

## Förderungsantrag – Nothing is Forever

**„Kann die Therapie mit Retinsäure das Wachstum von NF1 assoziierten humanen malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST) im Mausmodell hemmen?“**

### Antragstellerin / Institution

PD Dr. med. Anja Harder

Fachärztin für Neuropathologie, Email: anja.harder@ukmuenster.de, Institut für Gewebediagnostik am MVZ des HELIOS Klinikums Emil von Behring / AG Neurofibromatosen, Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Münster

### Fragestellung

Die Lebenserwartung von Patienten mit Neurofibromatose Typ1 (NF1) ist aufgrund bösartiger Tumoren wie z.B. maligner peripherer Nervenscheidentumoren (MPNST) reduziert. Die aktuellen Therapieoptionen dieser Tumoren sind auch international nicht zufriedenstellend. Daher wollen wir *all-trans* Retinsäure (ATRA) als potentiell Therapeutikum bzw. als Ergänzungstherapie für NF1-assoziierte MPNST im Mausmodell testen. Hierzu werden menschliche Zellen aus MPNST-Zelllinien in Mäuse transplantiert. Die Tiere, die dann humane Tumoren entwickeln, werden mit ATRA therapiert, wobei die Tumorremission mittels Bildgebung dokumentiert wird. Das Medikament ist bereits bei anderen Krebserkrankungen erprobt und zugelassen, so dass eine erfolgreiche Therapie von MPNST eine wichtige Alternative zur chirurgischen Intervention dieser Tumoren darstellen würde. Helfen Sie uns diese Tumoren zu stoppen.

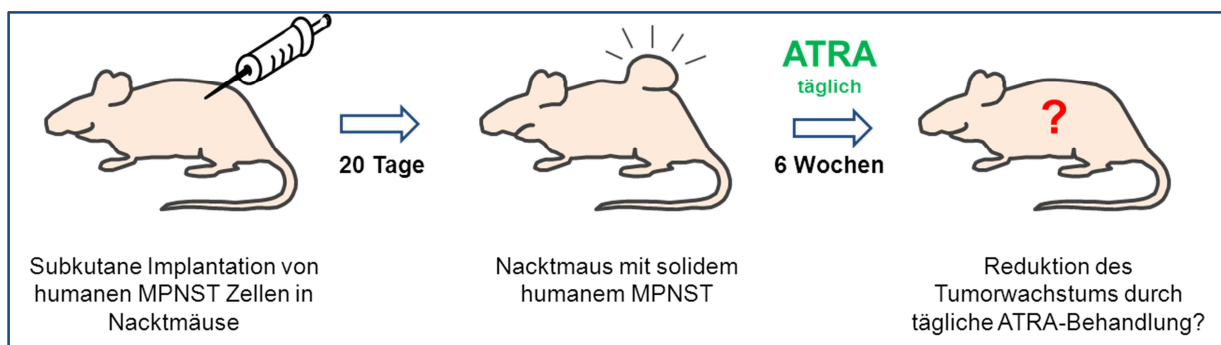


Abbildung 1: Schematische Darstellung der geplanten tierexperimentellen Versuche.

### Stand der Forschung und eigene Vorarbeiten

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) gehört zu den häufigsten, genetisch bedingten Erkrankungen und ist mit einer Manifestation von multiplen Nervenscheidentumoren charakterisiert. Insbesondere maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST) führen zu einer signifikant erhöhten Mortalität der NF1 Patienten.

Sie stellen bis zu 10% aller Weichteilsarkome dar und wachsen extrem aggressiv und infiltrativ<sup>1-5</sup>. Etwa 50% aller MPNST sind mit der NF1 assoziiert<sup>6-9</sup>. Aufgrund des bösartigen Verhaltens stellt bislang lediglich die chirurgische Therapie eine kurative Möglichkeit dar, die aber oft mit bleibenden Schäden verbunden ist. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit MPNST liegt trotz der Kombination mit Radiotherapie und Chemotherapie bei nur 35-50%<sup>4,10-12</sup>. Mehrere Studien belegen eine schlechtere krankheitsspezifische Überlebensrate von 16-38% für NF1-Patienten mit MPNST im Vergleich zu 42-57% bei sporadischen Fällen<sup>11,13,14</sup>. Aktuelle klinische Studien (SARC016) testen die Kombinationstherapie von Angiogenese-Hemmern (Avastin) mit mTOR-Inhibitoren (Everolimus), da Therapien mit Tyrosinkinaseinhibitoren leider einen nur geringen Therapieerfolg gezeigt haben. Weitere effektive Therapieoptionen besonders für die NF1- assoziierten Tumoren sind dringend erforderlich.

