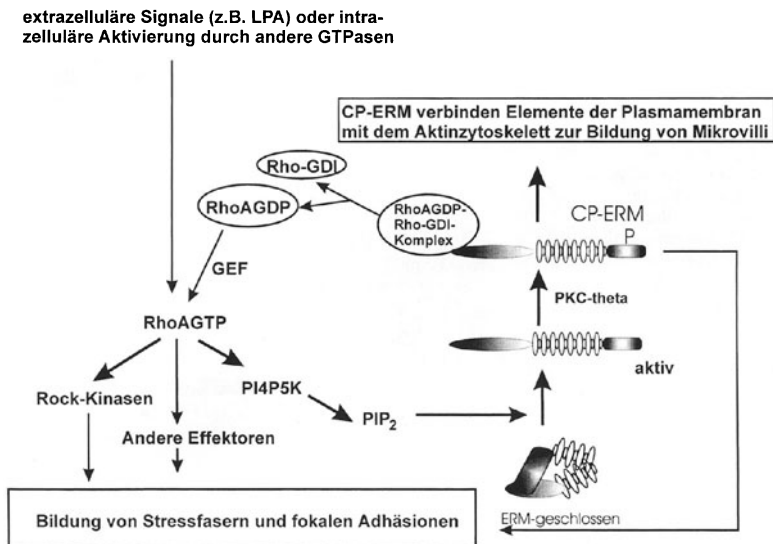


Abb. 5.12. Modell der RhoA-abhängigen Regulation der ERM-Proteine. Extrazelluläre Stimuli, wie z.B. LPA (Lyso-phosphatidsäure) oder intrazelluläre Aktivierung durch andere GTPasen, führen zu einer Aktivierung von RhoA. Mehrere, durch aktiviertes RhoA vermittelte Signaltransduktionswege regulieren die Organisation des Aktinzytoskeletts. Die Rho-abhängige Aktivierung der PI4P5K (Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase) bewirkt einen Anstieg der PIP<sub>2</sub>-Konzentration (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat), das den Übergang der ERM-Proteine in die offene Konformation erleichtert. Diese geöffnete Form wird durch die Phosphorylierung eines Threonins im C-Terminus durch Kinasen wie die Proteinkinase C- $\theta$  (PKC- $\theta$ ) stabilisiert. In

C-terminal phosphorylierter Form (CP-ERM) können die ERM-Proteine mit dem Rho-GDI-Komplex interagieren, was zu einer Inhibition und Dissoziation des GDI führt (guanin nucleotide dissociation-inhibitor) und RhoGDP freisetzt. GDP-beladenes RhoA kann durch GEF in die aktivierte GTP-gebundene Form überführt werden. Auf diese Weise sind aktivierte ERM-Proteine selbst an der Aktivierung von RhoA beteiligt. Zu den Effektoren des aktivierten RhoA zählt die Gruppe der Rock-Kinasen, die nicht an der RhoA-vermittelten Mikrovilliorganisation mitwirken, aber an der Bildung von Stressfasern und Adhäsionsfoci beteiligt sind. Hierbei wirken neben anderen Effektoren von RhoA auch die ERM-Proteine mit

auch einer funktionsfähigen  $\alpha$ -helikalen Domäne. Angesichts der Aminosäuredivergenz des C-Terminus zwischen Merlin und den ERM-Proteinen ist es erstaunlich, dass dieser Bereich des Merlins mit dem N-Terminus des Ezrin interagieren kann. Trotz der Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen von Merlin und Ezrin im C-terminalen Bereich ist bei beiden die Anwesenheit der letzten C-terminalen Aminosäuren für Interaktionen besonders wichtig (Gary und Bretscher 1995; Grönholm et al. 1999).

Ein interessanter Aspekt möglicher Regulationsmechanismen der Interaktionen des Merlins in Isoform 1 ergibt sich aus der Beobachtung, dass das vollständige Merlin im 2-Hybrid-Test mit N-terminal und C-terminal deletierten Merlinformen interagieren kann, nicht aber mit N- oder C-terminal deletiertem Ezrin. Heterotypische Interaktionen sind bei diesen Versuchen nur

möglich, wenn Merlin und Ezrin als trunkierte Proteine exprimiert werden. Diese Experimente können so interpretiert werden, dass die Bindungsstellen für Homodimerisierung bei der Merlinisoform 1 exponiert sind, während die Bereiche, die zur Interaktion mit Ezrin benötigt werden, maskiert sind. Dies würde bedeuten, dass eine Heterodimerisierung zwischen nativem Merlin mit Ezrin einer aktivierenden Konformationsänderung beider Proteine bedarf. Diese unterschiedliche Regulation von Homo- vs. Heterodimerisierung lässt ahnen, dass eine Rangordnung der Interaktionspartner existiert, die von intrazellulären Signalen moduliert wird, welche die Aktivierung von Ezrin oder Merlin regulieren. Da Koimmunpräzipitationsexperimente an Zellextrakten gezeigt haben, dass Ezrin und Merlin interagieren, muss zumindest ein Anteil dieser Proteine in der aktivierten Konformation vorliegen (Grönholm et al. 1999).

### 5.4.5.6 Interaktionspartner des Merlins und der ERM-Proteine

Die Moleküle, mit denen die MERM-Proteine Wechselwirkungen eingehen, sind in Tabelle 5.26 zusammengefasst. Nur solche Bindungspartner haben Berücksichtigung gefunden, deren Interaktion mit Merlin durch mindestens 2 verschiedene Methoden nachgewiesen wurde. Das angewendete Methodenarsenal umfasst den immunzytochemischen Nachweis der Kollokalisierung, Koimmunpräzipitation und Western-Blot, fraktionierte Elution mit ionischen oder nichtionischen Detergenzien, Affinitätsadsorption an eine matrixgebundene Komponente (entweder Merlin oder Bindungspartner) und der Hefe-2-Hybrid-Test. Bis auf die hochaffine Bindungsstelle für F-Aktin befinden sich die Bindungsstellen für die Interaktionspartner der ERM-Proteine im Bereich der N-ERMAD (Abb. 5.6). Aufgrund ihrer bipolaren Struktur und Orientierung können die ERM-Proteine sowohl mit dem submembranären Zytoskelett als auch mit transmembranären oder mit membranassoziierten Adaptorproteinen interagieren (Gruppe 2, Tabelle 5.26). Darüber hinaus bestehen auch heterotypische Interaktionen zwischen den Mitgliedern der MERM-Familie (Gruppe 3, s. Kapitel „Interdomänenassoziation des Merlins“, Unterkapitel „Heterotypische Interaktion des Merlins mit den ERM-Proteinen“) und Assoziationen mit einer Reihe anderer Proteine (Gruppe 4) und regulatorisch wirksamer Faktoren, zu denen auch Kleinmoleküle aus der Klasse der Phosphatidylinositide gehören (Gruppe 5). Im Nachfolgenden wird detailliert auf die einzelnen Interaktionspartner eingegangen, da diese Wechselwirkungen für das Verständnis der Pathogenese der NF2 von Bedeutung sind.

**Assoziation des Merlins mit Komponenten des Zytoskeletts.** Merlin interagiert mit dem Aktinzytoskelett über eine N-terminale Aktinbindungsstelle, die etwa im Übergangsbereich zwischen der N-terminalen und der  $\alpha$ -helikalen Domäne in dem von Exon 10 kodierten Bereich lokalisiert ist (Xu u. Gutmann et al. 1998).

Zusätzlich assoziiert Merlin über eine C-terminal lokalisierte Bindungsstelle mit  $\beta$ II-Spektrin, das selbst zur großen Gruppe der Aktin bindenden Proteine gehört (Scoles et al. 1998).

Neben der Assoziation mit Aktin kann Merlin in vitro auch mit einer anderen Komponente des Zytoskeletts, den Mikrotubuli, interagieren. Bei Experimenten mit polymerisierten Mikrotubuli assoziiert jedoch nur die Isoform 2 des Merlins, die

Tabelle 5.26. Interaktionspartner der MERM-Proteine

Interaktionspartner	Merlin	Ezrin	Radixin	Moesin
<i>1. Innenseite der Zellmembran</i>				
CD44	+	+	+	+
ICAM-1		+	+	+
ICAM-2		+	+	+
ICAM-3				+
EBP50 (NHE-RF)	+	+	+	+
E3KARP	+	+		
CD43		+	+	+
<i>2. Zytoskelett</i>				
F-Aktin	+	+	+	+
$\beta$ II-Spektrin	+			
Mikrotubuli	+			
<i>3. Hetero- und homotypische Interaktionen innerhalb der MERM-Gruppe</i>				
Merlin	+	+		
Ezrin	+	+		+
Radixin				
Moesin	+	+		
<i>4. Andere Proteine</i>				
RhoGDI	+	+	+	+
Dbl			+	
PKA		+		+
hDlg		+		
p165	+			
p145	+			
p125	+			
p85	+			
p70	+			
<i>5. Botenstoffe</i>				
Phosphatidylinositol 4,5 Bisphosphat (PIP <sub>2</sub> )	+	+	+	

nativ immer in der offenen Form vorliegt, mit Mikrotubuli. Auch C-terminal deletierte Formen des Merlins können in vitro an polymerisierte Mikrotubuli binden, nicht aber N-terminal deletierte Merlinmutanten oder die Full-length-Isoform 1, die intramolekulare Interaktionen eingeht. Da Letztere trotz intramolekularer Assoziation in der Lage ist, mit Aktin in Wechselwirkung zu treten, müssen separate Regionen in der N-terminalen Domäne als Bindungsstellen für Aktin und Mikrotubuli fungieren. In der geschlossenen Form ist die Mikrotubuli bindende Domäne des Merlins maskiert, während sie in der offenen Form zugänglich ist (Abb. 5.11). Bei ektopischer Expression der Merlinisoform 1 in HeLa-Zellen ist keine Kollokalisierung mit Mikrotubuli zu beobachten und die Behandlung mit Nocodazol, welches die Tubulinpolymerisation hemmt, beeinflusst die subzelluläre Lokalisation der ektopisch exprimierten Merlinisoform 1 nicht (Deguen et al. 1998). Aufgrund

der bislang geschilderten Eigenschaften des Merlins lässt sich erahnen, dass die wachstumssupprimierenden Eigenschaften von Merlin, die ja nur in der geschlossenen Form wirksam werden, durch Interaktion mit dem Zytoskelett moduliert werden (Xu u. Gutmann 1998).

**Interaktion mit Proteinen an der Innenseite der Zellmembran.** Zu den submembranär lokalisierten Interaktionspartnern der MERM-Proteine zählt EBP50 (*Ezrin bindendes Protein*), das aus 358 AS besteht und 2 PDZ-Domänen enthält (Murthy et al. 1998). Der Name dieser Domänen leitet sich von den 3 Proteinen

- PSD-95 (postsynaptic density protein),
- Dlg (*Drosophila disc large septate junction protein*) und
- ZO-1 (mammalian epithelial tight-junction protein of the zona occludens)

ab, bei denen die zugrunde liegenden Sequenzmotive zuerst entdeckt worden sind. PDZ-Domänen dienen als Module für Protein-Protein-Interaktionen. EBP50 ist das menschliche Homolog des Kaninchen-NHE-RF-Proteins, das als regulatorischer Kofaktor des  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauschproteins NHE fungiert. Letzteres ist beispielsweise in die transepitheliale  $\text{Na}^+$ -Absorption in Dünn- und Dickdarm involviert. In vivo ist eine Interaktion zwischen EBP50 und dem N-Terminus der MERM-Proteine nur in Gegenwart von Phosphatidylinositol-4-Phosphat und  $\text{PIP}_2$  möglich, da diese Interaktion die offene Konformation der MERM-Proteine voraussetzt. Im Fall des Merlins gilt dies jedoch nur für die Isoform 1. Phospholipidzusatz verändert die Affinität der Merlinisoform 2 zu EBP50 nicht, da diese Form keine intramolekulare Assoziation eingeht, welche die Bindungsstelle für EBP50 maskieren würde. Entsprechend fanden Gonzalez-Agosti et al. (1999), dass die Isoform 2 des Merlins die regulatorische Untereinheit des  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauschproteins effizienter binden kann, als die Isoform 1, da N-terminale Bindungsstellen hierfür nicht durch intramolekulare Assoziation maskiert sind. Das Gleiche gilt für  $\beta$ II-Spektrin, einen Interaktionspartner, der an den C-Terminus des Merlin bindet. Die physiologische Bedeutung der Interaktion des Merlins mit EBP50 ist unklar, aber im Zusammenhang mit den wachstumsregulierenden Eigenschaften des Merlins ist interessant, dass die Stimulation des  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauschproteins mit erhöhter Zellproliferation oder Differenzierung als Reaktion auf den Einfluss entsprechender Faktoren einhergeht (Ritter et al. 1997).

**Transmembranäre Interaktionspartner.** Durch die Interaktion mit Adaptorproteinen wie EBP50 oder E3KARP (NHE3-Kinase-A-Regulator-Protein 2) an der Innenseite der Plasmamembran interagieren die MERM-Proteine auf indirekte Weise mit transmembranären Proteinen.

Neben dieser indirekten ist auch eine direkte Interaktion der MERM-Proteine mit intrazellulären Domänen von Transmembranproteinen möglich, die über spezifische Bindungsmotive in den N-terminalen Domänen erfolgt. Zu den direkten Interaktionspartnern gehört das ubiquitär exprimierte 56 kDa-CD44-Transmembrannglykoprotein, das als einer der Hyaluronatrezeptoren (Übersicht: Sherman et al. 1994) und als ein Lymphozyten-Homing-Rezeptor bekannt ist. In der Krebsforschung hat CD44 große Bedeutung erlangt, da die Expression von Spleißvarianten mit einem oder mehreren von 10 alternativen Exons (v1-v10) in hohem Maß mit der Metastasenbildung korreliert ist (Ponta et al. 1994). Neben den Bindungsdeterminanten für Hyaluronat enthält der umfangreichere extrazelluläre Anteil des CD44 auch solche für andere Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), wie Kollagen, Fibronectin und Laminin. CD44 gehört somit auch zu den Zell-Matrix-Adhäsionsproteinen. Als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül fungiert es mittels wechselseitiger Bindung an membranständige Mukopolysaccharide. Damit ist das funktionelle Repertoire des CD44 und seiner Isoformen nicht erschöpft. Der extrazelluläre Anteil trägt auch Stellen für die kovalente Bindung von Chondroitinsulfat (im Sinn einer posttranslationalen Modifikation), sodass CD44 selbst als Proteoglykan fungiert, das mittels seines Glykans Wachstumsfaktoren an der Zelloberfläche sequestriert. Darüber hinaus ist die intrazelluläre Domäne des CD44 an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt, indem sie mit Proteinkinasen bzw. mit der Rho-AGTPase in Wechselwirkung tritt. Vor diesem Hintergrund erweist sich die Beanspruchung der intrazellulären Domäne des CD44 durch die 4 MERM-Proteine als eine weitere Komplikation eines bereits außerordentlich komplexen Systems: Zusätzlich zu seinen übrigen Funktionen ist CD44 über Ankyrin, durch die ERM-Proteine (Tsukita et al. 1994; Hirao et al. 1996) und durch Merlin (Sainio et al. 1997) an der Verknüpfung der Plasmamembran mit dem kortikalen (submembranären) Zytoskelett beteiligt. In COS-1-Zellen vermag Merlin, die Verteilung von CD44 in der Plasmamembran zu beeinflussen. Nach transientscher Transfektion mit einem Merlinexpressionsvektor kommt es zur Akkumulation beider Proteine in Membran-

ausstülpungen (Sainio et al. 1997). Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit der Dimerisierung von CD44 erhöht, welche Voraussetzung für die Zelladhäsion an Hyaluronsäure der ECM ist. Auf diese Weise könnte Merlin die Zell-Matrix-Adhäsion positiv beeinflussen, was mit seiner Funktion als Tumorsuppressor vereinbar wäre. Die Hypothese findet Bestätigung in den von Huynh u. Pulst (1996) an einer Schwannom- und einer Glioblastomzelllinie erhobenen Befunden, wonach Antisense-Oligonukleotide gegen Merlin-mRNA parallel zur Hemmung der Merlinsynthese Abrundung und leichtere Ablösbarkeit der Zellen zur Folge haben. Ganz analoge Ergebnisse waren zuvor mit Antisense-Oligonukleotiden gegen die mRNA der ERM-Proteine erhalten worden (Takeuchi et al. 1994). Die ektoische Expression N-terminal deletierter Merlinmutanten in SV40-transformierten Fibroblasten führt zur Substratablösung der Zellen 24 h nach der Transfektion (Koga et al. 1998). Merlin nimmt also wie die ERM-Proteine eine wichtige Stellung bei der Regulation der Zelladhäsion ein.

Auch die interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1, -2 und -3, die zusammen mit NCAM, VCAM und PECAM zur Familie der immunoglobulinähnlichen Adhäsionsmoleküle gehören, sind in vielfältige Wechselwirkungen involviert und zählen zu den Interaktionspartnern der ERM-Proteine (Heiska et al. 1998). Zu den transmembranären Bindungspartnern des Merlins zählt sehr wahrscheinlich auch  $\beta$ -Integrin, das in differenzierenden Schwann-Zellen, die eine Basallamina ausbilden, mit Merlin kolokalisiert und koimmunpräzipitiert werden kann (Obremski et al. 1998).

#### **Interaktion mit anderen Proteinen wie z.B. Rho-GDI.**

Zu den Interaktionspartnern, die an die N-terminale Domäne der ERM-Proteine binden, gehört auch der Komplex aus RhoGDP und Rho-GDI (RhoGDP-Dissoziationsinhibitor). Die Rho-Familie kleiner G-Proteine oder GTPasen umfasst die Proteine RhoA-RhoG, Rac1, Rac2, CDC42, TC10 und TTF. Mitglieder dieser Rho-Familie sind an der Regulation der Beweglichkeit von Zellen, der Veränderung der Zellform und an der Zytokinese beteiligt. Die Konversion der inaktiven, GDP-gebundenen Form von Rho in die aktive GTP-gebundene Form wird durch 2 Arten von Regulatoren beeinflusst:

1. durch GDP-GTP-Austauschfaktoren (GEF: guanine nucleotide exchange factors), welche die Bindung von GTP fördern,
2. durch den GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI).

Im Komplex von RhoGDP mit Rho-GDI wird die Aktivierung von Rho durch GEF wie z.B. Dbl verhindert (das Gen des Austauschfaktors Dbl wurde zum 1. Mal aus einem diffusen B-Zell-Lymphom isoliert und nach diesem benannt). In-vivo- und In-vitro-Analysen haben gezeigt, dass die Bindung des RhoA-Rho-GDI-Komplexes an die ERM-Proteine zur Inhibition des Rho-GDI führt und so die Dissoziation des GDP von Rho und dessen GTP-Beladung ermöglicht (Takahashi et al. 1997, 1998). Durch die Bindung der ERM-Proteine wird die Aktivierung von Rho eingeleitet, denn nun ist RhoGDP zugänglich für Austauschfaktoren, die die GTP-Bindung von Rho begünstigen. Der Rho-GDI-Komplex bindet jedoch nur an die N-terminale Domäne der ERM-Proteine, nicht an die vollständigen Proteine in geschlossener Form, da die intramolekulare Assoziation die Bindungsstelle für Rho-GDI maskiert. Wie in Abb. 5.12 vereinfacht dargestellt, tragen die ERM-Proteine auf diese Weise zur Aktivierung von RhoA bei, das seinerseits über 1 seiner 7 Effektoren, die PI4P5-Kinase, die Aktivierung der ERM-Proteine steuert. Die Bindung des Rho-GDI-Komplexes durch die ERM-Proteine führt also indirekt zu ihrer eigenen Aktivierung.

RhoA reguliert die Assoziation der ERM-Proteine mit CD44 und ihre Rekrutierung in apikalen Membranen sowie die Aktinpolymerisation in Zellfortsätzen wie Mikrovilli (Hirao et al. 1996; Tsukita et al. 1999). Da die Phosphorylierung und Aktivierung der ERM-Proteine direkt mit der Bildung von Mikrovilli korreliert ist (Oshiro et al. 1998; Matsui et al. 1998, 1999), wird angenommen, dass die ERM-Proteine selbst die Verlängerung der Aktinmikrofilamente steuern. Die Bindung von Rho-GDI im aktivierten Zustand deutet daraufhin, dass die ERM-Proteine, einmal aktiviert, zur Aufrechterhaltung des Rho-Signalwegs beitragen (Mangeat et al. 1999).

Auch Merlin kann mit Rho-GDI interagieren, wobei aber in vitro nur die N-terminale Domäne der Isoform 1 an Rho-GDI bindet, nicht das vollständige Merlin 1. Im Gegensatz hierzu kann die Merlinisoform 2 als vollständiges Protein mit Rho-GDI interagieren, da diese Form keine intramolekulare Assoziation eingeht, was sie von den ERM-Proteinen und der Merlinisoform 1 unterscheidet (Maeda et al. 1999). Die ERM-Proteine müssen erst an einem C-terminalen Threonin phosphoryliert werden, um in die Rho-GDI-bindungsfähige, offene Form überzugehen. Auch Merlinisoform 1 interagiert nur in der geöffneten Form mit Rho-GDI, jedoch ist noch nicht sicher,

ob die Aktivierung von Merlin auf die gleiche Weise reguliert wird wie die der ERM-Proteine.

Da Merlin den Rho-GDI-Komplex mit gleicher Affinität bindet wie die ERM-Proteine, ist anzunehmen, dass auch Merlin zur Aktivierung von RhoA beitragen kann und selbst wiederum durch Rho-vermittelte Signaltransduktionswege in seiner Aktivität reguliert wird. Hierfür spricht auch die Beobachtung von Gonzalez-Agosti et al. (1999), dass die Fähigkeit der Merlinisoform 1, den Interaktionspartner NHE-RF zu binden, in Gegenwart von PIP<sub>2</sub> stark erhöht ist. Die Synthese von PIP<sub>2</sub> wird wiederum durch Rho-vermittelte Signaltransduktion gesteuert, denn die PI4P5-Kinase Typ 1 $\alpha$  ist ein direkter Effektor von RhoA (Abb. 5.12). Mit der Bindung des Rho-GDI-Komplexes ist die Fülle der Proteine, die mit Merlin interagieren können, jedoch noch nicht ausgeschöpft. Takeshima et al. (1994) konnten zeigen, dass noch nicht näher charakterisierte Proteine, nach ihren Molekulargewichten als p165, p145, p125, p85 und p70 benannt, mit Merlin interagieren können.

#### 5.4.5.7 Merlin als negativer Wachstumsregulator

Da NF2-Patienten ein erhöhtes Risiko haben, an Meningeomen, Schwannomen und glialen Tumoren zu erkranken, und in diesen Tumoren der Verlust des Wildtypalleles des NF2-Gens erfolgt, ist Merlin der Gruppe der Tumorsuppressoren zuzuordnen. Auch die hohe Rate maligner Tumoren bei heterozygoten NF2-Knockout-Mäusen unterstreicht die Rolle von Merlin als negativem Regulator des Zellwachstums (McClatchey et al. 1998). Den experimentellen Beweis hierfür lieferte die Hemmung der Merlinexpression in einer Schwann-Zell-Linie (STS26T) mit Oligonukleotiden, die zur Merlin-mRNA komplementäre Sequenzen enthielten. Dies hatte eine gesteigerte Proliferation, veränderte Zellmorphologie und verminderte Adhärenz zur Folge (Huynh u. Pulst 1996). Dementsprechend kam es nach Transfektion mit Expressionsvektoren, die Wildtyp-NF2-cDNA enthielten, zu einer Reduktion der Proliferationsrate von Maus-NIH3T3-Zellen, die endogen nur sehr geringe Mengen des Merlins exprimieren. Die wachstumssupprimierende Wirkung der Transfektion mit Wildtyp-NF2-cDNA konnte in diesem Experiment durch NF2-Antisense-Oligonukleotide aufgehoben werden (Lutchman u. Rouleau 1995). Die Expression des endogenen Merlins wird in NIH3T3-Zellkulturen beim Erreichen eines konfluenten Stadiums und bei Serumentzug erhöht. Dieser Effekt ist für Wachstumsstillstand durch Konfluenz bzw. Se-

rummentzug spezifisch, da er nicht bei Zellen zu beobachten ist, die in der G<sub>1</sub>-, S- oder G<sub>2</sub>-M-Phase des Zellzyklus arretiert worden sind (Shaw et al. 1998a). Offenbar hat Merlin auch in diesem System eine negativ regulierende Wirkung auf die Zellproliferation. Die wachstumssupprimierende Wirkung von Merlin ist jedoch spezifisch für die Isoform 1. Nur nach Transfektion von Rattenschwannomlinien mit cDNA-Konstrukten der Merlinisoform 1 wird das Zellwachstum gehemmt, nicht aber nach Transfektion mit Isoform 2. Die wachstumshemmende Wirkung ist jedoch aufgehoben, wenn cDNA-Konstrukte transfiziert werden, die C-terminal trunziert sind oder solche, die nur die N-terminale oder nur die C-terminale Domäne enthalten. Wird jedoch mit 2 Arten von Expressionsvektoren gleichzeitig transfiziert, solchen, die für die C-terminale Merlindomäne kodieren und solchen mit der N-terminalen Domäne, so ist Wachstumsinhibition zu beobachten. Diese Befunde belegen die funktionelle Bedeutung der in Kapitel 5.4.5.5 „Interdomänenassoziation des Merlins“ besprochenen Interaktion zwischen der N- und der C-terminalen Domäne des Merlins in *cis* oder in *trans* für die Wachstumssuppression durch die Merlinisoform 1 (Sherman et al. 1997a).

Die Überexpression der NF2-Isoform 1 in Rattenschwannomzelllinien führt nicht nur zu einer reduzierten Proliferationsrate, sondern auch zu einer stark eingeschränkten Beweglichkeit der Zellen. Dieser Effekt ist nicht nach Transfektion mit der Isoform 2 oder mutanten NF2-cDNA-Konstrukten zu beobachten. Die wachstumshemmende Eigenschaft von Merlin scheint also direkt mit der Fähigkeit, die Beweglichkeit von Zellen zu steuern, korreliert zu sein. Dabei beeinflusst Merlin jedoch nicht die Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin, Ezrin oder Moesin. Die Überexpression der NF2-Isoform 1 in Ratten-Schwann-Zell-Linien führt auch zu einer verminderten Adhärenz nach Ausplattierung, die von einer Veränderung im Aktinzytoskelett begleitet ist. Diese Effekte der Merlinüberexpression sind transient, sie sind nur während der ersten 3 h nach Ausplattieren festzustellen (Gutmann et al. 1999d).

Da die transient exprimierte Isoform 1 wachstumssupprimierende Wirkung hat und diese von einer eingeschränkten Beweglichkeit und einer verminderten Substratadhäsion begleitet ist, ist zu folgern, dass Merlin seine wachstumsregulierende Funktion vermutlich über eine Interaktion mit dem Zytoskelett ausübt. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die N-terminale Aktinbindungsstelle des Merlins trotz intramolekularer

Komplexbildung nicht maskiert ist (Abb. 5.11). Sowohl die so genannte offene Form als auch die geschlossene Isoform des Merlins binden an Aktin. Diese Bindung erfolgt also unabhängig von der wachstumsregulierenden Funktion.

#### 5.4.5.8 Regulation des Merlins durch posttranslationale Modifikation

Es gibt Hinweise darauf, dass Merlin durch Phosphorylierung und/oder selektive Proteolyse reguliert werden kann (Shaw et al. 1998 a). Merlin ist in Zelllysaten aus verschiedensten humanen und Nagerzelllinien als ein Protein mit einem MG von etwa 70 KDa nachzuweisen, das in unphosphorylierter und phosphorylierter Form auftritt. Die Expression beider Formen wird erhöht, wenn die Zellen in Kultur ein konfluentes Stadium erlangen oder auch bei Serumentzug, wobei die unphosphorylierte Merlinform dominiert. Zunehmender Zell-Zell-Kontakt und Serumentzug wirken synergistisch auf die verstärkte Expression des Merlins, die spezifisch auf diese Parameter erfolgt und nicht durch bloße Arretierung der Zellen im Zellzyklus zu erzielen ist. Nach Serumentzug und darauf folgender Restimulation durch Zugabe von Serum ist innerhalb von wenigen Minuten ein Rückgang der Merlinexpression festzustellen, wobei ein stärkerer Abbau speziell der nichtphosphorylierten Merlinform erfolgt. Diese Beobachtungen sprechen für eine spezifische Degradierung insbesondere des nichtphosphorylierten Merlins im Zug von wachstumsfaktorvermittelten Signaltransduktionswegen.

Nicht nur Serumentzug oder die Etablierung von Zell-Zell-Kontakten beeinflussen das quantitative Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem Merlin, sondern auch der Verlust der Substratadhäsion. Werden Zellen in Suspension gehalten, kommt es zu einer schnellen Dephosphorylierung des Merlins. Breiten sich die Zellen auf dem Substrat aus, steigt die Menge des phosphorylierten Merlins wieder an. Alle Untersuchungen weisen bislang darauf hin, dass Merlin an Serin- und an Threoninresten, nicht aber an Tyrosin phosphoryliert wird. Veränderungen im Phosphorylierungsmuster waren nach dem Entzug oder dem Zusatz von Serum oder nach dem Erreichen der Konfluenz nicht zu beobachten (Shaw et al. 1998 a). Auch die Mitglieder der ERM-Familie werden nach Serumzusatz an Serin und Threonin, aber auch an Tyrosin phosphoryliert. Welche Wachstumsfaktoren die Phosphorylierung von Merlin induzieren können, ist noch unbekannt. Die Veränderung der Expression und des Verhält-

nisses der phosphorylierten zur nichtphosphorylierten Form des Merlins bei Konfluenz, Serumentzug oder Verlust der Substratadhäsion könnten mit einer übergeordneten Regulation des Zytoskeletts durch Mitglieder der RhoGTPasen in Zusammenhang stehen. Die geschilderten Experimente weisen darauf hin, dass Merlin besonders während der Antwort auf Bedingungen, welche der Proliferation eher abträglich sind, wachstumshemmend wirkt. Dazu gehören der Verlust der Substratadhäsion, zunehmender Zell-Zell-Kontakt und Mangel an Wachstumsfaktoren. Merlin ist unter diesen Bedingungen daran beteiligt, den Eintritt in den Zellzyklus zu verhindern. Dabei scheint die unphosphorylierte Form des Merlins die aktive wachstumssupprimierende Form zu sein.

Wie Kimura et al. (1998) zeigen konnten, wird Merlin intrazellulär durch die  $\mu$ - und m-Calpaine abgebaut, die zur großen Familie der kalziumabhängigen neutralen Cysteinproteasen gehören. Die Aktivität des calpainvermittelten proteolytischen Abbaus hängt nicht nur von der Mobilisierung des intrazellulären Kalziums ab, sondern auch von der Phosphorylierung des Substrats, die den proteolytischen Abbau hemmen oder fördern kann. Möglicherweise beeinflusst der Phosphorylierungsstatus des Merlins die Sensitivität gegenüber dem proteolytischen Abbau durch das Calpainsystem.

#### 5.4.5.9 Merlin vs. ERM-Proteine: Gemeinsamkeiten und Gegensätze

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargestellt, teilt Merlin einige Charakteristika mit den ERM-Proteinen. Im Vordergrund steht hierbei die Gemeinsamkeit der beschriebenen Domänenstruktur des Merlins und der ERM-Proteine. Besonders die hohe Ähnlichkeit im N-terminalen Bereich der ERM-Familie lässt auf gemeinsame Funktionen schließen, was durch ein überlappendes Spektrum an Interaktionspartnern reflektiert wird. In diesem Zusammenhang ist auch die gemeinsame submembranäre Lokalisation anzuführen, insbesondere die Konzentration in Mikrovilli und gekräuselten Membranen in Fibroblastenkulturen, wobei jedoch zu bemerken ist, dass Merlin, im Gegensatz zu den ERM-Proteinen, auch in perinukleären Bereichen in bislang uncharakterisierten Granula zu finden ist.

In Anbetracht der Gemeinsamkeiten zwischen Merlin und den ERM-Proteinen drängt sich die Frage auf, ob die ERM-Proteine zueinander in Konkurrenz stehen. Das molare Verhältnis des Merlins zu den ERM-Proteinen von 0,05–0,15 in

Fibroblasten und epithelialen Zellen spricht nicht dafür, dass Merlin unter physiologischen Bedingungen mit den ERM-Proteinen um Bindungspartner konkurriert (Maeda et al. 1999), es sei denn, es wäre mit höherer Affinität zu den Interaktionspartnern ausgestattet.

Die 2. Frage, die sich aufgrund der gemeinsamen Eigenschaften stellt, ist die nach der Redundanz der Funktionen von Merlin und den ERM-Proteinen. Alle 4 Proteine sind an der Organisation der Vernetzung von Zytoskelettelementen mit membranständigen Proteinen beteiligt. Jedoch besitzt Merlin nicht die hochaffine Aktinbindungsstelle am extremen C-Terminus der ERM-Proteine. Die Suppression der Expression der ERM-Proteine mit Antisense-Oligonukleotiden führt zwar bei allen zu gravierenden Störungen der Mikrovillusbildung, der Zellbeweglichkeit und der Substratadhäsion, aber nur im Fall von Merlin auch zur erhöhten Proliferation (Huynh u. Pulst 1996; Takeuchi et al. 1994). Auch der Vergleich der Phänotypen bei Knockout-Embryonen spricht nicht für ein stark überlappendes Funktionsspektrum. Nf2(-/-)-Embryonen können die Gastrulation aufgrund einer Fehlorganisation des extraembryonalen Gewebes nicht einleiten. Moesindefiziente Knockout-Mäuse dagegen entwickeln sich normal und haben keinen pathologischen Phänotyp, wobei der Verlust von Moesin nicht durch eine verstärkte Expression von Ezrin oder Radixin kompensiert zu werden braucht (Doi et al. 1999). Bei den ERM-Proteinen der Maus besteht also eine gewisse funktionelle Redundanz. Alle Mitglieder der ERM-Familie binden Rho-GDI und sind an der Aktivierung von RhoA beteiligt. Wie in Kapitel 5.4.5.6 „Interaktionspartner des Merlins und der ERM-Proteine“, Unterkapitel „Interaktion mit anderen Proteinen wie z.B. Rho-GDI“, näher erläutert, werden die ERM-Proteine durch die Rho-vermittelte Entstehung von PIP<sub>2</sub> aktiviert, durch die Bindung von Rho-GDI tragen sie aber selbst auch zur Aktivierung von RhoA bei. Da Merlin-Rho-GDI mit vergleichbarer Affinität bindet wie die ERM-Proteine, ist auch Merlin in die Aktivierung von Rho involviert. Inwiefern auch Merlin durch Rho-vermittelte Signaltransduktionswege aktiviert wird, ist noch unklar.

## 5.4.6 Pathogenese der NF2

### 5.4.6.1 Schwannome

Für die Entstehung der Tumoren, die von Schwann-Zellen ausgehen, gibt es wie bei den meisten Tumorarten, verschiedene Ursachen:

- die Aktivierung des Protoonkogens erbB2 (Neu) und
- die Defizienz der Tumorsuppressorproteine Neurofibromin bzw. Merlin (Schwannomin).

