

**Differentielle Modulation des Malignen Peripheren Nervscheiden-
Tumorwachstums durch Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Stephanie Nicole Drissel
aus Lippstadt

2006

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. U. Schmitz
2. Gutachter: Professor Dr. Ch. Grohé

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.10.2006

Medizinische Poliklinik
Direktor: Professor Dr. H. Vetter
in Kooperation mit dem
Neuropathologischen Institut
Direktor: Professor Dr. T. Pietsch
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGEN.....	8
1 EINLEITUNG.....	11
1.1 Neurofibromatose Typ1.....	13
<i>1.1.1 Klinische Merkmale der Neurofibromatose.....</i>	<i>13</i>
<i>1.1.2 Molekularbiologie der NF1</i>	<i>18</i>
1.1.2.1 Das <i>NF1</i> Gen.....	18
1.1.2.1.1 <i>NF1</i> als klassischer Tumorsuppressor.....	19
1.1.2.2 Neurofibromin.....	20
<i>1.1.3 Tiermodelle.....</i>	<i>23</i>
<i>1.1.4 Wachstumsfaktoren und NF1.....</i>	<i>24</i>
1.2 Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren.....	25
1.2.1 Essentielle Fettsäuren.....	25
1.2.2 Funktionen der Omega-3 Fettsäuren.....	26
1.2.3 FABP-7, ein DHA Rezeptor	30
1.3 Caspase und Apoptose.....	30
1.4 Mitogen aktivierte Protein Kinase.....	31
1.5 Aufgabenstellung der Arbeit.....	34
2 MATERIAL UND METHODEN.....	36
2.1 Material.....	36
2.1.1 Fettsäurepräparation.....	36
2.1.2 Zellkultur.....	36
2.1.2.1 Wachstumsfaktoren	37
2.1.2.2 Zellen	37
2.1.2.3 Farbstoffe.....	38
2.1.2.4 Lysierungslösungen.....	38
2.1.3 Antikörper	38
2.1.3.1 Primäantikörper	38

2.1.3.2 Sekundärantikörper	39
2.1.4 PCR-Reagenzien	39
2.2 Methoden	40
2.2.1 Präparation der Fettsäuren	40
2.2.2 Zellkultur	40
2.2.3 Proliferationsassay	40
2.2.4 Detektion der Apoptose	41
2.2.5 Western-Blot Analyse	41
2.2.6 Tumor Wachstums Assays	42
2.2.7 PCR-Analyse	42
2.2.8 Immunhistochemie	42
3 ERGEBNISSE	44
3.1 Hochdosiertes DHA induziert die Apoptose von murinen und humanen MPNST-Zellen	44
3.2 DHA hemmt die Stimulation der MPNST-Zellen durch Wachstumsfaktoren	47
3.3 DHA und AA zeigen eine reziproke Aktivität	50
3.4 DHA induziert die Phosphorylierung von ERK und die Aktivität von Caspase in MPNST-Zellen	52
3.5 Das Tumorwachstum <i>in vivo</i> wird durch DHA gehemmt	54
3.6 DHA Rezeptorexpression in Neurofibromen und in MPNST	55
4 DISKUSSION	58
4.1 Dosisabhängiger Effekt der Omega-3 Fettsäure auf humane und murine MPNST-Zellen	58
4.2 DHA kehrt die Wachstumsstimulation der MPNST-Zellen um	60
4.3 DHA beeinflusst die ERK-Phosphorylierung und die Caspase-Aktivierung in MPNST-Zellen	62
4.4 DHA und AA: Reziproke Aktivität auf das MPNST Zellwachstum	67
4.6 DHA Rezeptorexpression in Neurofibromen und in MPNST	70

4.7 DHA als möglicher Regulator der MPNST-Entwicklung während der Schwangerschaft	70
5 ZUSAMMENFASSUNG	72
6 LITERATURVERZEICHNIS	74
DANKSAGUNG	97
LEBENS LAUF	98

ABKÜRZUNGEN

AA	Arachidonsäure
AP-1	engl. Activator Protein-1
bFGF	engl. Basic fibroblast growth factor
BLBP	engl. Brain lipid binding protein
Cas-3	Caspase-3
6-CF	6-Carboxyfluoresceindiacetat
COX	Cyclooxygenase
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	engl. Dulbecco's modified Eagle Medium
EGF	engl. Epidermal growth factor
EGFR	engl. Epidermal growth factor receptor
EPA	Eicosapentaensäure
ERK	Extrazelluläre Rezeptorstimulierte Kinase
engl.	englisch
FABP-7	engl. Fatty-acid binding protein 7
FCS	engl. Fetal calf serum
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GS-F	Granulozyten-stimulierender Faktor
GTP	Guanosin Triphosphat
GTPase	Guanosin Triphosphatase
HGF	engl. Hepatic growth factor
HRP	engl. Horseradish peroxidase
IGF-1	engl. Insulin like growth factor 1
IGF-2	engl. Insulin like growth factor 2
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
LA	Linolsäure
LOX	Lipoxygenase
LNA	Linolensäure

MAK	Mitogen aktivierte Kinase
MAPKK	Mitogen aktivierte Kinase Kinase
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute(n)
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MPNST	Maligne(r) periphere(r) Nervscheidentumor(e)
MTT	engl. Malignant triton tumor
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NF2	Neurofibromatose Typ 2
NF-fib	Humane NF+/- Hautfibroblasten
nf-fib	Murine NF+/- Hautfibroblasten
NF-κB	Nuklearfaktor-κB
nSc	normale periphere Nervschwanzzellen
PBS	engl. Phosphate buffered saline
PCR	engl. Polymerase chain reaction
PDGF-β	engl. Platelet derived growth factor-β
PDGFR	engl. Platelet derived growth factor receptor
P-ERK	Phosphoryliertes ERK
PI	engl. Principal Investigator
PI-3	Phosphatidylinositol-3
PKA	Proteinkinase A
PLA2	Phospholipase A2
PMSF	Phenylmethylysulphonylfluoride
PNF	Plexiforme Neurofibrome
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
S.	Saccharomyces
SD	engl. Standard deviation
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α

wt-fib
ZNS

Wildtyp Hautfibroblasten
Zentralnervensystem

1 EINLEITUNG

Neurofibromatose Typ 1 (NF1) oder „von Recklinghausen Krankheit“ (nach der klassischen Monographie des deutschen Arztes Friedrich von Recklinghausen von 1882) ist eine der häufigsten genetischen Erkrankungen des Nervensystems. Beide Geschlechter sind mit einer Inzidenz von ca. 1:3500 weltweit betroffen (Huson et al., 1989a). NF1 ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die durch eine annähernd vollständige Penetranz, eine hohe Variation in der Expressivität, genetische Heterogenität und Pleiotropismus gekennzeichnet ist (Huson et al., 1988). Die variable Expressivität zeigt sich durch eine höchst unterschiedliche Art und Schwere der Manifestation bei gegebener Mutation. Es wird zudem eine genetische Heterogenität der NF1 mit mehr als einem zugrundeliegenden genetischen Ereignis der Erkrankung vermutet. Der Pleiotropismus der NF1 zeigt sich in der Involvierung multipler Gewebstypen und Organsysteme.

Patienten mit NF1 entwickeln multiple Tumore im Laufe ihres Lebens, am häufigsten entstehen jedoch gutartige Neurofibrome des peripheren Nervensystems. Diese enthalten hauptsächlich Schwannzellen, daneben auch Fibroblasten, Mastzellen und andere perineurale Zellen (Li et al., 2002). Ferner sind bei der NF1 häufig Melanozyten und Neuronen betroffen. Neben der Entwicklung verschiedener Tumore existiert eine Vielzahl neurologischer, psychiatrischer, orthopädischer, ophthalmologischer und allgemeinmedizinischer Komplikationen, die mit NF1 assoziiert sind (Huson et al., 1994b).

Mit der Identifizierung und Sequenzierung des *NF1* Gens 1990 (Cawthorne et al., 1990; Wallace et al., 1990), der Entwicklung verschiedener Tiermodelle und diversen klinischen und epidemiologischen Studien wurde das Verständnis der NF1 in den letzten Jahren weit voran gebracht. Trotz dieser Erkenntnisse sind viele Aspekte der Tumorentstehung, insbesondere die Ursachen der ausgeprägten Heterogenität und Variabilität noch unklar. Die NF1-mRNA ist ubiquitär expremiert, und auch das Protein Neurofibromin konnte in Gehirn, Lunge, Niere, Leber, Milz, Muskel und Kolon nachgewiesen werden. Dies war überraschend bei der überwiegenden Involvierung von embryonalen Neuralleistenzellen in der Pathogenese der NF1 (Wallace et al., 1990). Weiteren Faktoren wie gewebespezifische posttranslationale Modifikation oder Unterschiede in der Quantität der Expression wurde daraufhin eine Bedeutung für die

Selektivität der betroffenen Zelltypen beigemessen (Gutmann et al., 1991). Andererseits ließen sich nicht alle Charakteristika der Neurofibromatose mit einer Entstehung aus Zellen der embryonalen Neuralleiste erklären wie z.B. die knöchernen Veränderungen, oder die häufig beobachteten kognitiven Defizite. Selbst die Veränderungen, die auf Zellen der Neuralleiste zurückgehen, zeigen ein bislang nicht erklärtes unterschiedliches Wachstumsverhalten. So ist das Wachstum der Café-au-lait Flecken mehr oder weniger statisch, während Neurofibrome und anderer Tumore sich durch ein progressives Wachstum auszeichnen. Riccardi (1979; 1981a) postulierte daher, dass zwar die primären Defekte von Zellen der embryonalen Neuralleiste hergeleitet werden könnten, andere Aspekte der NF1 aber durch weitere Mechanismen erklärt werden müssten. Beispielsweise könnte eine direkte Interaktion der Neuralleistenzellen mit anderen Zelltypen eine Rolle spielen. Darüber hinaus forderte er die Unterscheidung primärer Charakteristika der NF1 wie z.B. Neurofibrome von sekundären Charakteristika wie z.B. Skoliose, die durch massives Wachstum der Neurofibrome bedingt ist, und tertiären Charakteristika oder Komplikationen wie die Spinalkanalkompression durch die Skoliose.

Die Neurofibromatose Typ 2 (NF2) stellt sowohl genetisch als auch klinisch eine separate Entität dar (Kley et al., 1995; Gutmann 1997a). Mit einer Inzidenz von 1:50 000 kommt NF2 seltener vor als NF1. Das Auftreten bilateraler Neurinome des Nervus statoakusticus, multipler Neurinome der Spinalwurzeln, Meningeome, Astrozytome sowie Hamartome des Cortex charakterisieren die Erkrankung (Evans et al., 1992). Die Tumore sind typischerweise langsam wachsend und benigne. Pathogenetisch liegt eine Mutation des *NF2*-Tumorsuppressorgens auf dem Chromosom 22q11 vor. Das *NF2* Gen kodiert das Protein Merlin, welches Sequenzhomologien zu einer Familie von Proteinen, die das Aktinzytoskelett mit Glykoproteinen der Zelloberfläche verbinden, enthält (Trofatter et al., 1993; Roleau et al., 1993). Merlin scheint eine Rolle in der Organisation des Zytoskeletts, in der Kontaktinhibition und in Wachstumsstillstand zu spielen (Gutmann, 1997b).

1.1 Neurofibromatose Typ 1

1.1.1 Klinische Merkmale der Neurofibromatose Typ 1

Der natürliche Verlauf der Neurofibromatose 1 ist durch eine ausgeprägte Variabilität und Progressivität charakterisiert. Die variable Expressivität zeigt sich in großen interfamiliären und in intrafamiliären Unterschieden in der Läsionsausprägung wie auch in verschiedenartiger Ausprägung der Läsion von einem Segment des Körpers zum nächsten Segment. Zudem handelt es sich um eine progrediente Erkrankung, die eine hohe Divergenz mit Vermehrung und Größenzunahme der Läsionen und selbst Veränderung der Art der Tumore zeigt (Friedman und Riccardi 1999). So kommt es nach Entwicklung der benignen plexiformen Neurofibrome zu einem Auftreten von malignen peripheren Nervscheiden Tumoren (MPNST). Ein gehäuftes simultanes Auftreten anderer Tumore wie pilozytische Astrozytome des Nervus opticus, Meningeome, Phäochromozytome und bestimmte Formen myeloischer Leukämien lässt sich ebenfalls beobachten (Matsui et al., 1993).

Die Neurofibrome sind die häufigsten Tumore der Patienten mit NF1. Es handelt sich um heterogene benigne Tumore der Nervenscheide, die größtenteils aus Schwannzellen und perineuralen Fibroblasten bestehen, aber auch verschiedene Zelltypen, darunter Endothelzellen, Perizyten, Mastzellen und Nervenzellen enthalten können (Lott und Richardson 1981). Neurofibrome finden sich überall im Körper, sie treten an den Nervendigungen der Haut oder in der Nervenscheide auf (Wiestler und Radner 1994). Vier verschiedene klinische Typen der Neurofibrome können unterschieden werden:

1. Diskrete kutane Neurofibrome der Dermis oder Epidermis
2. Diskrete subkutane Neurofibrome
3. Tiefe noduläre Neurofibrome
4. Diffuse plexiforme Neurofibrome

Während die kutanen Neurofibrome nur sehr selten schmerzhaft sind, stellen die subkutanen Neurofibrome oft eine schmerzhaft und empfindliche Läsion dar. Plexiforme Neurofibrome lassen sich in tiefe noduläre und diffuse Neurofibrome einteilen. Die tiefen nodulären Neurofibrome ähneln den diskreten kutanen und subkutanen Läsionen, involvieren aber oft große

Nerven in Geweben und Organen unter der Haut. Die häufig lange Zeit klinisch inapparenten nodulären plexiforme Neurofibrome sind nur in einigen Fällen schmerzhaft. Diffuse plexiforme Neurofibrome bestehen annähernd aus den gleichen Zellen wie die dermalen Neurofibrome, ihre extrazelluläre Matrix ist aber vergrößert und ihre Blutversorgung erhöht. Es finden sich häufig fingerartige Ausziehungen, die sich weit in das umgebende Gewebe ausbreiten. Diffuse plexiforme Neurofibrome entwickeln sich entlang der Hauptnervenäste, breiten sich in diesen Nerven aus und involvieren Äste, Nervstämme und Plexi. Die mit den plexiformen Neurofibromen assoziierte Hypertrophie des umgebenden Bindegewebes führt vielfach zu gravierender funktioneller Einschränkung und Entstellung (Korf et al., 1997). Die plexiformen Neurofibrome scheinen sich im Unterschied zu den in großer Zahl vorkommenden dermalen Neurofibromen zu Malignomen, den MPNST entwickeln zu können. Das wichtigste klinische Zeichen einer malignen Transformation ist der neu auftretende unerklärliche Schmerz. Klinisch zeigt sich außerdem eine Vergrößerung der Läsion sowie eine Veränderung der Konsistenz. Bei einer Metastasierung ist die Lunge am häufigsten betroffen. Weitere Metastasierungsorte sind Knochen, Leber, Nebennieren, Diaphragma, Mediastinum, Gehirn, Ovarien, Nieren und das Retroperitoneum (Korf 1999).