*Eigene Voruntersuchungen* konnten eine differentielle Expression des Retinsäure transportierenden Proteins CRABP2 (*cellular retinoic acid binding protein 2*) in Subtypen NF1-assoziiierter peripherer Nervenscheidentumoren nachweisen, was auf eine veränderte Retinsäure-Signalgebung in diesen Tumoren hinweist. Retinsäure ist ein essentieller Regulator während der Embryonalentwicklung und der neuronalen Differenzierung und hat antikanzerogene Eigenschaften<sup>15-20</sup>.

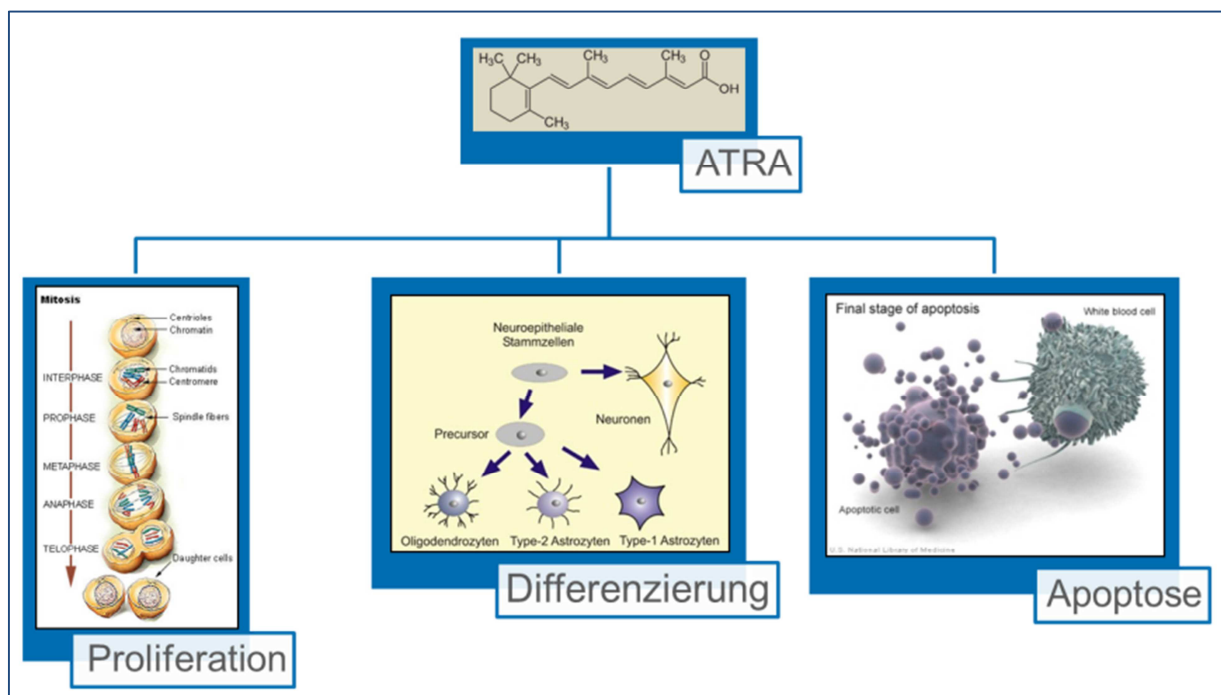


Abbildung 2: Retinsäure reguliert wichtige zelluläre Prozesse wie beispielsweise Zellteilung<sup>21</sup>, Differenzierung zu speziellen Zellarten<sup>22</sup> und Zelltod<sup>23</sup>.

Auch CRABP2 hat neben der Funktion als Transporter und Mediator für Retinsäure antiproliferative Eigenschaften<sup>24</sup>. Wir untersuchen in unserer Arbeitsgruppe derzeit die Rolle von CRABP2 in NF1-assoziierten Nervenscheidentumoren sowie den Transport von Retinsäure und die damit verbundenen Wechselwirkungen.

Die Effekte der ATRA-Therapie auf MPNST haben wir bereits intensiv in der Zellkultur untersucht und international vorgestellt, weshalb wir nun positive therapeutische Effekte im Tiermodell erwarten, die klinische Studien nach sich ziehen können: Um der bekannten Heterogenität der MPNSTs gerecht zu werden, haben wir die Effekte der ATRA in drei etablierten MPNST-Zelllinien untersucht, wobei sich *eine signifikante Hemmung der Proliferation und Migration sowie eine Induktion von Differenzierung und Apoptose* in allen drei Zelllinien zeigte, alles Prozesse, die als therapie-relevante Charakteristika *in vitro* bewertet werden. Diese Ergebnisse legen ATRA als potentielles Therapeutikum nahe, zumal ATRA bereits erfolgreich für die Behandlung verschiedener Krebsarten in der Differenzierungstherapie verwendet wird.