Vestibularisschwannome sind das Hauptkennzeichen der NF2; sind sie bilateral, ist NF2 zu diagnostizieren. VS treten bei 98% der NF2-Patienten auf und führen zu den häufigsten Komplikationen im Rahmen dieses Krankheitsbilds (Evans et al. 1992b, Parry et al. 1994). Im Vergleich zu den VS sporadischer Patienten werden bilaterale Tumoren in einem früheren Alter symptomatisch. Histologische Unterschiede zwischen sporadischen VS und solchen von NF2-Patienten sind von Sobel et al. (1993) beschrieben worden. Verocay-Körperchen, Areale besonders hoher Zelldichte und lobuläre Wachstumsmuster sind häufigere Charakteristika der NF2-assoziierten VS. Bei NF2-Patienten enthalten VS oft Nervenfasern des 7. und/oder des 8. kranialen Nerven, wohingegen Axone in sporadischen VS seltener zu beobachten sind (Jaaskelainen et al. 1994). Trotz dieser histopathologischen Unterschiede kann aufgrund molekularbiologischer Studien davon ausgegangen werden, dass den meisten sporadischen und NF2-assoziierten VS die gleichen Ursachen zugrunde liegen (s. unten). Dies gilt auch für Schwannome, die von Schwann-Zellen anderer peripherer Nerven ausgehen, wobei am häufigsten kraniale und spinale Nerven betroffen sind. Die Studie von Evans et al. (1992b) belegt, dass bei NF2-Patienten nach dem 8. der 5. kraniale Nerv (N. trigeminus) am häufigsten von Tumoren befallen ist. Sehr oft gehen NF2-assoziierte Schwannome auch vom 12. kranialen Nerv (N. hypoglossus) aus. Die Inzidenz spinaler Schwannome ist bei NF2 ebenfalls erhöht, wobei diese Tumoren bei NF2-Patienten oft in multipler Form auftreten. Kutane Schwannome, die von ihrem Aspekt her oft mit Neurofibromen verwechselt wurden, sind im Rahmen der Studie von Evans et al. (1992b) bei 68% der NF2-Patienten beobachtet worden. Die in den nachfolgenden Abschnitten geschilderten Untersuchungen lassen keinen Zweifel daran, dass bei den NF2-assoziierten Schwannomen und bei einem Großteil der sporadischen Schwannome die biallelische Inaktivierung des NF2-Gens das ursächliche molekulare Ereignis der Tumorentstehung dar-



stellt. Bei einem Teil der sporadischen Schwannome besteht der Verdacht, dass der Funktionsverlust anderer Tumorsuppressorgene zur Tumorgenese führt. Welche Rolle diese noch unbekannt Tumorsuppressoren bei der Schwannomentstehung von NF2-Patienten spielen, ist noch nicht bekannt.

**Inaktivierung des NF2-Gens in Schwannomen.** Zahlreiche Studien zur Mutationsanalyse des NF2-Gens belegen, dass somatische Mutationen bei etwa 60–70% der sporadischen und bei 30–50% der NF2-assoziierten Schwannome auftreten, unabhängig von der Lage der Tumoren (Bijlsma et al. 1994; Irving et al. 1994; Jacoby et al. 1994; Lekanne Deprez et al. 1994; Sainz et al. 1994; Twist et al. 1994; Merel et al. 1995; Sainz et al. 1995; Jacoby et al. 1996; Welling et al. 1996; Kluwe et al. 2000). Die repräsentative Stichprobe von 95 Schwannomen (77 sporadische und 18 NF2-assoziierte Schwannome) von Jacoby et al. (1994, 1996) belegt die Häufigkeit und die Mechanismen der biallelischen Inaktivierung des NF2-Gens. Beide NF2-Allele waren bei 58% ( $n=45$ ) der sporadischen und bei 44% ( $n=8$ ) der NF2-assoziierten Schwannome von Mutationen betroffen, also bei 56% der Tumoren. Die somatischen Zweitmutationen wurden in 68 Tumoren (72%) identifiziert. Partielle Deletionen oder der Verlust eines gesamten Chromosoms 22, welche als LOH sichtbar werden, traten bei insgesamt 43 Schwannomen (45%) auf, wobei LOH bei den sporadischen Tumoren weit häufiger festgestellt wurde ( $n=40$ ) als bei NF2-assoziierten Schwannomen ( $n=3$ ). Im Gegensatz hierzu fanden Kluwe et al. (2000) bei 58% (46 von 79) der Schwannome von NF2-Patienten LOH von Chromosom-22-Markern, sodass es nicht sehr wahrscheinlich ist, dass ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit von LOH zwischen NF2-assoziierten und sporadischen Schwannomen besteht. Bezüglich des Spektrums der Mutationstypen somatischer NF2-Gen-Mutationen in Schwannomen scheint es keine Unterschiede zu Keimbahnmutationen zu geben. Unter den 82 somatischen Mutationen waren 77% Nonsense- und Frameshift-Mutationen, bei 22% war das reguläre Spleißen beeinträchtigt, und nur 1 Tumor wies eine Missense-Mutation auf. Diese Anteile verschiedener Mutationstypen am Gesamtspektrum ähneln dem Verteilungsmuster der Keimbahnmutationen (s. Kapitel 5.4.4.1 „Mutationspektrum des NF2-Gens“).

Sowohl unter den somatischen als auch unter den Keimbahnmutationen dominieren solche mit Protein trunkierendem Effekt. Eine Häufung von somatischen Mutationen in bestimmten Berei-

chen des NF2-Gens wurde nicht beobachtet. Auffällig ist jedoch sowohl bei den somatischen als auch den Keimbahnmutationen, dass der C-Terminus, kodiert durch die Exons 16 oder 17, von Mutationen relativ ausgespart bleibt. Jacoby et al. (1994, 1996) konnten keine Korrelation der Art der Mutation im NF2-Gen mit klinischen Parametern wie Alter und Geschlecht der Patienten, dem Proliferationsindex und der Lage der Tumoren ermitteln. Unter den 95 Schwannomen dieser Studie waren bei 32% ( $n=30$ ) der Funktionsverlust von nur einem Allel des NF2-Gens und bei 11% ( $n=10$ ) weder Mutationen im NF2-Gen noch LOH für Chromosom-22-spezifische Marker zu finden. Stemmer-Rachamimov et al. (1997) haben bei 22 dieser Tumoren ohne nachweisbare biallelische Inaktivierung des NF2-Gens mittels Western-Blot- und immunhistochemischer Analysen festgestellt, dass dennoch kein Merlin exprimiert wird. Diese Diskrepanz könnte darin begründet sein, dass die gängigen Methoden zur Mutationsanalyse keine 100%ige Effizienz garantieren und dass große Anteile nichtkodierender Sequenzen nicht einbezogen wurden. Andere Ursachen für eine fehlende Merlinexpression bei nicht nachweisbarer biallelischer Inaktivierung sind in posttranslationalen Prozessen zu suchen, die zu einer Inaktivierung des Merlins führen. Hierbei könnte der gesteigerte proteolytische Abbau des Merlins eine wichtige Rolle spielen, wie in Kapitel „Schwannome“, Unterkapitel „Merlindefizienz durch gesteigerte Proteolyse“, erläutert wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei einem Großteil der sporadischen und der NF2-assoziierten Schwannome die Inaktivierung des NF2-Gens entsprechend dem Tumorsuppressormodell erfolgt. Hierfür sprechen auch umfangreiche Western-Blot- und immunhistochemische Analysen der Merlinexpression in Schwannomen. Bei Zusammenfassung der Untersuchungen von Stemmer-Rachamimov et al. (1997), Harwalkar et al. (1998); Huynh et al. (1997), Gutmann et al. (1997b) und Hitotsumatsu et al. (1997) ergibt sich, dass bei 95 von insgesamt 101 Schwannomen kein Merlin nachzuweisen war, wobei 14 dieser Tumoren von NF2-Patienten stammten. Bei 4 der 95 Schwannome wurde die Expression trunkierter Merlinvarianten nachgewiesen, jedoch ist anzunehmen, dass diese, wenn überhaupt, nur eingeschränkt funktionsfähig sind.

**Verlust der Merlinexpression in „tumorlets“.** Zu den von Schwann-Zellen ausgehenden Anomalien bei NF2-Patienten gehören kleine Areale asymptomati-

scher Schwann-Zell-Hyperproliferationen, die als „tumorlets“ bezeichnet werden und die vornehmlich an den Wurzeln der Spinalnerven auftreten (Louis et al. 1995). Die histologische Ähnlichkeit dieser Mikroläsionen mit Schwannomen ließ bereits vermuten, dass die „tumorlets“ Vorstufen von Schwannomen sind. Bestätigt wurde dies durch die Arbeiten von Stemmer-Rachamimov et al. (1998), die bei einem NF2-Patienten mit identifizierter Keimbahnmutation nicht nur in Schwannomen, sondern auch in den tumorlets LOH für Chromosom-22-spezifische Marker und fehlende Merlin-expression feststellten. Die biallelische Inaktivierung des NF2-Gens bereits in den Tumorstufen weist auf ein sehr frühes oder sogar initiales Ereignis bei der Tumorentstehung hin.

**Merlindefizienz durch gesteigerte Proteolyse?** In Kapitel 5.4.5.8 „Regulation des Merlins durch posttranslationale Modifikation“ wurde erläutert, dass Merlin *in vitro* und *in vivo* durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\mu$ - und *m*-Calpain-Cystein-Proteasen abgebaut werden kann. Obwohl die Expression der Merlin-mRNA durch RT-PCR in 3 NF2-assoziierten Schwannomen und in 3 sporadischen Meningeomen nachzuweisen war, konnte keine Merlin-expression auf Proteinebene mehr festgestellt werden. Da  $\beta$ -Tubulin, das auch ein Substrat der Calpaine ist, in diesen Tumoren keinem gesteigerten Abbau anheim fällt, scheint eine Selektivität für den Turnover des Merlins zu bestehen (Kimura et al. 1998). Ein gesteigerter proteolytischer Abbau des Merlins in diesen Tumoren hat also denselben Effekt wie eine inaktivierende Genmutation. In Zellkulturen eines Meningeoms ohne Merlin-expression und ohne Mutationsinaktivierung des NF2-Gens wurde die Expression des Merlins durch Zugabe von Calpaininhibitoren wieder nachweisbar. Jedoch zeigten die Untersuchungen von Ueki et al. (1999) an 50 sporadischen Meningeomen, dass das  $\mu$ -Calpain-System bei fast allen aktiviert war und keine Korrelation zur reduzierten Merlin-expression in diesen Tumoren bestand. Diese Befunde schränken die Bedeutung der Auswirkungen des aktivierten  $\mu$ -Calpain-Systems auf die Merlin-expression in Meningeomen und vielleicht auch in Schwannomen stark ein.

**Beteiligung anderer Tumorsuppressorgene an der Tumorgenese.** Studien zur Merlinexpression in Schwannomen haben gezeigt, dass bei etwa 5% der sporadischen Schwannome Merlin unvermindert exprimiert wird. In diesen Tumoren führte vermutlich die Inaktivierung anderer Tumorsup-

pressorgene zur Tumorgenese. Ob diese Gene auch bei der Tumorgenese NF2-assoziiierter Schwannome involviert sind, ist nicht bekannt. Es gibt Hinweise, dass auf Chromosom 22 außer dem NF2-Gen noch weitere Gene lokalisiert sind, deren Verlust zur Schwannomentstehung beiträgt. Bruder et al. (1999) untersuchten 50 Schwannome mit insgesamt 40 Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 22. LOH für einen oder mehrere Marker wurde bei 41 Schwannomen (82%) gefunden, wobei Monosomie 22 bei 29 Tumoren (56%) auftrat. Interstitielle oder terminale Deletionen oder eine Kombination von beidem zeigten 14 Schwannome (27%). Darunter waren auch 4 Schwannome, deren Deletionen außerhalb der NF2-Gen-Region lagen. Einer dieser 4 Tumoren wies Mutationen beider NF2-Allele auf, während bei 3 Tumoren kein NF2-Gen-Defekt festzustellen war. Da in diesen Tumoren aber Deletionen außerhalb der NF2-Gen-Region gefunden wurden, könnte der Verlust anderer Tumorsuppressorgene auf Chromosom 22 zur Tumorentstehung geführt haben. Der Vergleich der Deletionsgrößen ließ jedoch keine eindeutige Identifizierung einer kleinsten Überlappungsregion zu, sodass noch keine Eingrenzung einer Region möglich ist, in der Kandidatengene lokalisiert sind.

**Mono- oder polyklonaler Ursprung.** Die Erhebung des X-Inaktivierungsmusters bei 8 sporadischen und 1 NF2-assoziierten Schwannom zeigte bei Letzterem und 3 der sporadischen Schwannome eindeutig einen klonalen Ursprung der Tumorzellen. Als wahrscheinlich monoklonal wurden weitere 3 Schwannome eingestuft, bei welchen der Verdacht bestand, dass kontaminierende normale Zellen im Tumor vorhanden waren. Ein Schwannom wies ein eindeutig poly- oder biklonales X-Inaktivierungsmuster auf (Jacoby et al. 1990).

#### 5.4.6.2 Meningeome

Meningeome gehen von den Deckzellen der Arachnoidea des Gehirns und des Rückenmarks aus, sind meist gutartig und als so genannte typische Meningeome unter dem Grad I der WHO-Klassifizierung einzustufen. Etwa 10% der Meningeome werden als atypische Meningeome (Grad II) oder als anaplastische Meningeome (Grad III) klassifiziert, da sie ein aggressiveres Wachstum zeigen und mit einem höheren Rezurrenzrisiko assoziiert sind als typische Grad-I-Tumoren (Kleihues et al. 1993). In den meisten Fällen treten Meningeome

sporadisch auf, sie repräsentieren 25% aller spinalen und 15% aller kranialen Tumoren.

NF2-Patienten haben ein stark erhöhtes Risiko, an Meningeomen zu erkranken. Nach den Schwannomen zählen die Meningeome zu den häufigsten Tumoren bei NF2. Die klinische Charakterisierung von insgesamt 183 NF2-Patienten hat gezeigt, dass Meningeome bei 46,4% der Patienten auftraten (Evans et al. 1992b, Parry et al. 1994). Meningeome von NF2-Patienten unterscheiden sich weder in ihrer Pathologie noch bezüglich ihrer Lage von den sporadisch auftretenden Tumoren. Jedoch entstehen NF2-assoziierte Meningeome häufiger in multipler Form und in wesentlich jüngerem Alter als bei Patienten mit sporadischen Meningeomen. In der Regel sind Meningeome bei NF2-Patienten gutartig, atypische oder maligne Meningeome werden nicht mit erhöhter Inzidenz beobachtet. Es sind Familien mit multiplen Meningeomen ohne weitere Merkmale der NF2 beschrieben worden, die somit die diagnostischen Kriterien der NF2 nicht erfüllen. Diese Form der multiplen Meningeomatose wird autosomal-dominant vererbt und ist nicht allelisch zu NF2 (Pulst et al. 1993).

Die in den nachfolgenden Abschnitten geschilderten Untersuchungen über die genetischen Ursachen der Entstehung von Meningeomen wurden zum Großteil an sporadischen Tumoren ausgeführt, da diese vermutlich weit häufiger exzidiert werden als Meningeome von NF2-Patienten. Dies könnte u.a. dadurch bedingt sein, dass NF2-Patienten das Alter, in dem Meningeome symptomatisch werden (4.–6. Lebensdekade) seltener erreichen als Patienten mit sporadischen Meningeomen. Da sich die Meningeome von NF2-Patienten weder pathologisch noch bezüglich ihrer Lokalisation von den sporadischen Meningeomen unterscheiden, ist anzunehmen, dass die Mechanismen der Tumorgenese bei den sporadischen und den NF2-assoziierten Meningeomen ähnlich sind.

**Inaktivierung des NF2-Gens.** Die Monosomie eines G-Chromosoms in einem großen Anteil der Meningeome war die erste an soliden Tumoren beobachtete Chromosomenanomalie (Zang und Singer 1967). Nach Einführung der Bänderungsmethoden erwies sich das fehlende Chromosom als ein Chromosom 22 (Zankl u. Zang 1972). Auch zytogenetisch sichtbare Deletionen des distalen langen Arms von Chromosom 22, die bei 10–30% der Meningeome beobachtet wurden, wiesen früh auf pathogenetisch relevante Gene in dieser Region hin (Zang 1982; Casalone et al. 1987). Umfangreiche LOH-Untersuchungen haben gezeigt, dass bei

60–65% der sporadischen Meningeome Partialdeletionen oder der Verlust des ganzen Chromosoms 22 eintreten. Zusätzliche somatische Mutationen des NF2-Gens sind bei 16% (Ruttledge et al. 1994a) bzw. 20–49% der Meningeome nachgewiesen worden (Papi et al. 1995; Merel et al. 1995; Wellenreuther et al. 1995; De Vitis et al. 1996a; Harada et al. 1996; Ueki et al. 1999). Also geht auch bei einem Anteil der Meningeome die biallelische Inaktivierung des NF2-Gens gemäß dem Two-hit-Modell mit der Tumorentstehung einher. Dies wurde durch Western-Blot- und immunhistochemische Analysen der Merlinexpression bestätigt (Gutmann et al. 1997b; Hitotsumatsu et al. 1997; Huynh et al. 1997; Lee et al. 1997; Harwalkar et al. 1998). Im Rahmen dieser Studien war bei 55 von 75 Meningeomen (ungefähr 73%) keine Merlinexpression nachzuweisen. Unter diesen Tumoren ohne Merlinexpression waren auch 4 Meningeome von NF2-Patienten. In Analogie zu den Befunden bei Schwannomen ist also der Funktionsverlust des NF2-Gens bei einem Großteil der Meningeome die Ursache der Tumorentstehung. Wie bei den Schwannomen führen die meisten Mutationen in Meningeomen zu verkürzten Proteinen, während Missense-Mutationen eher selten sind. Im Unterschied zu den Schwannomen scheint aber bei Meningeomen der Anteil der Tumoren, bei welchen die Entstehung durch den Funktionsverlust anderer Gene bedingt ist, höher zu sein.

Es gibt Hinweise darauf, dass sich histopathologisch differenzierbare Subgruppen von Meningeomen hinsichtlich der Inzidenz von NF2-Gen-Mutationen unterscheiden. Wellenreuther et al. (1995) fanden bei insgesamt 59% der sporadischen Meningeome ihrer Stichprobe somatische Mutationen am NF2-Genort, wobei fibroblastische und transitionale Meningeome hohe Raten somatischer NF2-Gen-Mutationen von 70% bzw. 83% aufwiesen. Im Gegensatz hierzu zeigten nur 25% der meningotheelialen Meningeome Mutationen des NF2-Gens. Letzere sind durch synzytiales Wachstum und einen geringen Gehalt an Reticulinfasern gekennzeichnet. Durch quantitative RT-PCR konnten Wellenreuther et al. (1997) zeigen, dass bei fibroblastischen und transitionalen Meningeomen signifikant geringere NF2-mRNA-Mengen nachzuweisen sind als bei meningotheelialen Varianten. Diese Befunde legen nahe, dass in meningotheelialen Meningeomen keine Störungen der Transkription des NF2-Gens vorliegen, die zur Merlindefizienz führen könnten. Bei den meisten meningotheelialen Meningeomen ist also anzunehmen, dass die Tumorgenese durch andere genetische Ereign-

nisse als NF2-Gen-Defekte hervorgerufen wird. Hierfür sprechen auch die Western-Blot- und immunhistochemischen Analysen von Hitotsumatsu et al. (1997) und Lee et al. (1997). Bei 14 von insgesamt 17 meningotheleialen Meningeomen war Merlinexpression nachzuweisen, nicht aber bei 29 Meningeomen anderer histologischer Subtypen.

NF2-Gen-Mutationen sind somit als die pathogenetischen Ereignisse anzusehen, die der Entstehung fibroblastischer und transitionaler Meningeome zugrunde liegen (Wellenreuther et al. 1995). Auch bei atypischen (Grad II) und anaplastischen Meningeomen (Grad III) treten häufig somatische Mutationen des NF2-Gens auf. Jedoch scheinen Mutationen des NF2-Gens frühe Ereignisse bei der Tumorgenese sporadischer Meningeome zu sein und nicht direkt die Tumorprogression zu verursachen. Zahlreiche Studien weisen auf eine Assoziation des Verlusts von Genen auf Chromosom 1p, 10q und 14q mit maligner Entartung von Meningeomen hin (Bello et al. 1994; Lindblom et al. 1994; Simon et al. 1995).

Nicht nur die Entstehung sporadischer, sondern auch die der NF2-assoziierten Meningeome ist durch biallelische Inaktivierung des NF2-Gens bedingt, wie frühere Einzelbefunde (Trafatter et al. 1993; Kluwe et al. 2000) und die Analysen einer größeren Stichprobe von 30 NF2-assoziierten Meningeomen (Lamszus et al. 2000) zeigen.

**Entstehung von Meningeomen durch Inaktivierung anderer Gene.** Die Untersuchungen zur Merlinexpression in Meningeomen zeigten, dass etwa 70% der sporadischen Meningeome durch Funktionsverlust des Merlin entstehen. Im Fall der Meningeome ohne biallelische Inaktivierung des NF2-Gens muss angenommen werden, dass der Verlust eines anderen Tumorsuppressorgens die Tumorentstehung auslöst. Da bei den Meningeomen ohne NF2-Gen-Mutationen häufig LOH von Chromosom-22-Markern zu beobachten ist, liegt es nahe, ein solches zusätzliches Tumorsuppressorgen auf Chromosom 22 zu vermuten. Insbesondere die niedrige Rate an NF2-Gen-Mutationen in meningotheleiomatösen Meningeomen spricht dafür, dass diese Tumoren durch Defekte eines anderen, noch unbekanntes Tumorsuppressorgens entstehen. Inwieweit Verluste dieses unbekanntes Tumorsuppressorgens auch zur Tumorgenese oder Tumorprogression bei NF2-assoziierten Meningeomen beitragen, ist unbekannt. Zu den Kandidatengenen für ein zusätzliches Tumorsuppressorgen auf Chromosom 22 zählt das MN1-Gen, das durch eine balancierte Translokation t(4;22) in einem spo-

radischen Meningeom entdeckt wurde (Arai et al. 1994).

Da einige Meningeome Deletionen in Bereichen distal zum NF2-Gen aufweisen und für Marker aus der NF2-Region heterozygot bleiben, wird ein Tumorsuppressorgen auch im terminalen Bereich von Chromosom 22 vermutet (Ruttledge et al. 1994b; Akagi et al. 1995). Hierauf ließ auch die Beobachtung eines Ringchromosoms 22 mit terminaler Deletion bei einem Patienten mit multiplen Meningeomen schließen (Arinami et al. 1986). Es ist durchaus möglich, dass auch bei NF2-assoziierten Meningeomen Verluste anderer Gene auf Chromosom 22 zur Tumorgenese oder Tumorprogression beitragen. Partialdeletionen oder der Verlust eines Chromosoms 22 in Meningeomen von NF2-Patienten haben nicht nur die biallelische Inaktivierung des NF2-Gens zur Folge, sondern auch den Verlust anderer Gene. Kluwe et al. (2000) fanden LOH Chromosom-22-spezifischer Marker bei 14 von 19 (74%) NF2-assoziierten Meningeomen. Es gibt aber auch Anhaltspunkte dafür, dass Gene auf anderen Chromosomen als Chromosom 22 an der Entstehung von Meningeomen beteiligt sind (Carlson et al. 1997).

**Reduzierte Neurofibrominexpression.** Auch das Proteinprodukt des NF1-Gens, Neurofibromin, könnte bei der Tumorgenese von Meningeomen eine Rolle spielen, wie die Untersuchungen von Sundaram et al. (1997) zeigten. Bei 4 von 17 sporadischen Meningeomen und 1 Tumor eines NF2-Patienten wurde eine drastisch reduzierte Neurofibrominexpression, begleitet von einer verringerten, neurofibrominspezifischen GAP-Aktivität festgestellt. Im Gegensatz hierzu war die katalytische Aktivität von p120GAP bei 17 von 18 Tumoren im Normbereich. In einem malignen Meningeom waren die Neurofibromin- und p120GAP-Aktivität verringert, wobei aber die Reduktion der GAP-Aktivität des Neurofibromins wesentlich deutlicher war. Eine Assoziation zwischen histopathologischem Meningeomsubtyp und verringerter Neurofibrominexpression bestand nicht. Bemerkenswerterweise waren auch in einem Meningeom eines NF2-Patienten die Neurofibrominexpression und die neurofibrominspezifische GAP-Aktivität reduziert. In diesem Tumor konnte auch keine Expression des Merlins mehr nachgewiesen werden. Aus dieser Beobachtung ergibt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen Meningeompathogenese und aktiviertem p21Ras: Eine reduzierte negative Regulation von p21Ras durch verringerte Neurofibromin-GAP-Aktivität einerseits und Merlindefizienz andererseits könnten bei der Tumorgenese synergistisch wirken.

Die Untersuchungen von Tikoo et al. (1994) haben gezeigt, dass die Überexpression des Merlins den malignen Phänotyp v-Ha-Ras-transformierter NIH3T3-Zellen revertieren kann. Auf welche Weise Merlin in die Ras-vermittelte maligne Transformation eingreift, ist noch unklar (s. Kapitel 5.4.9 „Reversion des v-Ha-Ras-transformierten Phänotyps durch Merlin“), ebenso wie die Bedeutung der Ras-vermittelten Signaltransduktion und deren Störungen bei der Entstehung oder der Progression von Meningeomen. Obwohl Transfektionsstudien mit der dominant-negativen Ras-Mutante RasN17 darauf hinweisen, dass das Wachstum von Meningeomzellen von der Ras-Aktivität abhängt (Shu et al. 1999), bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Bedeutung einer reduzierten Neurofibrominexpression bei der Pathogenese von Meningeomen bewerten zu können.

**Einfluss des Geschlechts auf die Häufigkeit von Meningeomen.** Wie die sporadischen treten auch die NF2-assoziierten Meningeome bei Frauen häufiger auf als bei Männern. Zusätzlich ist die Anzahl der Meningeome bei weiblichen NF2-Patienten signifikant höher als bei männlichen (Evans et al. 1995). Ein Grund für den modifizierenden Einfluss des Geschlechts auf das Tumorwachstum kann in der Wirkung weiblicher Hormone vermutet werden.

**Polyklonaler oder monoklonaler Ursprung.** Die Untersuchungen von Zhu et al. (1995) und Wu et al. (1996) zeigten, dass bei 17 (59%) von insgesamt 29 informativen Meningeomen eine klonale Expansion von Tumorzellen stattgefunden haben muss, während in 41% der Tumoren ein uneinheitliches X-Inaktivierungsmuster vorgefunden wurde. Letzteres ist durch Heterogenität der Tumorzellen oder durch hohe Anteile „reaktiver Zellen“ zu erklären, deren Proliferation im Tumorgewebe parakrin stimuliert wird.

Die Klonalität rekurrenter Meningeome in Bezug auf den primären Tumor wurde bei 4 Patienten durch die Analyse des X-Inaktivierungsmusters und bei 1 sporadischen Patienten durch den Nachweis der gleichen NF2-Gen-Mutation im primären Meningeom und in 5 rekurrenten Tumoren bewiesen (von Deimling et al. 1999).

**Multiple Meningeome.** NF2-Patienten haben sehr häufig multiple Meningeome. Unter den sporadischen Meningeompatienten leiden nur 10–20% unter multiplen Tumoren (Lusins et al. 1981; Borovich et al. 1988). Die Untersuchungen von Stangl et al. (1997) zeigten, dass multiple Meningeome

sporadischer Patienten häufig einen gemeinsamen, klonalen Ursprung haben und wahrscheinlich durch subarachnoidale Ausbreitung der Tumorzellen im Liquor verursacht werden. Diese Autoren untersuchten 39 Meningeome von 12 Patienten, die unter multiplen Meningeomen litten, aber keine weiteren NF2-assoziierten Symptome oder Verwandte mit NF2 hatten. Da bei diesen Patienten keine konstitutionellen Mutationen des NF2-Gens nachzuweisen waren, ist das Auftreten multipler Meningeome keine Form der frusten oder allelischen Variante der NF2. In den Tumoren von 10 der 12 Patienten waren somatische NF2-Gen-Mutationen und LOH von Mikrosatellitenmarkern des Chromosoms 22 zu finden. Bei 6 Patienten verriet die gleiche somatische NF2-Gen-Mutation die monoklonale Herkunft der verschiedenen Tumoren. Die Klonalität multipler Meningeome wurde auch durch die Analyse des X-Inaktivierungsmusters bei 4 nichtverwandten sporadischen Patienten bestätigt (Larson et al. 1995). An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Existenz einer seltenen sporadischen Form der multiplen Meningeomatose, die nicht durch NF2-Gen-Defekte verursacht wird, nicht auszuschließen ist, zumal, wie in Kapitel 5.4.11 „Abgrenzung der NF2 von der familiären multiplen Meningeomatose“ geschildert, eine familiäre Form der multiplen Meningeomatose existiert, die keine allelische Variante der NF2 ist.

#### 5.4.6.3 Defekte des NF2-Gens bei glialen Tumoren

Wesentlich seltener als Schwannome oder Meningeome treten bei NF2-Patienten Tumoren der zentralen Glia auf, dennoch ist die Inzidenz dieser Tumoren bei NF2 im Vergleich zum Bevölkerungsdurchschnitt erhöht. In der Studie von Evans et al. (1992b) hatten 4% der NF2-Patienten Astrozytome und 2,5% Ependymome. Entsprechend der klinischen Studie von Rodriguez et al. (1966) sind etwa 80% der Gliome bei NF2 intramedulläre spinale Tumoren oder solche der Cauda equina. Ependymome sind 65–75% aller histologisch diagnostizierten Gliome von NF2-Patienten. Ein erhöhtes Risiko von NF2-Patienten, an Ependymomen zu erkranken, ist zu erwarten, da NF2-Gen-Mutationen zu den Defekten zählen, die auch bei einem Anteil der sporadischen Ependymome mit der Entstehung dieser Tumoren assoziiert sind. Gutmann et al. (1997b) fanden bei 3 von 8 sporadischen Ependymomen und Huynh et al. (1997) bei 2 von 7 Ependymomen keine bzw. nur eine reduzierte Merlinexpression. Eine somatische NF2-Gen-Mutation und LOH von Chromosom-22-Markern wie-

Tabelle 5.27. Häufigkeit somatischer NF2-Gen-Mutationen in nicht mit NF2 assoziierten Tumoren bzw. davon abgeleiteten Zelllinien

Autoren	Anzahl und Art der Tumoren	Anzahl der Tumoren mit NF2-Gen-Mutationen/biallelischer Inaktivierung des NF2-Gens	Anzahl der Tumoren ohne Merlinexpression
Arakawa et al. 1994	55 Brustkarzinome	0	
	44 Kolorektalkarzinome	2/1	
Englefield et al. 1994	67 Ovarialkarzinome	0	
Bianchi et al. 1994	3 primäre Melanome	1	
	17 Melanommetastasen	5	
	5 sporadische Phäochromozytome	0	
	14 primäre Brustkarzinome	1	
	20 Kolonkarzinome	0	
Bianchi et al. 1995	15 Mesotheliomzelllinien	8	
	7 Mesotheliome	6	
Hoang-Xuan et al. 1995	70 Gliome	0	
Joseph et al. 1995	28 zentrale Hämangioperizytome	0	
	10 periphere Hämangioperizytome	0	
Kanai et al. 1995	68 Brustkarzinome	0	
	48 hepatozelluläre Karzinome	0	
Merel et al. 1995	23 primäre Melanome	0	
	70 Gliome	0	
	24 Phäochromozytome	0	
	15 Neuroblastome	0	
	6 Medulloblastome	0	
	15 Kolonkarzinome	0	
	15 Brusttumoren	0	
Ng et al. 1995	3 anaplastische Astrozytome	0	
	8 Glioblastoma multiforme	0	
Rustgi et al. 1995	24 Kolorektumkarzinome	2	
	10 Kolonkrebszelllinien		
Sekido et al. 1995	14 Mesotheliomzelllinien	4/4	
	10 Mesotheliome	3	
	38 Zelllinien aus kleinzelligen Karzinomen der Lunge	0	
	34 Zelllinien aus nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen	0	
	3 Karzinoide der Lunge	0	
Slavc et al. 1995	2 rhabdoide Tumoren (atypische teratoide Tumoren bei Kindern)	0	
	1 Gliom	0	
Yaegashi et al. 1995	60 Brusttumoren	0	
De Vitis et al. 1996b	19 Melanome	0	
	15 Merkel-Zell-Karzinome	0	
Stemmer-Rachamimov et al. 1998	22 Osteosarkome	0	0
Deguen et al. 1998	18 Mesotheliomzelllinien	7	11
Cheng et al. 1999	25 Mesotheliomzelllinien	14/18	14

sen Rubio et al. (1994) bei 1 von 8 sporadischen Ependymomen nach. Diese Untersuchungen weisen auf Heterogenität der pathogenetischen Ursachen sporadischer Ependymome hin. Bei insgesamt 62 ependymalen Tumoren unterschiedlichen Grads wurden in 6 von 14 intramedullären spinalen Ependymomen des Grads II somatische NF2-Gen-Mutationen nachgewiesen. In 4 dieser Tumoren war eine biallelische Inaktivierung des NF2-Gens durch LOH von Chromosom-22-Mar-

kern festzustellen. Auch Birch et al. (1996) fanden in intramedullären Ependymomen des Grads II NF2-Gen-Mutationen (5/7). Im Gegensatz hierzu hatte keines der 15 intrakraniellen Ependymome (Grad II) eine NF2-Gen-Mutation. Offensichtlich treten selbst innerhalb der Ependymome des Grads II unterschiedliche pathogenetische Veränderungen auf, und die Inaktivierung des NF2-Gens scheint in erster Linie mit den intramedullären spinalen Ependymomen assoziiert zu sein, die ja

auch vorrangig bei NF2-Patienten auftreten (Ebert et al. 1999).

Obwohl NF2-Patienten ein erhöhtes Risiko haben, an Gliomen zu erkranken, zählen somatische Mutationen des NF2-Gens nicht zu den typischen Defekten bei sporadischen Astrozytomen bzw. Gliomen (Tabelle 5.27). Dennoch scheint zumindest bei einem Anteil der Astrozytome der Funktionsverlust des NF2-Gens in die Tumorgenese involviert zu sein, denn Hitotsumatsu et al. (1997) fanden bei 8 von insgesamt 36 Tumoren keine Merlinexpression. Unter den Tumoren ohne immunhistochemisch nachweisbare Merlinexpression waren 3 fibrilläre und 1 anaplastisches Astrozytom, 1 Glioblastom und 3 Oligodendrogliome. Obwohl keine Mutationsanalysen bei Astrozytomen von NF2-Patienten unternommen worden sind, ist anzunehmen, dass auch diese Tumoren durch die Inaktivierung des NF2-Gens entstehen.

#### 5.4.7 Molekulare Pathogenese

Die Interaktion membranständiger Proteine mit dem Zytoskelett spielt bei multiplen zellulären Funktionen eine wesentliche Rolle. Die ERM-Proteine nehmen bei dieser Interaktion eine Art Adaptorfunktion zwischen Plasmamembran und Aktinzytoskelett wahr. Sie sind wahrscheinlich auch direkt an der Reorganisation aktinbasierter Zelloberflächenstrukturen beteiligt. Eine weitere Aufgabe der ERM-Proteine ist es, Zelladhäsionsmoleküle in zellulären Fortsätzen zu konzentrieren. Ihre Aktivität bei der Modulation der Zelloberfläche und der Zelladhäsion mag erklären, weshalb sie auch indirekt an der Regulation des Zellwachstums beteiligt sind (Kaul et al. 1996).