Multiple mit NF1 assoziierte Merkmale betreffen die verschiedenen Systeme des ganzen Körpers. Die Mehrheit der Patienten entwickeln Pigmentstörungen wie Café-au-lait Flecken (kutane Diskolorationen) (Riccardi 1981a), Lisch-Knötchen (melanozytische Iris-Hamartome) (Lewis and Riccardi 1981; Lisch 1937) und Sommersprossen (engl. freckles) an charakteristischen Körperbereichen (Huson et al., 1994a). Die Pigmentanomalien und die peripheren Neurofibrome gehören nach dem National Institutes of Health (NIH)- Konsens von 1988 zu den primären diagnostischen Kriterien für NF1. Trotz der Identifizierung und Sequenzierung des *NF1* Gens (Cawthon et al., 1990; Wallace et al., 1990), blieb die Diagnose der Neurofibromatose 1 aufgrund der Größe des *NF1* Gens, der vielen variablen Lokalisationen der Mutationen und der multiplen Pseudogene eine klinische Diagnose. Sie basiert auf den folgenden Kriterien:

NF1 ist anzunehmen bei einem Patienten, der zwei oder mehr der folgenden Zeichen aufweist:

- Sechs oder mehr Café-au-lait Flecken >5mm im größten Durchmesser in präpubertären Individuen oder >15mm im größten Durchmesser postpubertär
- Zwei oder mehr Neurofibrome jeden Typs oder ein oder mehrere plexiforme Neurofibrome
- Tumore des optischen Systems
- Zwei oder mehr Lisch-Knötchen (Iris-Hamartome)
- Eine typische knöcherne Läsion wie Dysplasie der Sphenoidflügel oder die Ausdünnung des Kortex der langen Knochen (mit oder ohne Pseudoarthrose)
- Einen Verwandten ersten Grades (Elternteil, Geschwister oder Nachkomme) mit NF1 nach den oben genannten Kriterien

(National Institutes of Health Consensus Development Conference 1988; aus Gutman et al., 1997b)

Auch eine Pathologie des Skelettsystems ist häufig zu beobachten. Neben der oben aufgeführten Dysplasie der Sphenoidflügel repräsentieren die dysplastische Skoliose und die tibiale Pseudoarthrose zwei der schwersten und charakteristischsten klinischen Manifestationen der NF1. Die dysplastische Skoliose kann zu Spinalkanalskompression mit neurologischen Komplikationen führen. Weiterhin gibt es eine erhöhte Inzidenz von Fehlstellungen wie Genu Valgum und Genu Varum. Bei den funktionellen Abnormalitäten ist das Zentralnervensystem häufig betroffen. So findet man in ca. 45% der Patienten Lernbehinderungen sowie visuelle Defizite, häufig durch Gliome ausgelöst. Auch Makrocephalie und Kopfschmerzen kommen gehäuft vor, wobei die Makrocephalie nicht auf Knochenabnormalitäten zurückgeht, sondern eher auf einer Megalencephalie basiert. Eine kurze Statur und kognitive Dysfunktionen gehen oft mit der Megalencephalie einher (Ferner et al., 1996).

Die Entwicklung der klinischen Zeichen der NF1 ist durch eine starke Altersabhängigkeit gekennzeichnet (Friedman und Birch 1997; Huson 1994b; Huson et al., 1989b; Korf 1992; Obringer et al., 1989; Wolkenstein et al., 1996). So findet man die Lisch-Knötchen und die kutanen und subkutanen Neurofibrome nur selten in Kleinkindern und am häufigsten bei dem Erreichen des Erwachsenenalters. Auch die Sommersprossen sind selten bei Kindern unter vier Jahren, demgegenüber existieren Café-au-lait-Flecken bei den meisten der Patienten schon zum Zeitpunkt der Geburt (Huson 1994, Huson et al., 1989b, Obringer et al., 1989, Wolkenstein et al., 1996). Die Neurofibrome entstehen oft erst während der Pubertät. Bei vielen Patientinnen

beobachtet man zudem eine Vergrößerung und eine Vermehrung der diskreten und plexiformen Neurofibrome, sowie ein vermehrtes Auftreten und schnelles Wachstum von MPNST während der Schwangerschaft (Ginsburg et al., 1981; Puls und Chandler 1991). Oft lässt sich nach der Entbindung wieder eine Regression der Tumore beobachten.

Die durchschnittliche Lebenserwartung von Patienten mit NF1 ist um mindestens 10-15 Jahre verkürzt. Malignität ist der häufigste Grund für den Tod der Patienten. Zur Zeit existiert noch keine medikamentöse Therapie zur Prävention des Tumorwachstums oder zur Verkleinerung der Läsionen, so ist die Therapie weitestgehend limitiert auf die chirurgische Resektion der Neurofibrome. Sie rezidivieren allerdings häufig, und die irreguläre Form, die Größe und die hohe Vaskularisation der meisten plexiformen Neurofibrome macht oftmals eine komplette Resektion unmöglich. Die MPNST sind letal, wenn sie nicht behandelt werden. Die besten Ergebnisse werden bei kompletter Resektion des Tumors erzielt, eine Chemotherapie oder Radiatio zeigte demgegenüber nur wenig Vorteil (Korf, 1999). In Fällen, wo allerdings eine komplette Resektion nicht gelingt, sowie in metastasierten Stadien geht die Tendenz dennoch zu einer adjuvanten Radiochemotherapie (Brennan et al., 1991). Neue Chemotherapeutika, die an verschiedenen Stellen der Pathogenese der NF1 ansetzen, wurden entwickelt, darunter Angiogeneseinhibitoren (Folkman 1995) oder Inhibitoren des Enzyms Farnesyltransferase, welches Ras in der Membran verankert und so die Aktivierung ermöglicht (Yan et al., 1995). Es existieren multiple klinische Studien, in deren Rahmen Therapien mit bekannten und neuen Chemotherapeutika oder alternativen Therapien wie Immunmodulatoren getestet werden. So gibt es beispielsweise klinische Phase II-Studien über neue Präparate wie Pirfenidone, ein antifibrotisches Agens, das Wachstumsfaktoren inhibiert, die in der Pathogenese der NF1 eine Rolle spielen („Phase II Trial of Pirfenidone in Children, Adolescents, and Young Adults with Neurofibromatosis Type 1 and Progressive Plexiform Neurofibromas“; Principal Investigator (PI): Dr. Roger Packer) oder über den Farnesyltransferase Inhibitor R 115777, der die posttranslationale Isoprenylation von ras blockiert („A Phase II Randomised, Cross-Over, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial of the Farnesyltransferase Inhibitor R115777 in Paediatric Patients with Neurofibromatosis Type I and Progressive Plexiform Neurofibromas“; PI: Dr. Brigitte C. Widemann). Bei Patienten mit MPNST werden Therapien mit Thalidomid und Interferon- α („Phase II Study of Interferon alfa and Thalidomide in Patients With Surgically Resected High-Risk Soft Tissue Sarcoma“; PI: Robert N. Taub), Imatinib (Gleevec),

ein Tyrosinkinase-Inhibitor („Phase II Trial of Gleevec (Formerly Known as STI571) in Patients with Soft Tissue and Bone Sarcomas: A Multi-Disciplinary Trial of the North American Sarcoma Study Group of the Connective Tissue Oncology Society“; PI: Dr. Laurence Baker) oder eine Kombination von Vaccination und Kolonie-stimulierendem Faktor Sargramostim (GM-CSF) („Phase I Pilot Study of NY-ESO-1 Peptide Vaccine and Sargramostim (GM-CSF) in Patients With Stage II, III, or IV Soft Tissue Sarcoma Expressing NY-ESO-1 or LAGE Antigen“; PI: Dr. Kyriakos P. Papadopoulos und Herbert Irving) in Studien untersucht.

1.1.2 Molekularbiologie der NF1

1.1.2.1 Das *NF1* Gen

Die Klonierung und die Sequenzierung des *NF1* Gen gelang 1990 durch Cawthone et al. (1990) und Wallace et al. (1990). *NF1* ist auf dem langen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert. Es stellt ein großes Gen von ungefähr 300 000 Nukleotiden dar, beinhaltet ca. 59 Exons, und sein Transkriptionsprodukt von 11 000 bis 13 000 Nukleotiden hat multiple Splice-Varianten (Marchuk et al., 1991). Doch auch wenn die Identifizierung des Gens einen großen Fortschritt im Verständnis der Pathogenese der NF1 bedeutete, blieb der Mechanismus, wie die verschiedenen Mutationen die spezifischen Charakteristika der NF1 bedingen, weiter unklar. Es existieren multiple Mutationstypen, wie z.B. Punktmutationen in einem singulären Basenpaar, Deletionen vieler Basenpaare (Scotti et al., 1987), Deletionen des gesamten Gens oder Inversionen, Insertionen und Translokationen (Kayes et al., 1990).

Die Dominanz der *NF1* Mutation, die bei der Weitergabe zwischen den Generationen zu beobachten ist, ist auf zellulärem Niveau nicht zu finden. Mutationen führen nicht in allen Zellen zur phänotypischen Expression. Um die variable Expressivität der NF1, das lokalisierte und sporadische Erscheinen der Tumore und die niedrige Inzidenz der malignen Transformation der Tumore erklären zu können, suchte man nach weiteren Ereignissen. Man vermutete die Notwendigkeit einer permissiven Umgebung auf zellulärem Level für die komplette oder partielle Expression. Darunter sind epigenetische oder genetische Ereignisse, wie beispielsweise weitere Mutationen an gleichen oder verschiedenen Loci die zu Deletionen weiterer Tumorsuppressorgene wie *p53* führen (Menon et al., 1990; Gutmann et al., 1997a; Bernardis et al., 1999), direkte Zell-Zell-Interaktionen, oder durch lokale Sekretion vermittelte Interaktionen. Auf der Suche nach genetischen Ereignissen wurde in MPNST tatsächlich eine Deletion einer Region auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17, wo das Tumorsuppressorgen *p53* lokalisiert ist, nachgewiesen (Menon et al., 1990, Greenblatt et al., 1994). Die Deletion des *p53* wurde nur in den Malignomen, nicht jedoch in den benignen Neurofibromen gefunden, hinweisend auf eine Rolle des *p53* in der Progression zur Malignität (McCarron und Goldblum, 1998). Anhand von Tiermodellen ließ sich ebenfalls eine kausale Rolle für *p53* in der Entwicklung von MPNST zeigen (Chichowski et al., 1999; Vogel et al., 1999).

Auch nicht-genetische Effekte wie lokales Trauma oder hormonelle Veränderungen zeigen einen Einfluss auf die Entwicklung der Neurofibrome in der NF1 (Riccardi et al., 1992). Aufgrund des engen zeitlichen Zusammenhangs des ersten Auftretens der Tumore mit beginnender Pubertät sowie der beobachteten erhöhten Anzahl und Größenzunahme der Neurofibrome während der Schwangerschaft, die nach der Geburt wieder rückläufig sind (Swapp und Main 1973; Hall et al., 1981; Huson et al., 1994b; Dugoff und Sujansky 1996;), vermutete man eine Partizipation von Hormonen bei der Entwicklung der Neurofibrome. Unterstützung erfährt diese Theorie durch die vor kurzem demonstrierte Expression von Progesteronrezeptoren in einer großen Anzahl von Neurofibromen (McLaughlin und Jacks 2003).

1.1.2.1.1 *NF1* als klassischer Tumorsuppressor

Nur 5% der Neurofibrome zeigen eine Progression zur Malignität, und bisher wurde dies nur bei plexiformen Neurofibromen beobachtet (Woodruff, 1996). *NF1* wurde schon früh als Tumorsuppressorgen klassifiziert, denn eine große Anzahl der ererbten Mutationen führt zu einem inaktiven Proteinprodukt. Nach der für Tumorsuppressoren klassischen „Two-Hit“-Hypothese von Knudson initiiert eine zweite Mutation in dem ererbten Wildtyp-Allel die Tumorentwicklung (Knudson et al., 1971). Man vermutet daher, dass auch in der NF1 die somatische Mutation (oder das Fehlen der Heterozygotizität, engl. Loss of heterozygosity: LOH) die Voraussetzung für eine Progression zur Malignität ist. Eine der führenden Hypothesen besagt, dass die erste Mutation in einer oder beider Kopien des *NF1* Gens zu der Entwicklung benigner plexiformer Neurofibrome führe. Für die Transformation zu malignen MPNST seien dann aber mehrere genetische „Hits“ notwendig. Tatsächlich ließ sich ein „Second Hit“-Mechanismus in verschiedenen malignen Tumoren der NF1, wie in Phäochromozytomen, bei der myeloischen Leukämie (Xu et al., 1992; Legius et al., 1993; Shannon et al., 1994) und in MPNST (Skuse et al., 1989; Glover et al., 1991; Basu et al., 1992; DeClue et al., 1992) mit hoher Frequenz nachweisen.

Ob LOH in benignen Neurofibromen ebenfalls zur Tumorentwicklung beiträgt und bei den plexiformen Neurofibromen tatsächlich für die Transformation zur Malignität notwendig ist, wird allerdings kontrovers diskutiert. Frühere Arbeiten fanden in Zellen benigner Neurofibrome

Mutationen in nur einer Kopie des *NF1* Gens (Riccardi et al., 1994; Gutmann et al., 1997a; Bernardis et al., 1999). Bei vereinzelt Patienten, die dermale, plexiforme Neurofibrome und Café-au-lait-Flecken entwickelten, fanden sich aber auch in den benignen Veränderungen „Second-Hit“ Mutationen des Wildtyp-Allels. Die Entdeckung von LOH in Schwannzellen dermalen Neurofibrome, die nie eine Progression zur Malignität zeigen, lassen vermuten, dass das Fehlen der Neurofibromin-Funktion auch in der Entwicklung benigner Tumore eine Rolle spielt (Sawada et al., 1996; Serra et al., 1997, Kluwe et al., 1999; Serra et al., 2000). Es gibt mehrere Erklärungsansätze für diese unterschiedlichen Resultate. So stellt beispielsweise die Heterogenität der Tumorzelltypen und auch die Größe des Gens mit 335 kb genomischer DNA eine Herausforderung für die Entdeckung von Mutationen bei der NF1 dar.

1.1.2.2 Neurofibromin

Das *NF1* Gen Produkt Neurofibromin ist ein großes zytoplasmatisches Protein (>220kD) (DeClue et al., 1991; Gutmann et al., 1991; Golubic et al., 1992), dass bei Erwachsenen in Schwannzellen, Neuronen, Oligodendrozyten, Keratinozyten, Astrozyten, Nebennierenmark und in Leukozyten expremiert wird (Daston et al., 1992). Abhängig vom untersuchten Zelltyp konnte eine Assoziation von Neurofibromin mit Mikrotubulin, glattem endoplasmatischem Retikulum, Mitochondrien und dem Nukleus nachgewiesen werden (Bollag et al., 1993; Gregory et al., 1993; Nordlund et al., 1993; Roudebush et al., 1997). Neurofibromin enthält eine zentrale Domäne mit Sequenzhomologien zu den katalytischen Domänen einer Familie von Ras-GTPase-aktivierenden Proteinen (Ras-GAPs) (Xu et al., 1990, DeClue et al., 1991), sowie ausgedehnte Homologien zu den Ras-GAP Proteinen in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), IRA1 und IRA2 (Buchberg et al, 1990; Tanaka et al., 1991).

Die Ras Proteine werden durch drei *RAS* Gene *Ha-RAS*, *Ki-RAS*, and *N-RAS* kodiert. Sie sind durch Isoprenylation ihres Carboxylendes durch die Farnesyltransferase an der Zellmembran verankert (Casey et al., 1989). Als zentrale Faktoren in Signaltransduktionswegen nehmen sie Schlüsselfunktionen in Zellproliferation und Differenzierung ein. Ras Proteine reagieren auf diverse extrazelluläre Stimuli wie Zytokine, Hormone und Peptid-Wachstumsfaktoren, so sind in der durch Ras vermittelten Signaltransduktionskette die Rezeptor Tyrosin Kinasen Epidermalen

Wachstumsfaktor (engl. Epidermal growth factor: EGF), Plättchen Wachstumsfaktor (engl. Platelet derived growth factor: PDGF) und Nervenwachstumsfaktor (engl. Nerve growth factor: NGF) involviert (Bernards, 1995). Ras Proteine binden mit einer hohen Affinität an Guanin Nucleotide und hydrolysieren mit ihrer intrinsischen GTPase GTP zu GDP (Bourne et al., 1990). GAP Proteine hemmen Ras Proteine durch eine enzymatische Stimulation der intrinsischen GTPase, es kommt zu vermehrter Bindung an GDP und so zu verringerter Aktivität (Zhang et al., 1990; Bourne et al., 1991).

Nachweislich teilt Neurofibromin als Ganzes sowie sein Konstrukt, welches nur die von *NF1* kodierte GAP-verwandte Domäne des Neurofibromins (engl. GAP related domain: GRD) enthält, viele Eigenschaften der GAP Proteine. So führt Neurofibromin und die NF1-GRD zur Erhöhung der intrinsischen GTPase-Aktivität der Ras Proteine (Bollag und McCormick 1991; Ahmadian et al., 1996). Mutationen der *RAS* Gene führen zu einer Resistenz gegenüber der enzymatischen Regulierung sowohl durch GAP als auch durch NF1-GRD, wodurch es zu unregulierter Aktivität und somit zu vermehrter Proliferation kommt (Bos et al., 1989). Auch die Funktion von IRA1 und IRA2 in *S.cerevisiae* konnte durch NF1-GRD ersetzt werden (Martin et al, 1990).

