

David Emanuel Reuß
Dr. med.

Neurofibromin hemmt das Tumorzellwachstum durch RasGAP- unabhängige Suppression des Klasse II Transaktivators

Promotionsfach: Pathologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Andreas von Deimling

Das Tumorsyndrom Neurofibromatose Typ 1 wird durch Mutationen des Tumorsuppressorgens *NF1* verursacht, welches für das Ras spezifische GTPase aktivierende Protein (RasGAP) Neurofibromin kodiert. Neurofibromin geht auch in verschiedenen sporadischen Malignomen verloren. Obwohl die RasGAP Aktivität die einzige biochemisch charakterisierte Funktion von Neurofibromin darstellt, werden zusätzliche Funktionen vermutet. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, deren Expression durch Neurofibromin reguliert wird.

Mittels Subtraktiver Suppressionshybridisierung wurden cDNA Fragmente angereichert, die in *NF1*^{+/-} und *NF1*^{-/-} Schwanzzellen differentiell exprimiert werden. Durch Klonierung und Sequenzierung der Fragmente konnte eine Liste von möglicherweise Neurofibromin abhängig regulierten Genen erstellt werden. Die in einem cDNA-Array am stärksten differentiell exprimierten Gene gehörten zur MHC Klasse II (MHCII). Weitergehende Untersuchungen zeigten eine starke Expression von MHCII und der MHCII- assoziierten invarianten Kette (CD74) in *NF1*^{-/-} Schwanzzellen und in der *NF1*^{-/-} Glioblastomzelllinie LN229. *NF1*^{+/-} und *NF1*^{+/+} Schwanzzellen wiesen hingegen nur eine schwache Expression dieser Proteine *in vitro* auf. Mehrfachmarkierungen von Neurofibromgewebe zeigten eine *in vivo* MHCII/CD74 Expression nur in Neurofibromin negativen Schwanzzellen.

Die Re-Expression des gesamten Neurofibromins, nicht jedoch seiner RasGAP-Domäne, führte zu einer Herunterregulierung von MHCII und CD74 in LN229 und *NF1*^{-/-} Schwanzzellen. Die Suppression von MHCII/CD74 war mit reduzierten Mengen des Klasse II Transaktivators (CIITA) assoziiert. Eine Mutante von Neurofibromin ohne RasGAP Aktivität behielt die MHCII/CD74 regulierende Funktion. Die Hemmung der Ras abhängigen Mek/ERK und Pi3K/Akt Signalwege konnte die MHCII Expression in *NF1*^{-/-} Schwanzzellen nicht reduzieren.

Auch eine Modulation des cAMP/Proteinkinase A (PKA) Signalweges hatte keinen Einfluss auf die MHCII Expression.

Die Herunterregulierung von CIITA in LN229 Zellen mit spezifischer siRNA unterdrückte die Expression von MHCII/CD74 und hemmte das verankerungsunabhängige Wachstum im Weichagar. Die Überexpression von CIITA rettete die MHCII/CD74 Expression und das Wachstum im Weichagar, was den Beitrag von CIITA zum malignen Phänotyp von LN229 Zellen zeigte. Die Suppression von CIITA war mit einer verminderten Phosphorylierung der ERK Kinasen assoziiert. Herunterregulierung von CD74 führte ebenfalls zu reduzierter ERK Phosphorylierung und zu signifikant weniger Kolonien im Weichagar, so dass zu vermuten war, dass die Wirkungen von CIITA durch CD74 vermittelt werden. Der onkogene Makrophagen-Migrations-inhibitorische Faktor (MIF) initiiert CD74 vermittelte Signale, welche zur Aktivierung des Ras/ERK Pfades führen. Schwannzellen und Gliomzellen sezernieren MIF, was eine autokrine Stimulation vermuten ließ.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Neurofibromin die MHCII/CD74 Expression mittels CIITA durch einen RasGAP und PKA unabhängigen Weg kontrolliert und dass die Überexpression dieser Proteine in *NFI* defizienten Glioblastomzellen zum Tumorzellwachstum beiträgt. Die CIITA/CD74/MIF Signalachse kommt somit als potentiell therapeutisches Ziel für Neurofibromin defiziente Tumorzellen in Betracht.