Bereits aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den ERM-Proteinen, der teilweise überlappenden subzellulären Lokalisation und der gemeinsamen Interaktionspartner ist anzunehmen, dass auch Merlin an der Regulation der Zellgestalt, der Zellmotilität, der Substratadhäsion und der Proliferation beteiligt ist. Experimentell ist dies dadurch belegt, dass die Transfektion von Expressionsvektoren mit NF2-cDNA des Wildtyps morphologische Veränderungen und Wachstumshemmung bei NIH3T3-Zellen, Rattenschwannomzelllinien und primären humanen Meningeomzellen auslöst (Lutchman u. Rouleau 1995; Sherman et al. 1997 a; Ikeda et al. 1999). Die Überexpression der Wildtyp-mRNA in Rattenschwannomzelllinien führt zu einem Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus und nicht zu Apoptose (Sherman et al. 1997 a). Die hu-

manen ERM-Proteine sind zu 73–81% identisch; ihre Aktivitäten sind teilweise redundant und sie ersetzen sich gegenseitig (Takeuchi et al. 1994). Merlin hingegen weist nur 45% Identität zu Ezrin auf und besitzt sehr wahrscheinlich Funktionen, die es nicht mit den ERM-Proteinen teilt. Hierbei steht v.a. die Rolle des Merlins als negativer Wachstumsregulator im Vordergrund. Nach Transfektion von Oligonukleotiden, die zur Merlin-mRNA komplementäre Sequenzanteile enthalten, sind morphologische Veränderungen, Störungen der Substratadhäsion und erhöhte Proliferation der humanen Schwannomzelllinie STS26T zu beobachten (Huynh u. Pulst 1996). Proliferationssteigernde Effekte sind durch die Transfektion von Oligonukleotiden mit komplementären Sequenzen zu den mRNA der ERM-Proteine bei epithelialen und Thymomzelllinien von Mäusen nicht zu erzielen, vielmehr werden Zell-Zell-Interaktionen, Substratadhäsion und die Mikrovillobildung beeinträchtigt (Takeuchi et al. 1994). Die proliferations-supprimierende Wirkung des Merlins macht es zu einem Tumorsuppressor, dessen Verlust zur Entstehung von Schwannomen, Meningeomen und Ependyomen führt. Die Expressionsanalysen der ERM-Proteine bei Schwannomen belegen, dass der Funktionsverlust des Merlins in Schwannomen spezifisch ist, denn Western-Blot-Analysen an Lysaten aus 11 Vestibularisschwannomen, 1 peripheren und 1 spinalen Schwannom zeigten den Verlust der Merlinexpression, nicht aber den der ERM-Proteine. Immunhistochemisch war in den Tumorzellen Moesin, aber kein Merlin nachzuweisen (Stemmer-Rachamimov et al. 1997).

Die Fähigkeit des Merlins, als negativer Wachstumsregulator zu wirken, wird entscheidend von seiner Stabilität, der Bildung intramolekularer Komplexe und der Interaktion mit spezifischen Effektoren beeinflusst. Auch wird die Funktionsfähigkeit des Merlins durch intermolekulare homo- oder heterotypische Interaktionen, durch die Assoziation mit Aktin und durch Veränderungen der intrazellulären Lokalisation moduliert.

Die experimentellen Beweise dafür, dass Störungen der Stabilität, der intramolekularen Komplexbildung und der Interaktion mit Bindungspartnern die Merlinaktivität auf unterschiedlichen Ebenen beeinflussen, werden in den nachfolgenden Abschnitten dargelegt.

##### 5.4.7.1 Stabilität mutanter Merlinformen

Die Expressionsanalysen von Merlinmutanten zeigen, dass Protein trunkierende und Missense-Mu-

tationen die Merlinfunktion auf unterschiedliche Weise beeinträchtigen können (Gutmann et al. 1998). Durch oligonukleotidvermittelte Mutagenese wurden Expressionsvektoren mit mutanter NF2-cDNA hergestellt, welche die Stoppmutationen Q111X und R466X enthielten, die auch als Keimbahnmutationen bei NF2-Patienten beschrieben worden sind. Bei transierender Überexpression dieser cDNA-Konstrukte in COS-1-Zellen können die entsprechenden mutanten Proteine mit einem MG von etwa 14 kDa und 55 kDa im Western-Blot nachgewiesen werden. Es gelingt aber nicht, nach Transfektion der Rattenschwannomzelllinie RT4, die nur sehr geringe Mengen an endogenem Merlin exprimiert, Klone zu isolieren, welche die mutanten Merlinformen auf Proteinebene stabil exprimieren, obwohl die Expression auf mRNA-Ebene nachzuweisen ist. Im Vergleich zu Zellklonen, die trunkiertes Merlin und Wildtypmerlin stabil exprimieren, sind keine starken Expressionsunterschiede zwischen der mutanten mRNA und der Wildtyp-mRNA zu beobachten. Daraus ist zu folgern, dass die mutanten mRNA-Moleküle stabil sind, nicht aber die von ihnen kodierten trunkierten Proteine. Diese Befunde zur mRNA-Stabilität bei Protein trunkierenden Mutationen stehen in gewissem Widerspruch zu der von Jacoby et al. (1999) beobachteten verringerten Expression mutanter mRNA-Moleküle bei Stopp- und Frameshift-Mutationen (s. Kapitel 5.4.4.2 „Genotyp-Phänotyp-Korrelation“, Unterkapitel „Allelische Expression“). Leider wies keiner der von Jacoby et al. (1999) untersuchten Patienten die Stoppmutation Q111X oder R466X auf, sodass die Befunde nicht direkt verglichen werden können. Nicht alle Protein trunkierenden Mutationen, so auch die Stoppmutationen Q111X und R466X, sind mit reduzierter mRNA-Stabilität verbunden. Durch die 5- bis 10fache Überexpression der mutanten mRNA in den RT4-Zellen könnten auch solche Mechanismen, die unter physiologischen Bedingungen mRNA-Moleküle mit vorzeitigen Stoppkodons erkennen und eliminieren, nicht wirksam sein.

Aus den Befunden von Gutmann et al. (1998) geht hervor, dass selbst bei Stabilität der mutanten mRNA die trunkierten Proteine, die durch die Mutationen Q111X und R466X entstehen, per se instabil sind. Inwieweit dies für andere Protein trunkierende Mutationen gilt, ist offen, jedoch muss angenommen werden, dass zahlreiche Mutationen zu instabilen Merlinformen führen. Dies ist aus umfangreichen Studien zur Merlinexpression in Tumoren zu schließen, da bei einem Großteil der Schwannome und bei einem Anteil der Meninge-

ome und Ependymome keine Merlinexpression nachzuweisen ist. Stemmer-Rachamimov et al. (1997) konnten durch Western-Blot- und/oder immunhistochemische Analysen keine Merlinexpression in 22 Schwannomen feststellen. Bei keinem der 13 im Western-Blot untersuchten Schwannome wurden trunkierte Merlinformen identifiziert. Im Rahmen der Studie von Huynh et al. (1997) zeigten 25 Vestibularisschwannome keine Merlinexpression, während in 4 VS verkürzte Merlinformen auftraten, die nur mit N-terminalen Antikörpern nachzuweisen waren. Bei 3 der 4 Tumoren mit verkürztem, stabilem Merlin wurden somatische Mutationen identifiziert, welche auffälligerweise alle Exon 13 betrafen. Es ist schwierig zu erklären, weshalb diese Mutationen im Exon 13 zu stabilen verkürzten Proteinen führen, während andere Protein trunkierende Mutationen in Exons distal zu Exon 13 gelegen für instabile Proteine kodieren.

Bei einem Vergleich des Expressionsniveaus des Merlins in normalem Gehirngewebe und Schwannomen fanden Harwalkar et al. (1998) in 12 von 23 Schwannomen eine reduzierte Merlinexpression. Wahrscheinlich verdeckten kontaminierende normale Zellen den vollständigen Verlust des Merlins in diesen Tumoren. Nur 3 der Tumoren mit moderat reduzierter Merlinexpression enthielten stabile trunkierte Merlinmutanten mit deletiertem C-Terminus. Insgesamt belegen die zitierten Studien zur Merlinexpression in Tumoren, dass die meisten Mutationen des NF2-Gens zu einem instabilen Protein führen.

Im Gegensatz zu den Expressionskonstrukten mit Stoppmutationen konnten nach Transfektion von NF2-cDNA-Konstrukten mit den Missense-Mutationen L64P und L535P, die ebenfalls als Keimbahnmutationen bei NF2-Patienten beschrieben worden sind, stabil transfizierte RT4-Zellklone isoliert werden. Die Expression des mutanten Merlins war in diesen Klonen auch auf Proteinebene nachzuweisen (Gutmann et al. 1998). Obwohl sich die Halbwertszeit des mutanten Merlins als leicht reduziert erwies, waren bei Western-Blot-Analysen keine Unterschiede zwischen der Expressionsstärke des mutanten und des Wildtypmerlins festzustellen. Im Fall dieser Missense-Mutationen wird also ein stabiles Merlin exprimiert, das vermutlich noch bestimmte Funktionen ausüben kann. Durch diese Untersuchungen von Gutmann et al. (1998) finden die Beobachtungen, dass Missense-Mutationen häufiger bei Patienten mit mildem Phänotyp auftreten, eine experimentelle Bestätigung, wie auch die Tendenz, dass Protein trunkierende Mutationen oft mit einer schweren Manifestation asso-



ziert sind. Die Mutationen Q111X und R466X sind bei jeweils 3 schwer betroffenen Patienten und die Missense-Mutationen L535P und K413E bei jeweils 1 leicht betroffenen NF2-Patienten beobachtet worden (MacCollin et al. 1996).

#### 5.4.7.2 Dysfunktion mutanter Merlinformen

**Störungen der intramolekularen Assoziation und der Effektorbindung bei Missense-Mutationen.** Gutmann et al. (1998) gingen auch der Frage nach, auf welcher Ebene Missense-Mutationen Funktionsstörungen verursachen. Nur bei Überexpression des Wildtypmerlins ist eine reduzierte Proliferationsrate der RT4-Rattenschwannomzellen zu beobachten, nicht aber bei Merlin mit den Missense-Mutationen L64P, K413E und L535P, die eine leichte Reduktion der Halbwertszeit des Merlins bewirken. Als transformierte Linie zeigen RT4-Zellen keine durch Zell-Zell-Kontakte ausgelöste Wachstumshemmung. Die Überexpression des Wildtypmerlins kann diese Art der Proliferationshemmung in den RT4-Zellen wieder auslösen, nicht aber die des Merlins mit der Missense-Mutation L535P. Hieraus ist zu folgern, dass diese Missense-Mutation zwar nur zu einer geringfügigen Beeinträchtigung der Stabilität des Merlins führt, aber seine wachstumssupprimierenden Wirkungen verhindert. Wie in Kapitel 5.4.5.7 „Merlin als negativer Wachstumsregulator“ erläutert, sind die wachstumsregulierenden Funktionen des Merlins abhängig von der Fähigkeit, intramolekulare Assoziationen einzugehen. Bei Interaktion des N- mit dem C-Terminus kann Merlin polymerisierte Mikrotubuli nicht binden. Dieses Merkmal nutzten Gutmann et al. (1998) aus, um die Fähigkeit der mutanten Merlinformen zur intramolekularen Assoziation zu überprüfen. Da die Merlinmutante L64P polymerisierte Mikrotubuli binden kann, ist zu folgern, dass diese in der offenen Konformation vorliegt und keine intramolekulare Assoziation mehr eingehen kann (Xu u. Gutmann 1998) (Kapitel 5.4.5.6 „Interaktionspartner des Merlins und der ERM-Proteine“, Unterkapitel „Assoziation des Merlins mit Komponenten des Zytoskeletts“). Im Gegensatz hierzu scheint die Fähigkeit, intramolekulare Assoziationen auszubilden, bei den beiden anderen Missense-Mutationen (L535P und K413E) nicht beeinträchtigt, da sie nicht mit polymerisierten Mikrotubuli interagieren. Auch ihre Fähigkeit, bei Überexpression in Zelllinien mit Wildtypmerlin zu dimerisieren, erwies sich als nicht beeinträchtigt (Stokowski et al. 2000) (Tabelle 5.28). Da die beiden Missense-Mutanten L535P und K413E sub-

membranär lokalisiert sind, ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass die tumorigene Wirkung dieser Mutanten durch eine aberrante intrazelluläre Lokalisation bedingt ist, sondern vielmehr durch reduzierte Interaktionsfähigkeit mit Bindungspartnern. Bemerkenswerterweise wurden diese beiden Missense-Mutationen bei Patienten mit mildem Phänotyp beschrieben. Verschiedene Mutationen des NF2-Gens können also auf verschiedenen Ebenen mit den wachstumsregulierenden Fähigkeiten interferieren.

#### Auswirkungen verschiedener Merlinmutanten auf die intrazelluläre Lokalisation, die Substratadhäsion der Zellen und auf die Bindung von Interaktionspartnern.

Die wachstumssupprimierenden Eigenschaften des Merlins stehen sehr wahrscheinlich in direktem Zusammenhang mit seiner Lokalisation und der Interaktion mit Komponenten des Zytoskeletts. Merlin ist in verschiedenen Zellsorten in dynamischen Strukturen wie Filopodien, Lamellipodien und Membrankrausen in Kolo-kalisation mit Aktin nachgewiesen worden (Kapitel 5.4.5.4 „Intrazelluläre Lokalisation des Merlins“). Auch in vitro interagiert Merlin mit Komponenten des Zytoskeletts wie Aktin und Mikrotubuli (Xu u. Gutmann 1998).

Nach Transfektion mit Wildtyp-NF2-cDNA-Expressionskonstrukten verändern 3T3-Zellen und SV40-transformierte Lungenfibroblasten (VA13), die endogen kaum Merlin exprimieren, ihre Zellgestalt und bilden lange Fortsätze aus (Takeshima et al. 1994; Lutchman u. Rouleau 1995). Dieser Phänotyp kann durch die Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden revertiert werden.

Die subzelluläre Lokalisation und die strukturelle Ähnlichkeit des Merlins zu den ERM-Proteinen, welche Elemente des Zytoskeletts mit der Membran verbinden und in die Regulation der Zellgestalt und der Zellmotilität involviert sind, legen nahe, dass der Verlust der tumorsuppressiven Wirkung mancher Merlinmutanten auf einer Störung der Interaktion mit dem Aktinzytoskelett beruht. Bei Transfektion und Überexpression von Wildtyp-NF2-cDNA der Isoformen 1 und 2 in verschiedensten Zelllinien ist das ektopisch exprimierte Merlin vornehmlich submembranär lokalisiert, besonders angereichert in an F-Aktin reichen Membranvorstülpungen. Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten die Lokalisation verschiedener Merlinmutanten nach Transfektion der entsprechenden cDNA-Konstrukte in Zelllinien. In Tabelle 5.28 sind die Ergebnisse dieser Lokalisationsbestimmungen und Funktionsanalysen verschiedener Merlinmutanten zusammengefasst, die auch als Keimbahnmutatio-

Tabelle 5.28. Eigenschaften verschiedener Merlinmutanten bei Überexpression in Zelllinien

Merlinmutante	Lokalisation	Löslichkeit des Proteins <sup>a</sup>	EBP50-Bindung	/β1-Spektin-Interaktion	Fähigkeit zur Dimerisierung mit Wildtyp-merlin	Mikrotubuli-Interaktion <sup>b</sup>	Proliferations-hemmende Wirkung	Verlust der Substrad-häsion	Zitat
ΔN-ter									
ΔF118	Zytoplasma, perinukleär	+	Reduziert		Reduziert	+	-	-	Deguen et al. (1998), Goutebroze et al. (2000), Stokowski et al. (2000)
Δ39-80	Perinukleär	+					+	+	Koga et al. (1998)
Δ39-121	Zytoplasma, perinukleär	+				+			Deguen et al. (1998), Goutebroze et al. (2000)
Δ1-251	Perinukleär	+							Deguen et al. (1998)
Δ1-341	Zytoplasmatisch	+	Nicht beeinflusst		Reduziert		+	+	Deguen et al. (1998), Stokowski et al. (2000)
Δ170-177	Submembranär	Nicht beeinflusst	Reduziert		Erhöht		-	-	Koga et al. (1998), Stokowski et al. (2000)
Δ560-595	Submembranär	Nicht beeinflusst	Nicht beeinflusst		Erhöht		+	+	Stokowski et al. (2000)
ΔC-ter									
Δ526-595	Submembranär	+					+	+	Deguen et al. (1998)
Δ507-595	Submembranär	+							Deguen et al. (1998)
Δ476-595	Submembranär	+							Deguen et al. (1998)
Δ481-595	Submembranär	+							Koga et al. (1998)
Δ39-ter	Perinukleär						+	+	Koga et al. (1998)
AN-ter+AC-ter									
80A481-595	Perinukleär						+	+	Koga et al. (1998)
Δ225-595	Perinukleär						+	+	Koga et al. (1998)
Δ174-595	Perinukleär						+	+	Koga et al. (1998)
Δ342-595	Nukleär	+	Nicht beeinflusst				+	+	Stokowski et al. (2000)
Missense									
L64P	Zytoplasmatisch					+			Gutmann et al. (1998)
K79E	Submembranär	+	Reduziert					+	Stokowski et al. (2000)
V219M	Submembranär	Nicht beeinflusst	Reduziert		Nicht beeinflusst	-		+	Deguen et al. (1998), Goutebroze et al. (2000), Stokowski et al. (2000)
N220Y	Submembranär	Nicht beeinflusst	Reduziert		Nicht beeinflusst	-		+	Deguen et al. (1998), Goutebroze et al. (2000), Stokowski et al. (2000)
T352M	Submembranär	Nicht beeinflusst	Nicht beeinflusst		Nicht beeinflusst			+	Deguen et al. (1998), Stokowski et al. (2000)
L360P	Submembranär	+	Reduziert	Reduziert				+	Deguen et al. (1998), Scoles et al. (1998), Goutebroze et al. (2000)
K413E	Submembranär								Gutmann et al. (1998)
L535P	Submembranär	+	Reduziert	Reduziert	Erhöht	-		+	Gutmann et al. (1998), Scoles et al. (1998), Stokowski et al. (2000)
Q538P				Reduziert					Scoles et al. (1998)

Das Fehlen einer Angabe bedeutet; nicht getestet; <sup>a</sup> Erhöhte Detergenlöslichkeit einer Merlinmutante (+) weist auf eine gestörte oder relaxierte Aktinbindung hin; <sup>b</sup> Die Fähigkeit der Merlinmutanten, mit Mikrotubuli in vitro zu interagieren (+), spricht für eine offene Konformation, da die entsprechenden Bindungsstellen nicht durch intramolekulare Assoziationen maskiert sind; ΔN-ter, ΔC-ter Deletionen in der N- bzw. C-terminale Hälfte.

nen oder als somatische Mutationen in Tumoren identifiziert worden sind. Nach Transfektion C-terminal deletierter Merlinmutanten sind diese wie das Wildtypmerlin submembranär lokalisiert. Ihre Interaktion mit Aktin ist jedoch beeinträchtigt, was an einer erhöhten Detergenslöslichkeit erkennbar wird. Auch die ektopisch exprimierten Merlinmutanten mit den Missense-Mutationen V219M, N220Y, L360P und L535P sind submembranär nachzuweisen, jedoch ist nur bei den beiden letzteren Mutanten die Aktininteraktion reduziert. Aus diesen Experimenten ist zu folgern, dass Merlinsegmente, die C-terminal zur eigentlichen Aktinbindungsstelle im N-Terminus liegen, für die Stabilisierung der Interaktion mit Aktin nötig sind.

Aus dem Vergleich der Eigenschaften verschiedener Merlinmutanten wird ersichtlich, dass eine gestörte oder relaxierte Interaktion mit dem Aktinzytoskelett nicht mit der intrazellulären Lokalisation oder dem Verlust der Substratadhäsion der jeweiligen Mutante exprimierenden Zellen korreliert ist (Tabelle 5.28). Die Regulation der Zelladhäsion durch Merlin scheint also nicht von der Interaktion mit F-Aktin abhängig zu sein (Koga et al. 1998; Stokowski et al. 2000).

Alle analysierten C-terminal deletierten Merlinmutanten waren submembranär lokalisiert, selbst bei gestörter Interaktion mit dem Aktinzytoskelett. Die Merlinmutante  $\Delta 39-80\Delta 481-595$ , die zusätzlich zu einer C-terminalen auch eine N-terminale Deletion aufweist, ist nur perinukleär lokalisiert. Die submembranäre Lokalisation des Merlins scheint also vornehmlich von der Integrität des N-Terminus abhängig zu sein, die stabile Interaktion mit dem peripheren Aktinzytoskelett bedarf zusätzlich eines vollständigen C-Terminus. Bei Deletion des Phenylalanins in Position 118 (Merlinmutante  $\Delta F118$ ) oder bei Deletion des Bereichs, der durch Exon 2 und 3 kodiert wird ( $\Delta 39-121$ ), ist das mutante Merlin nicht mehr submembranär, sondern nur noch zytoplasmatisch und perinukleär in punktförmiger Verteilung zu lokalisieren, wo es nicht mehr an Aktin bindet. Dies belegt die essenzielle Bedeutung des Phenylalanin-Doublets der Positionen 118–119 für die submembranäre Lokalisation des Merlins. Bemerkenswert ist auch, dass 6 der in Tabelle 5.28 angeführten Missense-Mutationen eine reduzierte Fähigkeit zeigen, mit  $\beta$ II-Spektrin und/oder mit EBP50 zu interagieren.  $\beta$ II-Spektrin wird wie Merlin im retinalen Pigmentepithel und im unpigmentierten Epithel des Ziliarkörpers hoch exprimiert. Da Keimbahnmutationen des NF2-Gens auch zur Entstehung von Katarakten prädisponieren und Spektrindegredation häufig in

Augenlinsen der Ratte nach Induktion der Bildung von Katarakten beobachtet wurde, liegt es nahe, der beeinträchtigten Interaktion des Merlins mit  $\beta$ II-Spektrin besondere Bedeutung bei der Entstehung von Katarakten und retinalen Hamartomen beizumessen.

Eine andere Form der Merlininteraktion, die mit den wachstumsregulierenden Funktionen des Merlins in Verbindung gebracht werden muss, ist die Homodimerisierung. Wie in Kapitel 5.4.5.7 „Merlin als negativer Wachstumsregulator“ dargestellt, üben die homodimerisierten Formen des Merlins die wachstumshemmende Funktion aus. Stokowski et al. (2000) untersuchten die Fähigkeit ektopisch exprimierter Merlinmutanten, mit Wildtypmerlin zu dimerisieren. Während die Mutante  $\Delta F118$  kaum mehr mit Wildtypmerlin interagieren kann, ist die Fähigkeit der Missense-Mutante L535P zur Dimerisierung stark erhöht. Gesteigerte Dimerisierungsraten wurden auch bei der Analyse der Mutanten  $\Delta 170-177$  und  $\Delta 560-595$  beobachtet. Nach diesen Ergebnissen würden sowohl Merlinmutanten, die mit Wildtypmerlin dimerisieren, als auch solche mutanten Merlinformen, die nicht mehr mit Merlin des Wildtyps interagieren können, den Verlust der Merlinaktivität bedingen.

Nach Transfektion mit dem cDNA-Konstrukt  $\Delta 225-595$ , welches für ein stark verkürztes Merlin kodiert, das nur aus den Aminosäuren 1–224 besteht, findet sich das mutante Merlin ausschließlich perinukleär, und die Zellen lösen sich vom Substrat ab. Diese Effekte sind auch bei Koftransfektion mit cDNA-Expressionskonstrukten des Wildtypmerlins zu beobachten, sodass die Merlinmutante  $\Delta 225-595$  eine dominante Wirkung auszuüben scheint (Koga et al. 1998). Für die dominante Wirkung von manchen Merlinmutanten sprechen auch die Untersuchungen von Giovannini et al. (1999). Die transgene Expression von N-terminal deletiertem Merlin unter der Kontrolle eines Schwann-Zell-spezifischen Promotors führt zu einer erhöhten Rate an Schwann-Zell-Tumoren bei Mäusen, nicht aber die transgene Expression C-terminal deletierter Merlinmutanten (Kapitel 5.4.7.6 „Transgene Mäuse, die mutantes Merlin exprimieren“). Dominante Effekte stabiler Merlinmutanten sind jedoch nur bei einem kleineren Anteil von Meningeomen und Schwannomen zu erwarten, da die Analysen zur Merlinexpression in diesen Tumoren dafür sprechen, dass die meisten mutanten Merlinformen instabil sind und es die Merlindefizienz ist, die zur Tumorentstehung führt. Werden die Studien von Stemmer-Rachamimov et al. (1997), Huynh et al. (1997) und Harwal-

kar et al. (1998) zusammengefasst, zeigten 84% (59/70) der daraufhin untersuchten Tumoren keine Merlinexpression, 6% ( $n=4$ ) eine leicht reduzierte Merlinexpression, und bei 10% ( $n=7$ ) wurden trunkierte Proteine nachgewiesen.

Goutebroze et al. (2000) identifizierten ein Protein, das *in vitro* mit der Merlinisoform 1 interagiert und aufgrund dieser Eigenschaft als mit Schwannomin interagierendes Protein 1 (SCHIP-1) bezeichnet wurde. An dieser Interaktion sind 2 N-terminale Regionen des Merlins unabhängig voneinander und 1 C-terminale Coiled-coil-Domäne des SCHIP-1 beteiligt. SCHIP-1 kann keiner bekannten Proteinfamilie zugeordnet werden, zeigt jedoch innerhalb der Coiled-coil-Domäne 70% Aminosäureidentität zu den humanen FEZ-Proteinen 1 und 2, die beim Wachstum von Axonen und der Faszikulation eine Rolle spielen. Die zellulären Funktionen des SCHIP-1 sind unbekannt. *In vitro* vermag SCHIP-1 über seine C-terminale Domäne Homodimere zu bilden (Goutebroze et al. 2000). Obwohl die Merlinisoform 1 und SCHIP-1 in HeLa-Zellen häufig kolokalisieren, scheint SCHIP-1 nicht durchgängig mit Aktin assoziiert zu sein, da Zytocalasin-D-Behandlung der Zellen seine intrazelluläre Lokalisation nicht stört. Das Expressionspektrum des SCHIP-1 ist nicht unähnlich dem des Merlins. Beide sind im adulten Herzen, im Gehirn und im Skelettmuskel nachzuweisen. Überraschenderweise interagiert jedoch die Merlinisoform 1 im Hefe-2-Hybrid-Test nicht mit SCHIP-1, wohl aber die Merlinmutanten  $\Delta 39-121$  und  $\Delta F118$ , die beide *in vitro* an Mikrotubuli binden können. Offenbar liegen diese Merlinmutanten im Gegensatz zur Merlinisoform 1 in der offenen Konformation vor (s. Tabelle 5.28). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die mutante Wirkung der Merlinformen  $\Delta 39-121$  und  $\Delta F118$  auch durch die aberrante Bindung an SCHIP-1 vermittelt werden könnte. Die hier geschilderten Ergebnisse vermitteln den Eindruck, dass die normale Funktion des Merlins eines bestimmten Verhältnisses verschiedener Isoformen und Konformationszustände bedarf. Störungen solcher Gleichgewichte durch strukturelle Veränderungen, welche die eine oder die andere Konformation oder Isoform begünstigen, können empfindlich in das Wechselspiel des Merlins mit seinen Interaktionspartnern eingreifen und so zu Formveränderungen der Zellen führen, die am Anfang der Tumorgeneese stehen.

#### 5.4.7.3 Phänotyp und Wachstumseigenschaften von kultivierten Schwann-Zellen aus NF2-assoziierten und sporadischen Schwannomen

Die immunhistochemische Analyse primärer SZ-Kulturen zeigte, dass Schwannom-SZ S100, CNPase (cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase), Kollagen IV und NGFR exprimieren (Hung et al. 1998), während keine bzw. nur eine geringe Expression des MBP (myelin basic protein) nachzuweisen war. Rosenbaum et al. (1998) analysierten SZ-Kulturen aus 5 Schwannomen von 4 NF2-Patienten. Der durch S100-Färbungen erhobene SZ-Gehalt dieser Kulturen lag bei 90–99%. Die Keimbahnmutationen dieser 4 NF2-Patienten waren 1 Nonsense-Mutation im Exon 12, jeweils 1 Frameshift-Mutation im Exon 11 bzw. Exon 8 und 1 Missense-Mutation im Exon 15. In 4 der 5 SZ-Kulturen war auch LOH von Chromosom-22-spezifischen Markern zu beobachten.

Die NF2-Schwannom-SZ-Kulturen zeigen im Vergleich zu SZ aus normalen peripheren Nerven keine Kontaktinhibition, denn sie wachsen in multiplen Schichten. Im Gegensatz zu normalen SZ bilden sie lange Zellfortsätze aus, die Lamellipodien oder Filopodien ähneln. Die Anfärbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin zeigt keine auffälligen, mikroskopisch sichtbaren Veränderungen des Aktinzytoskeletts der NF2-SZ. Dies schließt jedoch solche Störungen, die auf diese Weise nicht erkennbar sind, nicht aus. Außerdem proliferieren die NF2-SZ schneller als die SZ aus gesundem peripheren Nervengewebe. Selbst in höheren Passagen bei den NF2-SZ-Kulturen sind noch hohe BrdU-Einbauraten zu finden, jedoch beobachteten Rosenbaum et al. (1998) keine Immortalisierung.

Im Zusammenhang mit der erhöhten Proliferationsrate der NF2-Schwannom-SZ könnte die Beobachtung von Kamleiter et al. (1999) stehen, dass diese im Vergleich mit SZ aus dem peripheren Nervensystem gesunder Probanden veränderte Membranpotenziale und einen erhöhten nichtaktivierenden  $K^+$ -Auswärtsstrom zeigen. Es ist jedoch auch möglich, dass der Merlinverlust die Verteilung oder das so genannte „clustering“ der Ionenkanäle beeinflusst und es dadurch zu einer höheren Dichte nichttranslozierter  $K^+$ -Kanäle im Zellsoma kommt.

Pelton et al. (1998) untersuchten SZ-Kulturen aus insgesamt 18 Schwannomen, darunter waren 13 Vestibularisschwannome, wovon 3 von NF2-Patienten stammten. Als Kontrollen dienten SZ-Kulturen aus 5 Nervenbiopsien gesunder Spender (NHSZ, normale humane Schwann-Zellen). Etwa

94–97% der Zellen all dieser Kulturen waren positiv für die SZ-Marker S100 $\beta$  und NGFR. Im Vergleich zu den NHSZ zeigen die Schwannom-SZ eine erhöhte basale Proliferationsrate, bei Stimulation mit dem Gliawachstumsfaktor 2 jedoch besteht kein Unterschied zwischen den Schwannzellkulturen unterschiedlicher Herkunft.

Die Morphologie der Schwannom-SZ ist in dem Sinn verändert, dass sie auf ihrem Substrat eine 5- bis 7-mal größere Fläche in Anspruch nehmen als NHSZ, ohne jedoch stärker abgeflacht zu sein als die Letzteren. Eine weitere Auffälligkeit von Schwannom-SZ, die Rosenbaum et al. (1998) nicht beobachteten (s. oben), sind desorganisierte Stressfasern im Gegensatz zu den NHSZ und Schwann-Zellen aus einem plexiformen Neurofibrom eines NF1-Patienten, deren Stressfasern normal organisiert sind. Dieser Phänotyp der Schwannom-SZ wird durch die konstitutive Aktivierung von RhoA ausgelöst, denn durch Transfektion mit dominant-negativem RhoA kann die Desorganisation der Stressfasern revertiert werden. Dies ist auch durch die Behandlung der Schwannom-SZ mit der C3-Transferase möglich, die die ADP-Ribosylierung von Rho katalysiert und somit den Aufbau von Stressfasern hemmt. Schwannom-SZ unterscheiden sich von den NHSZ auch durch vermehrte Membrankrausen (ruffled membranes), deren Bildung durch Transfektion der Schwannom-SZ mit dominant-negativem Rac inhibiert werden kann. Rac gehört zur Rho-Familie kleiner GTP-bindender Proteine.

Diese Befunde belegen, dass in Schwannom-SZ die Organisation des Zytoskeletts durch veränderte Rho- und Rac-Signaltransduktionswege gestört ist. Außerdem stellten Pelton et al. (1998) fest, dass zwischen SZ-Kulturen aus Schwannomen und NHSZ kein Unterschied hinsichtlich der Expression von Ezrin und Moesin besteht. Die ERM-Proteine scheinen also den Merlinverlust in den Schwannomen nicht durch erhöhte Expression zu kompensieren.

#### 5.4.7.4 Auswirkungen der Merlindefizienz bei Nf2(-/-)-Embryonen

Von der Herstellung und der Analyse der NF2-Knockout-Mäuse wurde erhofft, das Spektrum der Funktionen des Merlins in verschiedenen Zellsorten v.a. während der Entwicklung erfassen und Einblicke in die Mechanismen der Pathogenese der NF2 gewinnen zu können. Nach gezielter Mutagenese des NF2-Gens in embryonalen Stammzellen wurden diese in Embryonen des Blastozystenstadiums injiziert und Letztere wiederum scheinträchtig

gen Mäusen implantiert. Unter den Nachkommen von Kreuzungen der so gewonnenen Chimären [Nf2(+/+)(+/-)] mit dem Wildtyp sind heterozygote Nf2(+/-)-Mäuse, deren Genotyp dem der NF2-Patienten entspricht. Die homozygote Defizienz für das NF2-Gen-Produkt erwies sich als Letalfaktor. Etwa 20–30% der Nf2(-/-)-Embryonen starben kurz nach der Implantation, etwa 70% starben am Tag 6,5–7 bei massiver Fehlentwicklung der extraembryonalen Gewebe und ausbleibender Gastrulation (McClatchey et al. 1997). Diese beiden Gruppen von Nf2(-/-)-Embryonen sind auch bei Testkreuzungen mit anderen Mausstämmen beobachtet worden, sodass ein Einfluss des genetischen Hintergrunds auf diesen Phänotyp auszuschließen ist.