Die Rolle des Neurofibromins in der Aktivierung des Ras und deren Signalwegen stellt man sich wie folgt vor: Wachstumssignale der Zelloberfläche aktivieren Guanin Nukleotid-Austausch-Faktoren wie Sis, Grp, Grf, die GDP von dem membrangebundenen Ras dissoziieren. Dadurch kann Ras frei an GTP binden und aktiviert werden. Das aktivierte Ras-GTP sendet dann intrazelluläre Signale über den Phosphoinositol-3'kinase (PI3-kinase) Signalweg zur Inhibition der Apoptose und über den raf-Mitogen aktivierte Kinase (MAK) Signalweg zur Stimulation der Zellproliferation. Neurofibromin inaktiviert Ras-GTP durch die Stimulation der intrinsischen Ras-GTPase, die GTP zu GDP hydrolysiert. Durch inadäquate Level von Neurofibromin wie bei Haploinsuffizienz oder Inaktivierung des Neurofibromins durch LOH, wie sie in NF1-assoziierten Tumore durch Mutationen im *NF1* Gen vorkommen, ist somit ein erhöhtes Level an aktiviertem Ras einhergehend mit erhöhten Signalen durch raf und PI3-kinase zu erwarten (Viskochil 1999). Die Aktivierung von Ras geht folglich mit einer erhöhten Rate an Tumorformation durch erhöhte Zellproliferation und erhöhtes Zellüberleben einher. In vielen Tumore, die mit NF1 assoziiert sind, konnte tatsächlich eine erhöhte Ras-Aktivität bei Fehlen von

Neurofibromin nachgewiesen werden, so z.B. in MPNST (Basu et al., 1992; DeClue et al., 1992; Guha et al., 1996), Neurofibrome (Sherman et al., 2000), Astrozytome (Lau et al., 2000) und Leukämien (Bollag et al., 1996). Es scheint sich bei der enzymatischen Ras-GAP-Aktivität des Neurofibromins um eine spezifische Regulation zu handeln, die nicht von anderen Ras-GAP-Molekülen ersetzt werden kann. So lässt sich die erhöhte Aktivität des Ras Proteins und die erhöhte Zellproliferation in *NF1*^{-/-} Zellen mittels der Einfügung einer Wildtyp-NF1-GRD normalisieren, nicht jedoch mittels der Einfügung von p120-GAP, eines anderen Ras-GAP Moleküls (Hiatt et al., 2001).

Die erhöhte Proliferation in Neurofibromin-defizienten Mauszellen (*Nf1*^{-/-}) scheint durch die Ras-GAP Funktion des Neurofibromins erklärt werden zu können, und die Tumorsuppressionsfunktion des Neurofibromins wird partiell der Ras-GAP-Aktivität zugeschrieben. Die NF1-GRD nimmt allerdings nur etwa 10% des Moleküls ein, und es sprechen mehrere Ergebnisse experimenteller Studien für eine weitere Funktion des Neurofibromins unabhängig von der Ras-GAP-Aktivität. Vor allem Studien in der Fruchtfliege *Drosophila* konnten bei Fehlen des Neurofibromin-Homologes einen Ras-unabhängigen Phänotyp zeigen. Hier ist die cAMP- und Protein Kinase A (PKA)-Kaskade statt der Ras-Signalkette betroffen. Die Mutanten zeigten nicht den Phänotyp, der durch aktiviertes Ras zu erwarten wäre. Die Tiere fielen vielmehr durch kleines Wachstum auf, zeigten Verhaltensdefizite, kognitive Störungen und Defekte in spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Dieser Phänotyp konnte nicht durch die Regulation des Ras-Weges sondern nur durch ein aktiviertes PKA- Transgen umgekehrt werden (Guo et al., 1997; The et al., 1997). Auch in Maus *Nf1*^{-/-} Schwanzzellen beeinflusste das Fehlen von Neurofibromin die Zellantwort auf cAMP (Kim et al., 1997).

Immunhistochemische Studien, die die subzelluläre Lokalisation von Neurofibromin untersuchten, demonstrierten in Fibroblasten eine Kolo-kalisation von Neurofibromin mit Mikrotubulin (Gregory et al., 1993) sowie eine Interaktion von Neurofibromin mit Tubulin (Bollag et al., 1993). Die Struktur des Tubulins enthält eine dem Ras ähnliche G-Domänen-Falte (Pai et al., 1990), und die Nähe des N- und des C-Terminals in der Struktur von NF1-GRD lässt eine für die Bindung an Tubulin kritische Konformation vermuten (Scheffzek et al., 1998). Die Interaktion von Neurofibromin mit Mikrotubulin könnte eine neue Funktion in der Regulation

von Mikrotubulin-vermittelten-Prozessen von Neurofibromin reflektieren oder einen Mechanismus repräsentieren, über den die Neurofibromin Ras-GAP Aktivität kontrolliert wird.

1.1.3 Tiermodelle

Um die Neurofibromatose, das *NF1* Gen und das Protein Neurofibromin und seine Funktionen studieren zu können, wurden verschiedene Tiermodelle etabliert, darunter *tax*-transgene Mäuse, *Nf1*-knockout Mäuse, kombinierte *Nf1/p53* transgene Mäuse (Brannan et al., 1994; Jacks et al., 1994; Cichowski et al., 1999), die Fruchtfliege *Drosophila* (Guo et al., 1997, The et al., 1997) und andere Spezies wie Kühe, Syrischer Hamster und bicolor Damselische (Riccardi 1992). Obwohl viele dieser Modelle zum Verständnis der NF1 beitrugen, gelang es oft nicht, die klinische Vielfalt der Symptome von Patienten mit NF1 adäquat abzubilden. Heterozygote *Nf1* +/- Mutanten waren für eine Vielzahl von Symptomen, die auch Patienten mit NF1 entwickeln, prädisponiert. So fanden sich neben kognitiven Defiziten bei einigen der heterozygoten Mutanten auch Phäochromozytome und myeloische Leukämie (Silva et al., 1997). Die erwartete spontane Entwicklung von Neurofibromen oder die Transformation zu MPNST blieb dagegen aus (Brannan et al., 1994; Jacks et al., 1994). Die homozygoten Maus- *Nf1*-/- Mutanten waren wegen kardialer Abnormalitäten im Embryostadium Tag 12.5 letal. Der Frage nach Notwendigkeit eine „Second-Hit“-Mutation für die Entwicklung von Neurofibromen wurde daraufhin experimentell mit der Herstellung chimärer Mäuse, die partiell *Nf1*-/- Zellen enthalten, nachgegangen. Durch die Injektion *Nf1*-defizienter Zellen in Wildtyp-Blastozyten gelang 1999 die Herstellung chimärer Mäuse. Tatsächlich entwickelten nahezu alle Tiere neben Myelodysplasie und progressiven Motordefekten plexiforme Neurofibrome. Interessanterweise zeigten sich keine dermalen Neurofibrome, die häufigsten Tumore bei Patienten mit NF1. Die plexiformen Neurofibrome bestanden ebenso wie menschliche NF1-Neurofibrome zum größten Teil aus Schwannzellen mit wenigen perineuralen Zellen. Dabei stellten die *Nf1*-/- Zellen den größten Anteil dar mit zu vernachlässigender Beteiligung der Wildtyp- Zellen. Bei diesem Modell scheint der komplette Verlust des *Nf1*-Gens somit obligat für die Entwicklung plexiformer Neurofibrome zu sein (Cichowski et al., 1999).

Viele MPNST entwickeln sich aus plexiformen Neurofibromen und in den Geweben der MPNST konnten weitere genetische Veränderungen in der Region des Tumorsuppressors *p53* nachgewiesen werden (Menon et al., 1990; Greenblatt et al., 1994). Um die Rolle des *p53* in der Entwicklung von MPNST zu beleuchten, wurden *Nf1:p53* Mutanten hergestellt (Cichowski et al., 1999). Die Analyse der *Nf1*- und der *p53*- Lokalisation in diesen Mutanten zeigten nachweislich LOH, und die Mutanten entwickelten tatsächlich MPNST mit hoher Frequenz. Die zusätzliche Mutation des *p53*-Gens scheint somit notwendig für die Prädisposition zu maligner Transformation. Eine molekulare Analyse etablierter Zelllinien aus diesen Tumoren bestätigte eine neuroektodermale Herkunft sowie die Möglichkeit, sich in Schwannzellen, glatte Muskelzellen oder autonome Neurone zu entwickeln (Vogel et al., 1999).

1.1.4 Wachstumsfaktoren und NF1

Die Entwicklung der Neurofibrome ist gekennzeichnet durch eine Proliferation multipler Zellpopulationen wie Schwannzellen, perineurale Fibroblasten (Fisher und Vuzevski 1968; Stefansson et al., 1982) und Mastzellen (Carr und Warren 1993). Man vermutete daher, dass ein Teil der Proliferation auf Mitogene zurückzuführen sei. Tatsächlich konnte eine Hochregulation verschiedener Wachstumsfaktoren wie des Hepatozytenwachstumsfaktors (engl. Hepatocyte growth factor: HGF) (Krasnoselsky et al., 1994), des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors (engl. basic Fibroblast growth factor: bFGF) (Ratner et al., 1990) und des Insulin ähnlichen Wachstumsfaktors-2 (engl. Insulin like growth factor-2: IGF-2) (Hansson et al., 1988) in Neurofibromen identifiziert werden. In zwei Schwannzelllinien von MPNST fand sich darüber hinaus eine Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors PDGFR (engl. Platelet derived growth Factor receptor: PDGFR). PDGF führte zu einer starken Proliferationsinduktion in diesen Zellen, jedoch nicht in Schwannzelllinien von Patienten ohne NF1. Auch FGF war mitogen in diesen Zellen, allerdings in einem geringeren Ausmaß (Badache und De Vries 1998).

Eine weitere Studie demonstrierte die Expression des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (engl. Epidermal growth factor receptor: EGFR) in primären MPNST von NF1 Patienten und Patienten ohne NF1 und deren Zelllinien (DeClue et al., 2000). Die Expression des Rezeptors in

allen Zellen und Zelllinien korrelierte mit einer Aktivierung von Downstream-Signalwegen und einer Wachstumsstimulation durch EGF, die durch Antagonisten blockiert werden konnte. Normale Schwanzzellen zeigen hingegen keine Expression von EGF (Burden und Yarden 1997). Auch Schwanzzellen benigner Neurofibrome exprimieren nur sehr selten EGFR, man schließt daher auf eine wichtige Rolle von EGF in der Progression zur Malignität. MPNST-Zelllinien des *Nf1:p53* Maustumormodells zeigten ebenfalls eine Expression von EGFR mit einer Aktivierung der extrazellulären Rezeptorregulierten Kinase (ERK oder Mitogen-aktivierte Protein Kinase: MAPK)- Kaskade und der PI3k/AKT Signalkaskade als Zellantwort auf EGF. Das Wachstum der Zelllinien wurde durch EGF *in vitro* stark stimuliert und zudem durch Antagonisten des EGFR geblockt werden (Li et al., 2002).

1.2 Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren

1.2.1 Essentielle Fettsäuren

Fettsäuren bestehen aus Hydrocarbonketten mit einer Carboxylgruppe an einem und einer Methylgruppe am anderen Ende. Gesättigte Fettsäuren besitzen einfache, mit Hydrogen voll gesättigte Bindungen zwischen den Kohlenstoffen, hingegen weisen ungesättigte Fettsäuren Kohlenstoff-Doppelbindungen auf, die nicht mit Hydrogen gesättigt sind.

Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren unterscheiden sich durch die Stelle der Doppelbindung. Während die Doppelbindung in der Omega-3 Fettsäure drei Kohlenstoffe von dem Methylende der Kohlenstoffkette entfernt ist, sind es bei der Omega-6 Fettsäure sechs Kohlenstoffe bis zur Doppelbindung. Die Kohlenstoffbindungen der Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren können von Menschen nicht desaturiert werden, sie sind essentiell, d.h. sie müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Die Omega-6 Fettsäure wird zumeist als Linolsäure (LA) [Fettsäure mit 18 Kohlenstoffen, zwei Doppelbindungen, n-6 oder 18:2(n-6)] aufgenommen. Sie kommt in Gemüseölen, besonders in Kornöl und Sojabohnenöl vor. Die Arachidonsäure (AA) [20:4(n-6)], ein Metabolit aus LA, wird außerdem auch in Fleisch gefunden (Li et al., 1998). Die Omega-3 Fettsäuren sind in Gemüseölen, besonders Canolaöl, Sojabohnenöl und in grünem Salat als α -Linolsäure (LNA) [18:3(n-3)], sowie in größeren Mengen in Kaltwasserfischen als Eicosapentaensäure (EPA) [20:5(n-3)] oder als Docosahexaensäure (DHA) [22:6n-3)] enthalten.

Eine Elongation der Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren oder eine Desaturierung zu länger-kettigen Fettsäuren der gleichen Familie ist möglich, nicht jedoch eine Interkonvertierung (De Gomez und Brenner, 1975). Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren konkurrieren um dieselben Enzyme für die Produktion von Zytokinen. Die drei großen Omega-3 Fettsäuren LNA, EPA und DHA unterdrücken dabei die Produktion von AA aus LA durch erfolgreichere Konkurrenz um die Aktivität der $\Delta 5$ - und der $\Delta 6$ -Desaturasen (Hague und Christoffersen, 1984).

Als essentielle Komponenten in den Membranphospholipiden sind die Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren Substrate für viele Enzyme. So spaltet die Phospholipase A2 (PLA-2) die 20-Carbon Fettsäuren EPA und AA von Membranphospholipiden zur Produktion von Eicosanoiden ab. Durch die Aktivität der Cyclooxygenase (COX) entstehen aus EPA und AA Prostaglandine und Thromboxane, während die Lipoxygenase (LOX)-Aktivität auf EPA und AA zur Produktion von Leukotrienen führt. COX besitzt zwei Isoenzyme, COX-1 und COX-2. COX-1 wird in vielen Geweben produziert, während COX-2 durch Inflammation induziert wird und in normalem Gewebe nicht zu finden ist. COX-2 ist zudem in einer Vielzahl von Tumoren erhöht, wie z.B. in hepatozellulärem Karzinom (Kondo et al., 1999), Pankreaskarzinom (Okami et al., 1999), Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Shamma et al., 2000), Mammakarzinom (Hwang et al., 1998), Urothelkarzinom (Shirahama 2000) und Kolonkarzinom (Kargman et al., 1995). Besonders die Wirkung von COX-2 auf Kolonkarzinomzellen ist vielfach untersucht worden. So wird vermutet, dass COX-2-Inhibitoren in der Prävention und Therapie von Kolonkarzinomen eine wirkungsvolle Strategie darstellen könnten. Tatsächlich fanden sich Hinweise, dass COX-Inhibitoren wie Sulindac und Piroxicam das Wachstum von Kolonkarzinomen unterdrücken (Rao et al., 1995, Reddy et al., 1990). Der selektive COX-2 Inhibitor Celecoxib wirkte darüber hinaus in Tierexperimenten und in klinischen Untersuchungen als effektives präventives Agens beim Kolonkarzinom (Jacoby et al., 2000).

1.2.2 Funktionen der Omega-3 Fettsäuren

Die essentielle Bedeutung der Omega-3 Fettsäure für die normale neurologische Funktion wurde zuerst durch den Einsatz der totalen parenteralen Ernährung (engl. total parenteral nutrition: TPN), in Notfällen oder postoperativ eingesetzt, entdeckt. In den

80er Jahren begann man, der TPN zwei verschiedene Lipidemulsionen zuzusetzen, eine beinhaltete Sojabohnenöl, welches viel Omega-3 Fettsäure enthält, die andere beinhaltete Safflower Öl mit einem hohen Gehalt an Omega-6, aber annähernd ohne Omega-3 Fettsäure. TPN führte so zu den ersten Beispielen einer Omega-3 Fettsäuren-Defizienz. Die Patienten, die die Omega-3 defiziente TPN erhielten, zeigten multiple neurologische Ausfallerscheinungen wie Gehschwäche, Beinschmerzen, psychische Störungen oder Sehschwäche. Wurde die TPN gewechselt, war die Omega-3-Defizienz aufgehoben und die Neuropathologie verschwand (Holman 1998).