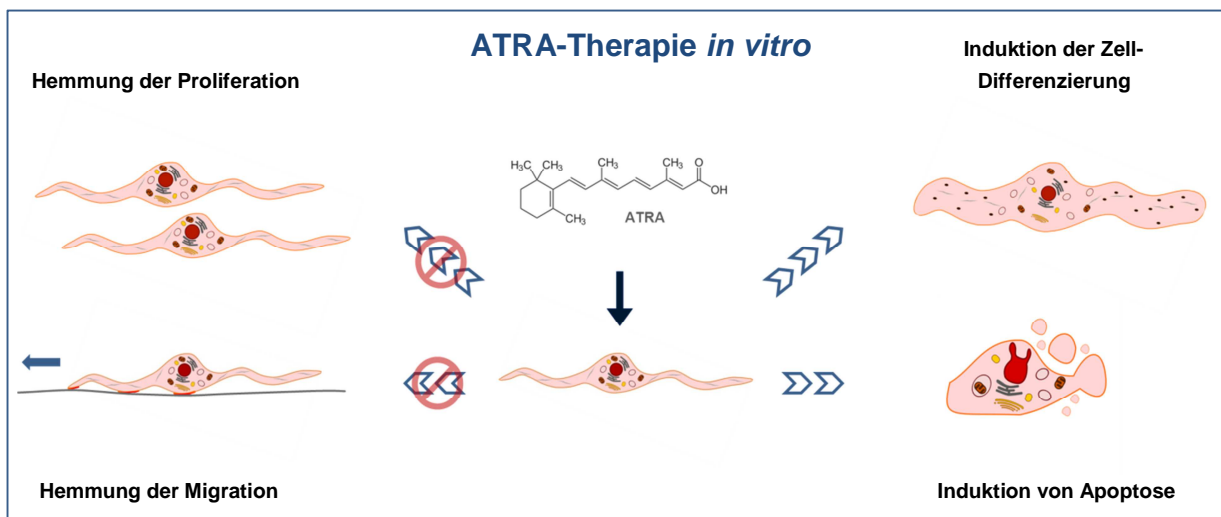


Abbildung 3: Effekte der ATRA-Therapie auf Tumor-Schwann Zellen *in vitro*. Schwann Zellen zeichnen sich durch ihre bipolare, spindelförmige Morphologie aus wie hier schematisch dargestellt wurde. Die Behandlung induziert Therapie-relevante Prozesse in Tumor-Schwann Zellen, wie beispielsweise die Hemmung des Tumorwachstums (Proliferation), die Hemmung des Metastasierungspotentials (Migration), die Induktion des Zelltods (Apoptose) und die Induktion der Differenzierung.

### Geplantes Vorgehen

Die bereits in der Zellkultur untersuchten Zellen aus drei MPNST-Zelllinien (es handelt sich um etablierte MPNST-Zelllinien, die aus humanen NF1 assoziierten MPNSTs generiert wurden und die seit langem in der Neurofibromatose-Forschung in Mausmodellen für MPNST Verwendung finden<sup>25,26</sup>) werden den Nacktmäusen in die Flanke unter die Haut gespritzt. Es werden verschiedene Zellzahlen getestet, um zu gewährleisten, dass sich nach wenigen Tagen stetig wachsende Tumoren bilden.

Sobald sich ein 5 mm großer Tumor gebildet hat, werden die Mäuse mit ATRA behandelt. In einem Vorversuch wird die optimale verträgliche Dosis der ATRA bestimmt. Während der Therapie wird zweimal wöchentlich das Tumolvolumen ermittelt, um das Tumorstadium mit dem unbehandelten Mäuse zu vergleichen. Nach sechswöchiger Therapie wird der Versuch beendet. Die Tumorzellen aus den Tumoren werden in der Zellkultur rekultiviert, um vergleichende molekularbiologische sowie epigenetische Untersuchungen der mit ATRA behandelten, der nicht mit ATRA behandelten und der ursprünglich applizierten Tumorzellen zu ermöglichen. Es können so therapieassoziierte Veränderungen in den Zellen identifiziert werden, die möglicherweise zu einem Wachstumstop oder Zelltod in den Tumoren geführt haben. Außerdem sollen Kombinationstherapien im Zellkulturmodell (z.B. mit MEK-Inhibitoren) untersucht werden, die den Therapieerfolg verbessern könnten.