Im Folgenden sind die Störungen beschrieben, die bei Nf2(-/-)-Embryonen beobachtet wurden, die bis zum Tag 7,5 überlebten. Die histologische Untersuchung von Wildtyp- und Nf2(+/-)-Embryonen am Tag 7,5 zeigt sie im Stadium einer fast vollständig abgeschlossenen Gastrulation, wobei mesodermale Zellschichten sowohl im gesamten Embryo zwischen ektodermalen und endodermalen Schichten als auch im extraembryonalen Anteil des Embryos zu erkennen sind. Im Gegensatz dazu haben die Nf2(-/-)-Embryonen zu diesem Zeitpunkt einen völlig abweichenden Phänotyp. Im länglich deformierten Eizylinder sind nur ektodermale und endodermale Schichten zu erkennen, die Mesoderminduktion ist ausgeblieben. Im fehlentwickelten extraembryonalen Gewebeanteil der Nf2(-/-)-Embryonen sind keine ektodermalen Anteile nachzuweisen. Auffällig ist auch, dass die Nf2(-/-)-Embryonen keine normale Orientierung bezüglich der mesometrial-antimesometrialen Achse der Dezidua zeigen. In Sagittalschnitten von Wildtypembryonen des Tags 7,5 umgibt das viszerale Endoderm die extraembryonale Hälfte des Embryos in Form eines Palisadenepithels, während der Embryo selbst von eher flachem, squamösem Epithel umhüllt wird. Im Nf2(-/-)-Embryo ist diese Einteilung jedoch aufgehoben; variable Anteile des Embryos und des extraembryonalen Gewebes sind mit squamösem oder Palisadenepithel umgeben. Dies ist vermutlich auf die Fehlorientierung der primären Achse des Embryos zurückzuführen. Das viszerale Endoderm der mutanten Embryonen bildet an der Grenze des Embryos zum extraembryonalen Gewebe multiple, in sich zurückgefaltete Schichten. Diese Hyperproliferation des viszeralen Endoderms im eigentlichen Embryo erfolgt trotz ausbleibender Endodermentwicklung oder -expansion im extraembryonalen Anteil.

Das Unvermögen der  $Nf2(-/-)$ -Embryonen, Mesoderm zu bilden, kann auf dem Fehlen der induzierenden Signale oder auf Störungen der rezeptorvermittelten Reaktionskaskaden beruhen, die von solchen Signalen ausgelöst werden. Merlin könnte in beide Teile dieses komplexen Geschehens involviert sein. Der Phänotyp der mutanten Embryos lässt erwarten, dass Merlin in der Ontogenese für die Organisation des extraembryonalen Ektoderms in ein Epithel benötigt wird. Es gibt mehrere Hypothesen, um die Fehlentwicklungen der  $Nf2(-/-)$ -Embryonen zu erklären.

- Zum einen könnte das Fehlen der epithelialen Strukturen im extraembryonalen Gewebe die Fehlorientierung der mutanten Embryonen in Bezug auf die mesometrial-antimesometriale Achse der Dezipua bedingen.
- Zum anderen ist möglich, dass bei Merlindefizienz die Invasion des Trophoblasten in die Dezipua in mesometrialer Richtung gehemmt ist. Wahrscheinlich erlaubt erst dieses Einwachsen des Trophoblasten das Wachstum und die Differenzierung des extraembryonalen Ektoderms.

Alexander et al. (1996) konnten zeigen, dass die Inhibition von Metalloproteinasen *in vivo*, die bekanntermaßen bei der Trophoblasteninvasion in die Dezipua eine Rolle spielen, zur Missorientierung des Embryos führt. Durch defekte Adhäsion oder Invasion des Trophoblasten wäre auch das Absterben mancher  $Nf2(-/-)$ -Embryonen kurz nach der Implantation zu erklären.

Um weitere Erkenntnisse über die Auswirkungen der Merlindefizienz während der Embryonalentwicklung der Maus zu erhalten, wurden chimäre Embryos durch Injektion von  $Nf2(-/-)$ -embryonalen Stammzellen in Blastozysten von Wildtypmäusen hergestellt. Diese embryonalen Stammzellen enthielten zusätzlich das lacZ-Gen inseriert, sodass sie mit Hilfe der X-Gal-Reaktion in Whole-mount-Präparaten leicht nachgewiesen werden konnten. In Blastozysten injizierte embryonale Stammzellen tragen nur zur inneren Zellmasse bei, nicht jedoch zu den extraembryonalen Geweben. Die Untersuchungen von vielen chimären Embryos mit ganz unterschiedlichen Anteilen an  $Nf2(-/-)$ -Zellen hat gezeigt, dass die Gastrulation normal abläuft, selbst wenn beachtliche Anteile homozygot mutanter Zellen im Embryo vorhanden sind. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die  $Nf2(-/-)$ -Stammzellen zur Bildung aller Keimblätter, auch des Mesoderms, beitragen. Also verhindert die Merlindefizienz die Mesodermentwicklung nicht in zellautonomer Weise, sondern wahrscheinlich indi-

rekt durch die Fehlentwicklung der extraembryonalen Gewebe (McClatchey et al. 1997).

Die Fehlorientierung der  $Nf2(-/-)$ -Embryonen könnte mit dem Verlust der regulatorischen Funktion des Merlins bei Interaktionen der Hyaluronsäure (HA) mit dem transmembranären Protein CD44 in Zusammenhang gebracht werden. HA kann im gesamten Embryo zum Zeitpunkt der Implantation nachgewiesen werden, verschwindet aber danach von der antimesometrialen Seite der Dezipua und ist nur noch auf der mesometrialen Seite in Bereichen der Trophoblasteninvasion während der ekto-plazentalen Konusbildung feststellbar. Die Entfernung der HA von der antimesometrialen Seite der Dezipua wird durch Endozytose des HA-Rezeptor-Komplexes bewerkstelligt und verhilft dem Trophoblasten zur Expansion in mesometrialer Richtung, was wiederum zur Orientierung des Embryos beiträgt. Der wesentliche Rezeptor für HA ist das transmembranäre Protein CD44, das mit seiner zytoplasmatischen Domäne sehr wahrscheinlich direkt an den N-Terminus von Merlin binden kann. Es liegt also nahe, zu postulieren, dass Interaktionen zwischen HA und CD44 oder CD44-ähnlichen Proteinen für die Zellmigration und die Proliferation bei der Invasion des Trophoblasten eine wichtige Rolle spielen und dass diese Interaktionen durch die Merlindefizienz empfindlich gestört werden.

#### 5.4.7.5 Heterozygote $Nf2(+/-)$ -Mäuse

Heterozygote  $Nf2(+/-)$ -Mäusen haben ein signifikant erhöhtes Risiko, maligne Tumoren, wie Osteosarkome, Fibrosarkome und hepatozelluläre Karzinome, zu entwickeln (McClatchey et al. 1998). Mit geringerer Frequenz werden auch Chondrosarkome, Uterussarkome und Karzinome der Gallengänge beobachtet.

Ein besonderes Merkmal dieser Tumoren, insbesondere der Osteosarkome und Fibrosarkome, ist ihr hohes Metastasierungspotenzial. Im Vergleich zu sporadisch auftretenden Osteosarkomen und Fibrosarkomen bei Wildtypmäusen ist die Metastasenbildung bei den  $Nf2(+/-)$ -Mäusen drastisch erhöht. Die primären Osteosarkome der heterozygoten Mäuse sind relativ kleine, differenzierte Tumoren, ebenso auch deren Metastasen, die vornehmlich in Leber und Lunge zu finden sind.

Die beim Menschen mit NF2-assoziierten Tumoren, Schwannome, Meningeome und Ependymome, treten bei den  $Nf2(+/-)$ -Mäusen nicht auf. Auch Linsenanomalien sind bei den heterozygoten Knockout-Mäusen nicht nachzuweisen. Da die

Nf2(+/-)-Mäuse jedoch erst relativ spät, im Alter von 10–30 Monaten, Tumoren entwickeln, ist anzunehmen, dass neben dem Verlust des NF2-Wildtypallels zusätzliche genetische Veränderungen für die Tumorgenese verantwortlich sind. In den Tumoren der Nf2(+/-)-Mäuse kommt es relativ häufig zum Verlust des gesamten Chromosoms 11. Dies bedingt nicht nur den Verlust des Wildtyp-NF2-Allels, sondern auch den Verlust eines p53-Allels, da das NF2- und das p53-Gen bei der Maus syntenisch sind. Der Verlust eines ganzen Chromosoms ist ein häufiges Ereignis im Zug der Entstehung von Tumoren bei der Maus (Luongo et al. 1994). Heterozygote p53(+/-)-Mäuse entwickeln mit erhöhter Inzidenz in unterschiedlichsten Geweben Sarkome im Alter von 9–24 Monaten (Jacks et al. 1994b).

Um kooperative Effekte der Mutationen im NF2- und p53-Gen zu untersuchen, wurden doppelt heterozygote Mäuse mit dem Genotyp Nf2(+/-);p53(+/-) gezüchtet (McClatchey et al. 1998). Solche Mäuse, bei welchen die mutierten Gene jeweils auf einem Chromosom liegen (*cis*), entwickeln früh multiple Osteosarkome und Fibrosarkome durch den Verlust des Chromosoms 11 mit den Wildtypallelen. Die Nf2(+/-);p53(+/-)-Mäuse mit den mutanten Genen auf einem Chromosom haben eine dramatisch reduzierte Überlebensrate bis maximal 5 Monate. Sie sterben vornehmlich aufgrund multipler Tumoren im Bereich der kraniofazialen Nasengänge. Die doppelt-heterozygoten Mäuse mit *trans*-Konfiguration der mutanten Gene zeigen im Vergleich zu den Nf2(+/-)- und p53(+/-)-Stämmen auch eine reduzierte Überlebensrate, wobei ein Alter von 21 Monaten nicht überschritten wird. Auch diese Tiere erkranken relativ früh an Osteosarkomen und an Fibrosarkomen, in welchen überraschenderweise häufig der Verlust beider Wildtypallele auftritt. Dies lässt sich nur durch die Annahme von jeweils 2 Ereignissen erklären, die zu LOH führen. Beispielsweise könnte somatische Rekombination die mutanten Allele in die *cis*-Stellung bringen, gefolgt vom Verlust des Chromosoms 11 mit den beiden Wildtypallelen. Zwei der doppelt-heterozygoten Mäuse mit *trans*-Konfiguration der mutanten Allele zeigten in den Tumoren den Verlust des Chromosoms 11 mit dem Wildtyp-p53-Allel und dem mutanten NF2-Gen. Diese Tumoren, ein Fibrosarkom und ein Osteosarkom, bildeten keine Metastasen im Gegensatz zu den Tumoren der doppelt-heterozygoten Tiere mit dem Verlust beider Wildtypallele, was die Bedeutung der Merlindefizienz für die Metastasierungskapazität unterstreicht, zumal Osteo-

sarkome, die p53(+/-)-Mäuse entwickeln, nicht sehr häufig metastasieren.

Das extreme Metastasierungspotenzial der Tumoren der Nf2(+/-)-Mäuse zeigt, dass durch die Merlindefizienz Prozesse wie die Penetration von Blutgefäßen oder die Invasion und die Etablierung in anderen Geweben befördert werden. Hierfür sprechen auch die Beobachtungen, dass merlindefiziente Tumorzellen aus Osteosarkomen oder Fibrosarkomen von Nf2(+/-)-Mäusen, die in die Schwanzvene von Wildtypmäusen injiziert wurden, multiple Metastasen in der Lunge der Empfängertiere bildeten und in deren Blut zirkulierten. Weder die Metastasenbildung, noch die Zirkulation im Blutstrom der Empfängertiere war nach Injektion von p53-defizienten Tumorzellen nachzuweisen.

Das hohe Metastasierungspotenzial der merlindefizienten Tumoren der Nf2(+/-)-Mäuse könnte dadurch bedingt sein, dass Merlin bei der Maus nicht nur als negativer Wachstumsregulator wirkt, sondern auch in die Regulation der Zellmotilität, der Invasivität und des verankerungsunabhängigen Wachstums involviert ist. Ob und auf welche Weise diese Prozesse auch beim Menschen durch merlinvermittelte Zellfunktionen reguliert werden, ist nicht bekannt. Schwannome, Meningeome und Ependymome, die typischen NF2-assoziierten Tumoren, in welchen auch bei sporadischen Patienten die Merlindefizienz nachgewiesen wurde, sind benigne Tumoren. Die heterozygoten Nf2(+/-)-Mäuse entwickeln auch Osteosarkome. Jedoch scheint NF2-Gen-Defekten bei der Entwicklung oder Progression von Osteosarkomen des Menschen keine Bedeutung zuzukommen (Jacoby et al. 1999) (Kapitel 5.4.10 „Somatische Mutationen des NF2-Gens in nicht mit NF2 assoziierten Tumoren“).

Die strukturelle und funktionelle Verwandtschaft des Merlins zu den ERM-Proteinen wirft die Frage nach der Redundanz ihrer Funktionen auf. Überraschenderweise haben moesindefiziente Mäuse keine phänotypischen Anomalien oder Fertilitätsstörungen. Auch die systematische histologische Analyse der Gewebe dieser Mäuse zeigte keine Auffälligkeiten (Doi et al. 1999). Für die normale Entwicklung der Maus ist Moesin also entbehrlich, was verwundert, denn Moesin ist in der Evolution hoch konserviert. *Drosophila* besitzt kein dem Ezrin oder Radixin homologes Protein, sondern nur Moesin, dessen Aminosäuresequenz derjenigen des Moesins der Maus zu 70% ähnlich ist. Die Unauffälligkeit der moesindefizienten Mäuse spricht dafür, dass die ERM-Proteine funktionell redundant sind. Eine kompensatorisch verstärkte Expression von Ezrin oder Radixin oder eine Ver-

änderung ihrer subzellulären Lokalisation konnte bei den moesindefizienten Mäusen nicht beobachtet werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere Mitglieder der Bande-4.1-Familie die Funktion des Moesins in den Zellen der Knockout-Mäuse übernommen haben oder ein verändertes Expressionsmuster zeigen. Der Vergleich der moesin- bzw. merlindefizienten Mäuse lässt ein unterschiedliches Funktionsspektrum von Merlin und Moesin erkennen.

Das erhöhte Risiko der Nf2(+/-)-Mäuse, maligne Tumoren zu entwickeln zeigt, dass grundsätzliche Unterschiede hinsichtlich der Auswirkungen der Merlindefizienz zwischen Mensch und Maus bestehen. Möglicherweise kompensieren bei der Maus die ERM-Proteine in bestimmten Zellsorten wie Schwann-Zellen die Merlindefizienz. Dass solche kompensatorischen Effekte bei Knockout-Mäusen möglich sind, ist nicht nur am oben geschilderten Beispiel des Moesins gezeigt worden, sondern auch bei Mitgliedern der Familie der Retinoblastomproteine und der Intermediärfilamente Vimentin und GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Colucci-Guyon et al. 1994; Gomi et al. 1995; Lee et al. 1996). Die Abweichungen des Phänotyps der Nf2(+/-)-Mäuse von der Manifestation der NF2 beim Menschen könnten zum einen durch speziespezifische Unterschiede der somatischen Mutationsrate unterschiedlicher Zelltypen (z. B. Schwann-Zellen vs. Osteoblasten), zum anderen durch Syntenieunterschiede beeinflusst werden. Beim Menschen liegt das NF2-Gen auf Chromosom 22, bei der Maus auf Chromosom 11. Diese Chromosomen divergieren in ihrem Genbestand. Der Verlust des Wildtypallels des NF2-Gens ereignet sich in Tumoren häufig als Folge des Verlusts des ganzen Chromosoms. Von diesen Verlusten sind also bei Mensch und Maus ganz unterschiedliche Gene betroffen. Der Verlust des Chromosoms 11 bedeutet bei der Maus auch immer den Verlust eines Allels des Tumorsuppressorgens p53 mit entsprechenden Konsequenzen für die Tumorentwicklung.

Zusammengefasst zeigen die Untersuchungen an NF2-Knockout-Mäusen, dass Merlin bereits in einem sehr frühen Stadium der Mausontogenese eine wichtige Rolle spielt und die homozygote Merlindefizienz ein Letalfaktor ist. Die hohe Metastasierungs-kapazität der Tumoren heterozygoter Nf2(+/-)-Mäuse weist auf essenzielle Funktionen des Merlins bei der Regulation der Zellmotilität und der substratabhängigen Wachstumskontrolle hin. Den unterschiedlichen Auswirkungen der Merlindefizienz bei Mensch und Maus liegen sehr wahrscheinlich auch speziespezifische Unterschie-

de zwischen den Wirkungsspektren des Merlins zugrunde. Da Nf2(+/-)-Mäuse keine Schwannome oder Meningeome entwickeln, sondern Osteosarkome und Fibrosarkome, in welchen die homozygote Inaktivierung des NF2-Gens nachgewiesen wurde, ist zu vermuten, dass Mensch und Maus über unterschiedliche zelltypspezifische Mechanismen der Wachstumsregulation verfügen. Auch die somatische Mutationsrate in SZ oder meningealen Zellen könnten bei Mensch und Maus wesentlich differieren.

#### 5.4.7.6 Transgene Mäuse, die mutantes Merlin exprimieren

Ein Mausmodell, das dem Phänotyp der NF2-Manifestation beim Menschen recht nahe kommt, etablierten Giovannini et al. (1999). Diese Mäuse exprimieren mutante NF2-cDNA unter der Kontrolle des P0-Promotors als Transgen. Das P0-Protein ist eine wesentliche Komponente des peripheren Myelins. Die Verwendung des P0-Promotors in diesem System ermöglicht eine Schwann-Zell-spezifische Expression der mutanten NF2-cDNA. Für diese Experimente wurden 2 unterschiedliche Merlinmutanten verwendet,

- zum einen  $\Delta$ Cter, eine C-terminale Deletionsmutante, und
- zum anderen  $\Delta(39-121)$ , eine mutante Merlinform, bei welcher die Exons 2 und 3 fehlen, aber ein offener Leserahmen erhalten bleibt.

Um die spezifische Expression des jeweiligen Transgens nachzuweisen, enthielten die Expressionsvektoren zusätzlich Sequenzen für ein spezielles Epitop, das die subzelluläre Lokalisation des mutanten Merlins nicht verändert. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen dieses Epitop ist dann der Nachweis der mutanten Merlinformen möglich. Durch Immunoblotting mit diesem Antikörper konnten also solche Mausstämme identifiziert werden, die in ihren peripheren Nerven die Merlinmutanten  $\Delta$ Cter (MG=39 KDa) oder  $\Delta(39-121)$  (MG=62 KDa) zusätzlich zum Wildtypmerlin exprimierten. Entsprechend der Zelltypspezifität des P0-Promotors war keine Expression der Transgene in Herz, Milz, Lunge, Leber, Niere, Zerebellum, N. opticus und verschiedenen anderen Gehirnstrukturen nachweisbar. Eine geringe Expression der jeweiligen Merlinmutanten fand sich jedoch im Uterus der transgenen Tiere, was durch die starke Innervation dieses Organs zu erklären ist. Die transgenen Mäuse, welche die Merlinmutante  $\Delta$ Cter exprimierten, hatten keine reduzierte Überlebensrate und kein erhöhtes Tumorrisiko. Im Gegensatz da-



zu zeigten Mäuse, die die Merlinmutante  $\Delta(39-121)$  exprimierten, Schwann-Zell-Tumoren und eine eingeschränkte Lebenserwartung. Giovannini et al. (1999) untersuchten insgesamt 36 Mäuse mit transgener Expression der Mutante  $\Delta(39-121)$ , die aus 4 unabhängig voneinander hergestellten Stämmen kamen. Dabei wiesen 12 Mäuse insgesamt 15 periphere Schwann-Zell-Tumoren auf, 4 davon waren am N. trigeminus entstanden bzw. in Spinalganglien. Im Uterus von 8 der 20 weiblichen Tiere wurden ebenfalls Schwann-Zell-Tumoren mit Verocay-Körper-ähnlichen Strukturen beobachtet. Im Gegensatz zu den natürlichen Verhältnissen bei menschlichen Schwannomen wurden in allen diesen SZ-Tumoren nebeneinander das mutante und das Wildtypmerlin exprimiert. Die FISH-Analyse von 2 Tumoren peripherer Nerven und 1 uterinen Tumor zeigte, dass beide Chromosomen 11 der Maus mit den Wildtyp-NF2-Allelen vorhanden waren. Bei 13 der 36 analysierten Mäuse, welche die Merlinmutante  $\Delta(39-121)$  als Transgen exprimierten, waren Herde hyperproliferierender Schwann-Zellen in den Spinalganglien zu erkennen. Wie bei NF2-Patienten ist auch bei den transgenen Mäusen anzunehmen, dass diese Foci Vorläuferläsionen von Schwannomen darstellen (Wiestler u. Radner 1994). Diese Schwannosis manifestiert sich bei den transgenen  $\Delta(39-121)$ -Mäusen auch in Skelettmuskeln in der Form hypertropher Nervenfasern mit Schwann-Zell-Hyperplasie.

Um die dominante Wirkung der Merlinmutante  $\Delta(39-121)$  in Relation zur Anzahl der Wildtypallele zu untersuchen, wurden die transgenen  $\Delta(39-121)$ -Mäuse mit heterozygoten  $Nf2(+/-)$ -Mäusen gekreuzt. Die aus diesen Kreuzungen resultierenden  $Nf2(+/-)$ -Mäuse, die das mutante Transgen exprimieren, entwickeln in höherem Maß Schwann-Zell-Tumoren und Schwannosis als  $Nf2(+/+)$ -Mäuse mit Expression der Merlinmutante  $\Delta(39-121)$ . Die Anzahl der funktionellen NF2-Allele moduliert also die tumorigene Wirkung der Merlinmutante  $\Delta(39-121)$ . Eine dominant-negative Wirkung des Merlins  $\Delta(39-121)$  ist aber laut Giovannini et al. (1999) eher unwahrscheinlich, da das mutante Merlin in Proteinextrakten aus normalen peripheren Nerven oder aus Tumoren der transgenen Mäuse nicht mit endogenem Wildtypmerlin koimmunpräzipitiert werden kann.

Die Bildung von Heterodimeren des mutanten Merlins mit Wildtypmerlin war zumindest auf diesem Weg nicht nachzuweisen. Es ist aber die oben beschriebene inverse Korrelation der Gendosis des Wildtypallels mit dem Ausmaß der Tumorgenese,

die von der dominanten Wirkung der Mutante  $\Delta(39-121)$  überzeugt. Auf welcher Ebene der Merlinfunktionen dieser dominante Effekt zum Tragen kommt, ist noch nicht geklärt.

In HeLa-Zellen ist die ektopisch exprimierte Merlinmutante  $\Delta(39-121)$  zytoplasmatisch in perinukleären Aggregaten lokalisiert und geht keine Assoziation mit dem Aktinzytoskelett ein (Deguen et al. 1998). Ganz entsprechend verhält sich die Deletionsmutante  $\Delta(1-250)$ . Die N-terminale Domäne des Merlins vermittelt also seine submembranäre Lokalisation und seine Bindung an das Aktinzytoskelett. Beides ist vermutlich für die Tumorsuppressorfunktion des Merlins erforderlich. Innerhalb der N-terminalen Domäne ist das Phenylalanin in Position 118 von besonderer Bedeutung, denn seine Deletion  $\Delta(118)$  allein bewirkt bereits die auch bei den genannten größeren Deletionen beschriebenen Effekte.

Im Gegensatz dazu steht das Verhalten dreier C-terminaler Deletionsmutanten des Merlins mit Verlust der letzten 70 bzw. 89 bzw. 120 Aminosäuren; sie bleiben submembranär lokalisiert und F-Aktin-gebunden, obwohl diese Bindung eine Lockerung erfährt. Dem C-Terminus kann also eine stabilisierende Wirkung auf die Aktinbindung des Merlins zugeschrieben werden (Deguen et al. 1998).

C-terminal deletierte Mutanten des Merlins in transgenen Mäusen führten bei einer Koexpression mit Wildtypmerlin in transgenen Mäusen auch bei hohem Überschuss nicht zur Bildung von Schwannomen; diese Mutanten entfalten also keine dominante Wirkung. In diesem Zusammenhang muss jedoch berücksichtigt werden, dass aufgrund der Mutationsanalysen des NF2-Gens an Meningeomen und Schwannomen davon ausgegangen werden kann, dass die meisten dieser Tumoren durch den Funktionsverlust des Wildtypallels, also entsprechend dem 2-Treffer-Modell entstehen. Dennoch ist denkbar, dass somatische Mutationen des NF2-Gens mit dominanten Effekten auch die Tumorgenese bei NF2-Patienten beeinflussen können. Möglicherweise führen somatische Mutationen mit dominanter Wirkung bei NF2-Patienten mit Keimbahnmutationen, welche die Merlinfunktionen nur geringfügig beeinträchtigen, zu Vestibularisschwannomen mit erhöhter Proliferationsrate. Gerade die Wachstumsrate der Vestibularisschwannome kann interindividuell sehr variabel sein. Auf diese Weise könnte also die Art der somatischen Zweitmutation zur interindividuellen Variabilität bei NF2 beitragen.

#### 5.4.7.7 Funktionsanalyse des Merlins bei *Drosophila*

Das enorme Repertoire der Möglichkeiten, gezielte genetische Veränderungen bei *Drosophila* vorzunehmen und diese durch Kreuzungen miteinander zu konfrontieren, hat dazu veranlasst, die Funktionsanalyse des Merlins auch an diesem Organismus in Angriff zu nehmen. Damit verbindet sich die Hoffnung auf Erkenntnisse, die neue Aspekte der Pathogenese der NF2 beim Menschen erschließen können.

Das Drosophilamerlin liegt auf dem X-Chromosom und kodiert für ein Protein aus 635 Aminosäuren (AS). Somit ist das Drosophilamerlin (D-Merlin) um 40 AS länger als das Merlin der Maus oder des Menschen. Dieser Längenunterschied ist vornehmlich durch Insertionen im Übergangsbereich der  $\alpha$ -helikalen zur C-terminalen Domäne bedingt. Das D-Merlin zeigt über die gesamte Länge der Proteinsequenz hinweg 61% Ähnlichkeit zum humanen Merlin (McCartney et al. 1996). Besonders ausgeprägt ist die Ähnlichkeit im N-terminalen Bereich, wo auch die ERM-Proteine die höchste Identität zu Merlin aufweisen (Abb. 5.6).

D-Merlin wird wie das Moesin, das einzige ERM-Protein bei *Drosophila*, während der Ontogenese in zahlreichen Geweben exprimiert. Dabei unterscheiden sich Merlin und Moesin bei *Drosophila* jedoch hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation. Während Moesin nur an der Plasmamembran vorgefunden wird, ist D-Merlin submembranär und zytoplasmatisch mit endozytotischen Vesikeln assoziiert.

Die ektopische Expression humaner NF2-cDNA in Drosophilalarven mit mutiertem endogenem Merlin reicht aus, die letale Wirkung homozygoter D-Merlin-Mutanten zu korrigieren. Daher ist davon auszugehen, dass die Funktionen des Merlins im Wesentlichen konserviert sind. Fehon et al. (1997) charakterisierten 4 unterschiedliche Mutationen des D-Merlin-Gens, 3 dieser Mutationen sind rezessive Letalfaktoren. Sie führen bei den hemizygoten Männchen im Larven- oder Puppenstadium zum Absterben, ohne dass für die verschiedenartigen Mutationen spezifische Unterschiede im Phänotyp zu beobachten wären (LaJeunesse et al. 1998). Diese 3 letalen Mutationen kodieren für trunkierte Proteine und heißen

- Mer<sup>1</sup> (Q324X),
- Mer<sup>2</sup> (Q318X) und
- Mer<sup>4</sup> (Q170X).

Mer<sup>3</sup> hingegen ist eine Missense-Mutation M177I. Fliegen mit homozygoter oder hemizygoter Mer<sup>3</sup>-

Mutation sind lebensfähig aber steril und zeigen Hypertrophie der Flügel und Augen. Diese Befunde belegen, dass vollständig funktionsfähiges Merlin für die normale Drosophilaentwicklung unbedingt erforderlich ist.

Um den zellulären Phänotyp bei Merlinddefekten im adulten Stadium zu untersuchen, züchteten LaJeunesse et al. (1998) Fliegen, die heterozygot für die Mer<sup>4</sup>-Mutation sind und bei welchen durch somatische Mutagenese während der Larvalentwicklung homozygot mutante Klone erzeugt werden können. Auf diese Weise entstehen somatische Mosaik, sodass mutante Klone in der Nachbarschaft normaler oder heterozygoter Zellen untersucht werden können. Bei genauer Analyse der Facettenaugen dieser Fliegen zeigen sich Größenunterschiede zwischen normalen und mutanten Schwesterklonen, die durch zusätzliche Mutationen in pigmentierungsrelevanten Genen voneinander unterschieden werden können. In den mutanten Klonen sind mehr Ommatidien zu finden als in den Schwesterklonen des Wildtyps.

Analoge Experimente wurden auch mit den D-Merlin-Mutanten Mer<sup>1</sup>, Mer<sup>2</sup> und Mer<sup>3</sup> gemacht. Auch in diesen Fällen ist die Hyperproliferation mutanter Klone im Fliegenauge zu beobachten, wobei der Größenunterschied im Vergleich zu den normalen Schwesterklonen je nach Art der Mutation um das 2- bis 3Fache variiert.

Die histologische Analyse der mutanten Klone zeigt eine normale Ommatidiendifferenzierung. Dies impliziert, dass der Funktionsverlust des D-Merlins nur die Proliferation beeinflusst und nicht die Differenzierung oder die Morphogenese. Bestätigung findet diese Schlussfolgerung auch durch den Proliferationsdefekt der Gewebe, in welchen die D-Merlin-Mutante Mer<sup>Δ170-177</sup> als Transgen überexprimiert wird. In den Flügeln sind Verbreiterungen der Flügelfläche und Venendefekte zu beobachten. Im Bereich der Flügelgelenke führt Hyperproliferation dazu, dass die Flügel vom Körper abstehen. Dieser Phänotyp gleicht dem der oben erwähnten Fliegen, die homozygot für die Mer<sup>3</sup>-Mutation sind. Diese Experimente belegen also, dass auch bei *Drosophila* Merlin ein negativer Regulator der Zellproliferation ist.

Um die Auswirkungen von intragenen Deletionen auf die submembranäre Lokalisation zu untersuchen, wurden verschiedene D-Merlin-Deletionsmutanten ektopisch in S2-Zellen und in imaginalen Epithelien exprimiert (LaJeunesse et al. 1998). Aus diesen Experimenten ist zu folgern, dass intakte C- und N-terminale sowie  $\alpha$ -helikale Bereiche

für die korrekte Lokalisation des D-Merlins an der Plasmamembran und im Zytoplasma nötig sind. Zum gleichen Schluss führten auch analoge Versuche mit humanem Merlin (Deguen et al. 1998; Koga et al. 1998) (Kapitel 5.4.7.2 „Dysfunktion mutanter Merlinformen“).

Zur weiteren Charakterisierung der In-vivo-Funktionen der D-Merlin-Mutanten wurden so genannte Rescue-Experimente durchgeführt, wobei untersucht wurde, ob die ektoische Expression bestimmter D-Merlin-Mutanten das Überleben von Larven mit der letalen D-Merlin-Mutante Mer<sup>4</sup> ermöglicht. Hieraus ergab sich, dass ein intakter N-Terminus und der N-terminale Anteil der  $\alpha$ -helikalen Domäne für die Komplementation der Letalität der Mer<sup>4</sup>-Mutation erforderlich sind.

Ektoische Expression der verschiedenen D-Merlin-Mutanten in Larven mit funktionsfähigem endogenem Merlin sollte dazu verhelfen, dominante Effekte mutanter Merlinformen aufzudecken. Dominant-negative Effekte, die zu einer Inaktivierung des Wildtypmerlins führen und die Larvalentwicklung stören, waren nur der Mutante Mer <sup>$\Delta$ 170-177</sup> zuzuschreiben. Durch die ektoische Expression der Mutante Mer <sup>$\Delta$ 170-177</sup> kam es zu den bereits beschriebenen Anomalien an den Flügeln, Flügelgelenken und Augen, die durch Hyperproliferationen während der Larvalentwicklung entstehen. Der dominant-negative Effekt wird dabei durch die Menge an endogenem Merlin beeinflusst. Auch an der intrazellulären Lokalisation des Wildtypmerlins bei Koexpression der Mutante D-Mer <sup>$\Delta$ 170-177</sup> ist deren dominant-negativer Effekt zu erkennen, da sie die Verteilung des Merlins im Zytoplasma verhindert und so zur submembranären Akkumulation des Merlins führt. Lajeunesse et al. (1998) schlossen aus ihren Experimenten, dass Merlin wahrscheinlich an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran eine Aktivierung erfährt. Entsprechend dieser Hypothese ist die D-Mer <sup>$\Delta$ 170-177</sup>-Mutante dieser Aktivierung gegenüber unempfindlich, inhibiert aber die Aktivierung des Wildtypmerlins, das an der Plasmamembran in inaktiver Form akkumuliert wird.

#### 5.4.8 CD44-Spleißvarianten in Schwannomen mit Mutationen des NF2-Gens

Die atypische Expression von CD44-Spleißvarianten mit einem oder mehreren der „variablen“ Exons v1-v10 spielt bei der Tumorprogression und Metastasenbildung eine wichtige Rolle. Zahlreiche Studien belegen, dass die Expression bestimmter

CD44-Spleißvarianten mit Metastasierung und schlechter Prognose verschiedenster Tumoren einhergeht [z.B. Sherman et al. (1996)]. Im Vergleich zu SZ aus normalen Nerven exprimieren SZ aus Schwannomen mit Mutationen des NF2-Gens höhere CD44-Mengen in seiner Standardform und zusätzlich die varianten Exons v9 und v10, nicht aber das v6-Exon, das in MPNST-Zelllinien von NF1-Patienten hoch exprimiert wird (Sherman et al. 1997b). Keines dieser varianten CD44-Exons wird von SZ aus normalem Nervengewebe bzw. von solchen aus den für NF1 typischen Neurofibromen exprimiert. Auf welche Weise Merlinmangel oder Mutanten des Merlins die Expression von CD44 und das differenzielle Spleißmuster des primären CD44-Gen-Transkripts beeinflussen, ist nicht bekannt. Wie bereits erwähnt, sind maligne Transformation und Metastasierung – Prozesse, die mit dramatischen Veränderungen des CD44-Spleißmusters zugunsten der varianten Exons einhergehen – für die Schwannome der NF2-Patienten nicht charakteristisch. Andererseits ist CD44 mit seiner intrazellulären Domäne ein direkter oder indirekter Wechselwirkungspartner des Merlins und der ERM-Proteine. Im Hinblick auf die überragende Bedeutung der CD44-Proteine für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion sollte der Erforschung des Einflusses von Merlinmangel und/oder Merlinmutanten auf die Funktionen von CD44 und seinen Varianten (einschließlich ihrer Wechselwirkung mit den ERM-Proteinen) hohe Priorität eingeräumt werden. Diese Zusammenhänge werden sich als relevant für die Pathogenese der NF2 erweisen.

#### 5.4.9 Reversion des v-Ha-Ras-transformierten Phänotyps durch Merlin

Die ektoische Expression von Wildtypmerlin in v-Ha-Ras-transformierten Zellen kann den transformierten Phänotyp dieser Zellen revertieren, d.h. verankerungsunabhängiges Wachstum in Softagar verhindern und Wachstumsstopp bei Zellkontakt wiederherstellen. In geringerem Maß ist diese Wirkung auch durch die ektoische Expression einer Merlinmutante zu erzielen (Tikoo et al. 1994). Zurzeit kann nur darüber spekuliert werden, auf welche Weise Merlin den durch v-Ha-Ras induzierten transformierten Phänotyp revertiert. Es liegt nahe, anzunehmen, dass die Regulation der Organisation des Aktinzytoskeletts hierbei eine entscheidende Rolle spielt. Auch verschiedene Inhibitoren von Proteinen der RhoGTPase-Familie

können den Ras-transformierten Phänotyp revertieren.