Tierexperimentell und anhand klinischer Studien mit Kleinkindern erwies sich DHA als ein essentieller nutritiver Faktor für die Entwicklung des Nervensystems (Simopoulos, 1989; Makrides et al., 1995). Beispielsweise wurde der bekannte Unterschied in der Reife des Nervensystems zwischen Kindern, die mit Muttermilch gefüttert wurden und Kindern, die Kindernahrung erhielten, nahezu komplett aufgehoben, wurde der Kindernahrung DHA zugesetzt (Makrides et al., 1995.).

Die Omega-3 Fettsäure DHA wird zunächst von der Leber aus dem Blut aufgenommen und schließlich zum Zentralnervensystem (ZNS) und zur neuralen Retina transportiert (Wang et al., 1992). Die höchsten Konzentrationen an DHA finden sich in Photorezeptoren und Synapsen der Retina und im Gehirn (Bazan et al., 1990). DHA wird besonders während der Synaptogenese und der Photorezeptorzellbiogenese benötigt (Scott und Bazan 1989). Dabei scheint DHA Einfluss auf die exzitatorischen Membranfunktionen, (Salem et al., 1986; Litman et al., 2001), auf das Gedächtnis, die Photorezeptorbiogenese und -funktion (Wheeler et al 1975; Stinson et al., 1991; Anderson et al., 2002) und die Neuroprotektion zu haben (Kim et al., 2001). Das Gehirn und die Retina haben darüber hinaus eine ungewöhnlich hohe DHA-Retentionsfähigkeit, und es erfordert eine lange DHA-Deprivation, um die Konzentration von DHA in diesen Geweben zu reduzieren (Neuringer et al, 1986). Kommt es allerdings zu einer Depletion der Speicher, manifestieren sich schwere Funktionsdefizite der Retina (Stinson et al., 1991; Neuringer et al., 1984).

Omega-3 Fettsäuren haben neben den Funktionen im gesunden Organismus auch einen Einfluss auf Malignome. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass das Tumorwachstum von

Tieren, deren Nahrung mit Omega-3 Fettsäuren versetzt war, reduziert wurde. Dies wurde für eine Vielzahl verschiedener Malignome demonstriert, darunter das Bronchialkarzinom (Hardman et al., 2000), das Kolonkarzinom (Calder et al., 1998; Chen und Istfan 2000), das Mammakarzinom (Hardman et al., 1997; Connolly et al., 1999) und das Prostatakarzinom (Connolly et al., 1997). Zudem konnte die Effizienz der Chemotherapie wie z.B. bei Therapien mit Doxorubin und Epirubicin, und der Radiotherapie bei verschiedenen Karzinomtypen durch Omega-3 Fettsäuren erhöht und die Nebenwirkungen der Chemotherapie reduziert werden (Hardman et al., 2000; Hardman et al., 2001; de Salis und Meckling-Gill 1995; Germain et al., 1999).

Bei der Hemmung des Tumorwachstums durch die Omega-3 Fettsäuren scheinen mehrere Mechanismen eine Rolle zu spielen. Darunter waren vor allem Veränderungen im Metabolismus der Eicosanoide, kurzlebige, hormonartige Lipide mit einer Kettenlänge von 20 Kohlenstoff-Atomen (Eicosa=20). Sie besitzen eine Vielzahl an unterschiedlichen Aktivitäten, modulieren inflammatorische Antworten und Immunantworten und spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Plättchenaggregation, dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung. Die Produktion der Eicosanoide beginnt mit der Freisetzung der verschiedenen Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren aus den Membranlipiden durch diverse Phospholipasen. Diese Fettsäuren sind sodann Substrate für COX-1 und COX-2, sowie Lipoxygenasen oder Cytochrom P450-Monooxygenasen. Während die Aktivität der Cyclooxygenasen zu Prostaglandinen und Thromboxanen führt, produzieren Lipoxygenasen Leukotriene, Hydroxy-Fettsäuren und Lipoxine. Die Art der produzierten Eicosanoide ist abhängig von dem relativen Anteil der verschiedenen Fettsäuren in der Zellmembran. Im Allgemeinen haben die von AA- abstammenden Eicosanoide proinflammatorische Effekte (Cowing und Saker 2001; Calder und Grimble 2002). Die von EPA stammenden Eicosanoide dagegen zeigen antiinflammatorische Wirkung. Des weiteren wurden die aus AA entstehenden Eicosanoide wie PGE 2, Leukotrien B4, Thromboxan A2 mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht (Rose und Connolly 1999b). So fördert PGE 2 nachweislich das Tumorzellüberleben und findet sich in höherer Konzentration in Karzinomzellen als in normalen Zellen (Chulada et al., 2000). Auch die von AA abstammenden Leukotriene spielen möglicherweise eine Rolle in Tumorzelladhäsion und könnten so eine Metastasierung mit beeinflussen (Damtew und Spagnuolo 1997).

Die Biosynthese von Eicosanoidprodukten der AA wird durch die Omega-3 Fettsäuren auf mehreren Wegen supprimiert. Zunächst kommt es bei hoher Omega-3 Fettsäurezufuhr zu einer Inkorporation in die Membranphospholipide, wodurch AA ersetzt wird (Crawford et al., 2000). Omega-3 Fettsäuren supprimieren zudem COX-2 (Ringbom et al., 2001; Singh et al., 1997), eine Omega-3 Fettsäuren -haltige Ernährung führte beispielsweise in MDA-MB 231 Brustkrebsgewebe bei athymischen Mäusen zur Hemmung der COX-2 Induktion (Rao et al., 1995, Reddy et al., 1990). Neben der Inhibition von COX hemmt DHA auch die Eicosanoidsynthese aus AA (Rose und Connolly 2000). Die Omega-3 Fettsäuren besitzen eine höhere Affinität für die Desaturasen und Elongasen und kompetetieren so erfolgreich mit Omega-6 Fettsäuren.

Zudem wird der Nuklearfaktor- κ B (NF- κ B) durch Omega-3 Fettsäuren gehemmt. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der proinflammatorische Faktoren induziert, darunter COX-2, Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und die Wachstumsfaktoren Interleukin-2 (IL-2) und Granulozyten-Stimulierender-Faktor (GS-F) (Schwartz et al., 1999). So wirkt die Hemmung des NF- κ B durch Omega-3 nicht nur reduzierend auf die proproliferativen Eicosanoide, die durch COX-2 produziert werden, sondern auch auf die durch NF- κ B induzierten Zytokine, die ebenfalls das Tumorstadium fördern und eine Rolle bei der Tumorkachexie spielen sollen (Barber et al., 2001; Babcock et al., 2000).

Über eine Aktivierung von Proteinkinase C bewirken Omega-6 Fettsäuren eine Stimulation der Mitose (Craven und DeRubertis 1988). DHA und EPA kehren diese Aktivierung der Proteinkinase C um und supprimieren so die Mitoserate (McCarty et al., 1996; Murray et al., 2002). Auch die Aktivität der Onkogene *ras* und *AP-1* (engl. Activator Protein-1) wurde durch Omega-3 Fettsäuren vermindert (Collett et al., 2001, Liu et al., 2001).

Omega-3 Fettsäuren erhöhen die Zelldifferenzierungsrate von Mammakarzinomzellen (Wang et al., 2000) und stellen die funktionelle Apoptose wieder her, indem sie die Expression von Genen der BCL-2 Familie herunterregulieren, die die Apoptose blockieren (Chiu und Wan 1999). Zudem erhöhen sie die Transkription von Genen und Transkriptionsfaktoren, die die Apoptose induzieren (Narayanan et al., 2001). Auch aktiver NF-

κ B blockiert die Apoptose (Schwartz et al., 1999), so nimmt man an, dass die Inhibition des NF- κ B durch DHA ebenfalls zu einer Wiederherstellung der Apoptose führt. Des Weiteren wird eine Hemmung der bei Malignomen neu auftretenden Angiogenese postuliert; so demonstrierten Wen et al. (2003) beispielsweise eine Angiogenesehemmung durch Omega-3 Fettsäuren in HEP-2 humanen Karzinomxenotransplantaten.

1.2.3 FABP-7, ein DHA-Rezeptor

FABP-7 (engl.: Fatty acid binding protein-7) ist ein Mitglied der FABP-Familie, das spezifisch während der Entwicklungsphase des ZNS exprimiert wird (Kurtz et al., 1994, Feng et al., 1994). Es findet sich eine strenge Korrelation der FABP-7 Expression in radialen Gliazellen und der neuronalen Differenzierung und Migration dieser Zellen *in vivo*. FABP-7 ist außerdem für die Aufrechterhaltung der Gliazelldifferenzierung in primärer Zellkultur notwendig (Feng et al., 1994). FABP-7 unterscheidet sich von anderen Mitgliedern der FABP-Familie durch sein Liganden-Bindungsverhalten. So ähnelt die Bindungsaffinität zu ungesättigten Fettsäuren wie AA der Affinität anderer Mitglieder, allerdings bindet FABP-7 keine gesättigten Fettsäuren wie Palmitinsäure oder Arachidinsäure. Verglichen mit den beobachteten Interaktionen anderer FABP mit Fettsäuren, bindet FABP-7 allerdings DHA mit einer 20-fach stärkeren Affinität (Xu et al., 1996). Aufgrund dieser hohen FABP-7/DHA –Bindungsaffinität, der Korrelation der zeitlichen FABP-7 Expression im sich entwickelnden ZNS und der Notwendigkeit für DHA für die Entwicklung des ZNS (Paulussen et al., 1988) wird vermutet, dass DHA der natürliche Ligand für FABP-7 ist (Xu et al., 1996). Während die genaue Rolle von FABP-7 im DHA-Metabolismus zur Zeit noch unklar ist, wird eine Funktion von FABP-7 in der Entwicklung des ZNS angenommen. Weiterhin scheint FABP einen Einfluss auf die Pathogenese verschiedener Malignome zu haben (Celis et al., 1996; Custer und Sorof, 1984; Das et al., 2001; Rasmussen et al., 1996). Miller et al. (2002) demonstrierten beispielsweise eine Überexpression von FABP-7 in einer Subpopulation von *Nf1*^{-/-} Schwannzellen sowie in EGFR-positiven MPNST-Zellen.

1.3 Caspase und Apoptose

Es existieren zwei Mechanismen des Zelluntergangs. Nach einer schweren Gewebsschädigung kommt es zu einer Nekrose die mit einer Immunreaktion einhergeht und unterscheidet sich von dem programmierten Zelltod, der Apoptose. Die Nekrose, meist eine Zellreaktion auf Schädigungen wie Hypoxie, Hyperthermie, Infektion oder mechanische Verletzung, führt zum Anschwellen der Zelle mit Schädigung der Organellen und der Zellmembran. Auch das Chromatin wird während der Nekrose kondensiert und geschädigt. Am Ende des Prozesses steht die Zellyse. Dadurch kommt es zu einem Austritt von Zellinhaltsstoffen, die so eine immunologische Entzündungsreaktion auslösen.

Die Apoptose hingegen wird aktiv von der Zelle durchgeführt. Dies ist ein wichtiger Mechanismus, über den die meisten Zellen verfügen, um eine negative Selektion von Zellen, die schädlich für den Organismus sind, herbeizuführen. Zu den Zellveränderungen, zu denen es bei diesem Prozess kommt, zählt der Verlust der Membranphospholipid-Asymmetrie bei intakter Zellmembran während früher Stadien der Apoptose. Dieses Phänomen ist universell und nicht auf einen Stimulus oder auf Säugetierzellen beschränkt (Martin et al., 1995). Die Aktivierung der Prozesse, die zur Apoptose führen, wird von einer Familie intrazellulärer Proteasen, den Cystein Aspartyl-spezifischen Proteasen (Caspasen) eingeleitet. Es existieren multiple Mechanismen der Caspasenaktivierung, wobei zwei Signalwege im Detail untersucht wurden. Ein Signalweg beginnt mit der Bindung eines Liganden an den TNF-Rezeptor, der über die Aktivierung der Caspase-8 die Effektor-Caspase-3 proteolytisch und somit zu Apoptose führt. Der andere Signalweg involviert Mitochondrien, die Caspase-aktivierende Proteine wie Cytochrom-C ins Cytosol freigeben, um so über Caspase-9 und wieder die Effektor - Caspase - 3 die Apoptose einzuleiten.

1.4 Mitogen aktivierte Protein Kinase

ERK gehört zu einer Familie von Serin/Threonin Mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK). Die MAPK Kaskade ist in diversen Zellfunktionen, darunter Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellbewegung, Zellteilung und Zelltod involviert. Die Kaskade ist evolutionär in allen Eukaryoten konserviert und spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Genexpression wie auch bei zytoplasmatischen Aktivitäten. In Säugetiersystemen gibt es derzeit

fünf verschiedene MAPK- Subfamilien. Unter ihnen die ERK1/2 Kaskade (Extrazellulär signalregulierte Kinase 1/2: ERK1/2), die cJNK (c-Jun N-terminale Kinase: JNK), die p38 Kaskade (Ip und Davis 1998; Lewis und Shapiro 1998) sowie die ERK3/4 Kaskade und die ERK5 Kaskade. Der biologische Kontext eines Signals spielt eine entscheidende Rolle für das Resultat einer MAPK-Aktivierung. So sind ERKs generell in der Regulation von Wachstum und Zelldifferenzierung und JNKs normalerweise in der Stressantwort involviert, JNKs induzieren allerdings in manchen Zelltypen auch eine Proliferation (Smith et al., 1997).

Die verschiedenen Signalwege, in denen die MAPK involviert sind, werden durch äußerst diverse Stimuli aktiviert. Wachstumsfaktoren wie EGF (McCawley et al., 1999), Lipopolysaccharide (Foey et al., 1998) und chemotherapeutische Agenzien (Persons et al., 2000) aktivieren beispielsweise den ERK-Weg. Die JNK und p38 MAPK Signalwege reagieren demgegenüber auf Stressstimuli wie Hitze, osmotischer Schock, Bestrahlung oder ebenso auf Wachstumsfaktoren (Paumelle et al., 2000).

Typischerweise besteht ein MAPK Modul aus drei Kinasen, die einen sequentiellen Aktivierungsweg darstellen. Die erste Kinase des Moduls, eine MAPK Kinase Kinase (MKKK), wird durch Interaktion mit kleinen GTP bindenden Proteinen der Ras- oder Rho- Familie aktiviert. Diese MKKKs sind Serin/Threonin Kinasen, die in aktiviertem Zustand die nächste Kinase dieses Moduls phosphorylieren, die MAPK Kinase (MKK). Diese wiederum phosphorylieren die letzte Kinase des Moduls, die MAPK, die die eigentlichen Substrate aktiviert. Die meisten dieser Substrate sind Transkriptionsfaktoren, aber auch Protein Kinasen, Phospholipasen und Zytoskelett-assoziierte Proteine.

Der am besten untersuchte MAPK Signalweg in Säugetierzellen ist der ERK- Weg. Die ERK1/2 Subfamilie ist eine von insgesamt fünf (ERK1-5). Durch die Stimulation von ERK kommt es zu einer Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren oder Serin Threonin Kinasen, die zu Zellproliferation und Zellüberleben, aber auch zu Differenzierung und Zellzyklusregulation führen. Eine Vielzahl der Faktoren, die die Phosphorylierung von ERK induzieren, wirken via Aktivierung von Ras. Ras aktiviert daraufhin die MKKK in diesem Modul, Raf-1, dieses wiederum stimuliert den ERK-Signalweg (Smith et al., 1986; Marais und Marshall 1996).

Die biologischen Funktionen von ERK hängen vom Kontext der Aktivierung ab. Viele Arbeitsgruppen konnten eine erhöhte Expression von ERK in Tumorgewebe und eine Korrelation zwischen einer ERK1/2- Aktivierung und erhöhter Zellproliferation zeigen. Darüber hinaus stimulieren Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF die Aktivität von ERK einhergehend mit einer erhöhten Zellproliferation. Beispielsweise zeigte eine Analyse der Expression und Aktivität von ERK in Mammakarzinomgewebe in allen untersuchten Geweben eine Überexpression von ERK mit einhergehender erhöhter Aktivität verglichen mit normalem Gewebe. Auch die Expression des Downstream-Effektors Raf-1 war im untersuchten Mammakarzinomgewebe heraufreguliert (Maemura et al., 1999). Eine Störung verschiedener Komponenten des ERK Signalweges durch dominant negative Mutanten oder durch antisens-Konstrukte für Raf-1 oder ERK führen zudem zu signifikanter Hemmung der Zellproliferation (Pages et al., 1993; Seger und Krebs 1995). ERK scheint zudem auf das Zellüberleben zu wirken, so wurde durch eine Inhibition von ERK eine Erhöhung der Apoptoseinduktion einhergehend mit einer Aktivierung des Schlüsselenzyms der Apoptose, der Caspase-3 in Chondrozyten demonstriert (Kim et al., 2002). Chuang et al. (2000) wiesen darüber hinaus eine Assoziation zwischen der durch Cadmium ausgelösten Inhibition von ERK und einer verstärkten Apoptose in humanen nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomzellen nach. Mansour et al. (1994) testeten die Hypothese, Onkogene, wie *ras*, *src* und *raf* induzierten eine verlängerte Aktivität von MAPKK und führten so zu Zelltransformation. Tatsächlich fand sich in Säugetierzellen, die eine konstitutiv aktivierte MAPKK Mutante mit erhöhter Aktivität gegenüber der Wildtyp Kinase exprimierten, eine Aktivierung der AP-1 regulierten Transkription. Diese Zellen waren stark tumorigen in athymischen Mäusen.