#### Literatur

1. Lewis JJ, Leung D, Woodruff JM, Brennan MF. Retroperitoneal soft-tissue sarcoma: analysis of 500 patients treated and followed at a single institution. *Ann Surg.* 1998; 228:355–65.
2. Pisters PW, Leung DH, Woodruff J, Shi W, Brennan MF. Analysis of prognostic factors in 1,041 patients with localized soft tissue sarcomas of the extremities. *J Clin Oncol.* 1996; 14:1679–89.
3. Stucky CC, Johnson KN, Gray RJ, Pockaj BA, Ocal IT, Rose PS, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST): the Mayo Clinic experience. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19:878–85.
4. Zou C, Smith KD, Liu J, Lahat G, Myers S, Wang WL, et al. Clinical, pathological, and molecular variables predictive of malignant peripheral nerve sheath tumor outcome. *Ann Surg.* 2009; 249:1014–22.
5. Grobmyer SR, Reith JD, Shahlaee A, Bush CH, Hochwald SN. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor: molecular pathogenesis and current management considerations. *J Surg Oncol.* 2008; 97:340–9.
6. Evans DG, Baser ME, McGaughran J, Sharif S, Howard E, Moran A. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 2002; 39:311–4.
7. Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS. 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.* 1989; 26:704–11.
8. Sorensen SA, Mulvihill JJ, Nielsen A. Long-term follow-up of von Recklinghausen neurofibromatosis. Survival and malignant neoplasms. *N Engl J Med.* 1986; 314:1010–5.
9. D'Agostino AN, Soule EH, Miller RH. Primary malignant neoplasms of nerves (malignant neurilemmomas) in patients without manifestations of multiple neurofibromatosis (Von Recklinghausen's disease). *Cancer.* 1963; 16:1003–14.
10. Anghileri M, Miceli R, Fiore M, Mariani L, Ferrari A, Mussi C, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumors: prognostic factors and survival in a series of patients treated at a single institution. *Cancer.* 2006; 107:1065–74.
11. Carli M, Ferrari A, Mattke A, Zanetti I, Casanova M, Bisogno G, et al. Pediatric malignant peripheral nerve sheath tumor: the Italian and German soft tissue sarcoma cooperative group. *J Clin Oncol.* 2005; 23:8422–30.
12. Ducatman BS, Scheithauer BW, Piegras DG, Reiman HM, Ilstrup DM. Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer.* 1986; 57:2006–21.
13. Sordillo PP, Helson L, Hajdu SI, Magill GB, Kosloff C, Golbey RB, et al. Malignant schwannoma—clinical characteristics, survival, and response to therapy. *Cancer.* 1981; 47:2503–9.
14. Porter DE, Prasad V, Foster L, Dall GF, Birch R, Grimer RJ. Survival in malignant peripheral nerve sheath tumours: a comparison between sporadic and neurofibromatosis type 1-associated tumours. *Sarcoma.* 2009; 756395.
15. Niederreither K, Dolle P. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 9: 541-553, 2008

16. Warrell RP, Jr., de The H, Wang ZY, Degos L. Acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 329: 177-189, 1993
17. Iyengar TD, Ng S, Lau CC, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC. Differential expression of NF1 type I and type II isoforms in sporadic borderline and invasive epithelial ovarian tumors. *Oncogene* 18: 257-262, 1999
18. Jetten AM, Kim JS, Sacks PG, Rearick JI, Lotan D, Hong WK, Lotan R. Inhibition of growth and squamous-cell differentiation markers in cultured human head and neck squamous carcinoma cells by beta-all-trans retinoic acid. *Int J Cancer* 45: 195-202, 1990
19. Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, Ray SK. Combination of all-trans retinoic acid and taxol regressed glioblastoma T98G xenografts in nude mice. *Apoptosis* 12: 2077-2087, 2007
20. Donato LJ, Suh JH, Noy N. Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling. *Cancer Res* 67: 609-615, 2007
21. [http://www.repropeedia.org/sites/default/files/mitosis-final\\_0.jpg](http://www.repropeedia.org/sites/default/files/mitosis-final_0.jpg)
22. <http://www.aktuelle-wochenschau.de/2005/images/woche29/abb3.jpg>
23. <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/apoptosismacrophage.jpg>
24. Donato LJ, Noy N. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Res* 65: 8193-8199, 2005
25. Demestre M, Messerli SM, Celli N, Shahhossini M, Kluwe L, Mautner V, Maruta H. CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phytother Res.* 2009 Feb;23(2):226-30.
26. Hirokawa Y, Nheu T, Grimm K, Mautner V, Maeda S, Yoshida M, Komiyama K, Maruta H. Sichuan pepper extracts block the PAK1/cyclin D1 pathway and the growth of NF1-deficient cancer xenograft in mice. *Cancer Biol Ther.* 2006 Mar;5(3):305-9. Epub 2006 Mar 12.