Tikoo et al. (1994) machten sich für ihre Interpretation die Doppelnatur des p120GAP als negativer Regulator und Effektor von Ras zunutze (Tocque et al. 1997). Hiernach wird p120GAP durch Interaktion mit der Effektordomäne von Ras-GTP in die Lage versetzt, das RhoGAP p190 zu binden und zu aktivieren. Hierdurch kommt es zur Inaktivierung der die Stressfasern organisierenden Wirkung von RhoA. Auf diesem Weg würde die seit langem bekannte Wirkung der Ras-Aktivierung auf das Aktinzytoskelett realisiert. In Analogie zu der Regulator-Effektor-Beziehung zwischen Ras-GTP und p120GAP könnte p190RhoGAP seinerseits ein Effektor von RhoA sein, der jedoch durch seine Bindung an p120GAP an seiner Mitwirkung bei der Stressfaserorganisation gehindert wird. Merlin könnte in diesem Modell mit der Interaktion zwischen p120GAP und p190 interferieren und so als Antagonist der Inhibition durch den p120GAP/p190-Komplex die Stressfaserorganisation begünstigen.

Im Gegensatz zu dieser hypothetischen Konstruktion von Tikoo et al. (1994) stehen andere funktionelle Beziehungen zwischen den Aktivitäten der Ras-GTPasen und den RhoGTPasen auf solider empirischer Basis [Übersicht: Zohn et al. (1998)]. Es ist schon seit längerem bekannt, dass die durch aktivierte Ras-GTPasen induzierte Transformation der Mitwirkung von RhoGTPasen bedarf, insbesondere von RhoA, RhoB, RhoG, Rac1 und Cdc42. Einer der überzeugendsten experimentellen Beweise hierfür ist die Hemmung der Ras-Transformation durch dominant-negativ wirkende Mutanten dieser GTPasen der Rho-Familie. Manche RhoGTPasen sind selbst nachgeordnete Mediatoren der Ras-GTPasen, und konstitutiv aktivierte RhoGTPasen wirken mit Ras-aktiviertem Raf1 synergistisch auf Transformationsparameter. Dabei verläuft die Aktivierung von RhoGTPasen durch Ras nicht über Raf1, den Effektor der MAPK-Kaskade. So wird z.B. Rac1 über den Ras-Effektor PI3K aktiviert und aktiviert seinerseits RhoA. Ihrem bekannten Funktionsspektrum entsprechend, sind die RhoGTPasen in die mit der Ras-Transformation verbundene Reorganisation des Aktinzytoskeletts involviert. An dieser Stelle bestehen noch Widersprüche hinsichtlich der Vereinbarkeit der Aktivierung von RhoGTPasen durch Ras mit den beobachteten Phänomenen (Zusammenbruch der Stressfasern, Zunahme der Membrankrausen und Lockerung der Adhäsionsfoci). Im Gegensatz zu den Ras-GTPasen wird die Akti-

vität der RhoGTPasen nicht nur durch GEF und GAP reguliert, sondern zusätzlich durch Guanin-nukleotiddissoziationsinhibitoren (GDI), welche die GDP-gebundene Form der GTPasen stabilisieren und so deren Aktivierung durch GEF blockieren. Die inaktiven RhoGDP-Rho-GDI-Komplexe translozieren vom Zytoplasma zur Zellmembran, wo sie durch die Bindung des Rho-GDI an ERM-Proteine dissoziieren und so die RhoGTPase zur Aktivierung durch ein Rho-GEF freigeben. Auch die N-terminale Domäne des Merlins vermag an Rho-GDI zu binden, jedoch ist noch nicht bekannt, ob damit eine Hemmung der Rho-GDI-Aktivität (Aktivierung von Rho) verbunden ist (Maeda et al. 1999). Dies scheint jedoch bei der Bindung der ERM-Proteine an Rho-GDI zu erfolgen, sofern diese durch Phosphorylierung in die offene, aktive Form überführt wurden. Wenn Merlin auf die gleiche Weise, d.h. durch Rho-GDI-Inaktivierung, zur Aktivierung von RhoGTPasen beitrüge, wie die ERM-Proteine, so würde Merlinmangel die Transformation hemmen und nicht, wie bei Mangel an einem Tumorsuppressor erwartet, begünstigen. Aufgrund der Ergebnisse von Tikoo et al. (1994) und der Tatsache, dass Antisense-Oligonukleotide gegen Merlin-mRNA die Zelladhäsion hemmen und die Proliferation fördern (Huynh u. Pulst 1996) ist die Tumorsuppressorfunktion des Merlin aber zweifelsfrei erwiesen. Nur wenn Merlin als Antagonist der ERM-Proteine bei der Aktivierung von RhoGTPasen im Zug Ras-induzierter Transformation wirkte, wären die Ergebnisse von Tikoo et al. (1994) im Sinn des oben dargestellten Modells deutbar. Antagonismus von Merlin gegen die ERM-Proteine ist in den von Maeda et al. (1999) untersuchten Zellsystemen jedoch wenig wahrscheinlich, da die Merlinkonzentration zwischen 5% und 14% derjenigen der ERM-Proteine liegt und seine Affinität zu Rho-GDI sich nicht von jener der N-terminalen Domänen der ERM-Proteine unterscheidet (Maeda et al. 1999).

Die bisher bekannten Daten fügen sich also noch nicht zu einem schlüssigen Konzept über die Tumorsuppressorfunktion des Merlins zusammen. Die Redundanz der beteiligten Moleküle (RhoGTPasen, Rho-GEF und Rho-GDI) sowie ihre jeweils zelltypspezifischen Expressionsspektren werden ebenso stärkere Berücksichtigung finden müssen, wie die Regulation der MERM-Proteine durch posttranslationale Modifikation. Die Beteiligung des Merlins an Zielfunktionen der Ras-induzierenden Signaltransduktion könnte aber der Schlüssel zum Verständnis der partiellen Überlappung der Symptomatik bei NF1 und NF2 sein.

#### 5.4.10 Somatische Mutationen des NF2-Gens in nicht mit NF2 assoziierten Tumoren

Die Mutations- und Expressionsanalyse des NF2-Gens bei einer Vielzahl von Tumoren verschiedenster Herkunft lieferte keine Hinweise darauf, dass der Funktionsverlust des NF2-Gens gehäuft in die Tumorgenese solcher Tumoren involviert ist, die nicht mit NF2 assoziiert sind. Eine gewisse Ausnahme sind Mesotheliome, denn bei einem Anteil dieser Tumoren ist die biallelische Inaktivierung des NF2-Gens bzw. fehlende Merlin-expression nachgewiesen worden (Tabelle 5.27). Mesotheliome sind relativ seltene, maligne Tumoren mesodermalen Ursprungs, die durch Asbestexposition entstehen können, wobei häufig eine lange Latenzzeit zwischen der Exposition und der Tumormanifestation beobachtet wird. Dies lässt darauf schließen, dass multiple genetische Veränderungen zur Entwicklung der Mesotheliome beitragen, wofür auch die umfangreichen zytogenetischen Veränderungen sprechen, die bei diesen Tumoren beobachtet wurden (Taguchi et al. 1993). Auf diesem Hintergrund ist zu folgern, dass der Funktionsverlust des NF2-Gens in Mesotheliomen sehr wahrscheinlich mit der Tumorprogression und nicht mit der Tumorentstehung assoziiert ist.

Da heterozygote NF2-Knockout Mäuse (NF2+/-) eine ausgeprägte Prädisposition zur Entwicklung von Osteosarkomen zeigen, in welchen der Verlust des Wildtyp-NF2-Allels nachgewiesen werden konnte, bestand der Verdacht, dass auch bei Osteosarkomen des Menschen Defekte des NF2-Gens zur Tumorgenese beitragen. Die Mutations- und Expressionsanalysen des NF2-Gens bei 22 Osteosarkomen bestätigten diese Vermutung jedoch nicht.

#### 5.4.11 Abgrenzung der NF2 von der familiären multiplen Meningeomatose

Die seltene familiäre Form der multiplen Meningeomatose mit autosomal-dominanter Vererbung ist dadurch gekennzeichnet, dass die Betroffenen multiple Meningeome, aber keine weiteren Merkmale der NF2 aufweisen. Bislang sind erst 15 Fallbeschreibungen familiärer multipler Meningeomatose veröffentlicht worden [zusammengefasst von Maxwell et al. (1998)]. Die Inzidenz der multiplen Meningeomatose ohne NF2, die im Rahmen der epidemiologischen Studien von Antinheimo et al. (2000) ermittelt wurde, beträgt 4% (29 unter 823

Patienten mit Meningeomen). Pulst et al. (1993) zeigten an einer Familie mit multipler Meningeomatose, dass das zugrunde liegende Gen nicht mit Markern von 22q gekoppelt ist. Dieser Befund ist gut damit vereinbar, dass in Meningeomen solcher Patienten keine NF2-Gen-Mutationen nachgewiesen werden konnten (Maxwell et al. 1998). Western-Blot-Analysen an Extrakten aus 2 Meningeomen von Patienten einer Familie mit multipler Meningeomatose ergaben, dass Merlin in diesen Tumoren exprimiert wird. Es ist jedoch einschränkend anzumerken, dass mit den Methoden der Mutationsanalyse nicht alle Mutationen des Merlins erfasst werden und, dass der Nachweis von Merlin durchaus mit dem Vorhandensein von Mutationen vereinbar ist, welche die Stabilität des Merlins nicht beeinträchtigen. Die meisten bisher gefundenen Mutationen des NF2-Gens führen allerdings sowohl als somatische als auch als Keimbahnmutationen zu trunkiertem Merlin, das in der Regel raschem Abbau anheim fällt (s. Kapitel 5.4.4.1 „Mutationenspektrum des NF2-Gens“). Das NF2-Gen ist zwar noch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen, es gibt andererseits aber noch keinen Hinweis auf ein anderes Gen, das dieser seltenen Tumorerkrankung zugrunde liegen könnte. Wie in Kapitel 5.4.6.2 „Meningeome“, Unterkapitel „Inaktivierung des NF2-Gens“, angesprochen, besteht der Verdacht, dass sporadische meningotheiomatöse Meningeome durch den Funktionsverlust eines anderen Tumorsuppressorgens entstehen. Da Patienten mit multipler Meningeomatose aber nicht vorrangig unter meningotheiomatösen Meningeomen leiden (Maxwell et al. 1998), besteht offenbar keine Beziehung zwischen den jeweiligen Gendefekten.

#### 5.4.12 Schwannomatose und NF2

Noch bevor verbindliche Kriterien für NF2 formuliert worden waren, beschrieben mehrere Autoren das Vorkommen multipler Schwannome bei Patienten, die keine anderen Symptome der NF2 aufwiesen [Zitate bei Wolkenstein et al. (1997)]. Obwohl bei Verlaufsstudien das spätere Auftreten von Vestibularisschwannomen bei einigen Patienten mit multiplen Schwannomen beobachtet wurde, ließ sich doch eine Gruppe von Fällen eindeutig von NF2 abgrenzen, bei denen sich weit jenseits des bei NF2 beobachteten Manifestationsalters von Vestibularisschwannomen keine solchen Tumoren bildeten. Solche Beobachtungen erforderten eine klare Definition der diagnostischen Kriterien, mit deren Hilfe die Schwannomatose als klinische Ent-

tät von NF2 abgegrenzt werden konnte. Diese Kriterien wurden von Jacoby et al. (1997) folgendermaßen formuliert:

- Vorhandensein von 2 oder mehr pathologisch bestätigten Schwannomen und
- Fehlen radiologisch nachweisbarer Vestibularisschwannome bei Patienten im Alter >18 Jahre.

Die Verdachtsdiagnose für Schwannomatose ergibt sich, wenn bei Patienten im Alter >30 Jahren 2 oder mehr Schwannome vorhanden sind, aber keine Symptome, die durch Vestibularisschwannome verursacht sein könnten. Das gilt auch für regional begrenzten Befall durch Schwannome bei beliebigem Alter, also für segmentale Manifestation infolge eines Mosaikstatus.

Bei strikter Anwendung dieser Kriterien, sowohl retrospektiv auf kasuistische Publikationen als auch in aktuellen Studien, wird deutlich, dass die Schwannomatose eine sehr seltene Erkrankung ist. Bisher sind weltweit kaum mehr als 50 Schwannomatosepatienten zuverlässig dokumentiert worden. Beispielhaft ist die Untersuchung an 14 Patienten, die den strengen Kriterien entsprachen, durch MacCollin et al. (1996). Keiner dieser Patienten litt an Meningeomen, die bei 50% der NF2-Patienten auftreten; keiner zeigte eine der okulären Anomalien, welche bei 80% der NF2-Patienten nachzuweisen sind. Ein weiterer Gegensatz zu NF2 ist das seltene Vorkommen familiärer Schwannomatose; nur 1 der 14 Patienten hatte einen betroffenen Verwandten I. Grads. Außerdem geht die familiäre Schwannomatose oft mit unvollständiger Penetranz und einem Grad von variabler Expressivität einher, wie er von NF2 nicht bekannt ist. Ein hoher Anteil der Schwannomatosepatienten zeigt segmentale Manifestation. Auch die weniger häufigen Tumorarten, die bei NF2 auftreten, wie Ependymome und Astrozytome sowie die periphere Neuropathie, sind bei Schwannomatose nicht anzutreffen (Jacoby et al. 1997).

Alle diese Beobachtungen bestätigen die Schwannomatose als eine von NF2 abgrenzbare Entität und werfen zugleich die Frage auf, in welchem genetischen Verhältnis die beiden Krankheitsbilder zueinander stehen. Handelt es sich um eine unvollständige Manifestationsform der NF2 oder ist die Schwannomatose eine andere genetische Entität? Molekularbiologische Untersuchungen zu dieser Problematik sind noch nicht in großem Umfang durchgeführt worden, lassen jedoch bereits erkennen, dass die pathogenetischen Mechanismen, die der Schwannomatose zugrunde liegen, heterogen sein könnten. Bisher liegen 3 Studi-

en vor, in denen Patienten und/oder ihre Schwannome auf NF2-Gen-Mutationen und die Tumoren auf LOH an Markern der NF2-Gen-Region untersucht wurden.

Honda et al. (1995) haben – sofern eine Mutation im NF2-Gen der Leukozyten eines sporadischen Schwannomatosepatienten und der homozygote Verlust eines Segments des NF2-Gens im Schwannom eines anderen Patienten dafür ausreichend erscheinen – bei 2 von 7 Patienten Keimbahnmutationen nachgewiesen. Ein Mosaikstatus kann jedoch aufgrund dieser Befunde nicht ausgeschlossen werden. Seppälä et al. (1998) fanden keine konstitutionelle Mutation des NF2-Gens bei 7 Schwannomatosepatienten, obwohl alle Exons erfasst wurden. Die Studie von Jacoby et al. (1997) umfasste 20 Schwannomatosepatienten, von denen einige durch segmentale Manifestation auffielen. Der Mosaikstatus für eine NF2-Gen-Mutation wurde von diesen Autoren bei einem Patienten nachgewiesen, dessen Tumorbefall dies nicht nahe legte.

Das Vorkommen der gleichen NF2-Gen-Mutation in 3 Schwannomen eines weiteren Patienten ließ auf dessen Mosaikstatus schließen. Somit gibt es also Schwannomatosepatienten mit konstitutioneller Mutation des NF2-Gens, wenn auch z.T. als Mosaik. Diese Subgruppe mit konstitutioneller NF2-Gen-Mutation scheint also von einer Variante der NF2 betroffen zu sein. Da die Anteile der jeweiligen Minorität (Wildtyp bzw. Mutante) an den der Analyse leicht zugänglichen Zellsorten (Lymphozyten, Fibroblasten) sehr gering sein können, ist der Mosaikstatus u. U. schwer nachzuweisen, sodass nicht auszuschließen ist, dass letztlich alle Schwannomatosepatienten Mosaik für NF2-Gen-Mutationen sind.

Diese Ergebnisse erscheinen jedoch in einem anderen Licht, wenn die an Schwannomen von Schwannomatosepatienten beobachteten Allelverluste (LOH) und Mutationen des NF2-Gens betrachtet werden. Von 44 Tumoren zeigten 28 LOH an intragenen und regionalen (Jacoby et al. 1997) bzw. nur regionalen (Honda et al. 1995) Markern; in 24 Tumoren wurden Mutationen nachgewiesen, welche zu verkürztem Merlin führen. Die 22 Tumoren mit LOH und einer inaktivierenden Mutation am verbliebenen Allel sowie 2 an beiden Allelen durch inaktivierende Mutationen betroffene Tumoren belegen, dass auch bei der Schwannomatose der biallelische Funktionsverlust des NF2-Gens zur Entstehung der Tumoren führt.

Von besonderem Interesse sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Analyse der seltenen

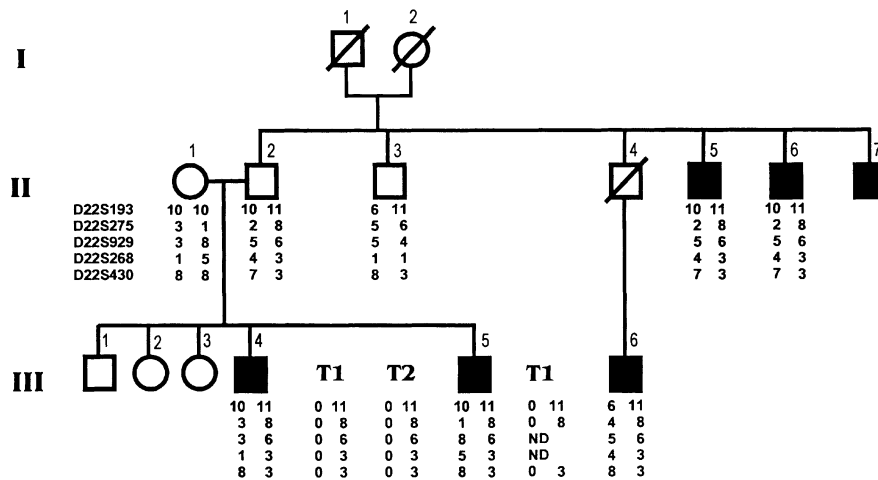


Abb. 5.13. Stammbaum einer Familie mit multipler Schwannomatose. Unter den Symbolen der Individuen sind die jeweiligen Haplotypen der Marker *D22S193* und *D22S275* (proximal zum *NF2*-Gen gelegen), des intragenen Markers (*D22S929*) und der beiden distalen Marker *D22S268* und *D22S430* wiedergegeben. Die betroffenen Mitglieder dieser Familie haben einen bestimmten Haplotyp gemeinsam (11, 8, 6, 6, 3), der aber nicht in allen Fällen mit der Krankheit

segregiert, da die Personen *II/2* und *III/4* diesen Haplotyp weitergeben, aber selbst erkrankt sind. In den Tumoren von Patient *III/4* und Patient *III/5* bleibt jeweils derselbe Haplotyp zurück, während das jeweilige andere Allel von LOH betroffen ist. Tumor 1 und 2 (*T1*; *T2*) des Patienten *III/4* haben unterschiedliche somatische Mutationen; *T1* Spleißmutation an Exon 5, *T2* Frameshift in Exon 8, nach Jacoby et al. (1997)

Schwannomatosefamilien und von mehreren Tumoren ein und desselben Patienten. Hierzu haben Jacoby et al. (1997) den entscheidenden Beitrag geleistet. Mit Hilfe von 2 proximalen, 1 intragenen und 2 distalen Mikrosatellitenmarkern überprüften die Autoren die Segregation der Haplotypen in der *NF2*-Gen-Region mit der Krankheit in 3 Familien. An dem in Abb. 5.13 dargestellten Beispiel ist erkennbar, dass die Schwannomatose in dieser Familie unregelmäßig mit einem bestimmten Haplotyp (11 8 6 3 3) segregiert, der auch bei den nicht betroffenen Vätern *II/2* und *II/4* von Patienten nachgewiesen bzw. vorauszusetzen ist. Das ist zugleich der Haplotyp, der in den hemizygoten Tumoren der Patienten *III/4* und *III/5* verbleibt; LOH erfolgt jeweils durch Verlust des anderen Haplotyps. Dies entspricht dem Tumorsuppressorparadigma. Wenn dieser Haplotyp jedoch ein bestimmtes Defektallel des *NF2*-Gens enthält, ist dessen unvollständige Penetranz schwer verständlich, da *NF2*-Gen-Mutationen erfahrungsgemäß mit vollständiger Penetranz einhergehen. Unerwarteterweise sind die Mutationen, welche in verschiedenen Schwannomen eines Schwannomatosepatienten gefunden werden, verschieden und ereignen sich auf dem Chromosom mit dem Haplotyp, der mit der Krankheit kosegregiert. Das steht im Widerspruch

zum Tumorsuppressionsparadigma, das ja das Verbleiben des konstitutionellen Defektallels des jeweiligen Patienten im Tumorgewebe fordert. Was also in diesen Familien zu segregieren scheint, ist somatische Mutabilität am *NF2*-Gen-Locus in Schwann-Zellen. Dieses unerwartete, von Jacoby et al. (1997) an multiplen Tumoren von 4 Schwannomatosepatienten beobachtete Verhalten ist nicht im klassischen Sinn zu deuten, wenn von Keimbahnmutationen am *NF2*-Gen-Locus bei den Patienten ausgegangen wird.

Jacoby et al. (1997) schlugen die Beteiligung eines 2., mit dem *NF2*-Gen eng gekoppelten Locus vor, dessen vermutlich rezessive Mutationen entweder das *NF2*-Gen im Sinn einer erhöhten Mutabilität destabilisieren oder selbst eine erhöhte Proliferation von Schwann-Zellen verursachen, in deren Verlauf es zu tumorigenen *NF2*-Gen-Mutationen kommt. Wir möchten die erste Möglichkeit dahingehend präzisieren, dass es sich um einen postzygotischen, also somatischen, locuspezifischen und nur in *cis* wirksamen Mutator handeln könnte, dessen Wirksamkeit interindividuell in weiten Grenzen variiert. Dieses Modell wäre mit einem Mosaikstatus aller Schwannomatosepatienten vereinbar. An einem Ende der Variabilität stünden nichtmanifestierende Überträger. Zelltypspezifität

und/oder Zeitpunkt der somatischen Wirksamkeit des Mutators bedingen die Begrenzung der Symptomatik auf subkutane, spinale und/oder paraspinale Schwannome. Es ist zu erwarten, dass weitere, möglichst vollständige Erhebungen der Haplotypensegregation und der Mutationsereignisse am NF2-Locus bei Schwannomatose einen neuen Mechanismus der Krankheitsentstehung zu Tage fördern werden. Eine weitere mögliche Ursache könnte die Existenz eines 2. Tumorsuppressorgens auf Chromosom 22 sein, dessen Inaktivierung ursächlich an der Entstehung von Schwannomen beteiligt ist. Hierfür sprechen Befunde von Bruder et al. (1999), die bei einem Anteil der Schwannome sporadischer Patienten (ohne NF2 oder Schwannomatose) interstitielle Deletionen auf 22q identifizierten, welche die NF2-Gen-Region nicht betrafen. Somatische Mutationen des NF2-Gens waren in diesen Tumoren nicht nachzuweisen. Die Identifizierung der kleinsten Überlappungsregion (SRO: smallest region of overlap) solcher Deletionen könnte auf die Spur eines Kandidatengens für Schwannomatose führen.

## 5.5 Resümee

Unter der Bezeichnung Neurofibromatose wird eine Gruppe hereditärer neurokutaner Tumorprädispositionskrankheiten zusammengefasst, die autosomal-dominant mit hoher Penetranz erblich sind und unterschiedliche Grade variabler Expressivität zeigen. Ein hoher Anteil der sporadischen Erkrankungen an Neurofibromatosen (30–50%) beruht auf Neumutationen in der Keimbahn eines Elternteils oder auf postzygotischen Mutationen, die sich während der Ontogenese ereignen. In diesem Fall entsteht der genetische Mosaikstatus, der sich als vergleichsweise leichte, generalisierte oder als segmentale (regionale) NF manifestieren kann. Auf Mutationen des NF1-Gens beruhen neben der NF1 das Watson-Syndrom, eine Form der familiären spinalen NF, eine Form der Kombination von NF1 und Noonan-Syndrom und eine auf multiple CALF beschränkte Form. Von manchen dieser Varianten existieren nichtallelische Formen, deren genetische Ursachen nicht bekannt sind. Mutationen des NF2-Gens liegen neben der NF2 auch einer Form der familiären spinalen Schwannomatose zugrunde. Die genetische Ursache der seltenen generalisierten Schwannomatose, die hauptsächlich sporadisch auftritt und in den wenigen beobachteten fa-

miliären Fällen mit unvollständiger Penetranz vererbt wird, ist noch nicht bekannt. Die wichtigsten Eigenschaften der beiden Hauptformen der NF, NF1 und NF2, sind in Form einer Gegenüberstellung in Tabelle 5.29 zusammengefasst.

Neurofibromin erfüllt die Kriterien eines Tumorsuppressors. Die überwiegende Mehrzahl der Mutationen des NF1-Gens verursacht eine Reduktion der Neurofibrominmenge um 50%. Der vollständige Verlust des Neurofibromins aufgrund von Mutationen des Wildtypallels des NF1-Gens ist, entsprechend dem Tumorsuppressormodell, ein entscheidender Schritt bei der Entstehung der Progenitorzellen der meisten mit NF1 assoziierten Neoplasien. Dies gilt für einen Teil der MPNST, für einen großen Teil der mit NF1 assoziierten juvenilen myelomonozytischen Leukämien und mit großer Wahrscheinlichkeit auch für alle Arten von Neurofibromen. Bei letzteren sind SZ als die betroffenen Zellen identifiziert worden, es ist aber nicht ausgeschlossen, dass auch andere Zellarten des PNS (evtl. auch Perineuralzellen) als Ursprungszellen von Neurofibromen fungieren können. Auto- und parakrine Mechanismen sind wahrscheinlich am Wachstum der Neurofibrome maßgeblich beteiligt. Kulturen von Melanozyten aus CALF zeigen keinen Verlust des Wildtypallels des NF1-Gens.

Heterozygote NF1-Knockout-Mäuse exprimieren *nicht* die Kardinalsymptome der NF1: Neurofibrome und Pigmentierungsanomalien. Zusätzlich zum Tumorspektrum von Wildtypmäusen des gleichen Stamms entwickeln Nf1(+/-)-Mäuse vorrangig Phäochromozytome und myeloide Leukämien. Nf1(-/-)-Mäuse sterben in utero zwischen Tag E12,5 und E14 an multiplen Anomalien des kardiovaskulären Systems. Chimären, die aus Nf1(+/+) oder Nf1(+/-)-Blastozysten nach Inokulation mit embryonalen Nf1(-/-)-Stammzellen entstehen, entwickeln multiple Neurofibrome. NF1-Knockout-Mäuse ermöglichten es, den Einfluss des NF1-Genotyps auf die Eigenschaften von SZ und anderen reinen Zellpopulationen zu untersuchen. Nf1(+/-)-SZ der Maus sind invasiv, angiogen, morphologisch verändert und zeigen einen erhöhten Ras-GTP-Anteil. Bei Nf1(-/-)-SZ sind diese Veränderungen stärker ausgeprägt. Nur die Nf1(-/-)-SZ vermögen in Kultur transformierte Foci zu bilden. Bestimmte Neuronenpopulationen aus Nf1(-/-)-Embryonen der Maus überleben und/oder proliferieren in Abwesenheit von Neurotrophen. Nf1(+/-)-Mäuse haben Schwierigkeiten beim Erlernen bestimmter Raumorientierungsaufgaben.



Tabelle 5.29. Gegenüberstellung der wichtigsten Charakteristika von NF1 und NF2

Parameter	NF1	NF2
Prävalenz	1:2500–1:4500	1:40 000
Vererbungsmodus	Autosomal-dominant	Autosomal-dominant
Penetranz	Fast vollständig	Fast vollständig
Lebenserwartung	Durchschnittlich um 8–10 Jahre verringert	Durchschnittlich 36 Jahre
Neurofibrome	Multipel	Vereinzelt
Schwannome	Vereinzelt	Multipel
Meningeome	Selten	Multipel
Ependymome	Selten	Häufig
Optikusgliom	Häufig	– <sup>a</sup>
Maligne Entartung	2–4%	Sehr selten
CALF	Multipel	Häufig, aber in geringer Anzahl
Freckling	Axillar, inguinal sehr häufig	–
Irishamartome (LN)	Sehr häufig	Sehr selten
Skelettanomalien	Häufig	–
Minderwuchs	Häufig	–
Lernschwierigkeiten	Häufig	–
Verhaltensanomalien	Häufig	–
Gen		
Lokalisation	17q11.2	22q12.2
Größe [kb]	335	110
Zahl der Exons	60	17
Transkriptionsrichtung	17cen→17qter	22cen→22qter
mRNA	12 100 Nt	7 kb, 4,4 kb, 2,6 kb
Ubiquitär exprimierte Spleißisoformen	2(±Exon 23a)	2(±Exon 16)
Protein	Neurofibromin	Schwannomin/Merlin
Aminosäuren	2818/2839	595/590
Funktion	GAP für H-, K-, N-, R-Ras und TC21	Beteiligt an der Interaktion zwischen submembranärem Zytoskelett und Plasmamembran
Funktionelle Domäne	366 As GRD (1172–1538)	Verschiedene Sequenzmotive für intra- und intermolekulare Interaktionen
Homologien	GRD mit denen anderer Ras-GAP; GRD-flankierend mit Scir <sup>a</sup> -1 und ira <sup>-2</sup>	Mit Ezrin, Radixin und Moesin (ERM-Proteine); mit anderen Proteinen der 4.1-Familie
Mutationen	ca. 90% trunkierend; Gleichverteilung; keine ausgeprägten Hot spots	ca. 90% trunkierend; Gleichverteilung über Exons 1–15, Exon 9 ausgespart
Genotyp-Phänotyp-Korrelation	Nicht nachweisbar; Ausnahme: Höhere Wahrscheinlichkeit schwerer Manifestation bei großen Deletionen des ganzen Gens und flankierender Bereiche	Deutliche Tendenz leichter Manifestation bei Missense-Mutationen

<sup>a</sup> Meningeome des N. opticus treten bei NF2 auf.

Die Frage, ob alle neoplastischen Veränderungen bei NF1 auf der infolge Neurofibrominmangels erhöhten Ras-Aktivierung beruhen, ist noch nicht entschieden. Es gibt Hinweise darauf, dass Neurofibromin auch auf andere Weise als durch Aktivierung der Ras-GTPase wachstumssupprimierende Wirkungen ausüben kann.

Bei den wichtigsten nichtneoplastischen Symptomen der NF1,

- Pigmentierungsanomalien,
- Skelettanomalien,
- NF1-Vaskulopathie und
- Lern- und Verhaltensstörungen,

ist es möglich, Hypothesen über die Beteiligung verstärkter Ras-vermittelter Signaltransduktionswege am Zustandekommen dieser Symptome zu entwickeln. Hierzu liegen aber erst sehr wenige experimentelle Daten vor.

Die Kardinalsymptome der NF2 sind:

- bilaterale Vestibularisschwannome,
  - multiple intrakranielle Meningeome,
  - Ependymome und
  - multiple spinale Schwannome.
- Hautmanifestationen sind
- Schwannome,

- gelegentlich Neurofibrome und,
- in geringerem Umfang als bei NF1, CALF (meist <6).

Die oft früh manifestierende Augensymptomatik umfasst:

- posteriore subkapsuläre,
- kapsuläre und
- kortikale Katarakt und
- Retinahamartome.

Das Proteinprodukt des NF2-Gens, Merlin oder Schwannomin, gehört zur Gruppe der Bande-4.1-Proteine, welche an der Interaktion zwischen der Plasmamembran und dem submembranären Zytoskelett (F-Aktin und Spektrin) beteiligt sind. Die nächsten Verwandten des Merlins sind die Proteine Ezrin, Radixin und Moesin (ERM-Proteine). Mit ihnen hat Merlin u. a. die Domänenstruktur gemeinsam, mit

- einer globulären N-terminalen,
- einer  $\alpha$ -helikalen, zentralen und
- einer polaren C-terminalen Domäne.

Wie die ERM-Proteine, übt auch Merlin eine wichtige Funktion bei der Regulation und Organisation der Zellbeweglichkeit und der Substratadhäsion aus. Zu den gemeinsamen Interaktionspartnern der ERM-Proteine zählt auch der RhoGDP-RhoGDI-Komplex. Diese Interaktion legt nahe, dass nicht nur die ERM-Proteine, sondern auch Merlin zur Aktivierung von RhoA beiträgt und in RhoA-vermittelte Signaltransduktionswege involviert ist. Im Gegensatz zu den ERM-Proteinen weist Merlin wachstumssupprimierende Eigenschaften auf. Die homozygote Merlindefizienz in Schwannomen, Meningeomen und Ependyomen belegt, dass Merlin in Schwann-Zellen, meningealen und ependymalen Zellen als Tumorsuppressor fungiert. Die Fähigkeit des Merlins, als negativer Wachstumsregulator zu wirken, wird entscheidend von seiner Stabilität, der Bildung intramolekularer Komplexe und von der Interaktion mit spezifischen Effektoren beeinflusst.

Während moesindefiziente Knockout-Mäuse keinen pathologischen Phänotyp zeigen, sind homozygot defiziente NF2-Knockout-Mäuse nicht lebensfähig; die  $Nf2(-/-)$ -Embryonen sterben spätestens am Tag E7 an schweren Fehlbildungen der extraembryonalen Gewebe, fehlender Mesoderminduktion und ausbleibender Gastrulation. Die heterozygoten,  $Nf2(+/-)$ -Mäuse entwickeln weder hinsichtlich ihres Tumorspektrums noch in Bezug auf die Augensymptomatik einen der NF2 analogen Phänotyp. Vielmehr bilden sie mit signifikant erhöhter Häufigkeit Osteosarkome, Fibrosarkome

und hepatozelluläre Karzinome aus. In den Osteosarkomen und Fibrosarkomen der  $Nf2(+/-)$ -Mäuse ist der Verlust des NF2-Wildtypallels nachgewiesen worden, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass zusätzliche genetische Ereignisse, wie der Verlust eines Allels des p53-Gens, zur Bildung dieser malignen Tumoren beitragen.

Das Spektrum somatischer und konstitutioneller Mutationen des NF2-Gens zeigt keine ausgeprägten Vorzugsstellen, aber rekurrente C:T-Transitionen an 6 CGA-Kodons weisen diese Stellen als so genannte Warm spots aus. Hinsichtlich der Lage der Mutationen gibt es keine bevorzugten Areale; es fällt jedoch auf, dass Exon 9 und die C-terminalen Exons 16 und 17 von Mutationen ausgespart sind. Protein trunkierende Mutationen sind statistisch signifikant häufiger bei NF2-Patienten mit frühem Erkrankungsalter und schwerer Verlaufsform beobachtet worden. Patienten mit milder Manifestation der NF2 haben oft Missense-Mutationen oder andere Mutationen, die kein vorzeitiges Stoppkodon einführen. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation dieser Art ist jedoch auf individueller Ebene nicht immer gültig, denn es wurden schwer und leicht betroffene NF2-Patienten mit ein und derselben Mutation beobachtet. Unter Umständen spielen hierbei auch die variablen Folgen der Mutationen auf das Spleißen eine Rolle. Diese Beobachtungen weisen aber auch auf die Bedeutung des genetischen Hintergrunds, epigenetischer Faktoren und stochastischer Ereignisse auf die Manifestation der NF2 hin. Im Gegensatz zur NF1 ist die intrafamiliäre Variabilität bei NF2 jedoch wesentlich weniger ausgeprägt.