Neben der Stimulierung der Zellproliferation ist der ERK-Signalweg auch in der Induktion der Zelldifferenzierung involviert. Wurden B-Lymphozyten beispielsweise mit Okadaidsäure, einem Phosphataseinhibitor behandelt, kam es zu einer Aktivierung von ERK mit einhergehender Hemmung der Zellproliferation (Casillas et al., 1993). ERK scheint darüber hinaus auch in Cerebellaren Granular Neuronen (CGN) den Zelltod auszulösen. So führte eine Inhibition der ERK Aktivität zu einer Reduktion der geschädigten Neuronen, unabhängig von Caspase-3 (Subramaniam et al., 2004). In glatten Muskelzellen beobachtete man ebenfalls eine zellwachstumshemmende Aktivität von ERK. PGE 2 führt in diesen Zellen nachweislich zu einer Hemmung der Zellproliferation. Bornfeldt et al. (1997) gelang der Nachweis über einen

Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ERK in diesen Zellen und der Sekretion von PGE 2 mit einhergehender Hemmung der Zellproliferation. Die Hemmung schien von PGE 2 abzuhängen, denn fehlte in den glatten Muskelzellen die induzierbare Form der COX, kam es bei Aktivierung von ERK nicht zu einer PGE2 Sekretion und die Zellen proliferierten.

1.5 Aufgabenstellung der Arbeit

Obwohl das Verständnis der Pathogenese der NF1 durch die neuen molekularbiologischen Methoden, wie z.B. die Entdeckung des *NF1* Gens (Cawthone et al., 1990; Wallace et al., 1990) oder die Analyse des Proteins Neurofibromin (DeClue et al., 1991; Gutmann et al., 1991; Golubic et al., 1992), stark zugenommen hat, bleiben viele Aspekte der Neurofibromatose Typ 1 unklar. So ist die große Variabilität der Ausprägung und des natürlichen Verlaufs der Krankheit Gegenstand intensiver Forschung.

Anhand verschiedener Studien wurde bereits die Rolle von Hormonen und Wachstumsfaktoren in der Pathogenese der NF1 analysiert. Demgegenüber gab es bisher noch keine Untersuchungen über den Einfluss von Fettsäuren auf das Tumorwachstum bei NF1. Studien über Expressionsprofile in *Nf1*^{-/-} Schwanzzellen zeigten eine dramatische Induktion des FABP-7 (Feng et al., 1994; Kurtz et al., 1994; Miller et al., 2003), ein Protein, welches DHA mit einer hohen Affinität bindet (Xu et al., 1996).

Wir untersuchten daher den Effekt der Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren in der Neurofibromatose Typ 1. Als Modell wurden Zellkulturen von Maus *Nf1/p53* Zellen, die als Tumormodell für die Entwicklung von MPNST dienen, verwendet. Die Omega-3 Fettsäure DHA und die Omega-6 Fettsäure AA allein und in Kombination wurden eingesetzt und ihr Einfluss auf das Zellwachstum und auf die Apoptose betrachtet. Es wurden Proliferationsassays durchgeführt, um quantitative Aussagen über das Wachstum oder die Wachstumshemmung unter dem Einfluss der Fettsäuren zu bekommen.

Ferner wurde die Wirkung der Fettsäuren DHA und AA auf die durch multiple Wachstumsfaktoren induzierte Zellproliferation in der NF1 analysiert. Ein weiteres Ziel war es,

Details über die molekularen Mechanismen der Modulation des Zellwachstums durch die Fettsäuren herauszufinden. Zunächst wurde der Mechanismus des Zelltodes mittels Immunhistochemie und Western-Blot-Analyse untersucht. Im nächsten Schritt wurden Moleküle möglicher Downstream-Signalwege, durch die DHA und AA wirken könnten, analysiert.

Nach den *in vitro* Studien wurden *in vivo* Experimente an Mäusen durchgeführt, um so das durch Injektion von *Nf1/p53* Tumorzellen induzierte Tumorstadium und die Überlebensrate nach Applikation von DHA und AA zu beurteilen. Die Lokalisation des DHA Rezeptors FABP-7 in NF1 assoziierten Zelllinien und Tumorgewebe wurde mittels Immunhistochemie und PCR in Expressionsstudien untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Fettsäurepräparation

DHA Sigma, München

AA Sigma, München

Albumin Lösung Sigma, München

5%

2.1.2 Zellkultur

DMEM Invitrogen, Karlsruhe

(engl. Dulbecco's modified Eagle Medium)

PBS (steril), Phosphatpuffer, pH 7,4 Apotheke der Universität Bonn

- 8 g NaCl
- 0,276 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 2,864 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$
- ad 1.000,0 ml Aqua dest.

Fetales Kalbs Serum Invitrogen, Karlsruhe

(engl. fetal calf serum: FCS)

10%

Apoptose Detektions Kit Sigma, München

(APO-AC)

Annexin V-Cy3.18 Sigma, München

(A4963)

100µg/ml Lösung in 50mM Tris-HCl,

pH 7,5 mit 100mM NaCl

6-Carboxyfluoresceindiacetat (6-CF) (C5041)	Sigma, München
Bindender Puffer (B9796) (10x) 10mM Hepes pH 7,5 mit 140mMNaCl,2,5 mM CaCl ₂	Sigma, München
Aceton	Apotheke der Universität Bonn
Penicillin	Apotheke der Universität Bonn
Streptomycin	Apotheke der Universität Bonn
2.1.2.1 Wachstumsfaktoren	
EGF	Sigma, München
PDGF-β	Sigma, München
bFGF	Invitrogen, Karlsruhe
IGF-1	Invitrogen, Karlsruhe
2.1.2.2 Zellen	
Maus <i>Nf1:p53</i> MPNST Zell Linien 39-2-11 und 32-5-30	Geschenk von Louis Parada (University of Texas)
Mensch <i>NF1:P53</i> MPNST Zell Linien S520, S462, S805 Mensch Zelllinie S811	Geschenk von Viktor Mautner (Universität Hamburg)

Mensch- und Maus-Hautfibroblasten

Erhalten aus Nf^{+/-} und Wild-Typ Mäusen und der Haut eines NF1-Patienten und eines gesunden Individuums respektive

2.1.2.3 Farbstoffe

Trypanblau

Serva, Heidelberg

Charge: 15F-0060

2.1.2.4 Lysierungslösungen

Proteaseinhibitoren

Sigma, München

Leupeptin, Aprotinin, Phenylmethylysulphonylfluoride (PMSF)

Liquid Nitrogen

12-15% SDS Gel

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primärantikörper

Anti-P-ERK/ERK

Upstate, Dundee

Anti-ERK

Upstate, Dundee

Anti-Caspase-3

Cell Signaling Technology, Danvers

Anti- β -actin

Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Anti-FABP-7

Geschenk von Thomas Müller
(Max Delbrück Center Berlin)

2.1.3.2 Sekundärantikörper

Anti-Hase Sekundärantikörper

Amersham Biosciences, Freiburg

Horseshoe peroxidase (HRP) markiert

ECL-Chemiluminescence Detektionssystem

Amersham Biosciences, Freiburg

Ziege Anti-Hase

Amersham Biosciences, Freiburg

Sekundär biotinyliert

ABC System

Vector Laboratories, Burlingame

DAB

2.1.4 PCR-Reagenzien

Trizol Reagenz

Life Technologies, Eggenstein

Oligo-dT Primer, Superscript

Gibco-BRL, Gaithersburg

Mensch β -actin Primer

5'-AGCGGTTCCGCTGCCTGA-3'

5'-GGACTTCCTGTAACAATG-3'

Maus β -actin Primer

Invitrogen, Karlsruhe

Maus/Mensch FABP-7 Primer

5'-GGCGTGGGCTTTGCCACT-3'

5'-TGCCATCCTTAATTTCTC-3'

1% Agarose Gel

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der Fettsäuren

Die Fettsäuren DHA und AA wurden mit je 5% entfetteter Albuminlösung zu einer Konzentration von 600µg/ml gemischt und für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Fettsäurelösungen wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert. Sie wurden direkt vor dem Gebrauch aufgetaut.

2.2.2 Zellkultur

Die Maus *Nf1:p53* MPNST Zelllinien 39-2-11 und 32-5-30 waren ein Geschenk von Louis Parada (University of Texas). Die menschlichen *NF1:P53* MPNST Zelllinien S520, S462 und S805 stammten von MPNST und wurden genotypisiert wie beschrieben (Frahm et al., 2004). Die menschliche Zelllinie S811 stammt von MPNST, Mutationsanalysen und Karyotypisierung dieser Zelllinien zeigten jedoch die nicht-tumoröse Entstehung. Mensch- und Maus- Hautfibroblasten wurden aus *Nf1*^{+/-} und Wildtyp-Mäusen erhalten und von der Haut eines NF1-Patienten und eines gesunden Individuums respektive. Die Zellen wurden in DMEM mit 10%igem FCS und Penicillin/ Streptomycin kultiviert.

2.2.3 Proliferationsassay

Die Zellen wurden in 24-Kammer-Platten mit 20.000 Zellen/Kammer für die 3-Tages-Wachstumsassays und mit 10.000 Zellen/Kammer für die 6-Tages-Wachstumsassays in komplettem Wachstumsmedium angesetzt. Sobald die Zellen adhärend waren, wurden sie für 24h in serumfreiem Medium kultiviert. Medium, versetzt mit den Fettsäuren DHA, AA oder den Wachstumsfaktoren EGF, PDGF-β, bFGF und IGF-1 und mit Albuminlösung als Kontrolle wurde sodann appliziert, und die Zellen wurden bei 37°C inkubiert. Nach 3 Tagen wurde Trypsin-EDTA zugesetzt, um die Zellen von den Kulturflaschen zu lösen. Die Zählung erfolgte mittels Trypanblau. Bei den 6-Tages-Wachstumsassays wurde das Medium am 3. Tag gewechselt, und die Zellen wurden am 6.Tag wie oben beschrieben trypsiniert und ausgezählt.

Die Konzentrationen und Kombinationen der individuellen Faktoren werden in den Legenden der Graphen beschrieben.

2.2.4 Detektion der Apoptose

Die Apoptose wurde mittels immunhistochemischer Markierung mit Annexin-Cy 3.18 und 6-CF detektiert. Um die Apoptose zu induzieren, wurden die Zellen in serumfreiem DMEM für 24h inkubiert und dann mit DHA (30µg/ml) oder Albumin in derselben Konzentration behandelt. Nach 24h Inkubation wurden die Zellen trypsiniert und gelöst. Die Proben wurden mit der Doppelimmunfluoreszenz für Annexin und 6-CF nach dem Protokoll des Herstellers gefärbt, und die Ergebnisse wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskops beobachtet und danach fotografiert. Abhängig von der Markierung wurden die entsprechenden Filter verwendet.

2.2.5 Western-Blot Analyse

In jede Kammer der 12-Kammer-Platte wurden ungefähr 2×10^5 Zellen ausgesät. Sie wurden in Wachstumsmedium für 16h bis zur Adhärenz kultiviert und dann für 24h in serumfreies Medium gebracht, bevor sie wie in den Legenden der Graphen beschrieben, mit EGF, DHA oder AA behandelt wurden. Die Zellen wurden 1h und 7h nach dieser Behandlung für 5min in dem adäquaten Lysierungspuffer, dem die Proteaseinhibitoren Leupeptin, Aprotinin und PMSF zugesetzt wurden, lysiert. Die Lyseprodukte wurden sofort in liquidem Nitrogen gefroren, und es wurden gleiche Mengen an Protein auf 12-15%igem SDS-Gel für die Elektrophorese geladen. Die Western-Blot Analyse wurde mit den Antikörpern Anti-P-ERK/ERK, Anti-ERK, Anti-Caspase-3 und Anti-β-Actin durchgeführt und mittels des HRP-markierten sekundären Ziege-Anti-Hase Antikörpers und des ECL-Chemilumineszenz Detektionssystems detektiert.

2.2.6 Tumor Wachstums Assays

Athymischen Mäusen wurde die Maus-MPNST Zelllinie 32-5-39 mit 10^5 Zellen pro Maus subkutan injiziert. Sobald die Tumore eine Größe von ungefähr 100 mm^3 erreichten, wurden diese Mäuse per Zufall drei Gruppen zu je sechs Mäusen zugeordnet. In die Tumore der experimentellen Gruppe wurden $10 \mu\text{l}$ DHA ($30 \mu\text{g/ml}$) und in die Tumore der Kontrollgruppe entweder $10 \mu\text{l}$ AA ($30 \mu\text{g/ml}$) oder Albuminlösung injiziert. Die Tumore wurden jeden 2. Tag behandelt und ihre Größe gemessen. Die Mäuse wurden geopfert, sobald die Tumorgöße 2 cm in einer Dimension erreicht hatte.

2.2.7 PCR-Analyse

Die RNA wurde aus einer gleichen Anzahl Zellen oder aus gleichen Volumenanteilen an Gewebe präpariert. Es wurde Trizol Reagenz für die cDNA-Transkription mit Oligo-dT Primer und Superscript Reverse Transkriptase verwendet. Die humanen β -actin Primer (5'-AGCGGTTCCGCTGCCTGA-3', 5'-GGACTTCCTGTAAACAATG-3'), Maus β -actin Primer und die humanen/Maus FABP-7 Primer 5'-GGCGTGGGCTTTGCCACT-3', 5'-TGCCATCCTTAATTTCTC-3' wurden in den PCR-Reaktionen verwendet. Es wurden 35 Zyklen mit 1min Denaturation bei 94°C ; 1min Annealing bei 55°C und 1min Polymerisation bei 72°C durchgeführt. Die Produkte wurden auf einem 1,0 %igem Agarose Gel analysiert.

2.2.8 Immunhistochemie

In Paraffin eingebettete humane Neurofibromgewebsschnitte wurden 10min in der Mikrowelle erhitzt und nach 5min Abkühlung bei RT mit frischer Xylenlösung für 10min behandelt. Nach zweimaligem Waschen in 100%igem Ethanol für je 5min wurden die Schnitte mittels gradueller Waschung in Ethanol rehydriert und anschließend in ddH₂O und PBS für je 1min gewaschen. Die Behandlung in der Mikrowelle wurde in PBS/1% (v/v) Acetsäure für 10min bei 80°C durchgeführt. Die Schnitte wurden gekühlt und zweimal in PBS gewaschen. Das Gewebe wurde sodann mit PBS/1% BSA behandelt und mit 20%igem Normalserum in PBS für 30min geblockt.

Normalserum der Spezies, in der die Antikörper produziert wurden, wurde als Blockung benutzt. Der Antikörper Anti-FABP-7 wurde in einer Verdünnung von 1:3000 für 20min bei 50°C appliziert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte für 30min mit 20%igem Normalserum in PBS geblockt. Der sekundäre biotinylierte Ziege-Anti-Hase Antikörper wurde für 20min in PBS/2% BSA bei RT appliziert. Die Gewebsschnitte wurden dreimal mit PBS gewaschen. Die Detektion und die Visualisierung wurde mittels ABC-Reagenzien für 15min mit 0,1mg/ml 3,3'-diaminobenzidine (DAB)-Färbung als Substrat durchgeführt, bevor die Schnitte eingebettet wurden. Die Tumore und normaler Nerv der Maus wurden entnommen und eingefroren. Die Schnitte wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert, in PBS gewaschen und die Immunhistochemie wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Hochdosiertes DHA induziert die Apoptose von murinen und humanen MPNST-Zellen

Um den Effekt von DHA auf die MPNST- Zellen zu testen, wurden den humanen (S520, S462, S805) und den murinen (32-5-30, 39-2-11) MPNST-Zellen DHA in physiologischer Konzentration (26,4 +/- 10,2 µg/ml), die auch in maternalem Plasma zu finden ist, zugesetzt (Ruyle et al., 1990). Am 3. Tag stieg bei einer niedrigen Dosierung von 3 µg/ml die Zellzahl der Mauszelllinie 32-5-30 signifikant um 209%, und die der humanen MPNST-Zelllinien um 119% an (Abbildung 1). Weder bei den *NFI*^{+/-}, den humanen und murinen Wildtyp- Hautfibroblasten, noch bei der murinen MPNST-Zelllinie 39-2-11 konnte ein Effekt detektiert werden. Die Zelllinie 39-2-11 ist die tumorgenste aus einer Gruppe von sechs unabhängigen Linien, die Zelllinie 32-5-30 hingegen stellt die Zelllinie mit den geringsten tumorigenen Eigenschaften dar (Daten werden hier nicht gezeigt). Es könnte folglich sein, dass die Zellen mit höherem tumorigenem Potential eine verminderte oder fehlende Sensitivität gegenüber der proliferativen Wirkung von DHA besitzen.

Die Applikation von 30 µg/ml DHA führte hingegen zum Zelltod der meisten murinen MPNST-Zellen mit einem geringeren Effekt auf die humanen MPNST-Zellen. Während sich das Wachstum der humanen und murinen Wildtyp-Hautfibroblasten nicht änderte, war ein leichter, aber signifikanter Effekt auf die *NFI*^{+/-} Hautfibroblasten zu beobachten (Abbildung 1).

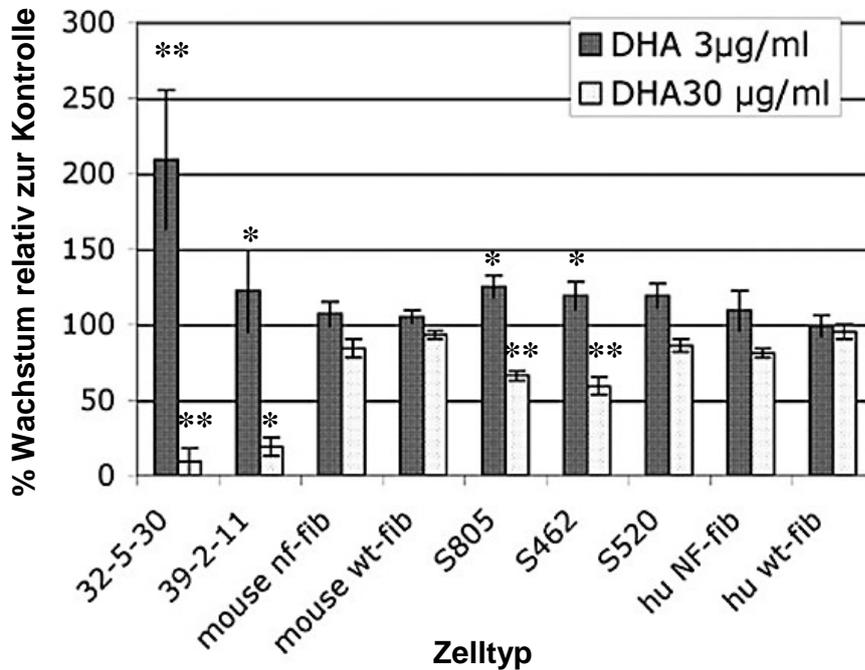


Abbildung 1: Effekt von DHA (3 und 30µg/ml) oder Albuminlösung auf die Proliferation der murinen (Zelllinien 32-5-30, 39-2-11) und humanen (Zelllinien S805, S462, S520) Malignen peripheren MPNST-Zellen und auf die murinen und humanen *NFI*+/- (mouse nf-fib, hu NF-fib) und Wildtyp (mouse wt-fib, hu wt-fib) primären Hautfibroblasten. Den Zellen wurde drei Tage DHA oder Albumin zu serumfreien Medien zugesetzt. (Sternchen: Signifikanz zwischen behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe; ** P<0,002; *P<0,02; zweiseitiger T-Test. Balken ohne Sternchen zeigen keine Signifikanz zwischen den behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe. Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen der 3 und 30µg/ml Gruppe in der Zelllinie S520 und der 3 und 30µg/ml Gruppe in humanen *NFI*+/- Fibroblasten : P<0.045). Experimente n>6.

Um den Mechanismus des durch DHA verursachten Zelltodes zu etablieren, applizierten wir DHA mit einer Konzentration von 60 µg/ml und Albuminlösung auf die Mauszelllinie 39-2-11. Nach Inkubation für 24h in serumfreiem Medium wurden die apoptotischen und die vitalen Zellen mit Hilfe des Annexin V und 6-CF gemessen. In >80% der Zellen, die mit DHA behandelt wurden, konnte Annexin als Marker für eine frühe Apoptose entdeckt werden, während in der Kontrollzellgruppe nur <5% apoptotisch waren (Abbildung 2).

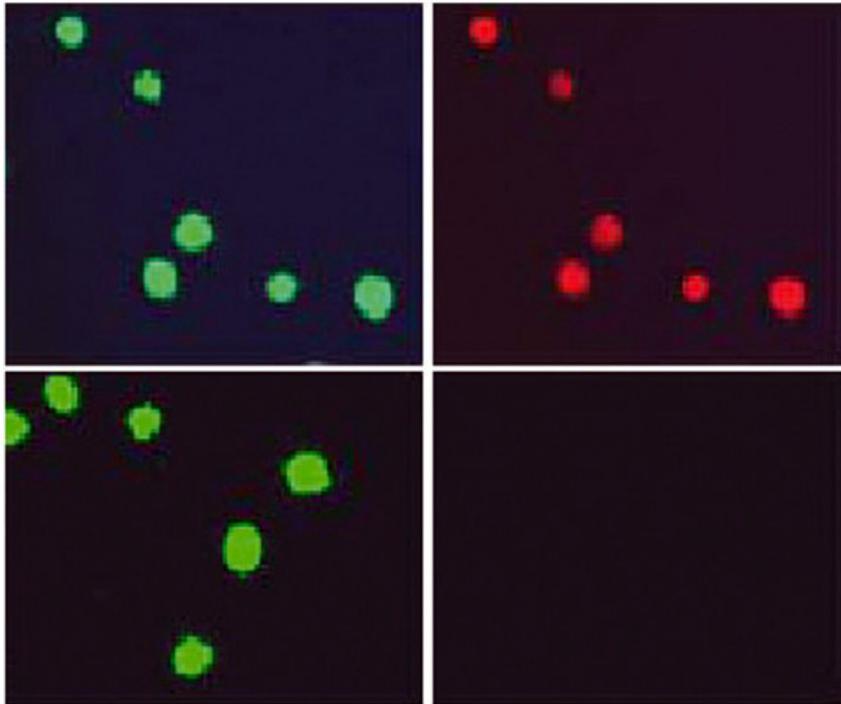


Abbildung 2: Immunfluoreszenzfärbung von 6-CF (grün) oder Annexin (rot) in murinen 39-2-11 Zellen mit DHA (obere Abbildung) oder Albumin (untere Abbildung) behandelt. Die Zellen wurden für 24h in serumfreiem Medium kultiviert, DHA oder Kulturmedium wurde zugesetzt, und nach 24h wurde die Apoptose gemessen. Experimente n>3.

Mittels Western-Blot Analyse der murinen MPNST-Zelllinien und der humanen MPNST-Zelllinien konnte die Induktion der Apoptose über eine Aktivierung des Caspase-3-Signalweges durch DHA bestätigt werden. AA führte weder in humanen noch in murinen MPNST-Zellen zu einer Aktivierung der Caspase-3, wie für die Zelllinie S520 und 39-2-11 gezeigt wird (Abbildung 3).

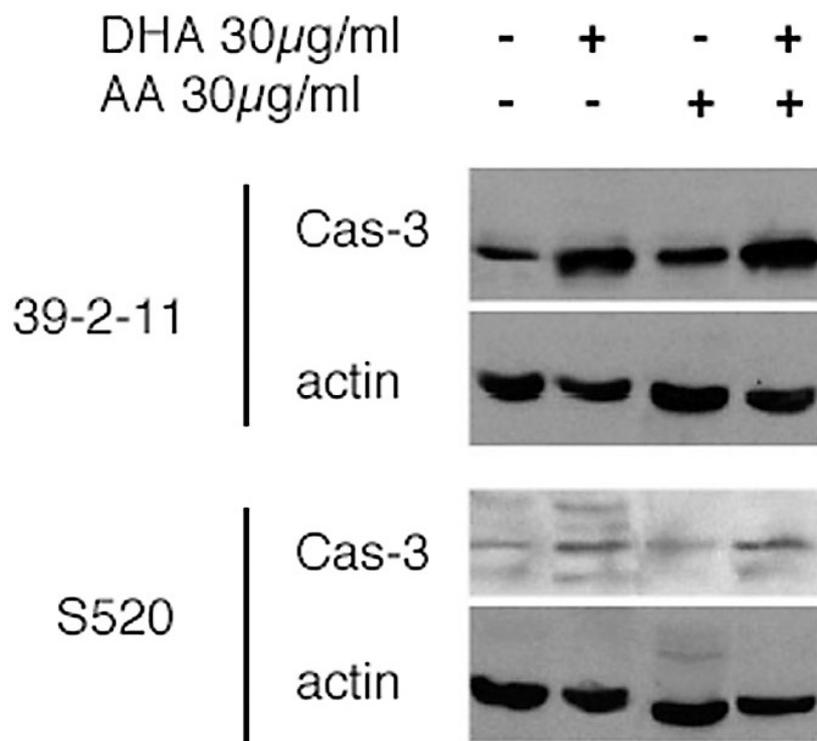


Abbildung 3: Western-Blot Analyse der aktivierten Caspase-3 (Cas-3) und des β -Actins in murinen (39-2-11) und humanen (S520) MPNST-Zelllinien. Den Zellen wurde DHA und AA für 7h in serumfreiem Medium zugesetzt. Experimente n>3.

3.2 DHA hemmt die Stimulation der MPNST-Zellen durch Wachstumsfaktoren

Wir testeten den Effekt von DHA in Kombination mit Wachstumsfaktoren, die bekanntermaßen das Wachstum von MPNST-Zellen stimulieren. In der Zelllinie 39-2-11 führte die Applikation von EGF und PDGF- β zu einem mehr als dreifach erhöhtem Zellwachstum, während bFGF und IGF-1, verglichen mit der Kontrolle am 6. Tag, ein mehr als zweifach erhöhtes Zellwachstum induzierten. DHA in einer Konzentration von 30 μ g/ml kehrte die Stimulation durch alle getesteten Wachstumsfaktoren komplett um und reduzierte die Zellzahl auf ebenso niedrige Level wie mit DHA alleine erreicht wurden (Abbildung 4).

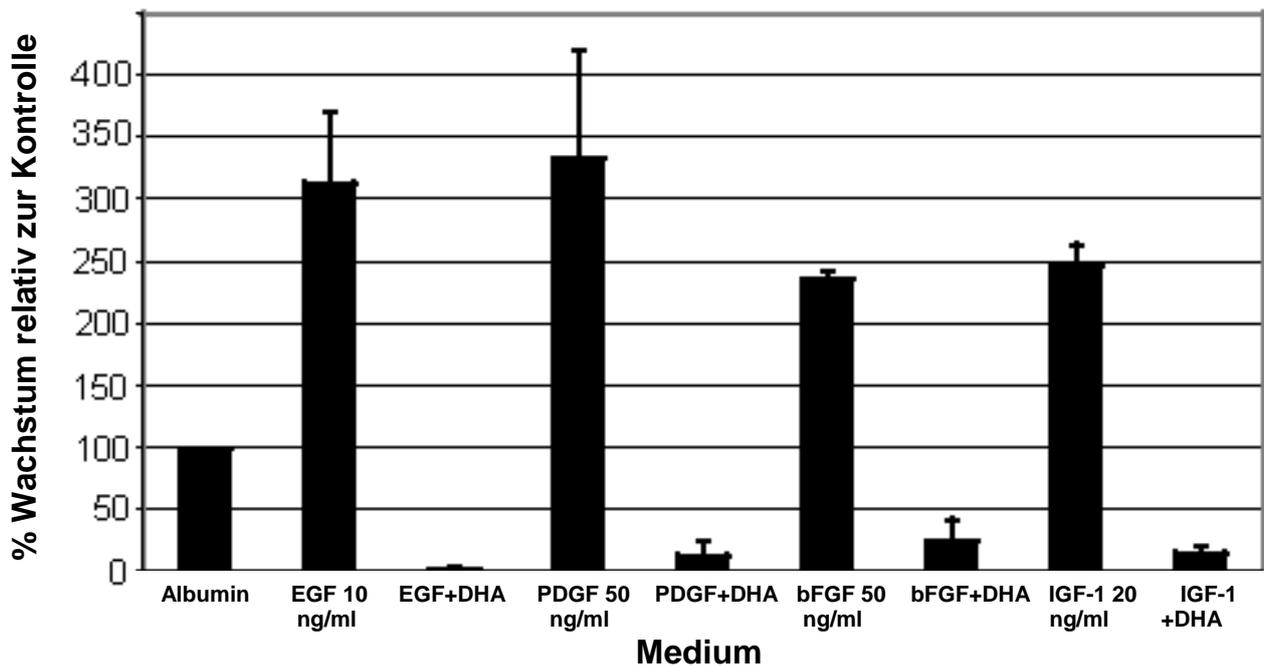


Abbildung 4: Effekt von DHA (30µg/ml) auf die Wachstumsfaktorstimulation der murinen 39-2-11 MPNST-Zellen. Die Zellen wurden für 6 Tage mit einem Mediumwechsel nach 3 Tagen inkubiert. Die Differenz zwischen dem Effekt der Wachstumsfaktoren alleine und dem Effekt der Wachstumsfaktoren plus DHA war signifikant ($P < 0.0007$, T-Test). Experimente $n > 3$.

Die Induktion der Apoptose in EGF-stimulierten Zellen war auch in Anwesenheit von 0,5% FCS dosisabhängig (Abbildung 5). Bei der Zelllinie 32-5-30 wurden vergleichbare Level der Wachstumsfaktorstimulation und der Hemmung durch DHA gefunden (Die Daten werden hier nicht gezeigt).

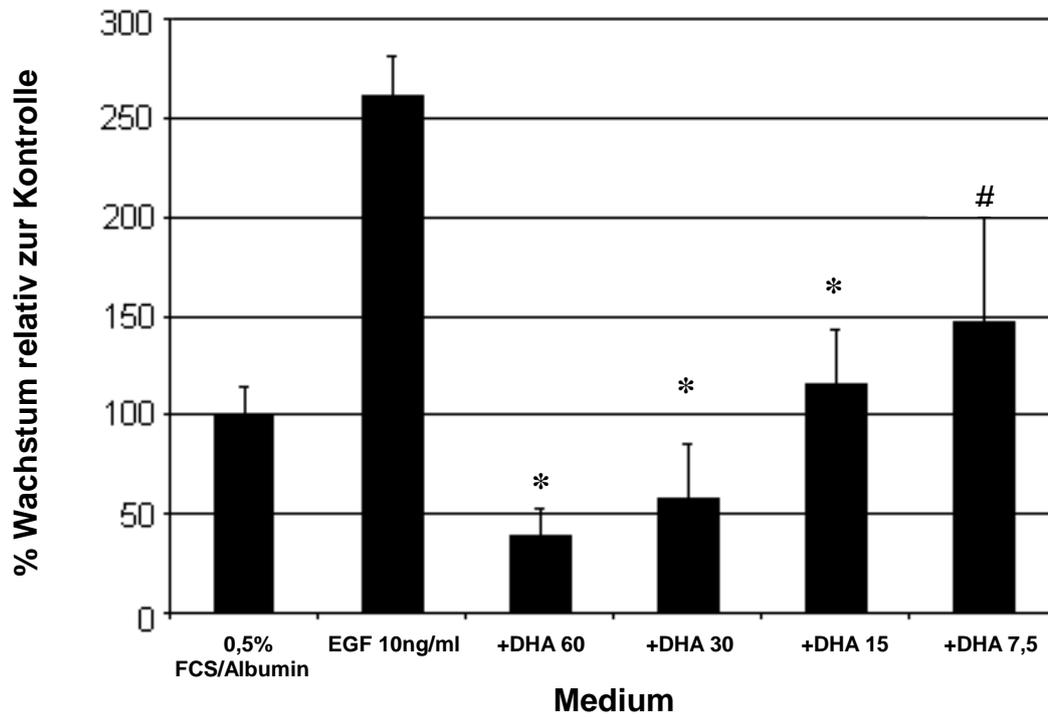


Abbildung 5: Dosis-Wirkungs-Darstellung von DHA auf die Stimulation muriner 39-2-11 MPNST-Zellen durch EGF und 0,5% FCS. Sternchen: $P < 0.01$ verglichen mit EGF alleine; Kreuzchen: $P = 0.07$ (T-Test). Experimente $n > 3$.