## 5.6 Literatur

### 5.6.1 Monografien

- Cooper DN, Krawczak M (1994) Human gene mutation. BIOS Scientific Publ, Oxford
- Crowe FW, Schull WJ, Neel JV (1956) A clinical, pathological, and genetic study of multiple neurofibromatosis. Thomas, Springfield
- Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM (1999) Neurofibromatosis, 3rd edn. The John Hopkins University Press, Baltimore
- Huson SM, Hughes RAC (1994) The neurofibromatoses. Chapman & Hall Medical, London
- Köhler B (1990) Neurofibromatose im Kindesalter. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Riccardi VM (1992) Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis, 2nd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore

- Riccardi VM, Eichner JE (1986) Neurofibromatosis, 1st edn. John Hopkins University Press, Baltimore
- Riccardi VM, Mulvihill JJ, Wade WM (eds) (1981) Neurofibromatosis (Von Recklinghausen disease). *Adv Neurol* 29:1-282
- Rubenstein AE, Korf BR (1990) Neurofibromatosis, a handbook for patients, families, and health-care professionals. Thieme, Stuttgart New York
- Rubenstein AE, Bunge RP, Housman DE (eds) (1986) Neurofibromatosis. *Ann N Y Acad Sci* 486:1-414
- Upadhyaya M, Cooper DN (1998) Neurofibromatosis type 1; from genotype to phenotype. Bios Scientific Publ, Oxford, Washington DC
- ### 5.6.2 Zitierte Literatur
- Abeliovich D, Gelman-Kohan Z, Silverstein S et al. (1995) Familial café-au-lait spots: a variant of neurofibromatosis type 1. *J Med Genet* 32:985-986
- Ahlgren-Beckendorf JA, Maggio WW, Chen F, Kent TA (1993) Neurofibromatosis 1 mRNA expression in blood vessels. *Biochem Biophys Res Commun* 197:1019-1024
- Ahmadian MR, Wiesmüller L, Lautwein A, Bischoff FR, Wittinghofer A (1996) Structural differences in the minimal catalytic domains of the GTPase-activating proteins p120GAP and neurofibromin. *J Biol Chem* 271:16.409-16.415
- Ahmadian MR, Stege P, Scheffzek K, Wittinghofer A (1997) Confirmation of the arginine finger hypothesis for the GAP stimulated GTP hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol* 4:686-689
- Ahn MS, Jackler RK, Lustig LR (1996) The early history of the neurofibromatoses. Evolution of the concept of neurofibromatosis type 2. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122:1240-1249
- Ainsworth PJ, Chakraborty PK, Weksberg R (1997) Example of somatic mosaicism in a series of de novo neurofibromatosis type 1 cases due to a maternally derived deletion. *Hum Mutat* 9:452-457
- Akagi K, Kurahashi H, Arita N et al. (1995) Deletion mapping of the long arm of chromosome 22 in human meningiomas. *Int J Cancer* 60:178-182
- Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O et al. (1996) Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 122:1723-1736
- Allanson JE, Upadhyaya M, Watson GH et al. (1991) Watson syndrome: is it a subtype of type 1 neurofibromatosis? *J Med Genet* 28:752-756
- Andersen LB, Fountain JW, Gutmann DH et al. (1993a) Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines. *Nat Genet* 3:118-121
- Andersen LB, Ballester R, Marchuk DA et al. (1993b) A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase activating protein activity. *Mol Cell Biol* 13:487-495
- Andrews JD, Mancini DN, Singh SM, Rodenhiser DI (1996) Site and sequence specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) gene includes C5839T: the site of the recurrent substitution mutation in exon 31. *Hum Mol Genet* 5:503-507
- Antinheimo J, Sankila R, Carpen O, Pukkala E, Sainio M, Jaaskelainen J (2000) Population-based analysis of sporadic and type 2 neurofibromatosis-associated meningiomas and schwannomas. *Neurology* 54:71-76
- Arai E, Ikeuchi T, Nakamura Y (1994) Characterization of the translocation breakpoint on chromosome 22q12.2 in a patient with neurofibromatosis type 2 (NF2). *Hum Mol Genet* 3:937-939
- Arakawa H, Hayashi N, Nagase H, Ogawa M, Nakamura Y (1994) Alternative splicing of the NF2 gene and its mutation analysis of breast and colorectal cancers. *Hum Mol Genet* 3:565-568
- Arinami T, Kondo I, Hamaguchi H, Nakajima S (1986) Multifocal meningiomas in a patient with a constitutional ring chromosome 22. *J Med Genet* 23:178-180
- Armstrong JF, Kaufman MH, Harrison DJ, Clarke AR (1995) High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol* 5:931-936
- Ars E, Kruyer H, Gaona A et al. (1998) A clinical variant of neurofibromatosis type 1: familial spinal neurofibromatosis with a frameshift mutation in the NF1 gene. *Am J Hum Genet* 62:834-841
- Ars E, Serra E, Garcia J et al. (2000) Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 9:237-247
- Atit RP, Crowe MJ, Greenhalgh DG, Wenstrup RJ, Ratner N (1999) The NF1 tumor suppressor regulates mouse skin wound healing, fibroblast proliferation, and collagen deposited by fibroblasts. *J Invest Dermatol* 112:835-842
- Bahuau M, Houdayer C, Assouline B et al. (1998) Novel recurrent nonsense mutation causing neurofibromatosis type 1 (NF1) in a family segregating both NF1 and Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 75:265-272
- Ballester RM, Marchuk D, Boguski M et al. (1990) The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 63:851-859
- Barber CK, Cross IE, Douglas F, Nicholson JC, Moore KJ, Browne CE (1998) Neurofibromatosis pseudogene amplification underlies euchromatic cytogenetic duplications and triplications of proximal 15q. *Hum Genet* 103:600-607
- Barker D, Wright E, Nguyen K et al. (1987a) A genomic search for linkage of neurofibromatosis to RFLPs. *J Med Genet* 24:536-538
- Barker D, Wright E, Nguyen K et al. (1987b) Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. *Science* 236:1100-1102
- Barlett Bunge M, Wood PM, Tynan LB, Bates ML, Sanes JR (1989) Perineurium originates from fibroblasts: demonstration in vitro with a retroviral marker. *Science* 243:229-231
- Baser ME, Ragge NK, Riccardi VM, Janus T, Gantz B, Pulst SM (1996) Phenotypic variability in monozygotic twins with neurofibromatosis 2. *Am J Med Genet* 64:563-567
- Baser ME, Kluwe L, Mautner VF (1999) Germ-line NF2 mutations and disease severity in neurofibromatosis type 2 patients with retinal abnormalities. *Am J Hum Genet* 64:1230-1233
- Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J (1992) Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature* 356:713-715
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertina PM, Issa JP (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72:141-196

- Bello MJ, Campos JM de, Kusak ME et al. (1994) Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 9:296–298
- Bernards A (1998) Evolutionary comparisons. In: Upadhyaya M, Cooper DN (eds) *Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype*. BIOS Scientific Publ, Oxford, pp 175–186
- Bernards A, Snijders AJ, Hannigan GE, Murthy AE, Gusella JF (1993) Mouse neurofibromatosis type 1 cDNA sequence reveals high degree of conservation of both coding and non-coding mRNA segments. *Hum Mol Genet* 2:645–650
- Berner JM, Sorlie T, Mertens F et al. (1999) Chromosome band 9p21 is frequently altered in malignant peripheral nerve sheath tumors: studies of CDKN2A and other genes of the pRB pathway. *Genes Chromosomes Cancer* 26:151–160
- Bianchi AB, Hara T, Ramesh V et al. (1994) Mutations in transcript isoforms of the neurofibromatosis 2 gene in multiple human tumour types. *Nat Genet* 6:185–192
- Bianchi AB, Mitsunaga S-I, Cheng JQ et al. (1995) High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10.854–10.858
- Bijlsma EK, Wallace AJ, Evans DG (1997) Misleading linkage results in an NF2 presymptomatic test owing to mosaicism. *J Med Genet* 34:934–936
- Birch BD, Johnson JP, Parsa A et al. (1996) Frequent type 2 neurofibromatosis gene transcript mutations in sporadic intramedullary spinal cord ependymomas. *Neurosurgery* 39:135–140
- Boeddrich A, Griesser J, Horn D, Kaufmann D, Krone W, Nürnberg P (1995) Reduced neurofibromin content but normal GAP activity in a patient with neurofibromatosis type 1 caused by a five base pair duplication in exon 12b of the NF1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 214:895–904
- Boeddrich A, Robinson PN, Schülke M, Buske A, Tinschert S, Nürnberg P (1997) New evidence for a mutation hotspot in exon 37 of the NF1 gene. *Hum Mutat* 9:374–377
- Bollag G, McCormick F (1991) Differential regulation of ras-GAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature* 351:576–579
- Bollag G, McCormick F, Clark R (1993) Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *EMBO J* 12:1923–1927
- Bollag G, Clapp DW, Shih S et al. (1996) Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nat Genet* 12:144–148
- Borasio GD, John J, Wittinghofer A, Barde YA, Sendtner M, Heumann R (1989) Ras p21 protein promotes survival and fiber outgrowth of cultured embryonic neurons. *Neuron* 2:1087–96
- Borovich B, Doron Y, Braun J et al. (1988) The incidence of multiple meningiomas – do solitary meningiomas exist? *Acta Neurochir (Wien)* 90:15–22
- Bos JL (1988) The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res* 195:255–271
- Bottema CDK, Ketterling RP, Ii S, Yoon H-S, Philips JA, Sommer SS (1991) Missense mutations and evolutionary conservation of amino acids: evidence that many of the amino acids in factor IX function as „spacer elements“. *Am J Hum Genet* 49:820–838
- Bourn D, Carter SA, Mason S, Gareth D, Evans R, Strachan T (1994) Germline mutations in the neurofibromatosis type 2 tumour suppressor gene. *Hum Mol Genet* 3:813–816
- Bourne HR (1997) The arginine finger strikes again. *Nature* 389:673–674
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349:117–127
- Boveri Th (1914) *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Fischer, Jena
- Boyer MJ, Gutmann DH, Collins FS, Bar-Sagi, D (1994) Crosslinking of the surface immunoglobulin receptor in B lymphocytes induces a redistribution of neurofibromin but not p120-GAP. *Oncogene* 9:349–357
- Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS et al. (1994) Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev* 8:1019–1029
- Bretscher A, Reczek D, Berryman M (1997) Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J Cell Sci* 110:3011–3018
- Brockes JP, Breakefield XO, Martuza RL (1986) Glial growth factor-like activity in Schwann cell tumors. *Ann Neurol* 220:317–322
- Bruder CE, Ichimura K, Blennow E et al. (1999) Severe phenotype of neurofibromatosis type 2 in a patient with a 7.4-MB constitutional deletion on chromosome 22: possible localization of a neurofibromatosis type 2 modifier gene? *Genes Chromosomes Cancer* 25:184–190
- Brunner HG, Hulsebos T, Steijlen PM, Kinderen DG der, Steen AVD (1993) Exclusion of the neurofibromatosis locus in a family with inherited café-au-lait spots. *Am J Med Genet* 46:472–474
- Buchberg AM, Cleveland LS, Jenkins NA, Copeland NG (1990a) Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway. *Nature* 347:291–294
- Buchberg AM, Bedigian HG, Jenkins NA, Copeland NF (1990b) Evi-2, a common integration site involved in murine myeloid leukemogenesis. *Mol Cell Biol* 10:4658–4666
- Burke TW, Kadonaga JT (1996) Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev* 110:711–724
- Cameron EE, Baylin SB, Herman JG (1999) p15<sup>INK4B</sup> CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood* 94:2445–2451
- Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17:1395–1413
- Cappione AJ, French BL, Skuse GR (1997) A potential role for NF1 mRNA editing in the pathogenesis of NF1 tumors. *Am J Hum Genet* 60:305–312
- Carey JC (1998) Neurofibromatosis-Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 75:263–264
- Carey JC, Viskochil DH (1999) Neurofibromatosis type 1: a model condition or the study of the molecular basis of variable expressivity in human disorders. *Am J Med Genet* 89:7–13
- Carlson KM, Bruder C, Nordenskjöld M, Dumanski JP (1997) 1p and 3p deletions in meningiomas without de-

- teable aberrations of chromosome 22 identified by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 20:419-424
- Casalone R, Granata P, Simi P et al. (1987) Recessive cancer genes in meningiomas? An analysis of 31 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 27:145-59
- Castresana JS, Gomez L, Gamallo C et al. (1995) The status of the NF1 GRD mutation and p53 expression in neuroblastoma. *Int J Oncol* 7:755-757
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA et al. (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305:779-784
- Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM et al. (1990a) Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EV12 and mapping of other transcripts. *Genomics* 7:555-65
- Cawthon RM, Weiss R, Xu G, Viskochil D et al. (1990b) A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 62:193-201
- Cawthon RM, Andersen LB, Buchberg AM et al. (1991) cDNA sequence and genomic structure of EV12B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene. *Genomics* 9:446-460
- Charrow J, Listerick R, Ward K (1993) Autosomal dominant multiple café-au-lait spots and neurofibromatosis. *Am J Med Genet* 45:606-608
- Chiba-Falek O, Kerem E, Shoshani T et al. (1998) The molecular basis of disease variability among cystic fibrosis patients carrying the 3849+10 kb C→T mutation. *Genomics* 53:276-2283
- Christian JL, Nakayama T (1999) Can't get no SMA disfac-tion: smad proteins as positive and negative regulators of TGF- $\beta$  family signals. *Bioessays* 21:382-390
- Cichowski K, Shih TS, Schmitt E et al. (1999) Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science* 286:2172-2176
- Clark MB, Zeheb R, White TK, Bunge RP (1991) Schwann cell plasminogen activator is regulated by neurons. *Glia* 4:514-528
- Clark SJ, Harrison J, Molloy PL (1997) Sp1 binding is inhibited by <sup>m</sup>Cp<sup>m</sup>CpG methylation. *Gene* 195:65-71
- Claudio JO, Marineau C, Rouleau GA (1994) The mouse homologue of the neurofibromatosis type 2 gene is highly conserved. *Hum Mol Genet* 3:185-190
- Claudio JO, Lutchman M, Rouleau GA (1995) Widespread but cell type specific expression of the mouse neurofibromatosis type 2 gene. *Neuroreport* 6:1942-1946
- Collins FS, Ponder BAJ, Seizinger BR, Epstein DJ (1989) The von Recklinghausen neurofibromatosis region on chromosome 17 - genetic and physical maps come into focus. *Am J Hum Genet* 44:1-5
- Colman SD, Williams CA, Wallace MR (1995) Benign neuro-fibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show so-matic deletions of the NF1 gene. *Nat Genet* 11:90-92
- Colman SD, Rasmussen SA, Ho VT, Abernathy CR, Wallace MR (1996) Somatic mosaicism in a patient with neurofi-bromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 58:484-490
- Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C (1994) Mice lacking vimentin develop and re-produce without an obvious phenotype. *Cell* 79:679-694
- Cook SJ, McCormick F (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262:1069-1072
- Corvera S, Czech MP (1998) Direct targets of phosphoinosi-tide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends Cell Biol* 8:442-446
- Crowe FW, Schull WJ (1953) Diagnostic importance of the cafe au lait spot in neurofibromatosis. *Arch Intern Med* 91:758-766
- Cummings LM, Trent JM, Marchuk DA (1996) Identification and mapping of type 1 neurofibromatosis (NF1) homolo-gous loci. *Cytogenet Cell Genet* 73:334-340
- Danglot G, Regnier V, Fauvet D et al. (1995) Neurofibroma-tosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene. *Hum Mol Genet* 4:915-920
- Darby JK, Feder J, Selby M et al. (1985) A discordant sibship analysis between  $\beta$ -NGF and neurofibromatosis. *Am J Hum Genet* 37:52-59
- Däschner K, Assum G, Eisenbarth E et al. (1997) Clonal ori-gin of tumor cells in a plexiform neurofibroma with LOH in NF1 intron 38 and in dermal neurofibromas without LOH of the NF1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 234:346-350
- Daston MM, Ratner N (1992) Neurofibromin, a predomi-nantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expressed during development. *Dev Dyn* 195:216-226
- Daston MM, Scrable H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N (1992) The protein product of the neurofi-bromatosis type 1 gene is expressed at highest abun-dance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron* 8:415-428
- Decker HJ, Cannizzaro LA, Mendez MJ et al. (1990) Chro-mosomes 17 and 22 involved in marker formation in neurofibrosarcoma in von Recklinghausen disease. A cy-togenetic and in situ hybridization study. *Hum Genet* 85:337-342
- DeClue JE, Cohen BD, Lowy DR (1991) Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9914-9918
- DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA et al. (1992) Abnor-mal regulation of mammalian p21ras contributes to ma-lignant tumor growth in von Recklinghausen (type1) neurofibromatosis. *Cell* 69:265-273
- DeClue JE, Heffelfinger S, Benvenuto G et al. (2000) Epider-mal growth factor receptor expression in neurofibromato-sis type 1-related tumors and NF1 animal models. *J Clin Invest* 105:1233-1241
- Deguen B, Merel P, Goutebroze L et al. (1998) Impaired in-teraction of naturally occurring mutant NF2 protein with actin-based cytoskeleton and membrane. *Hum Mol Genet* 7:217-226
- Den Bakker MA, Riegman PHJ, Hekman RACP et al. (1995a) The product of the NF2 tumour suppressor gene localizes near the plasma membrane and is highly ex-pressed in muscle cells. *Oncogene* 10:757-763
- Den Bakker MA, Tascilar M, Riegman PH et al. (1995b) Neurofibromatosis type 2 protein co-localizes with ele-ments of the cytoskeleton. *Am J Pathol* 147:1339-1349
- De Vitis LR, Tedde A, Vitelli F et al. (1996a) Screening for mutations in the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet* 97:632-637
- De Vitis LR, Tedde A, Vitelli F et al. (1996b) Analysis of the neurofibromatosis type 2 gene in different human tumors of neuroectodermal origin. *Hum Genet* 97:638-641

- Dhanasekaran N, Tsim S-T, Dermott JM, Onesime D (1998) Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene* 17:1383-1394
- DiPaolo DP, Zimmermann RA, Rorke LB, Zackai EH, Bilaniuk LT, Yachnis AT (1995) Neurofibromatosis type 1: pathologic substrate of high-signal-intensity foci in the brain. *Radiology* 195:721-724
- Doi Y, Itoh M, Yonemura S et al. (1999) Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *J Biol Chem* 274:2315-2321
- Dorschner MO, Sybert VP, Weaver M, Pletcher BA, Stephens K (2000) NF1 microdeletion breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences. *Hum Mol Genet* 9:35-46
- Dumanski JP, Carlom E, Collins VP, Nordenskjold M (1987) Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9275-9279
- Duve S, Rakoski J (1994) Cutaneous melanoma in a patient with neurofibromatosis: a case report and review of the literature. *Br J Dermatol* 131:290-294
- Easton DF, Ponder MA, Huson SM, Ponder BAJ (1993) An analysis of variation in expression of neurofibromatosis type 1: evidence for modifying genes. *Am J Hum Genet* 53:305-313
- Ebert C, Haken M von, Meyer-Puttitz B et al. (1999) Molecular genetic analysis of ependymal tumors. NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas. *Am J Pathol* 155:627-632
- Eisenbarth I, Assum G, Kaufmann D, Krone W (1997) Evidence for the presence of the second allele of the neurofibromatosis type 1 gene in melanocytes derived from café au lait macules of NF1 patients. *Biochem Biophys Res Commun* 237:138-141
- Eisenbarth I, Beyer K, Krone W, Assum G (2000a) Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 66:393-401
- Eisenbarth I, Vogel G, Krone W, Vogel W, Assum G (2000b) An isochore transition in the NF1 gene coincides with a switch in the extent of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 67:873-880
- Eldridge R, Denckla MB, Bien E et al. (1989) Neurofibromatosis type 1 (Recklinghausen's disease). Neurologic and cognitive assessment with sibling controls. *Am J Dis Child* 143:833-837
- Evans DG, Huson SM, Donnai D et al. (1992a) A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness, and confirmation of maternal transmission effect on severity. *J Med Genet* 29:841-846
- Evans DG, Huson SM, Donnai D et al. (1992b) A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *QJM* 84:603-618
- Evans DG, Ramsden R, Huson SM, Harris R, Lye R, King TT (1993) Type 2 neurofibromatosis: the need for supra-regional care? *J Laryngol Otol* 107:401-406
- Evans DG, Blair V, Strachan T, Lye RH, Ramsden RT (1995) Variation of expression of the gene for type 2 neurofibromatosis: absence of a gender effect on vestibular schwannomas, but confirmation of a preponderance of meningiomas in females. *J Laryngol Otol* 109:830-835
- Evans DG, Trueman L, Wallace A, Collins S, Strachan T (1998a) Genotype/phenotype correlations in type 2 neurofibromatosis (NF2): evidence for more severe disease associated with truncating mutations. *J Med Genet* 35:450-455
- Evans DG, Wallace AJ, Wu CL, Ramsden RT, Strachan T (1998b) Somatic mosaicism: a common cause of classic disease in tumor-prone syndromes? Lessons from type 2 neurofibromatosis. *Am J Hum Genet* 63:727-736
- Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C et al. (2000) Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum Genet* 66:790-818
- Fairbank (1994) Orthopaedic manifestation in neurofibromatosis. In: Huson SM, Hughes RAC (eds) *The neurofibromatoses: a pathogenetic and clinical overview*. Chapman Drosophila homologues of the human neurofibromatosis 2 and yeast CDC42 genes using a simple and efficient reverse-genetic method. *Genetics* 146:245-252
- Feigenbaum L, Fujita K, Collins FS, Jay G (1996) Repression of the NF1 gene by tax may explain the development of neurofibromas in human T-lymphotropic virus type 1 transgenic mice. *J Virol* 70:3280-3285
- Feldmann P, Eicher EN, Leever SH, Hafen E, Hughes DA (1999) Control of growth and differentiation by *Drosophila* RasGAP, a homolog of p120 Ras-GTPase-activation protein. *Mol Cell Biol* 19:1928-1937
- Feldkamp MM, Lau N, Proviav JP, Gutmann DH, Guha A (1996) Acute presentation of a neurogenic sarcoma in a patient with neurofibromatosis type 1: a pathological and molecular explanation. *J Neurosurg* 84:867-873
- Ferner RE (1994a) Medical complications of neurofibromatosis 1. In: Huson SM, Hughes RAC (eds) *The neurofibromatoses: a pathogenetic and clinical overview*. Chapman & Hall, London New York, pp 316-330
- Ferner RE (1994b) Intellect in neurofibromatosis 1. In: Huson SM, Hughes RAC (eds) *The neurofibromatoses: a pathogenetic and clinical overview*. Chapman & Hall, London New York, pp 233-252
- Ferner RE, Hughes RA, Weinman J (1996) Intellectual impairment in neurofibromatosis 1. *J Neurol Sci* 138:125-133
- Fialkow PJ, Sagebiel RW, Gartler SM, Rimoin DL (1971) Multiple cell origin of hereditary neurofibromas. *N Engl J Med* 284:298-300
- Fleischmajer R, Timpl R, Dziadek M, Leibold M (1985) Basement membrane proteins, interstitial collagens, and fibronectin in neurofibroma. *J Invest Dermatol* 85:54-59
- Flueler U, Boltshauser E, Küchhufer A (1986) Iris hamartoma as diagnostic criterion in neurofibromatosis. *Neuropediatrics* 17:183-185
- Foulkes WD, Englefield P, Campbell IG (1994) Mutation analysis of RASK and the „FLR exon“ of NF1 in sporadic ovarian carcinoma. *Eur J Cancer* 30:528-530
- Frenk E, Schellhorn JP (1969) Zur Morphologie der epidermalen Melanineinheit. *Dermatologica* 139:271-277
- Frenk E, Marazzi A (1984) Neurofibromatosis of von Recklinghausen: a quantitative study of the epidermal keratinocyte and melanocyte populations. *J Invest Dermatol* 83:23-25
- Friedman JM, Birch P (1997) An association between optic glioma and other tumours of the central nervous system in neurofibromatosis type 1. *Neuropediatrics* 28:131-132
- Gamblin SJ, Smerdon SJ (1998) GTPase-activating proteins and their complexes. *Curr Opin Struct Biol* 8:195-201
- Gardner WJ, Frazier CH (1930) Bilateral acoustic neurofibromatosis: a clinical study and field survey of a family of

- five generations with bilateral deafness in thirty-eight members. *Arch Neurol Psychol* 23:266–302
- Gary R, Bretscher A (1995) Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell* 6:1061–1075
- Gideon P, John J, Frech M et al. (1992) Mutational and kinetic analysis of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol* 12:2050–2056
- Gilchrist BA, Blog FB, Szabo G (1979) Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. *J Invest Dermatol* 73:141–143
- Giordano MJ, Mahadeo DK, He YY, Geist RT, Hsu C, Gutmann DH (1996) Increased expression of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene product, neurofibromin, in astrocytes in response to cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 43:246–253
- Giovannini M, Robanus-Maandag E, Niwa-Kawakita M et al. (1999) Schwann cell hyperplasia and tumors in transgenic mice expressing a naturally occurring mutant NF2 protein. *Genes Dev* 13:978–986
- Glover TW, Stein CK, Legius E, Andersen LB, Brereton A, Johnson S (1991) Molecular and cytogenetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Genes Chromosomes Cancer* 3:62–70
- Goldgar DE, Green PH, Parry DM, Mulvihill JJ (1989) Multipoint linkage analysis in neurofibromatosis type 1: an international collaboration. *Am J Hum Genet* 44:6–12
- Golubic M, Tanaka K, Dobrowolski S et al. (1991) The GTPase stimulatory activities of the neurofibromatosis type 1 and the yeast IRA2 proteins are inhibited by arachidonic acid. *EMBO J* 10:2897–2903
- Golubic M, Roudebush M, Dobrowolski S, Wolfman A, Stacey DW (1992) Catalytic properties, tissue and intracellular distribution of neurofibromin. *Oncogene* 7:2151–2159
- Gomez L, Barrios C, Kreicbergs A, Zetterberg A, Pestana A, Castresana JS (1995) Absence of mutation at the GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene in sporadic neurofibrosarcomas and other bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 81:173–174
- Gomez L, Rubio MP, Martin MT et al. (1996) Chromosome 17 allelic loss and NF1-GRD mutations do not play a significant role as molecular mechanisms leading to melanoma tumorigenesis. *J Invest Dermatol* 106:432–436
- Gomi H, Yokoyama T, Fujimoto K et al. (1995) Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron* 14:29–41
- Gonzalez-Agosti C, Xu L, Pinney D et al. (1996) The merlin tumor suppressor localizes preferentially in membrane ruffles. *Oncogene* 13:1239–1247
- Gonzalez-Agosti C, Wiederhold T, Herndon ME, Gusella J, Ramesh V (1999) Interdomain interaction of merlin isoforms and its influence on intermolecular binding to NHE-RF. *J Biol Chem* 274:34438–34442
- Gouttebroze L, Brault E, Muchardt C, Camonis J, Thomas G (2000) Cloning and characterization of SCHIP-1, a novel protein interacting specifically with spliced isoforms and naturally occurring mutant NF2 proteins. *Mol Cell Biol* 20:1699–1712
- Green JE, Baird AM, Hinrichs SH, Klintworth GK, Jay G (1992) Adrenal medullary tumors and iris proliferation in a transgenic mouse model of neurofibromatosis. *Am J Pathol* 140:1401–1414
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54:4855–4878
- Gregory PE, Gutmann DH, Mitchell A et al. (1993) Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associated with microtubules. *Somat Cell Mol Genet* 19:265–274
- Griesser J, Kaufmann D, Eisenbarth I, Bäuerle C, Krone W (1995) Ras-GTP regulation is not altered in cultured melanocytes with reduced levels of neurofibromin derived from patients with neurofibromatosis 1 (NF1). *Biol Chem* 376:91–101
- Griesser J, Kaufmann D, Maier B, Mailhammer R, Kuehl P, Krone W (1997) Post-transcriptional regulation of neurofibromin level in cultured human melanocytes in response to growth factors. *J Invest Dermatol* 108:275–280
- Grönholm M, Sainio M, Zhao F, Heiska L, Vaheri A, Carpen O (1999) Homotypic and heterotypic interaction of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein merlin and the ERM protein ezrin. *J Cell Sci* 112:895–904
- Grumbles RM, Shao L, Jeffrey JJ, Howell DS (1997) Regulation of the rat interstitial collagenase promoter by IL-1 $\beta$ , c-Jun, and ras-rependent signaling in growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* 67:92–102
- Guha A (1998) Ras activation in astrocytomas and neurofibromas. *Can J Neurol Sci* 25:267–281
- Guha A, Lau N, Huvar I et al. (1996) Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors. *Oncogene* 12:507–513
- Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson (1997) Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene* 15:2755–2765
- Guo HF, The I, Hannan F, Bernards A, Zhong Y (1997) Requirement of *Drosophila* NF1 for activation of adenyl cyclase by PACAP38-like neuropeptides. *Science* 276:795–798
- Guo HF, Tong J, Hannan F, Luo L, Zhong Y (2000) A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in *Drosophila*. *Nature* 403:895–898
- Gutkind JS (1998) Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 17:1331–1342
- Gutmann DH, Andersen LB, Cole JL, Swaroop M, Collins FS (1993a) An alternatively-spliced mRNA in the carboxy terminus of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene is expressed in muscle. *Hum Mol Genet* 2:989–992
- Gutmann DH, Tennekoon GI, Cole JL, Collins FS, Rutkowski JL (1993b) Modulation of the neurofibromatosis type 1 product, neurofibromin, during Schwann cell differentiation. *J Neurosci Res* 36:216–223
- Gutmann DH, Cole JL, Collins FS (1994a) Modulation of neurofibromatosis type 1 gene expression during in vitro myoblast differentiation. *J Neurosci Res* 37:398–405
- Gutmann DH, Cole J, Stone W, Ponder BAJ, Collins FS (1994b) Loss of neurofibromin in adrenal gland tumors from patients with neurofibromatosis 1. *Genes Chromosomes Cancer* 10:55–58
- Gutmann DH, Geist RT, Rose K, Wright DE (1995a) Expression of two new protein isoforms of the neurofibromatosis type 1 gene product, neurofibromin, in muscle tissues. *Dev Dyn* 202:302–311
- Gutmann DH, Geist RT, Wright DE, Snider WD (1995b) Expression of the neurofibromatosis 1 (NF1) isoforms in developing and adult rat tissues. *Cell Growth Diff* 6:315–323

- Gutmann DH, Wright DE, Geist RT, Snider WD (1995c) Expression of the neurofibromatosis 2 (NF2) gene isoforms during rat embryonic development. *Hum Mol Genet* 4:471-478
- Gutmann DH, Giordano MJ, Mahadeo DK, Lau N, Silbergeld D, Guha A (1996) Increased neurofibromatosis 1 gene expression in astrocytic tumors: positive regulation by p21-ras. *Oncogene* 16:2121-2127
- Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC et al. (1997a) The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 278:51-57
- Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A (1997b) Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology* 49:267-270
- Gutmann DH, Geist RT, Xu Hm, Kim JS, Saporito-Irwin S (1998) Defects in neurofibromatosis 2 protein function can arise at multiple levels. *Hum Mol Genet* 7:335-345
- Gutmann DH, Zhang Y, Hirbe A (1999a) Developmental regulation of a neuron-specific neurofibromatosis 1 isoform. *Ann Neurol* 46:777-782
- Gutmann DH, Loehr A, Zhang Y, Kim J, Henkemeyer M, Cashen A (1999b) Haploinsufficiency for the neurofibromatosis 1 (NF1) tumor suppressor results in increased astrocyte proliferation. *Oncogene* 18:4450-4459
- Gutmann DH, Haiepek CA, Hoang Lu K (1999c) Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein, merlin, forms two functionally important intramolecular associations. *J Neurosci Res* 58:706-716
- Gutmann DH, Sherman L, Seftor L, Haiepek C, Hoang Lu K, Hendrix M (1999d) Increased expression of the NF2 tumor suppressor gene product, merlin, impairs cell motility, adhesion and spreading. *Hum Mol Genet* 8:267-275
- Gutmann DH, Donahoe J, Brown T, James CD, Perry A (2000) Loss of neurofibromatosis 1 (NF1) gene expression in NF1-associated pilocytic astrocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26:361-367
- Habib AA, Morton LS, Allwardt B et al. (1998a) Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system. *J Neurochem* 70:1704-1711
- Habib AA, Gulcher JR, Högnason T, Zheng L, Stefánsson K (1998b) The OMgp gene, a second growth suppressor within the NF1 gene. *Oncogene* 16:1525-1531
- Habiby R, Silverman B, Listernick R, Charrow J (1995) Precocious puberty in children with neurofibromatosis type 1. *J Pediatr* 126:364-367
- Haeussler J, Haeussler J, Striebel AM et al. (2000) Tumor antigen HuR binds specifically to one of five protein-binding segments in the 3'-untranslated region of the neurofibromin messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 267:726-732
- Hajra A, Martin-Gallardo A, Tarlé SA et al. (1994) DNA sequences in the promoter region of the NF1 gene are highly conserved between human and mouse. *Genomics* 21:649-652
- Hall A (1993) Ras-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 5:265-268
- Hamilton SR, Liu B, Parsons RE et al. (1995) The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 332:839-847
- Han JW, McCormick F, Macara IG (1991) Regulation of Ras-GAP and the neurofibromatosis-1 gene product by eicosanoids. *Science* 252:576-579
- Hansson HA, Lauritzen C, Lossing C, Petruson K (1988) Somatomedin C as tentative pathogenic factor in neurofibromatosis. *Scand J Plast Reconstr Surg* 22:7-13
- Hara T, Bianchi AB, Seizinger BR, Kley N (1994) Molecular cloning and characterization of alternatively spliced transcripts of the mouse neurofibromatosis 2 gene. *Cancer Res* 54:330-335
- Harada T, Irving RM, Xuereb JH et al. (1996) Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene in sporadic meningioma. *J Neurosurg* 84:847-851
- Harwalkar JA, Lee JH, Hughes G, Kinney SE, Golubic M (1998) Immunoblotting analysis of schwannomin/merlin in human schwannomas. *Am J Otol* 19:654-659
- Hattori S, Maekawa M, Nakamura S (1992) Identification of neurofibromatosis type 1 gene product as an insoluble GTPase-activating protein towards ras p21. *Oncogene* 7:481-485
- Hayashi S, Kubota Y, Shimada S, Hori Y (1990) Characterization of cultured neurofibroma cells derived from von Recklinghausen's disease. *Clin Exp Dermatol* 15:217-221
- Heiska L, Alftan K, Gronholm M, Vilja P, Vaehri A, Carpen O (1998) Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem* 273:21.893-21.900
- Hemesath TJ, Price ER, Takemoto C, Badalian T, Fisher DE (1998) MAP kinase links the transcription factor microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 391:298-301
- Henkemeyer M, Rossi DJ, Holmyard DP et al. (1995) Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature* 377:695-701
- Hermonen J, Hirvonen O, Ylä-Outinen H et al. (1995) Neurofibromin: expression by normal human keratinocytes in vivo and in vitro and in epidermal malignancies. *Lab Invest* 73:221-228
- Hewett SJ, Choi DW, Gutmann DH (1995) Expression of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene in reactive astrocytes in vitro. *Neuroreport* 31:1565-1568
- Hinrichs SH, Nerenberg M, Reynolds RK, Khoury G, Jay G (1987) A transgenic mouse model for human neurofibromatosis. *Science* 237:1340-1343
- Hirao M, Sato N, Kondo T et al. S (1996) Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* 135:37-51
- Hitotsumatsu T, Kitamoto T, Iwaki T, Fukui M, Tateishi J (1994) An exon 8-spliced out transcript of neurofibromatosis 2 gene is constitutively expressed in various human tissues. *J Biochem* 116:1205-1207
- Hitotsumatsu T, Iwaki T, Kitamoto T et al. (1997) Expression of neurofibromatosis 2 protein in human brain tumors: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 93:225-232
- Hoang-Xuan K, Merel P, Vega F et al. (1995) Analysis of the NF2 tumor-suppressor gene and of chromosome 22 deletions in gliomas. *Int J Cancer* 60:478-481
- Hoffmeyer S, Assum G, Griesser J, Kaufmann D, Nürnberg P, Krone W (1995) On unequal allelic expression of the neurofibromin gene in neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 4:1267-1272