3.3 DHA und AA zeigen eine reziproke Aktivität

In der Modulation verschiedener Tumorzellen ließ sich eine reziproke Aktivität der Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren nachweisen (Hardman, 2002). Um diesen Effekt in MPNST-Zellen zu testen und die Spezifität der Modulation durch die Fettsäuren darzustellen, wurde der Effekt von 30µg/ml DHA und AA auf Zelltod und Proliferation verglichen. Nachweislich führte DHA nahezu zum kompletten Zelltod, bei AA war demgegenüber eine Wachstumsstimulation mit einem zweifach erhöhten Wachstum zu beobachten (Tabelle 1).

Probe (µg/ml)	39-2-11	32-5-30
Albumin Lösung	100+/-19	100+/-19
DHA 30	3+/-5 (0.001)	8+/-8 (0.009)
AA 30	202+/-70 (0.009)	203+/-20 (0.004)
DHA 30 + AA 30	32+/-20 (0.42)**	68+/-30 (0.1)##
DHA 30 + AA 3	25+/-22 (0.008)*	74+/-27 (0.1)#
DHA 3 + AA 30	197+/-18 (0.003)**	291+/-18 (0.002)##
DHA 3 + AA 3	149+/-61 (0.37)*	284+/-123 (0.059)#

Tabelle1: Vergleich von DHA, AA und verschiedener Kombination beider Fettsäuren auf das MPNST Zellwachstum. Die Daten sind als Prozent des Wachstums relativ zu der Albuminlösung angegeben (+/-SD). In Klammern: Signifikanzwerte zwischen Kontrolle und behandelter Gruppen (T-Test). *,**, #, ## = Signifikanzwerte zwischen gleichen AA- und 3 und 30µg/ml DHA- Gruppen respektive. ** = 0.0008, * = 0.02, ## = 0.0004, # = 0.04. Experimente n>3.

Nach der beobachteten reziproken Wirkung beider Fettsäuren wurde nun der Effekt von 30µg/ml AA auf die durch die Wachstumsfaktoren ausgelöste Stimulation der MPNST-Zelllinie 39-2-11 getestet. Hier zeigte sich kein Effekt auf die Wachstumsstimulation durch EGF und IGF-1. Es ließ sich allerdings ein verminderter Wachstumseffekt von bFGF und ein markanter synergistischer Effekt von AA auf die Stimulation durch PDGF-β darstellen. So induzierte AA in Kombination mit PDGF-β eine sechsfache Erhöhung des Wachstums im Vergleich zu einer dreifachen Erhöhung von PDGF-β alleine (Abbildung 6). DHA zeigte insgesamt einen konsistent

hemmenden Effekt auf die Stimulation durch Wachstumsfaktoren, während sich bei AA ein variabler Effekt in Abhängigkeit von den Faktoren zeigte.

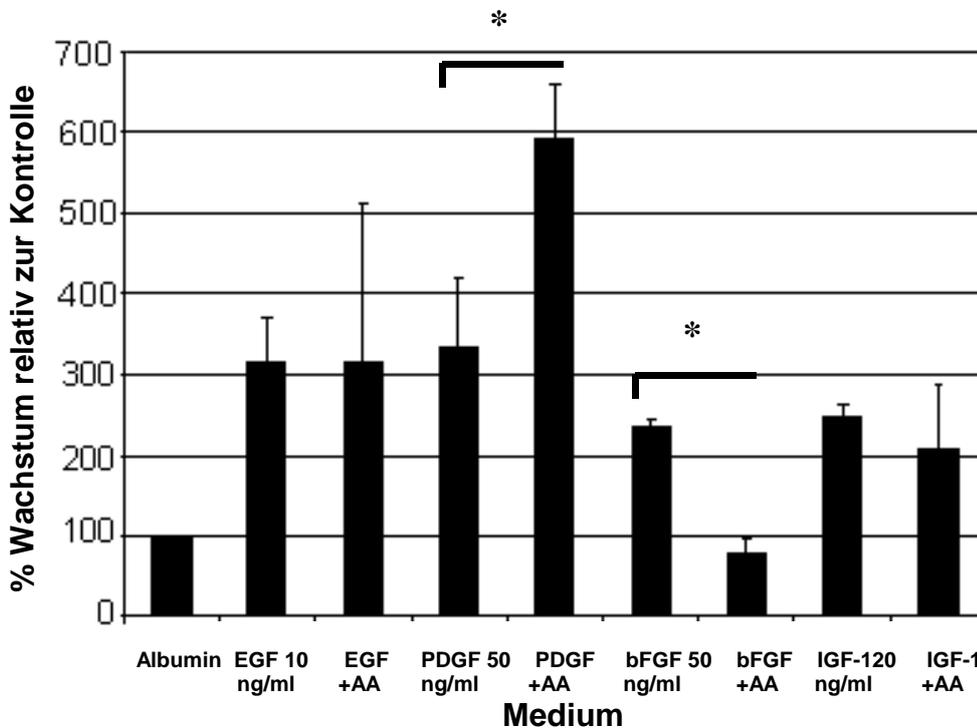


Abbildung 6: Effekt von AA (30µg/ml) auf die Wachstumsfaktorstimulation muriner 39-2-11 MPNST-Zellen. Signifikante Differenzen sind durch Sternchen markiert: P<0.02 (T-Test). Experimente n>3.

In verschiedenen Malignomen konnte bereits ein Einfluss der Relation der Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren auf die Tumorgenese gezeigt werden (Hardman 2002). Wir untersuchten dieses Phänomen, indem die Zelllinien 32-5-30 und 39-2-11 mit verschiedenen Kombinationen von niedrig dosiertem (3µg/ml) und hochdosiertem (30µg/ml) DHA und AA behandelt wurden (Tabelle 1). In Konditionen mit hochdosiertem DHA konnte AA in keiner Dosierung das Wachstum der MPNST-Zellen stimulieren, auch wenn die Anwesenheit von AA die Hemmung der Zelllinie 32-5-30 durch DHA verminderte. In Konditionen mit niedrig dosiertem DHA führten beide Dosierungen von AA zu einer Stimulation des Zellwachstums, sowohl über den Effekt der hochdosierten AA, als auch der niedrig dosierten DHA hinaus. Zusammenfassend scheint DHA im Medium bei vergleichbarer Dosierung von DHA und AA insgesamt das Zellwachstumsmuster zu kontrollieren, selbst in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren (Tabelle 1).

3.4 DHA induziert die Phosphorylierung von ERK und die Aktivierung von Caspase in MPNST-Zellen

Verschiedene Studien fanden Hinweise auf eine Reduktion der Inzidenz von Kolonkarzinomen bei Einhaltung einer DHA-reichen Diät (Deschner et al., 1990; Minoura et al., 1988; Reddy et al., 1991). Weiterhin weisen Experimente darauf hin, dass DHA durch eine Inhibition von Ras Kolonkarzinomzellen beeinflusst (Collett et al., 2001). Wir untersuchten hier die Mechanismen, durch die DHA auf die MPNST-Zellen wirken. Dazu wurden die Ras-GTP Level und die Phosphorylierung der Ras-Downstream-Signalmoleküle MAP-Kinase/ERK in Reaktion auf EGF, DHA und AA in humanen und murinen MPNST-Zellen gemessen. Wie erwartet konnte gezeigt werden, dass EGF in einer Konzentration von 20 ng/ml die Phosphorylierung von ERK in allen Zellen stark induzierte. Überraschenderweise bewirkte DHA auch eine Erhöhung der P-ERK-Level, und in Kombination mit EGF erhöhte DHA überdies den EGF-Effekt (Abbildung 7).

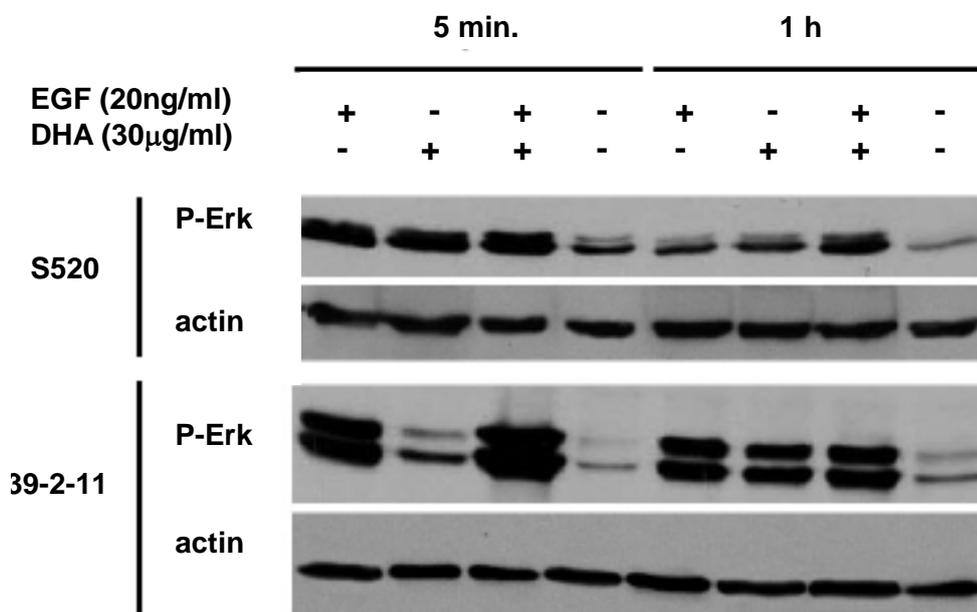


Abbildung 7: ERK-Phosphorylierung in humanen S520 und murinen 39-2-11 Zellen. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium für 1h mit DHA inkubiert, bevor EGF für 5min und 1h respektive zugesetzt wurde. Als Kontrolle wurde β -Actin verwendet. Experimente n>3.

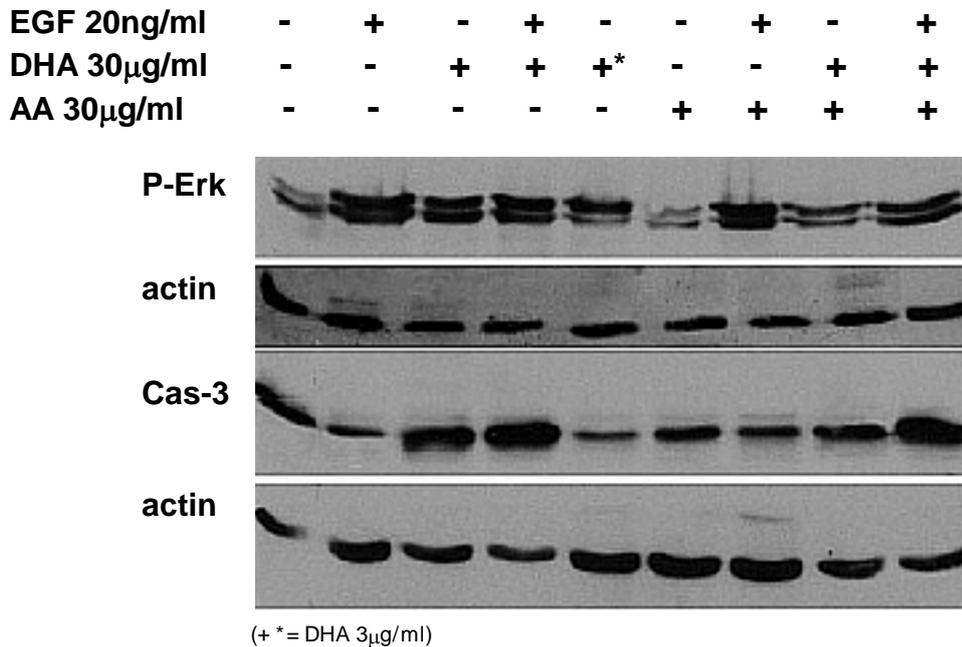


Abbildung 8: Caspase-3 Aktivierung von murinen 39-2-11 MPNST-Zellen nach Stimulation mit EGF, DHA und AA. Die Zellen wurden für 7h mit den einzelnen Faktoren wie in der Abbildung bezeichnet in serumfreiem Medium inkubiert. Experimente n>3.

Die Ras-GTP Level zwischen EGF und EGF/DHA behandelten Zellen und Kontrollzellen zeigten keine Differenz (Die Daten werden hier nicht gezeigt). Bei einer Konzentration von 30 µg/ml DHA ließ sich die Phosphorylierung von ERK durch AA in derselben Konzentration hemmen. Diese Hemmung konnte durch die Gabe von EGF mit und ohne DHA blockiert werden (Abbildung 8).

DHA in einer Konzentration von 30 µg/ml induzierte die Aktivierung von Caspase-3, einem Schlüsselenzym der Apoptose. Dies konnte nicht durch EGF blockiert und nur partiell durch AA gehemmt werden. Im Vergleich dazu war zu beobachten, dass es bei 3 µg/ml DHA zwar zur Phosphorylierung von ERK kam, dass in dieser Konzentration aber keine Aktivierung von Caspase-3 zu detektieren war (Abbildung 8). Diese Daten deuten darauf hin, dass DHA zwei Wege in MPNST-Zellen aktiviert: der MAP-Kinase/P-ERK Weg wird bei hohen und bei niedrigen Konzentrationen aktiviert, und der Apoptose-Weg via Caspase-3 wird nur bei hohen Konzentrationen aktiviert.

3.5 Das Tumorwachstum *in vivo* wird durch DHA gehemmt

Um den Einfluss der Fettsäuren auf das Tumorwachstum *in vivo* zu untersuchen, wurden Zellen der Maus-Zelllinie 32-5-30 subkutan in athymische Mäuse injiziert. Folglich wuchsen subkutane Tumore, die direkt mit DHA, AA oder Albumin als Kontrolle behandelt wurden mit $n=6$ in jeder Gruppe. Ein signifikanter Unterschied in der Größe der Tumore zwischen der DHA- und der Albumin- Gruppe konnte ab dem 13. Tag nach Behandlung detektiert werden ($P<0.005$, T-Test) und dauerte an bis zum Ende des Experiments (Abbildung 9). Ein signifikanter Unterschied zwischen der DHA- und der AA- Gruppe wurde ab dem 20. Tag nach Behandlung festgestellt ($P<0.009$). Die Tumore, die mit AA behandelt wurden, waren nicht signifikant verschieden von den Kontrollen, ausgenommen an zwei Zeitpunkten am Tag 18 und am Tag 20 ($P<0.02$).