- Hoffmeyer S, Nürnberg P, Ritter H et al. (1998) Nearby stop codons in exons of the neurofibromatosis type 1 gene are disparate splice effectors. *Am J Hum Genet* 62:269–277
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS et al. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22:3551–3555
- Honda M, Arai E, Sawada S, Ohta A, Niimura M (1995) Neurofibromatosis 2 and neurilemmomatosis gene are identical. *J Invest Dermatol* 104:74–77
- Huang L, Ichimaru E, Pestonjamsk K et al. (1998) Merlin differs from moesin in binding to F-actin and in its intra- and intermolecular interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 248:548–553
- Huebner K, Isobe M, Chao M et al. (1986) The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12–17q22 distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1403–1407
- Hulsebos TJ, Bijleveld EH, Riegman PH, Smink LJ, Dunham I (1996) Identification and characterization of NF1-related loci on human chromosomes 22, 14, and 2. *Hum Genet* 98:7–11
- Huson SM (1994a) Neurofibromatosis: historical perspective, classification and diagnostic criteria. In: Huson SM, Hughes RAC (eds) *The neurofibromatoses: a pathogenetic and clinical overview*. Chapman & Hall, London New York, pp 1–22
- Huson SM (1994b) Neurofibromatosis 1: a clinical and genetic overview. In: Huson SM, Hughes RAC (eds) *The neurofibromatoses: a pathogenetic and clinical overview*. Chapman & Hall, London New York, pp 160–203
- Huson SM, Upadhyaya M (1994) Neurofibromatosis 1: clinical management and genetic counselling. In: Huson SM, Hughes RAC (eds) *The neurofibromatoses: a pathogenetic and clinical overview*. Chapman & Hall, London New York, pp 355–381
- Huson SM, Jones DD, Beck L (1987) Ophthalmic manifestations of neurofibromatosis. *Br J Ophthalmol* 71:235–238
- Huson SM, Harper PS, Compston DAS (1988) Von Recklinghausen neurofibromatosis: a clinical and population study in South East Wales. *Brain* 111:1355–1381
- Huson SM, Compston DAS, Clark P, Harper PS (1989) A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet* 26:704–711
- Huynh DP, Pulst SM (1996) Neurofibromatosis 2 antisense oligodeoxynucleotides induce reversible inhibition of schwannomin synthesis and cell adhesion in STS26T and T98G cells. *Oncogene* 13:73–84
- Huynh DP, Lin CT, Pulst SM (1992) Expression of neurofibromin, the neurofibromatosis 1 gene product: studies in human neuroblastoma cells and rat brain. *Neurosci Lett* 143:233–236
- Huynh DP, Nechiporuk T, Pulst SM (1994) Differential expression and tissue distribution of type I and type II neurofibromins during mouse fetal development. *Dev Biol* 161:538–551
- Huynh DP, Tran TMD, Nechiporuk T, Pulst SM (1996) Expression of neurofibromatosis 2 transcript and gene product during mouse fetal development. *Cell Growth Differ* 7:1551–1561
- Huynh DP, Mautner V, Baser ME, Stavrou D, Pulst SM (1997) Immunohistochemical detection of schwannomin and neurofibromin in vestibular schwannomas, ependymomas and meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:382–390
- Ikeda K, Saeki Y, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V, Chiocca EA (1999) Inhibition of NF2-negative and NF2-positive primary human meningioma cell proliferation by overexpression of merlin due to vector-mediated gene transfer. *J Neurosurg* 91:85–92
- Ingram DA, Yang FC, Travers JB et al. (2000) Genetic and biochemical evidence that haploinsufficiency of the Nf1 tumor suppressor gene modulates melanocyte and mast cell fates in vivo. *J Exp Med* 191:181–188
- Irving RM, Moffat DA, Hardy DG, Barton DE, Xuereb JH, Maher ER (1994) Somatic NF2 gene mutations in familial and non-familial vestibular schwannoma. *Hum Mol Genet* 3:347–350
- Ishioka C, Ballester R, Engelstein M et al. (1995) A functional assay for heterozygous mutations in the GTPase activating protein related domain of the neurofibromatosis type 1 gene. *Oncogene* 10:841–847
- Izawa I, Tamaki N, Saya H (1996) Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 382:53–59
- Jaakkola S, Peltonen J, Uitto J (1989) Perineurial cells coexpress genes encoding interstitial collagens and basement membrane zone components. *J Cell Biol* 108:1157–1163
- Jaaskelainen J, Paetau A, Pyykko I, Blomstedt G, Palva T, Troupp H (1994) Interface between the facial nerve and large acoustic neurinomas. Immunohistochemical study of the cleavage plane in NF2 and non-NF2 cases. *J Neurosurg* 80:541–547
- Jacks T, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernards A, Weinberg RA (1994a) Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in NF1. *Nat Genet* 7:353–361
- Jacks T, Remington L, Williams BO et al. (1994b) Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4:1–7
- Jackson RJ (1993) Cytoplasmic regulation of mRNA function: the importance of the 3' untranslated region. *Cell* 74:9–14
- Jacoby LB, Pulaski K, Rouleau GA, Martuza RL (1990) Clonal analysis of human meningiomas and schwannomas. *Cancer Res* 50:6783–6786
- Jacoby LB, MacCollin M, Louis DN et al. (1994) Exon scanning for mutation of the NF2 gene in schwannomas. *Hum Mol Genet* 3:413–419
- Jacoby LB, MacCollin M, Barone R, Ramesh V, Gusella JF (1996) Frequency and distribution of NF2 mutations in schwannomas. *Genes Chromosomes Cancer* 17:45–55
- Jacoby LB, Jones D, Davis K et al. (1997) Molecular analysis of the NF2 tumor-suppressor gene in schwannomatosis. *Am J Hum Genet* 61:1293–1302
- Jacoby LB, MacCollin M, Parry DM et al. (1999) Allelic expression of the NF2 gene in neurofibromatosis 2 and schwannomatosis. *Neurogenetics* 2:101–108
- Jadayel D, Fain P, Upadhyaya M et al. (1990) Paternal origin of new mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Nature* 343:558–559
- Jamieson CR, Burgt I van der, Brady AF et al. (1994) Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12. *Nat Genet* 8:357–360
- Jarpe MB, Widmann C, Knall C et al. (1998) Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: checkpoints and stop signs along the road to death. *Oncogene* 17:1475–1482
- Jawahery R, Khachi A, Lo K, Zenzie-Gregory B, Smale ST (1994) DNA sequence requirements for transcriptional

- initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14:116-127
- Jenne DE, Tinschert S, Stegmann E et al. (2000) A common set of at least 11 functional genes are lost in the majority of NF1 patients with gross deletions. *Genomics* 15:93-97
- Jensen S, Paderanga D, Chen P et al. (1995) Molecular analysis of the NF1 locus in astrocytic brain tumors. *Cancer* 76:674-677
- Jhanwar SC, Chen Q, Li FP, Brennan MF, Woodruff JM (1994) Cytogenetic analysis of soft tissue sarcomas. Recurrent chromosome abnormalities in malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). *Cancer Genet Cytogenet* 78:138-144
- John AM, Ruggieri M, Ferner R, Upadhyaya M (2000) A search for evidence of somatic mutations in the NF1 gene. *J Med Genet* 37:44-49
- Johnson MR, Look AT, De Clue JE, Valentine MB, Lowy DR (1993) Inactivation of the NF1 gene in human melanoma and neuroblastoma cell lines without impaired regulation of GTP-Ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5539-5543
- Johnson MR, DeClue JE, Felzmann S et al. (1994) Neurofibromin can inhibit ras-dependent growth by a mechanism independent of its GTPase-accelerating function. *Mol Cell Biol* 14:641-645
- Johnson LL, Dyer R, Hupe DJ (1996) Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol* 2:466-471
- Jones PA (1996) DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 56:2463-2467
- Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21:1163-1167
- Joseph JT, Lisle DK, Jacoby LB et al. (1995) NF2 gene analysis distinguishes hemangiopericytoma from meningioma. *Am J Pathol* 147:1450-1455
- Joy P, Roberts C, North K, DeSilva M (1995) Neuropsychological function and MRI abnormalities in neurofibromatosis type 1. *Dev Med Child Neurol* 37:906-914
- Kalra R, Paderanga DC, Olson K, Shannon KM (1994) Genetic analysis is consistent with the hypothesis that NF1 limits myeloid cell growth through p21<sup>ras</sup>. *Blood* 84:3435-3439
- Kamleiter M, Hanemann CO, Kluwe L et al. (1998) Voltage-dependent membrane currents of cultured human neurofibromatosis type 2 Schwann cells. *Glia* 24:313-322
- Kanter WR, Eldridge R (1978) Maternal effect in central neurofibromatosis. *Lancet* 21:903
- Kanter WR, Eldridge R, Fabricant R, Allen JC, Koerber T (1980) Central neurofibromatosis with bilateral acoustic neuroma: genetic, clinical and biochemical distinctions from peripheral neurofibromatosis. *Neurology* 30:851-859
- Karsenty G (1999) The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* 13:3037-3051
- Kaufmann D, Krone W, Hochsattel R, Martin R (1989) A cell culture study on melanocytes from patients with neurofibromatosis 1. *Arch Dermatol Res* 281:510-513
- Kaufmann D, Wiandt S, Vesper J, Krone W (1991) Increased melanogenesis in cultured epidermal melanocytes from patients with neurofibromatosis 1 (NF1). *Hum Genet* 87:144-150
- Kaufmann D, Bartelt B, Hoffmeyer S, Müller R (1999a) Post-translational regulation of neurofibromin content in melanocytes of neurofibromatosis type 1 patients. *Arch Dermatol Res* 291:312-317
- Kaufmann D, Junge I, Bartelt B, Lattke H, Müller R (1999b) On the lysosomal degradation of neurofibromin and its phosphorylation in cultured melanocytes. *Biol Chem* 380:1071-1078
- Kaul SC, Mitsui Y, Komatsu Y, Reddel RR, Wadhwa R (1996) A highly expressed 81 kDa protein in immortalized mouse fibroblast: its proliferative function and identity with ezrin. *Oncogene* 13:1231-1237
- Keene JD (1999) Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5-7
- Kehrer H, Krone W (1994) Spontaneous chromosomal aberrations in cell cultures from patients with neurofibromatosis 1. *Mutat Res* 306:61-70
- Kehrer-Sawatzki H, Schwickardt T, Assum G, Rocchi M, Krone W (1997) A third neurofibromatosis type 1 (NF1) pseudogene at chromosome 15q11.2. *Hum Genet* 100:595-600
- Kehrer-Sawatzki H, Maier C, Moschgath E, Elgar G, Krone W (1998) Genomic characterization of the neurofibromatosis type 1 gene of *Fugu rubripes*. *Gene* 222:145-153
- Kerem E, Nissim-Rafinia M, Argaman Z et al. (1997) A missense cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutation with variable phenotype. *Pediatrics* 100:E5
- Kerkhoff E, Rapp UR (1998) Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* 17:1457-1462
- Kestler HA, Haschka M (1999) A model for the emergence of café-au-lait macules. *J Invest Dermatol* 113:858-859
- Kim HA, Ratner N (1997) NF1-deficient mouse Schwann cells are angiogenic and invasive and can be induced to hyperproliferate: reversion of some phenotypes by an inhibitor of farnesyl protein transferase. *Mol Cell Biol* 17:862-872
- Kim MR, Tamanoi F (1998) Neurofibromatosis 1 GTPase activating protein-related domain and its functional significance. In: Upadhyaya M, Cooper DN (eds) *Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype*. BIOS Scientific Publ, Oxford, pp 89-112
- Kim HA, Rosenbaum T, Marchionni MA, Ratner N, DeClue JF (1995) Schwann cells from neurofibromin deficient mice exhibit activation of p21<sup>ras</sup>, inhibition of cell proliferation and morphological changes. *Oncogene* 11:325-335
- Kim HA, DeClue JE, Ratner N (1997) cAMP-dependent protein kinase A is required for Schwann cell growth: interactions between the cAMP and neuregulin/tyrosine kinase pathways. *J Neurosci Res* 49:236-247
- Kimura Y, Koga H, Araki N et al. (1998) The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nat Med* 4:915-922
- Kinzler K, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159-170
- Kirby ML, Gale TF, Stewart DE (1983) Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science* 220:1059-1061
- Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993) The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 3:255-268
- Klesse LH, Parada LF (1998) p21 Ras and phosphatidylinositol-3 kinase are required for survival of wild-type and NF1 mutant sensory neurons. *J Neurosci* 18:10.420-10.428
- Klose A, Ahmadian MR, Schuelke M et al. (1998) Selective disactivation of neurofibromin GAP activity in neurofibromatosis type 1 (NF1). *Hum Mol Genet* 7:1261-1268
- Kluwe L, Mautner VF (1996) A missense mutation in the NF2 gene results in moderate and mild clinical pheno-

- types of neurofibromatosis type 2. *Hum Genet* 97:224-227
- Kluwe L, Mautner VF (1998) Mosaicism in sporadic neurofibromatosis 2 patients. *Hum Mol Genet* 7:2051-2055
- Kluwe L, Pulst SM, Koppen J, Mautner VF (1995) A 163-bp deletion in the neurofibromatosis 2 (NF2) gene associated with variant phenotypes. *Hum Genet* 95:443-446
- Kluwe L, Bayer S, Baser ME et al. (1996) Identification of NF2 germ-line mutations and comparison with neurofibromatosis 2 phenotypes. *Hum Genet* 98:534-538
- Kluwe L, MacCollin M, Tatagiba M et al. (1998) Phenotypic variability associated with 14 splice-site mutations in the NF2 gene. *Am J Med Genet* 77:228-233
- Kluwe L, Friedrich RE, Mautner VF (1999a) Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. *Genes Chromosomes Cancer* 24:283-285
- Kluwe L, Friedrich RE, Mautner V-F (1999b) Allelic loss of the NF1 gene in NF1-associated plexiform neurofibromas. *Cancer Genet Cytogenet* 113:65-69
- Kluwe L, Mautner V, Parry D et al. (2000) The parental origin of new mutations in neurofibromatosis 2. *Neurogenetics* in press
- Knudson AG Jr (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:829-833
- Kobayashi M, Hashimoto N, Hoshino M, Hattori S, Iwashita S (1993) Differential contribution of *M<sub>v</sub>* 120 kDa ras-GTPase-activating protein and neurofibromatosis type 1 gene product during the transition from growth phase to arrested state in human fibroblasts accompanied by a unique ras-GTPase-activating activity. *FEBS* 327:177-182
- Koch G (1966) Phakomatosen. In: Becker PE (Hrsg) *Human-genetik. Ein kurzes Handbuch in fünf Bänden, Bd V/1*. Thieme, Stuttgart New York, S 34-111
- Koga H, Araki N, Takeshima H et al. (1998) Impairment of cell adhesion by expression of the mutant neurofibromatosis type 2 (NF2) genes which lack exons in the ERM-homology domain. *Oncogene* 17:801-810
- Koh T, Yokota J, Ookawa K et al. (1995) Alternative splicing of the neurofibromatosis 1 gene correlates with growth patterns and neuroendocrine properties of human small-cell lung-carcinoma cell. *Int J Cancer* 60:843-847
- Köhler B (1990) Neurofibromatose im Kindesalter. *Klinik und Diagnostik von Kindern mit Morbus Recklinghausen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S 1-150
- Koivunen J, Yla-Outinen H, Korkiamaki T et al. (2000) New function for NF1 tumor suppressor. *J Invest Dermatol* 114:473-479
- Korf BR (1999) NNF (National Neurofibromatosis Foundation) International NF1 Genetic Analysis Consortium. Februar 1999. [http://www.clam.com/nf/nf1gene/secure\\_data/nf1gene.mutdata.index.html](http://www.clam.com/nf/nf1gene/secure_data/nf1gene.mutdata.index.html)
- Krämer A (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem* 65:367-409
- Krasnoselsky A, Massay MJ, DeFrances MC, Michalopoulos G, Zarnegar R, Ratner N (1994) Hepatocyte growth factor is a mitogen for Schwann cells and is present in neurofibromas. *J Neurosci* 14:7284-7290
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90:41-54
- Kroll J, Waltenberger J (1997) The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 272:32.521-32.527
- Krone W, Mao R, Mühlecke O, Kling H, Fink T (1986) Cell culture studies on neurofibromatosis (von Recklinghausen). Characterization of cells growing from neurofibromas. *Ann N Y Acad Sci* 486:354-370
- Krone W, Hoffmeyer S, Grieser J et al. (1998) Studies on neurofibromatosis type 1. In: Singh JR, Sperling K, Neitzel H (eds) *Progress in human genetics*. Printwell, Amritsar
- LaJeunesse DR, McCartney BM, Fehon RG (1998) Structural analysis of *Drosophila* merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization. *J Cell Biol* 141:1589-1599
- Lakkis MM, Epstein JA (1998) Neurofibromin modulation of ras activity is required for normal endocardial-mesenchymal transformation in the developing heart. *Development* 125:4359-4367
- Lakkis MM, Golden JA, O'Shea KS, Epstein JA (1999) Neurofibromin deficiency in mice causes exencephaly and is a modifier for Splotch neural tube defects. *Dev Biol* 212:80-92
- Lamszus K, Vahldiek F, Mautner VF et al. (2000) Allelic losses in neurofibromatosis 2-associated meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:504-12
- Largaespada DA, Shoughnessy JD, Jenkins NA, Copeland NG (1995) Retroviral integration at the Evi-2 locus in BXH-2 myeloid leukemia cell lines disrupts NF1 expression without changes in steady-state Ras-GTP levels. *J Virol* 69:5095-5102
- Largaespada DA, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG (1996) NF1 deficiency causes Ras-mediated granulocyte/macrophage colony stimulating factor hypersensitivity and chronic myeloid leukaemia. *Nat Genet* 12:137-143
- Larson JJ, Tew JM Jr, Simon M, Menon AG (1995) Evidence for clonal spread in the development of multiple meningiomas. *J Neurosurg* 83:705-709
- Lassmann H, Jurecka W, Gebhart W (1976) Some electron microscopic and autoradiographic results concerning cutaneous neurofibromas in von Recklinghausen's disease. *Arch Dermatol Res* 255:69-81
- Lassmann H, Jurecka W, Lassmann G, Gebhart W, Matras H, Watzek G (1977) Different types of benign nerve sheath tumors. *Virchows Arch* 375:197-210
- Lázaro C, Gaona A, Lynch M, Kruyer H, Ravella A, Estivill X (1995) Molecular characterization of the breakpoints of a 12-kb deletion in the NF1 gene in a family showing germ-line mosaicism. *Am J Hum Genet* 57:1044-1049
- Lázaro C, Gaona A, Ainsworth P et al. (1996) Sex differences in mutational rate and mutational mechanism in the NF1 gene in neurofibromatosis type 1 patients. *Hum Genet* 98:696-699
- Leblanc V, Tocque B, Delumeau I (1998) Ras-GAP controls Rho-mediated cytoskeletal reorganization through its SH3 domain. *Mol Cell Biol* 18:5567-5578
- Ledbetter DH, Rich DC, O'Connell P, Leppert M, Carey JC (1989) Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation. *Am J Hum Genet* 44:20-24
- Lee MH, Williams BO, Mulligan G et al. (1996) Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes Dev* 10:1621-1632
- Lee JH, Sundaram V, Stein DJ, Kinney SE, Stacey DW, Golubic M (1997) Reduced expression of schwannomin/merlin

- in human sporadic meningiomas. *Neurosurgery* 40:578-587
- Legius E, Marchuk DA, Hall BK et al. (1992) NF1-related locus on chromosome 15. *Genomics* 13:1316-1318
- Legius E, Marchuk DA, Collins FS (1993) Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibromasarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis. *Nat Genet* 3:122-126
- Legius E, Dierick H, Wu R et al. (1994) TP53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10:250-255
- Legoux P, Legrand MF, Ollagnon E, Lenoir G, Thomas G, Zucman-Rossi J (1999) Characterisation of 16 polymorphic markers in the NF2 gene: application to hemizygosity detection. *Hum Mutat* 13:290-293
- Lekanne Deprez RH, Bianchi AB et al. (1994) Frequent NF2 gene transcript mutations in sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. *Am J Hum Genet* 54:1022-1029
- Lewis RA, Riccardi VM (1981) Von Recklinghausen neurofibromatosis. Incidence of iris hamartomata. *Ophthalmology* 88:348-354
- Li Y, White R (1996) Suppression of a human colon cancer cell line by introduction of an exogenous NF1 gene. *Cancer Res* 56:2872-2876
- Li Y, Bollag G, Clark R et al. (1992) Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors. *Cell* 69:275-281
- Li Y, O'Connell P, Breidenach HH et al. (1995) Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics* 25:9-18
- Lindblom A, Ruttledge M, Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski JP (1994) Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 56:354-357
- Lipton S, Zuckerbrod M (1966) Familial enteric neurofibromatosis. *Med Times* 94:544-548
- Lisch K (1937) Über Beteiligung der Augen, insbesondere das Vorkommen von Irisknötchen bei der Neurofibromatose (Recklinghausen). *Z Augenheilkd* 93:137-143
- Listernick R, Louis DN, Packer RJ, Gutmann DH (1997) Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF1 optic pathway glioma task force. *Am Neurol* 41:143-149
- Lopez-Correa C, Brems H, Lazaro C et al. (1999) Molecular studies in 20 submicroscopic neurofibromatosis type 1 gene deletions. *Hum Mutat* 14:387-93
- Lopez-Correa C, Zucman-Rossi J, Brems H, Thomas G, Legius E (2000) NF2 gene deletion in a family with a mild phenotype. *J Med Genet* 37:75-77
- Lothe RA, Saeter G, Danielsen HE et al. (1993) Genetic alterations in a malignant schwannoma from a patient with neurofibromatosis (NF1). *Pathol Res Pract* 189:465-471
- Lothe RA, Slettan A, Saeter G, Brogger A, Borresen AL, Nesland JM (1995) Alterations at chromosome 17 loci in peripheral nerve sheath tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:65-73
- Lothe RA, Karhu R, Mandahl N et al. (1996) Gain of 17q24-qtter detected by comparative genomic hybridization in malignant tumors from patients with von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Cancer Res* 56:4778-4781
- Louis DN, Ramesh V, Gusella JF (1995) Neuropathology and molecular genetics of neurofibromatosis 2 and related tumors. *Brain Pathol* 5:163-172
- Ludwig L, Janssen JW, Schulz AS, Bartram CR (1993) Mutations within the FLR exon of NF1 are rare in myelodysplastic syndromes and acute myelocytic leukemias. *Leukemia* 7:1058-1060
- Ludwig L, Janssen JW, Bartram CR (1995) Exon trap analysis of a NF1 splice-site mutation in a chronic myelomonocytic leukemia patient. *Leukemia* 9:922-924
- Luijten M, Wang Y, Smith BT et al. (2000) Mechanism of spreading of the highly related neurofibromatosis type 1 (NF1) pseudogenes on chromosomes 2, 14 and 22. *Eur J Hum Genet* 8:209-214
- Lukashev ME, Werb Z (1998) ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Cell Biol* 8:437-441
- Lukes A, Mun-Bryce S, Lukes M, Rosenberg GA (1999) Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol Neurobiol* 19:267-284
- Luongo C, Moser AR, Gledhill S, Dove WF (1994) Loss of Apc+ in intestinal adenomas from Min mice. *Cancer Res* 54:5947-5952
- Luria D, Avigad S, Cohen IJ, Stark B, Weitz R, Zaizov R (1997) p53 mutation as the second event in juvenile chronic myelogenous leukemia in a patient with neurofibromatosis type 1. *Cancer* 80:2013-2018
- Lusins JO, Nakagawa H (1981) Multiple meningiomas evaluated by computed tomography. *Neurosurgery* 9:137-141
- Lutchman M, Rouleau GA (1995) The neurofibromatosis type 2 gene product, schwannomin, suppresses growth of NIH 3T3 cells. *Cancer Res* 55:2270-2274
- Lynch HT, Chapelle A de la (1999) Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 36:801-818
- MacCollin M (1996) NF2 germline mutation map. Version 26.8.1999 <http://neuro-trials1.mgh.harvard.edu/nf2/>
- MacCollin M, Woodfin W, Kronn D, Short MP (1996) Schwannomatosis: a clinical and pathologic study. *Neurology* 46:1072-1079
- MacEwen (1990) Orthopedic aspects of neurofibromatosis. In: Rubenstein AE, Korf BR (1990) Neurofibromatosis. A handbook for patients, families and health-care professionals. Thieme, Stuttgart New York, pp 125-141
- Maeda M, Matsui T, Imamura M, Tsukita S, Tsukita S (1999) Expression level, subcellular distribution and rho-GDI binding affinity of merlin in comparison with ezrin/radixin/moesin proteins. *Oncogene* 18:4788-4797
- Magendantz M, Henry MD, Lander A, Solomon F (1995) Interdomain interactions of radixin in vitro. *J Biol Chem* 270:25.324-25.327
- Malhotra R, Ratner N (1994) Localization of neurofibromin to keratinocytes and melanocytes developing rat and human skin. *J Invest Dermatol* 102:812-818
- Mancini DN, Singh SM, Archer TK, Rodenhiser DI (1999) Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with binding of CREB and SP1 transcription factors. *Oncogene* 18:4108-4119
- Mangeat P, Roy C, Martin M (1999) ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 9:187-192
- Mangues R, Corral T, Lu S, Symmans WF, Liu L, Pellicer A (1998) NF1 inactivation cooperates with N-ras in in vivo lymphogenesis activating Erk by a mechanism independent of its Ras-GTPase accelerating activity. *Oncogene* 17:1705-1716
- Maquat LE (1996) Defects in RNA splicing and the consequence of shortened translational reading frames. *Am J Hum Genet* 59:279-286

- Marchuk DA, Saulino AM, Tavakkol R et al. (1991) cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product. *Genomics* 11:931-940
- Martin GA, Viskochil D, Bollag G et al. (1990) The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 63:843-849
- Martinsson T, Sjöberg RM, Hedborg F, Kogner P (1997) Homozygous deletion of the neurofibromatosis-1 gene in the tumor of a patient with neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 95:183-189
- Martuza RL, Philippe I, Fitzpatrick TB, Zwaan J, Seki Y, Lederer J (1985) Melanin macroglobules as a cellular marker of neurofibromatosis: a quantitative study. *J Invest Dermatol* 85:347-350
- Mastrangelo M, Goepf CE, Patel YA, Clark WH (1979) Cutaneous melanoma in a patient with neurofibromatosis. *Arch Dermatol* 115:864-865
- Matsui I, Tanimuro M, Kobayashi N, Sawada T, Nagahara N, Akatsuka J (1993) Neurofibromatosis type 1 and childhood cancer. *Cancer* 72:2746-2754
- Matsui T, Maeda M, Doi Y et al. (1998) Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140:647-657
- Matsui T, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1999) Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* 9:1259-1262
- Mautner VF, Tatagiba M, Lindenau M et al. (1995) Spinal tumors in patients with neurofibromatosis type 2: MR imaging study of frequency, multiplicity, and variety. *AJR Am J Roentgenol* 165:951-955
- Mautner VF, Lindenau M, Baser ME et al. (1996a) The neuroimaging and clinical spectrum of neurofibromatosis 2. *Neurosurgery* 38:880-885
- Mautner VF, Baser ME, Kluwe L (1996b) Phenotypic variability in two families with novel splice-site and frameshift NF2 mutations. *Hum Genet* 98:203-206
- Mautner VF, Lindenau M, Baser ME, Kluwe L, Gottschalk J (1997) Skin abnormalities in neurofibromatosis 2. *Arch Dermatol* 133:1539-1543
- Maxwell M, Shih SD, Galanopoulos T, Hedley-Whyte ET, Cosgrove GR (1998) Familial meningioma: analysis of expression of neurofibromatosis 2 protein merlin. Report of two cases. *J Neurosurg* 88:562-569
- Mazarakis ND, Yannoutsos N, el-Jabbour JN, Hatton W, Fletcher R, Grosveld F (1996) Neurocristopathy resembling neurofibromatosis type 1 in an NGF-SV40 transgenic line. *Genes Cells* 1:125-137
- McCartney BM, Fehon RG (1996) Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the *Drosophila* homologues of moesin and the neurofibromatosis 2 tumor suppressor, merlin. *J Cell Biol* 133:843-852.
- McClatchey AI, Saotome I, Ramesh V, Gusella JF, Jacks T (1997) The Nf2 tumor suppressor gene product is essential for extraembryonic development immediately prior to gastrulation. *Genes Dev* 11:1253-1265
- McClatchey AI, Saotome I, Mercer K et al. (1998) Mice heterozygous for a mutation at the NF2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes Dev* 12:1121-1133
- McCaughran JM, Harris DI, Donnai D et al. (1999) A clinical study of type 1 neurofibromatosis in North West England. *J Med Genet* 36:197-203
- McGlade J, Brunkhorst B, Anderson D et al. (1993) The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J* 12:3073-3081
- McKusick VA (1998) Mendelian inheritance in man, 11th edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore London
- Menon AG, Anderson KM, Riccardi VM et al. (1990) Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5435-5439
- Metheny LJ, Skuse GR (1996) NF1 mRNA isoform expression in PC12 cells: modulation by extrinsic factors. *Exp Cell Res* 228:44-49
- Mérel P, Hoang-Xuan K, Sanson M et al. (1995) Predominant occurrence of somatic mutations of the NF2 gene in meningiomas and schwannomas. *Genes Chromosomes Cancer* 13:211-216
- Merenmies J, Parada LF, Henkemeyer M (1997) Receptor tyrosine kinase signaling in vascular development. *Cell Growth Diff* 8:3-10
- Messiaen L, Callens T, De Paepe A, Craen M, Mortier G (1997) Characterisation of two different nonsense mutations, C6792A and C6792G, causing skipping of exon 37 in the NF1 gene. *Hum Genet* 101:75-80
- Miles DK, Freedman MH, Stephens K et al. (1996) Patterns of hematopoietic lineage involvement in children with neurofibromatosis type 1 and malignant myeloid disorder. *Blood* 88:4314-4320
- Miyauchi J, Asada M, Tsunematsu Y, Kaneko Y, Kojima S, Mizutani S (1999) Abnormalities of the p53 gene in juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 106:980-986
- Mohrenweiser HW, Jones IM (1998) Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? *Mutat Res* 400:15-24
- Morcos P, Thapar N, Tusneem N, Stacey D, Tamanoi F (1996) Identification of neurofibromin mutants that exhibit allele specificity or increased Ras affinity resulting in suppression of activated ras alleles. *Mol Cell Biol* 16:2496-2503
- Mori S, Satoh T, Koide H, Nakafuku M, Villafranca E, Kaziro Y (1995) Inhibition of Ras/Raf interaction by anti-oncogenic mutants of neurofibromin, the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene product, in cell-free systems. *J Biol Chem* 270:28.834-28.838
- Morrison DK, Cutler RE (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:174-179
- Muhammad AKM, Yoshimine T, Maruno M et al. (1997) Chromosome 17 allelic loss in astrocytic tumors and its clinico-pathologic implications. *Clin Neuropathol* 16:220-226
- Muir D (1995) Differences in proliferation and invasion by normal, transformed and NF1 Schwann cell cultures are influenced by matrix metalloproteinase expression. *Clin Exp Metastasis* 13:303-314
- Muir D, Manthorpe M (1992) Stromelysin generates a fibronectin fragment that inhibits Schwann cell proliferation. *J Cell Biol* 116:177-185
- Mulvihill JJ, Parry DM (1987) Symposium on linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1). *Genomics* 1:337-339
- Murthy A, Gonzalez-Agosti C, Cordero E et al. (1998) NHERF, a regulatory cofactor for Na(+)-H+ exchange, is a

- common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins. *J Biol Chem* 273:1273–1276
- Nakafuku M, Nagamine M, Ohtoshi A, Tanaka K, Toh-E A, Kaziro Y (1993) Suppression of oncogenic Ras by mutant neurofibromatosis type 1 genes with single amino acid substitutions. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6706–6710
- Nakai H, Misawa S, Horiike S et al. (1994) Analysis of mutations and expression of GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in the progression of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 8:1027–1033
- Nakano A, Tani E, Miyazaki K, Yamamoto Y, Furuyama JI (1995) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas. *J Neurosurg* 83:298–307
- Ng NF, Shooter EM (1993) Activation of p21ras by nerve growth factor in embryonic sensory neurons and PC12 cells. *J Biol Chem* 268:25.329–25.333
- Ng HK, Lau KM, Tse JYM et al. (1995) Combined molecular genetic studies of chromosome 22q and the neurofibromatosis type 2 gene in central nervous system tumors. *Neurosurgery* 37:764–773
- Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Ino Y, Moller MB, Rosenberg AE, Louis DN (1999) Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation. *Am J Pathol* 155:1879–1884
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342:705–708
- NIH Consensus Development Conference Neurofibromatosis (1988) Conference statement. *Arch Neurol* 45:575–578
- Nishi T, Lee P, Oka K et al. (1991) Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation. *Oncogene* 6:1155–1559
- Noel JP (1997) Turning off the Ras switch with the flick of a finger. *Nat Struct Biol* 4:677–680
- Nordlund M, Gu X, Shipley M, Ratner N (1993) Neurofibromin is enriched in the endoplasmic reticulum of CNS neurons. *J Neurosci* 13:1588–1600
- Nordlund ML, Rizvi TA, Brannan CI, Ratner N (1995) Neurofibromin expression and astrogliosis in neurofibromatosis (type 1) brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:588–600
- North K (1999) Cognitive function and academic performance. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM (eds) *Neurofibromatosis. phenotype, natural history, and pathogenesis*, 3rd edn. John Hopkins University Press, Baltimore, pp 162–189
- North K, Joy P, Yuille D et al. (1994) Learning difficulties in neurofibromatosis type 1: the significance of MRI abnormalities. *Neurology* 44:878–883
- North K, Joy P, Yuille D, Cocks N, Hutchins P (1995) Cognitive function and academic performance in children with neurofibromatosis type 1. *Dev Med Child Neurol* 37:427–436
- Norton KK, Xu J, Gutmann DH (1995) Expression of the neurofibromatosis 1 gene product, neurofibromin, in blood vessel endothelial cells and smooth muscle. *Neurobiol Dis* 2:13–21
- Norton KK, Mahadeo DK, Geist RT, Gutmann DH (1996) Expression of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene during growth arrest. *Neuroreport* 7:601–604
- Obremski VJ, Hall AM, Fernandez-Valle C (1998) Merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product, and beta1 integrin associate in isolated and differentiating Schwann cells. *J Neurobiol* 37:487–501
- Oshiro N, Fukata Y, Kaibuchi K (1998) Phosphorylation of moesin by rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. *J Biol Chem* 273:34.663–34.666
- Papi L, De Vitis LR, Vitelli F et al. (1995) Somatic mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet* 95:347–351
- Park VM, Pivnick EK (1998) Neurofibromatosis type 1 (NF1): a protein truncation assay yielding identification of mutations in 73% of patients. *J Med Genet* 35:813–820
- Park VM, Kenwright KA, Sturtevant DB, Pivnick EK (1998) Alternative splicing of exons 29 and 30 in the neurofibromatosis type 1 gene. *Hum Genet* 103:382–385
- Parkes Weber F (1909) Cutaneous pigmentation as an incomplete form of Recklinghausen's disease, with remarks on the classification of incomplete and anomalous forms of Recklinghausen's disease. *Br J Dermatol* 21:49–51
- Parry DM, Eldridge R, Kaiser-Kupfer MI, Bouzas EA, Pikus A, Patronas N (1994) Neurofibromatosis 2 (NF2): clinical characteristics of 63 affected individuals and clinical evidence for heterogeneity. *Am J Med Genet* 52:450–461
- Parry DM, MacCollin MM, Kaiser-Kupfer MI et al. (1996) Germ-line mutations in the neurofibromatosis 2 gene: correlations with disease severity and retinal abnormalities. *Am J Hum Genet* 59:529–539
- Pelton PD, Sherman LS, Rizvi TA et al. (1998) Ruffling membrane, stress fiber, cell spreading and proliferation abnormalities in human schwannoma cells. *Oncogene* 17:2195–2209
- Peltonen J, Marttala T, Vihersaari T, Renvall S, Penttinen R (1981) Collagen synthesis in cells cultured from von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 55:183–187
- Peltonen J, Aho H, Halme T et al. (1984) Distribution of different collagen types and fibronectin in neurofibromatosis tumours. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect A* 92:345–352
- Peltonen J, Penttinen R, Larjava H, Aho H (1986) Collagens in neurofibromas and neurofibroma cell cultures. *Ann NY Acad Sci* 486:260–270
- Peltonen J, Jaakkola S, Lebowitz M et al. (1988) Cellular differentiation and expression of matrix genes in type 1 neurofibromatosis. *Lab Invest* 59:760–771
- Perera FP (1997) Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 278:1068–1073
- Perry HD, Font RL (1982) Iris nodules in von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Arch Ophthalmol* 100:1635–1640
- Petrova TV, Makinen T, Alitalo K (1999) Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Cell Res* 2253:117–130
- Plaat BEC, Molenaar WM, Mastik MF, Hoekstra HJ, Meerman te GJ, Berg van den E (1999) Computer-assisted cytogenetic analysis of 51 malignant peripheral-nerve-sheath tumors: sporadic vs. neurofibromatosis-type-1-associated malignant schwannomas. *Int J Cancer* 83:171–178
- Platten M, Giordano MJ, Dirven CMF, Gutmann DH, Louis DN (1996) Up-regulation of specific NF1 gene transcripts in sporadic pilocytic astrocytomas. *Am J Pathol* 149:621–637
- Pletcher BA, Magee ML, Frohman IP et al. (1996) Confirmation of decreased risk of optic glioma in African Americans with NF type 1. *Am J Hum Genet* 59:A101

- Poullet P, Lin B, Esson K, Tamanoi F (1994) Functional significance of lysine 1423 of neurofibromin and characterization of a second site suppressor which rescues mutations at this residue and suppresses RAS2Val-19-activated phenotypes. *Mol Cell Biol* 14:815-821
- Poyhonen M, Leisti E-L, Kytölä S, Leisti J (1997) Hereditary spinal neurofibromatosis: a rare form of NF1? *J Med Genet* 34:184-187
- Preudhomme C, Vachee A, Quesnel B, Wattel E, Cosson A, Fenaux P (1993) Rare occurrence of mutations of the FLR exon of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia* 7:1071
- Pronk GJ, Bos JL (1994) The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim Biophys Acta* 1198:131-147
- Pulst SM, Riccardi VM, Fain P, Korenberg JR (1991) Familial spinal neurofibromatosis: clinical and DNA linkage analysis. *Neurology* 41:1923-1927
- Pulst SM, Rouleau GA, Marineau C, Fain P, Sieb JP (1993) Familial meningioma is not allelic to neurofibromatosis 2. *Neurology* 43:2096-2098
- Purandare SM, Huntsman Breidenbach H, Li Y et al. (1995) Identification of neurofibromatosis 1 (NF1) homologous loci by direct sequencing, fluorescence in situ hybridization, and PCR amplification of somatic cell hybrids. *Genomics* 30:476-485
- Purandare SM, Ota A, Neil S et al. (1996) Identification of cis-regulatory elements in the neurofibromatosis type 1 gene. *Am J Hum Genet* 59:A157
- Pykett MJ, Murphy M, Harnish PR, George DL (1994) The neurofibromatosis 2 (NF2) tumor suppressor gene encodes multiple alternatively spliced transcripts. *Hum Mol Genet* 3:559-564
- Ragge NK, Baser ME, Klein J et al. (1995) Ocular abnormalities in neurofibromatosis 2. *Am J Ophthalmol* 120:634-641
- Rao UNM, Surti U, Hoffner L, Yaw K (1996) Cytogenetic and histologic correlation of peripheral nerve sheath tumors of soft tissue. *Cancer Genet Cytogenet* 88:17-25
- Rasmussen SA, Colman SD, Abernathy CR, Muir D, Wallace MR (1997) Somatic loss of the NF1 gene in plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 61:A80
- Rasmussen SA, Colman SD, Ho VT et al. (1998) Constitutional and mosaic large NF1 gene deletions in neurofibromatosis type 1. *J Med Genet* 35:468-471
- Ratner N, Lieberman MA, Riccardi VM, Hong D (1990) Mitogen accumulation in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Ann Neurol* 27:298-303
- Ratner N, Atit R, Sherman LS, Crowe M, Cox AD, Wenstrup R (1999) Evidence in support of Ras-GTP dependent and independent abnormalities in NF1-mutant cells revealed by a new in situ Ras-activation assay and by skin wounding. *Med Genet* 11:483
- Regnier V, Meddeb M, Lecointre G et al. (1997) Emergence and scattering of multiple neurofibromatosis (NF1)-related sequences during hominoid evolution suggest a process of pericentromeric interchromosomal transposition. *Hum Mol Genet* 6:9-16
- Reuther GW, Der CJ (2000) The ras branch of small GTPases: ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol* 12:157-165
- Riccardi VM (1980) Pathophysiology of neurofibromatosis. IV. Dermatologic insights into heterogeneity and pathogenesis. *J Am Acad Dermatol* 3:157-166
- Riccardi VM (1982) Neurofibromatosis: clinical heterogeneity. *Curr Probl Cancer* 7:3-33
- Riccardi VM (1986) Growth-promoting factors in neurofibroma crude extracts. In: Rubenstein AE, Bunge RP, Housman DE (eds) *Neurofibromatosis*. Ann N Y Acad Sci 486:206-226
- Riccardi VM (1993) Invited editorial. Genotype, malleotype, phenotype, and randomness: lessons from neurofibromatosis-I (NF-I). *Am J Hum Genet* 53:301-304
- Riccardi VM (1999) Skeletal system. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM (eds) *Neurofibromatosis*. Phenotype, natural history, and pathogenesis, 3rd edn. John Hopkins University Press, Baltimore, pp 250-273
- Riccardi VM, Elder DW (1986) Multiple cytogenetic aberrations in neurofibrosarcomas complicating neurofibromatosis. *Cancer Genet Cytogenet* 23:199-209
- Riccardi VM, Lewis RA (1988) Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants. *Am J Hum Genet* 42:284-289
- Ricciardone MD, Özcelik T, Cevher B et al. (1999) Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer Res* 59:290-293
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577
- Ridley AJ, Paterson HF, Noble M, Land H (1988) Ras-mediated cell cycle arrest is altered by nuclear oncogenes to induce Schwann cell transformation. *EMBO J* 7:1635-1645
- Riopelle RJ, Riccardi VM, Faulkner S, Martin MC (1984) Serum neuronal growth factor levels in von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Ann Neurol* 16:54-59
- Ritchie RJ, Mattei M-G, Lalande M (1998) A large polymorphic repeat in the pericentromeric region of human chromosome 15q contains three partial gene duplications. *Hum Mol Genet* 7:1253-1260
- Ritter M, Wöll E, Haller T, Dartsch PC, Zwierzina H, Lang F (1997) Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger by transforming Ha-ras requires stimulated cellular calcium influx and is associated with rearrangement of the actin cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 72:222-228
- Rizvi TA, Akunuru S, Courten-Myers G de, Switzer RC 3rd, Nordlund ML, Ratner N (1999) Region-specific astrogliosis in brains of mice heterozygous for mutations in the neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor. *Brain Res* 816:111-123
- Robinson PN, Boddlich A, Peters H et al. (1995) Two recurrent nonsense mutations and a 4 bp deletion in a quasi-symmetric element in exon 37 of the NF1 gene. *Hum Genet* 96:95-98
- Rodenhiser DI, Coulter-Mackie MB, Singh SM (1993) Evidence of DNA methylation in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene region of 17q11.2. *Hum Mol Genet* 2:439-444
- Rodriguez HA, Berthrong M (1996) Multiple primary intracranial tumors in von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Arch Neurol* 14:467-475
- Rodriguez-Viciano P, Marte BM, Warne PH, Downward J (1996) Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351:225-231
- Rosenbaum T, Boissy YL, Kombrinck K et al. (1995) Neurofibromin-deficient fibroblasts fail to form perineurium in vitro. *Development* 121:3583-3592

- Rosenbaum T, Patrie KM, Ratner N (1997) Neurofibromatosis type 1: genetic and cellular mechanisms of peripheral nerve tumor formation. *Neuroscientist* 3:412-420
- Rosenbaum C, Kluwe L, Mautner VF, Friedrich RE, Muller HW, Hanemann CO (1998) Isolation and characterization of Schwann cells from neurofibromatosis type 2 patients. *Neurobiol Dis* 5:55-64
- Rosman NP, Pearce J (1967) The brain in multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen's disease): a suggested neuropathological basis for the associated mental defect. *Brain* 90:829-838
- Roudebush M, Slabe T, Sundaram V, Hoppel CL, Golubic M, Stacey DW (1997) Neurofibromin colocalizes with mitochondria in cultured cells. *Exp Cell Res* 236:161-172
- Rouleau GA, Wertelecki W, Haines JL et al. (1987) Genetic linkage of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* 329:246-248
- Rouleau GA, Merel P, Lutchman M et al. (1993) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature* 363:515-521
- Roy C, Martin M, Mangeat P (1997) A dual involvement of the amino-terminal domain of ezrin in F- and G-actin binding. *J Biol Chem* 272:20.088-20.095
- Rubinstein LJ (1986) The malformative central nervous system lesions in the central and peripheral form of neurofibromatosis: a neuropathological study of 22 cases. *Ann NY Acad Sci* 486:14-29
- Rubio M-P, Correa KM, Ramesh V et al. (1994) Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas. *Cancer Res* 54:45-47
- Ruggieri M, Huson SM (1999) The neurofibromatoses. An overview. *Ital J Neurol Sci* 20:89-108
- Ruggieri M, Moss C, Upadhyaya M, Huson SM (1999) Segmental/mosaic neurofibromatosis type 1 (NF1): a clinical study. *Eur J Paediatr Neurol* 3: A66-A67
- Rustgi AK, Xu L, Pinney D et al. (1995) Neurofibromatosis 2 gene in human colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 84:24-26
- Rutkowski JL, Kirk CJ, Lerner MA, Tennekoon GI (1995) Purification and expansion of human Schwann cells in vitro. *Nat Med* 1:80-83
- Rutkowski JL, Wu K, Gutmann DH, Boyer PJ, Legius E (2000) Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 9:1059-1066
- Ruttle M, Sarrazin J, Rangaratnam S et al. (1994a) Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 6:180-184
- Ruttle M, Xie YG, Han FY et al. (1994b) Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosomes Cancer* 10:122-130
- Ruttle M, Andermann AA, Phelan CM et al. (1996) Type of mutation in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) frequently determines severity of disease. *Am J Hum Genet* 59:331-342
- Saal HM, Schorry EK, Lovell AM et al. (1995) Racial differences in the prevalence of optic nerve gliomas in neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 57:A54
- Sah VP, Attardi LD, Mulligan GJ, Williams BO, Bronson RT, Jacks T (1995) A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet* 10:175-180
- Sainio M, Strachan T, Blomstedt G et al. (1995) Presymptomatic DNA and MRI diagnosis of neurofibromatosis 2 with mild clinical course in an extended pedigree. *Neurology* 45:1314-1322
- Sainio M, Zhao F, Heiska L et al. (1997) Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein colocalizes with ezrin and CD44 and associates with actin-containing cytoskeleton. *J Cell Sci* 110:2249-2260
- Sainz J, Huynh DDP, Figueroa K, Ragge NK, Baser ME, Pulst St-M (1994) Mutations of the neurofibromatosis type 2 gene and lack of the gene product in vestibular schwannomas. *Hum Mol Genet* 3:885-891
- Sainz J, Figueroa K, Baser ME, Mautner VF, Pulst SM (1995) High frequency of nonsense mutations in the NF2 gene caused by C to T transitions in five CGA codons. *Hum Mol Genet* 4:137-139
- Salyer WR, Salyer DC (1974) The vascular lesions of neurofibromatosis. *Angiology* 25:510-519
- Samuelsson B, Akesson HO (1988) Relative fertility and mutation rate in neurofibromatosis. *Hereditas* 108:169-171
- Samuelsson B, Akesson HO (1989) Neurofibromatosis in Gothenburg, Sweden. *Neurofibromatosis* 2:107-115
- Sanson M, Marineau C, Desmaze C et al. (1993) Germline deletion in a neurofibromatosis type 2 kindred inactivates the NF2 gene and a candidate meningioma locus. *Hum Mol Genet* 2:1215-1220
- Sarfara M, Huson SM, Edwards JH (1987) An exclusion map for von Recklinghausen neurofibromatosis. *J Med Genet* 24:515-520
- Sasaki T, Arai K, Nagai Y (1992) Growth and collagen synthesis of cultured neurofibroma fibroblasts. *J Dermatol* 19:598-601
- Sawada S, Florell S, Purandare SM, Ota M, Stephens K, Viskochil D (1996) Identification of NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofibroma. *Nat Genet* 14:110-112
- Scheele JS, Rhee JM, Boss GR (1995) Determination of absolute amounts of GDP and GTP bound to Ras in mammalian cells: comparison of parental and Ras-overproducing NIH 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1097-1100
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W et al. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277:333-338
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Wiesmüller L et al. (1998) Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications. *EMBO J* 17:4313-4327
- Scheurlen WG, Senf L (1995) Analysis of the GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in childhood brain tumors. *Int J Cancer* 64:234-238
- Schmidt MA, Michels VV, Dewald GW (1987) Cases of neurofibromatosis with rearrangements of chromosome 17 involving band 17q11.2. *Am J Med Genet* 28:771-777
- Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO (1999) Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 17:269-278
- Schmucker B, Ballhausen WG, Kressel M (1997) Subcellular localization and expression pattern of the neurofibromatosis type 2 protein merlin/schwannomin. *Eur J Cell Biol* 72:46-53
- Schmucker B, Tang Y, Kressel M (1999) Novel alternatively spliced isoforms of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor are targeted to the nucleus and cytoplasmic granules. *Hum Mol Genet* 8:1561-1570
- Scoles DR, Baser ME, Pulst SM (1996) A missense mutation in the neurofibromatosis 2 gene occurs in patients with mild and severe phenotypes. *Neurology* 47:544-546



- Scoles DR, Huynh DP, Morcos PA et al. (1998) Neurofibromatosis 2 tumour suppressor schwannomin interacts with betaII-spectrin. *Nat Genet* 18:354-359
- Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726-735
- Seizinger BR, Martuza RL, Gusella JF (1986) Loss of genes on chromosome 22 in tumorigenesis of human acoustic neuroma. *Nature* 322:644-647
- Seizinger BR, Rouleau GA, Lane AH et al. (1987a) Linkage analysis in von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) with DNA markers for chromosome 17. *Genomics* 1:346-348
- Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ et al. (1987b) Genetic linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene. *Cell* 49:589-594
- Seizinger BR, Monte S de la, Atkins L, Gusella JF, Martuza RL (1987c) Molecular genetic approach to human meningioma: loss of genes on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5419-5423
- Sekido Y, Pass HI, Bader S et al. (1995) Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. *Cancer Res* 55:1227-1231
- Seppälä MT, Sainio MA, Haltia MJ, Kinnunen JJ, Setälä KH, Jääskeläinen JE (1998) Multiple schwannomas: schwannomatosis or neurofibromatosis type 2? *J Neurosurg* 89:36-41
- Serra E, Puig S, Otero D et al. (1997) Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas. *Am J Hum Genet* 61:512-519
- Shannon KM, O'Connell P, Martin GA et al. (1994) Loss of the normal allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med* 336:597-601
- Shaw RJ, McClatchey AI, Jacks T (1998a) Regulation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor protein, merlin, by adhesion and growth arrest stimuli. *J Biol Chem* 273:7757-7764
- Shaw RJ, McClatchey AI, Jacks T (1998b) Localization and functional domains of the neurofibromatosis type II tumor suppressor, merlin. *Cell Growth Differ* 9:287-296
- Sheela S, Riccardi VM, Ratner N (1990) Angiogenic and invasive properties of neurofibroma Schwann cells. *J Cell Biol* 111:645-653
- Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M (1996) Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet* 33:2-17
- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H (1998) Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 58:604-608
- Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H (1994) Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 6:726-733
- Sherman L, Sleeman J, Dall P et al. (1996) The CD44 proteins in embryonic development and in cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 213:249-269
- Sherman L, Xu H-M, Geist RT et al. (1997a) Interdomain binding mediates tumor growth suppression by the NF2 gene product. *Oncogene* 15:2505-2509
- Sherman L, Jacoby LB, Lampe J et al. (1997b) CD44 expression is aberrant in benign Schwann cell tumors possessing mutations in the neurofibromatosis type 2, but not type 1, gene. *Cancer Res* 57:4889-4897
- Sherman L, Daston MM, Ratner N (1998) Neurofibromin: distribution, cell biology and role in neurofibromatosis type 1. In: Upadhyaya M, Cooper DN (eds) *Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype*. BIOS Scientific Publ, Oxford, pp 113-126
- Shu J, Lee JH, Harwalkar JA, Oh-Siskovic S, Stacey DW, Golubic M (1999) Adenovirus-mediated gene transfer of dominant negative Ha-Ras inhibits proliferation of primary meningioma cells. *Neurosurgery* 44:579-587
- Side L, Taylor B, Cayouette et al. (1997) Homozygous inactivation of the NF1 gene in bone marrow cells from children with neurofibromatosis type 1 and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med* 336:1713-1720
- Side LE, Emanuel PD, Taylor B et al. (1998) Mutations of the NF1 gene in children with juvenile myelomonocytic leukemia without clinical evidence of neurofibromatosis type 1. *Blood* 92:267-272
- Silva AJ, Frankland PW, Marowitz Z et al. (1997) A mouse model for the learning and memory deficits associated with neurofibromatosis type I. *Nat Genet* 15:281-284
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-148
- Simon M, Deimling A von, Larson JJ et al. (1995) Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 55:4696-4701
- Simons PC, Pietromonaco SF, Reczek D, Bretscher A, Elias L (1998) C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun* 253:561-565
- Skolnick MH, Ponder B, Seizinger B (1987) Linkage of NF1 to 12 chromosome 17 markers: a summary of eight concurrent reports. *Genomics* 1:382-383
- Skuse GR, Cappione AJ (1997) RNA processing and clinical variability in neurofibromatosis type 1 (NF1). *Hum Mol Genet* 6:1707-1712
- Skuse GR, Kosciulek BA, Rowley PT (1989) Molecular genetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis: loss of heterozygosity for chromosome 17. *Genes Chromosomes Cancer* 1:36-41
- Skuse GR, Kosciulek BA, Rowley PT (1991) The neurofibroma in von Recklinghausen neurofibromatosis has an unicellular origin. *Am J Hum Genet* 49:600-607
- Skuse GR, Cappione AJ, Sowden M, Metheny LJ, Smith HC (1996) The neurofibromatosis type 1 messenger RNA undergoes base-modification RNA editing. *Nucleic Acids Res* 24:478-486
- Slavc I, MacCollin MM, Ddunn M et al. (1995) Exon scanning for mutations of the NF2 gene in pediatric ependymomas, rhabdoid tumors and meningiomas. *Int J Cancer* 64:243-247
- Smith RW (1849, 1989) *A treatise on the pathology, diagnosis and treatment of neuroma*. Hodges and Smith, Dublin. *Clin Orthop* 245:3-9
- Smith G, Stanley LA, Sim E, Strange RC, Wolf CR (1995) Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility. *Cancer Surv* 25:27-65
- Sobel RA (1993) Vestibular (acoustic) schwannomas: histologic features in neurofibromatosis 2 and in unilateral cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 52:106-113
- Stangl AP, Wellenreuther R, Lenartz D et al. (1997) Clonality of multiple meningiomas. *J Neurosurg* 86:853-858
- Stark M, Assum G, Kaufmann D, Kehrer H, Krone W (1992) Analysis of segregation and expression of an identified

- mutation at the neurofibromatosis type 1 locus. *Hum Genet* 90:356-359
- Stemmer-Rachamimov AO, Xu L, Gonzalez-Agosti C et al. (1997) Universal absence of merlin, but not other ERM family members, in schwannomas. *Am J Pathol* 151:1649-1654
- Stemmer-Rachamimov AO, Nielsen GP, Rosenberg AE et al. (1998) The NF2 gene and merlin protein in human osteosarcomas. *Neurogenetics* 2:73-74
- Stephens K, Kayes L, Riccardi VM, Rising M, Sybert VP, Pagnon RA (1992) Preferential mutation of the neurofibromatosis type 1 gene in paternally derived chromosomes. *Hum Genet* 88:279-282
- Stewart HJS, Eccleston PA, Jessen KR, Mirsky R (1991) Interaction between cAMP elevation, identified growth factors, and serum components in regulating Schwann cell growth. *J Neurosci Res* 30:346-352
- Stocker KM, Baizer L, Coston T, Sherman L, Ciment G (1995) Regulated expression of neurofibromin in migrating neural crest cells of avian embryos. *J Neurobiol* 27:535-552
- Stokowski RP, Cox DR (2000) Functional analysis of the neurofibromatosis type 2 protein by means of disease-causing point mutations. *Am J Hum Genet* 66:873-891
- Streubel B, Latta E, Kehrer-Sawatzki H, Hoffmann GF, Fonnatsch C, Rehder H (1999) Somatic mosaicism of a greater than 1.7-Mb deletion of genomic DNA involving the entire NF1 gene as verified by FISH: further evidence for a contiguous gene syndrome in 17q11.2. *Am J Med Genet* 87:12-16
- Sundaram V, Lee JH, Harwalkar JA et al. (1997) Reduced expression of neurofibromin in human meningiomas. *Br J Cancer* 76:747-756
- Suzuki Y, Suzuki H, Kayama T et al. (1991) Brain tumors predominantly express the neurofibromatosis type 1 gene transcripts containing the 63 base insert in the region coding for GTPase activating protein-related domain. *Biochem Biophys Res Commun* 181:955-961
- Suzuki H, Takahashi K, Kubota Y, Shibahara S (1992) Molecular cloning of a cDNA coding for neurofibromatosis type 1 protein isoform lacking the domain related to ras GTPase-activating protein. *Biochem Biophys Res Commun* 187:984-990
- Suzuki H, Ozawa N, Taga C, Kano T, Hattori M, Sakaki Y (1994) Genomic analysis of a NF1 related pseudogene on human chromosome 21. *Gene* 147:277-280
- Swift M, Sholman L, Perry M, Chase C (1976) Malignant neoplasms in the families of patients with ataxia-telangiectasia. *Cancer Res* 36:209-215
- Taguchi T, Jhanwar SC, Siegfried JM, Keller SM, Testa JR (1993) Recurrent deletions of specific chromosomal sites in 1p, 3p, 6q, and 9p in human malignant mesothelioma. *Cancer Res* 53:4349-4355
- Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A et al. (1997) Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* 272:23.371-23.375
- Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A et al. (1998) Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl. *Oncogene* 16:3279-3284
- Takahashi T, Ueno H, Shibuya M (1999) VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 18:2221-2230
- Takekuma H, Izawa I, Lee PS, Safdar N, Levin VA, Saya H (1994) Detection of cellular proteins that interact with the NF2 tumor suppressor gene product. *Oncogene* 9:2135-2144
- Takeuchi K, Sato N, Kasahara H et al. (1994) Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J Cell Biol* 125:1371-1384
- Tanaka K, Nakafuku M, Tamanoi F, Kaziro Y, Matsumoto K, Toh-e A (1990b) IRA2, a second gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein with a domain homologous to mammalian ras GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol* 10:4303-4313
- Teixeira F, Martinez-Palomo A, Riccardi VM, Fernandez-Diez J (1988) Vascular changes in cutaneous neurofibromas. *Neurofibromatosis* 1:5-16
- Tenan M, Colombo BM, Cajola L, Pollo B, Broggi G, Finocchiaro G (1993) Low frequency of NF1 gene mutations in malignant gliomas. *Eur J Cancer* 29:1217-1218
- Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S et al. (1999) Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene; ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet* 64:1617-1631
- The I, Murthy AE, Hannigan GE et al. (1993) Neurofibromatosis type 1 gene mutations in neuroblastoma. *Nat Genet* 3:62-66
- The I, Hannigan GE, Cowley GS et al. (1997) Rescue of a *Drosophila* NF1 mutant phenotype by protein kinase A. *Science* 276:791-794
- Theiler R, Stocker H, Boltshauser E (1991) Zur Klassifizierung atypischer Neurofibromatose-Formen. *Schweiz Med Wochenschr* 121:446-455
- Thiel G, Marczynek K, Neumann R, Witkowski R, Marchuk D, Nürnberg P (1995) Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in gliomas and primitive neuroectodermal tumors. *Anticancer Res* 15:2495-2500
- Tikoo A, Varga M, Ramesh V, Gusella J, Maruta H (1994) An anti-Ras function of neurofibromatosis type 2 gene product (NF2/Merlin). *J Biol Chem* 269:23.387-23.390
- Tocque B, Delumeau I, Parker F, Maurier F, Multon MC, Schweighoffer F (1997) Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras. *Cell Signal* 9:153-158
- Trahey M, McCormick F (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238:542-545
- Treisman R (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 8:205-215
- Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL et al. (1993) A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 72:791-800
- Tsai M-H, Yu C-L, Wie F-S, Stacey DW (1989) The effect of GTPase activating protein upon Ras is inhibited by mitogenically responsive lipids. *Science* 243:522-526
- Tsukita S, Yonemura S (1999) Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* 274:34.507-34.510
- Tsukita S, Oishi K, Sato N, Sagara J, Kawai A, Tsukita S (1994) ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 126:391-401
- Twist EC, Rutledge MH, Rousseau M et al. (1994) The neurofibromatosis type 2 gene is inactivated in schwannomas. *Hum Mol Genet* 3:147-151
- Uchida T, Matozaki T, Suzuki T et al. (1992) Expression of two types of neurofibromatosis type 1 gene transcripts in

- gastric cancers and comparison of GAP activities. *Biochem Biophys Res Commun* 187:332–339
- Uchida T, Wada C, Ishida H et al. (1995) Infrequent involvement of mutations on neurofibromatosis type 1, H-ras, K-ras and N-ras in urothelial tumors. *Urol Int* 55:63–67
- Ueki K, Wen-Bin C, Narita Y, Asai A, Kirino T (1999) Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Res* 59:5995–5998
- Uitto J, Matsuoka LY, Chu ML, Pihlajaniemi T, Prockop DJ (1986) Connective tissue biochemistry of neurofibromas. *Ann NY Acad Sci* 486:271–286
- Ullrich A, Gray A, Berman C, Dull TJ (1983) Human  $\beta$  nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* 303:821–825
- Upadhyaya M, Cooper DN (1998) The mutational spectrum in neurofibromatosis 1 and its underlying mechanisms. In: Upadhyaya M, Cooper DN (eds) *Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype*. BIOS Scientific Publ, Oxford, pp 65–82
- Upadhyaya M, Shen M, Cherryson A et al. (1992) Analysis of mutations at the neurofibromatosis 1 (NF1) locus. *Hum Mol Genet* 1:735–740
- Upadhyaya M, Osborn M, Maynard J, Harper P (1996) Characterization of six mutations in exon 37 of neurofibromatosis type 1 gene. *Am J Med Genet* 67:421–423
- Upadhyaya M, Osborn MJ, Maynard J, Kim MR, Tamanoi F, Cooper DN (1997) Mutational and functional analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum Genet* 99:88–92
- Varnhagen CK, Lewin S, Das JP, Bowen P, Ma K, Klimek M (1988) Neurofibromatosis and psychological processes. *J Dev Behav Pediatr* 9:257–265
- Verhoef S, Bakker L, Tempelaars AM et al. (1999) High rate of mosaicism in tuberous sclerosis complex. *Am J Hum Genet* 64:1632–1637
- Virchow R (1847) Ueber die reform der pathologischen und therapeutische Anschauungen durch die mikroskopischen Untersuchungen. *Virchows Arch* 1:207–255
- Viskochil DH (1998) Gene structure and expression. In: Upadhyaya M, Cooper DN (eds) *Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype*. BIOS Scientific Publ, Oxford, pp 39–56
- Viskochil D, Carey JC (1994) Alternate and related forms of the neurofibromatosis. In: Huson SM, Hughes RAC (eds) *The neurofibromatosis: a pathogenetic and clinical overview*. Chapman & Hall, London New York, pp 445–474
- Viskochil D, Buchberg AM, Xu G et al. (1990) Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 62:187–192
- Viskochil D, Cawthon R, O'Connell P et al. (1991) The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Mol Cell Biol* 11:906–912
- Vogel KS, Parada LF (1998) Sympathetic neuron survival and proliferation are prolonged by loss of p53 and neurofibromin. *Mol Cell Neurosci* 11:19–28
- Vogel KS, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF (1995) Loss of neurofibromin results in neurotrophin-independent survival of embryonic sensory and sympathetic neurons. *Cell* 82:733–742
- Vogel KS, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, Meyers K, Rushing EJ, Parada LF (1999) Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. *Science* 286:2176–2179
- Von Deimling A, Louis DN, Menon AG et al. (1993) Deletions on the long arm of chromosome 17 in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 86:81–85
- Von Deimling A, Larson J, Wellenreuther R et al. (1999) Clonal origin of recurrent meningiomas. *Brain Pathol* 9:645–650
- Von Recklinghausen FD (1882) Ueber die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuroomen. Hirschwald, Berlin
- Vos JM (1995) DNA repair mechanisms: impact on human diseases and cancer. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Waardenburg PJ (1918) Heterochromie en melanosis. *Ned Tijdschr Geneesk* 2:1453–1455
- Wallace MR, Marchuk DA, Anderson LB et al. (1990) Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249:181–186
- Wallace MR, Andersen LB, Saulino AM, Gregory PE, Glover TW, Collins FS (1991) A de novo alu insertion results in neurofibromatosis type 1. *Nature* 353:864–866
- Wallace MR, Rasmussen SA, Lim IT, Gray BA, Zori RT, Muir D (2000) Culture of cytogenetically abnormal Schwann cells from benign and malignant NF1 tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 27:117–123
- Wang Q, Lasset C, Desseigne F et al. (1999) Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children. *Cancer Res* 59:294–297
- Weiss B, Bollag G, Shannon K (1999) Hyperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* 89:14–22
- Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D et al. (1995) Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 146:827–832
- Wellenreuther R, Waha A, Vogel Y et al. (1997) Quantitative analysis of neurofibromatosis type 2 gene transcripts in meningiomas supports the concept of distinct molecular variants. *Lab Invest* 77:601–606
- Welling DB, Guida M, Goll F et al. (1996) Mutational spectrum in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic and familial schwannomas. *Hum Genet* 98:189–193
- Werb Z (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91:439–442
- Wickens M (1990) How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem Sci* 15:277–281
- Wiestler OD, Radner H (1994) Pathology of neurofibromatosis type 1 and 2. In: Huson SM, Hughes RAC (eds) *The neurofibromatosis. A pathogenetic and clinical overview*. Chapman S. cerevisiae. *Cell* 62:835–841
- Xu G, O'Connell P, Stevens J, White R (1992a) Characterization of human adenylate kinase 3 (AK3) cDNA and mapping of the AK3 pseudogene to an intron of the NF1 gene. *Genomics* 13:537–542
- Xu W, Mulligan LM, Ponder MA et al. (1992b) Loss of NF1 alleles in pheochromocytomas from patients with type I neurofibromatosis. *Genes Chromosomes Cancer* 4:337–342
- Yaegashi S, Sachse R, Ohuchi N, Mori S, Sekiya T (1995) Low incidence of a nucleotide sequence alteration of the neurofibromatosis 2 gene in human breast cancers. *Jpn J Cancer Res* 86:929–933
- Yang P, Grufferman S, Khoury MJ et al. (1995) Association of childhood rhabdomyosarcoma with neurofibromatosis type 1 and birth defects. *Genet Epidemiol* 12:467–474

- Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM (1996) Progression of coronary atherosclerosis is associated with a genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 271:13.055–13.060
- Ye F, Cayre YE, Thang M-N (1999) Evidence for a novel Ras-GAP-associated protein of 105 kDa in both mature trophoblasts and differentiating choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 263:523–527
- Ylä-Outinen H, Aaltonen V, Björkstrand AS et al. (1998) Up-regulation of tumor suppressor protein neurofibromin in normal human wound healing and in vitro evidence for platelet derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1) elicited increase in neurofibromin mRNA steady-state levels in dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 110:232–237
- Yu C-L, Tsai M-H, Stacey DW (1988) Cellular ras activity and phospholipid metabolism. *Cell* 52:63–71
- Zang KD (1982) Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 6:249–274
- Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216:84–85
- Zankl H, Zang KD (1972) Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. *Humangenetik* 14:167–169
- Zhang Y, Derynck R (1999) Regulation of smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Cell Biol* 9:274–279
- Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG (1998a) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and the p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92:725–734
- Zhang Y, Vik TA, Ryder JW et al. (1998b) Nf1 regulates hematopoietic progenitor cell growth and ras signaling in response to multiple cytokines. *J Exp Med* 187:1893–1902
- Zhu J, Frosch MP, Busque L et al. (1995) Analysis of meningiomas by methylation- and transcription-based clonality assays. *Cancer Res* 55:3865–3872
- Zlotogora J (1993) Mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis: an hypothesis. *Am J Med Genet* 46:182–184
- Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ (1998) Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* 17:1415–1438
- Zucman-Rossi J, Legoux P, Der Sarkissian H et al. (1998) NF2 gene in neurofibromatosis type 2 patients. *Hum Mol Genet* 7:2095–2101