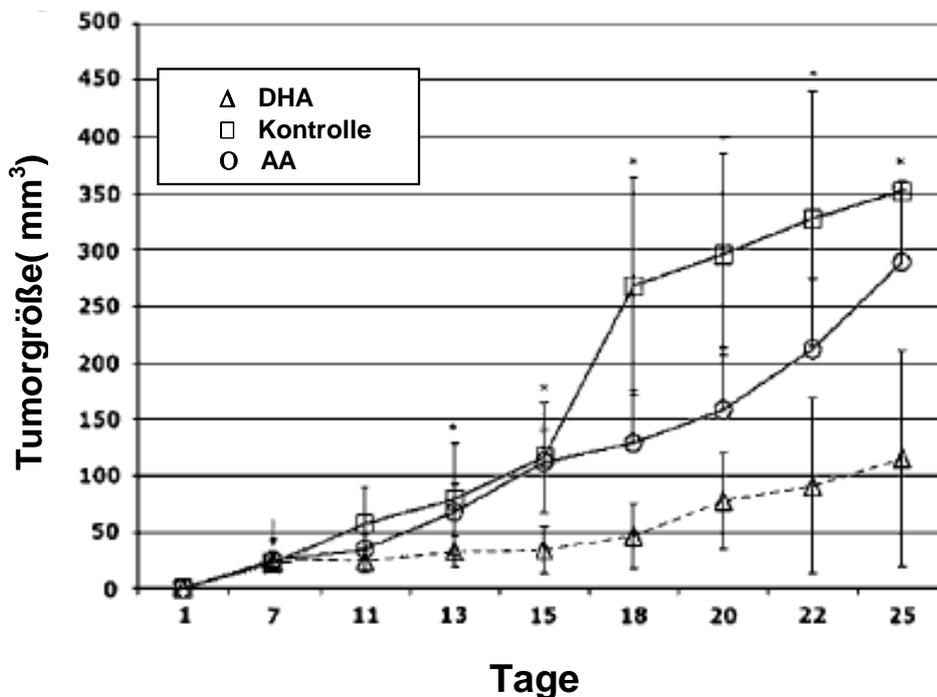


Abbildung 9: Tumorwachstumsassay von DHA, AA und Albuminlösung auf murine 32-5-30 MPNST-Zellen. Tumorwachstum von Mäusen, behandelt mit DHA (30 μ g/ml), AA (30 μ g/ml) und Kontrolle (Albuminlösung). Tumore wurden injiziert und jeden zweiten Tag gemessen (*Statistische Signifikanz zwischen Kontrolle und DHA-Gruppen).(Die *in vivo*- Experimente wurden von Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.)

Die Überlebenszeit war signifikant erhöht in der DHA- Gruppe verglichen mit der AA- und der Albumin-Kontrollgruppe ($P=0.0007$ und 0.0004 respektive; Logrank Test). Es zeigte sich kein Unterschied in der Überlebenszeit zwischen der AA- und der Albumin-Gruppe (Abbildung 10).

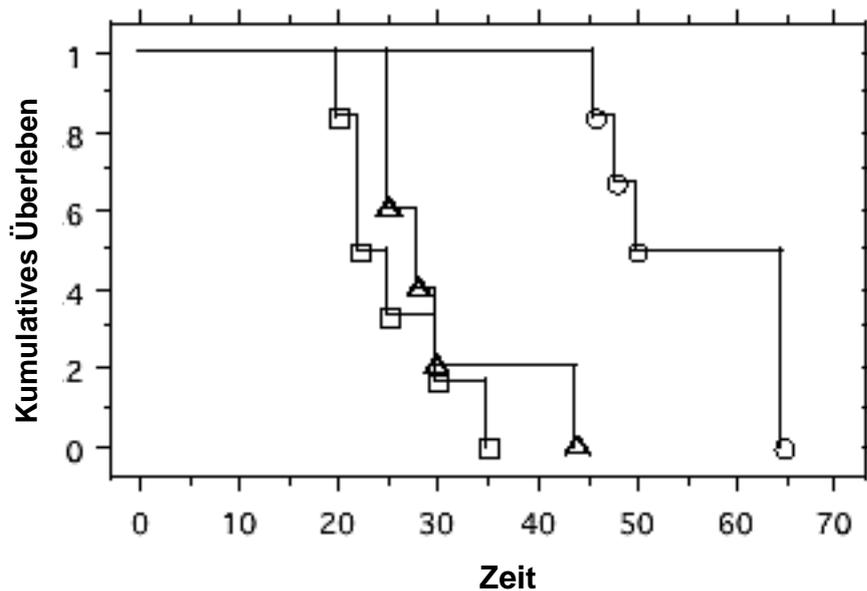


Abbildung 10: Kaplan-Meier Überlebens-Analyse von Mäusen, behandelt mit DHA (Kreise), AA (Dreiecke), und Albuminlösung (Quadrate). (Die *in vivo*- Experimente wurden von Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.)

3.6 DHA Rezeptorexpression in Neurofibromen und in MPNST

DHA bindet mit einer hohen Affinität an das intrazellulär bindende Protein FABP-7 (Xu et al., 1996). Wir untersuchten daher die Expression des FABP-7 in humanem und in murinem peripherem Nerv, in Neurofibromen, in MPNST und in MPNST-Zellen. Die Expression wurde zunächst auf RNA-Level mittels RT-PCR und nachfolgend auf Protein-Level mittels Immunhistochemie analysiert. Die Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) Analyse zeigte eine Expression von FABP-7-mRNA in menschlichen Neurofibrom-Schwanzzellen und in MPNST-Zellen, allerdings weder in normalen menschlichen Schwanzzellen noch in nichttumorösen Zellen von NF1-Patienten (S811) (Abbildung 11).

Die Expression von FABP-7 mRNA wurde auch in 6/6 Maus *Nf1:p53* MPNST Zelllinien detektiert, allerdings war die Expression in den Tumorgeweben, die von diesen Zellen stammten, reduziert (Abbildung 12).

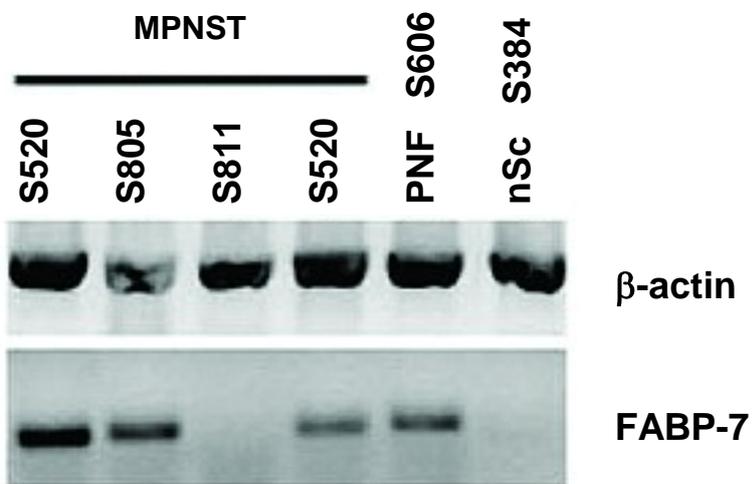


Abbildung 11: Detektion von β -Actin und FABP-7-mRNA Expression in humanen Zelllinien durch RT-PCR. MPNST-Zellen (S520, S805, S811, S520), Schwannzellen plexiformer Neurofibrome (PNF S606) und Schwannzellen normaler peripherer Nerven (nSc S384). Experimente $n > 3$.

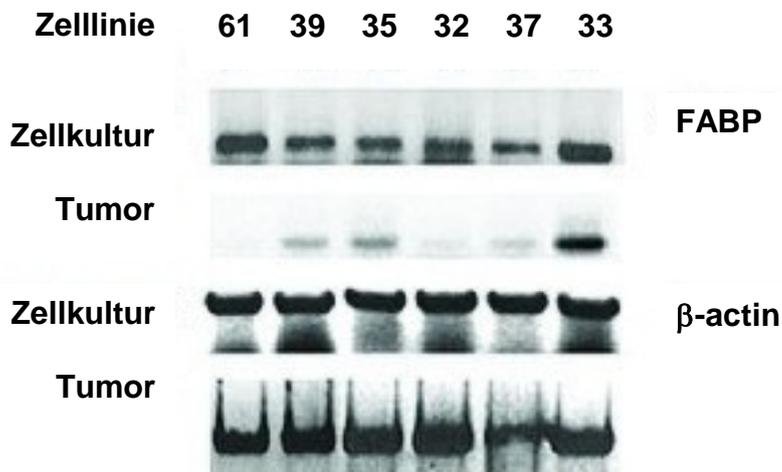


Abbildung 12: RT-PCR-Detektion von β -Actin und FABP-7 Expression in MPNST- und Maligner Triton Tumor (MTT) -Zelllinien von *Nf1:p53* Mäusen und in Tumorgewebe dieser Zellen. Experimente $n > 3$.

Die Expression des Proteins FABP-7 konnte im Ischiasnerv von *Nf1*^{+/-}-Mäusen und in drei von sieben plexiformen Neurofibromen demonstriert werden, in Wildtyp-Mäusen war demgegenüber keine Proteinexpression nachweisbar (Abbildung 13A-C).

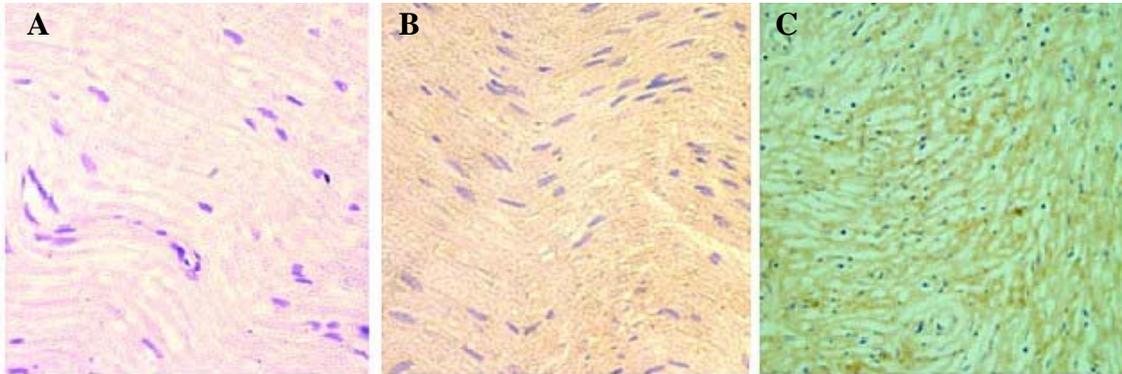


Abbildung 13 A,B: FABP-7 Detektion durch Immunhistochemie in Ischiasnerv von Mäusen, A= Wildtyp (*Nf1*^{+/+}), B= *Nf1*^{-/-}. **13 C:** FABP-7 Detektion durch Immunhistochemie in humanen plexiformen Neurofibromen. Experimente n>3.

4 DISKUSSION

4.1 Dosisabhängiger Effekt der Omega-3 Fettsäure auf humane und murine MPNST-Zellen

In der vorliegenden Studie wird erstmals ein Einfluss von Fettsäuren auf das Wachstum von MPNST-Zellen, einem Tumormodell für die NF1, demonstriert. Die erhobenen Daten lassen eine potentielle Rolle eines diätetischen Faktors in dem natürlichen Verlauf der NF1 vermuten. Die Wirkung der getesteten Omega-3 Fettsäure DHA auf das Wachstum der MPNST-Zellen war abhängig von der Dosierung. Im Gegensatz zu den in verschiedenen Tumormodellen nachgewiesenen antiproliferativen Effekten der Omega-3 Fettsäure DHA, zeigte sich in der hier vorliegenden Studie bei einer niedrigen Konzentration von 3 µg/ml zunächst eine Stimulation des Zellwachstums der MPNST-Zellen.

Eine antiapoptotische Wirkung von DHA wurde zuvor vermehrt in normalen, nicht-tumorigenen Zelllinien beschrieben. So zeigten Kim et al. (2000) eine Inhibition der durch Serumdeprivation ausgelösten Apoptose neuronaler Zellen durch DHA. Dies ging einher mit einer Akkumulation von Phosphatidylserin und einer Erhöhung der Membranlokalisation von Raf-1, dem Downstream-Effektor in der Proliferationskaskade Ras/Raf/ERK, sowie einer Herunterregulation des Schlüsselenzyms der Apoptose, Caspase-3. Rotstein et al. (2003) demonstrierten ebenfalls einen protektiven Effekt von DHA in Zellen der Retina. So hemmte DHA die durch oxidativen Stress mittels Paraquat ausgelöste Apoptose in Amacrin Zellen und Photorezeptorneuronen der Retina in einem Rattenmodell *in vitro*. Zudem wies die Arbeitsgruppe die Wiederherstellung der mitochondrialen Integrität durch DHA nach. Auch die durch Paraquat induzierte Erhöhung der proapoptotischen Bax-Expression wurde geblockt und die antiapoptotische Bcl-2 Expression stark hochreguliert. DHA scheint in verschiedenen Zellsystemen durch Modulation der pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie seine unterschiedliche Wirkung auszuüben.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wiesen Kishida et al. (1998) ebenfalls einen antiapoptotischen Effekt von DHA auf Tumorzellen nach. Sie demonstrierten eine antiapoptotische Wirkung von DHA auf humane promyelocytische Leukämiezellen (HL-60 Zellen). Diese Wirkung war nur durch DHA zu erzielen, weder AA noch EPA zeigten diesen antiapoptotischen Effekt.

Bis auf vereinzelte Ergebnisse demonstrierten experimentelle Tierstudien, *in vitro* Studien und klinische Studien allerdings eine tumorsupprimierende Wirkung der Omega-3 Fettsäure auf verschiedene Karzinomtypen. Die wachstumsinhibierende Wirkung von DHA ließ sich auch in der hier vorliegenden Studie in MPNST-Zellen nachweisen. Nach Behandlung der Zellen mit höheren Konzentrationen an DHA war der Zelltod der meisten MPNST-Zellen nachweisbar. Dabei wurde den MPNST-Zellen DHA in Konzentrationen zugefügt, die auch in maternalem Plasma nachgewiesen wurde wie die Arbeitsgruppe um Ruyle et al. (1990) zeigte. Vergleichbar hohe DHA-Blutkonzentrationen wurden zudem bei Menschen gefunden, die eine DHA-Substitution erhielten (Conquer und Holub 1998).

Eine apoptotische und induktionshemmende Wirkung von DHA wurde in verschiedenen Modellen für unterschiedliche Karzinomtypen und Zelllinien demonstriert. So wurde das Wachstum von Kolonkarzinomen in der Maus, das durch 1,2-Dimethylhydrazine induziert wurde, durch Omega-3 Fettsäuren reduziert (Lindner 1991). Das Karzinomwachstum bei Kolonkarzinomzellimplantation *in vivo* wie auch das Wachstum von Kolonkarzinomzellen *in vitro* wurde ebenfalls durch Omega-3 Fettsäuren supprimiert. Beide Effekte waren unabhängig von dem COX-Signalweg (Boudreau et al., 2001). Ebenfalls COX-unabhängig war die durch DHA induzierte Apoptoseinduktion in HT-29 Kolonkarzinomzellen. Es zeigte sich vielmehr eine Umkehr der Apoptose durch ein synthetisches Antioxidanz, hinweisend auf eine mögliche Rolle der Lipidperoxidation in der durch DHA vermittelten Apoptose (Chen und Istan 2000). In Assoziation mit der Apoptose wurde von dieser Arbeitsgruppe eine Herunterregulation der antiapoptotischen Bcl-2 Expression beobachtet, wohingegen die proapoptotischen Bax-Level unverändert blieben. Des Weiteren ließ sich in humanen CaCo-2 Kolonkarzinomzellen mittels Micro-Array eine Regulation von Genen und Transkriptionsfaktoren, die die Apoptose induzieren, durch DHA nachweisen (Narayanan und Narayanan 2001). Auch die induzierbare NO-Synthase und verwandte proinflammatorische Gene wurden durch DHA in humanen Kolonkarzinomzellen moduliert (Narayanan et al., 2003). Merendino et al. (2003) untersuchten den Einfluss von DHA auf Pankreaskarzinomzellen. LA und DHA inhibierten das Zellwachstum, während nur DHA auch apoptoseinduzierende Wirkung auf die humane Paca-44 Pankreaskarzinomzelllinie zeigte. Im Gegensatz zu Kishida et al. (1998), die einen antiapoptotischen Effekt von DHA in humanen promyelozytischen HL-60 Zellen demonstriert hatten, wiesen Arita et al. (2001) eine Induktion der Apoptose durch Omega-3 und Omega-6

Fettsäuren in der Leukämiezelllinie HL-60 nach. Beide Fettsäuren stimulierten die Generation von reaktiven Oxygenspezies (ROS) und aktivierten eine Vielzahl an Proteasen Caspasen wie Caspase-3, -6, -8, und -9, wobei die Wirkung der Omega-3 Fettsäure stärker war, als die der Omega-6 Fettsäure. Klinische Studien unterstützen die durch tierexperimentelle und *in vitro* Studien gewonnenen Daten. So führte der Konsum von Omega-3 Fettsäuren in Patienten mit sporadischen Adenomen, die ein hohes Risiko für die Entwicklung von Kolonkarzinomen tragen, zu einer Reduktion der intestinalen Hyperproliferation (Anti et al., 1992; Anti et al., 1994).

4.2 DHA kehrt die Wachstumsfaktorstimulation der MPNST-Zellen um

DHA kehrte die Wachstumsstimulation einer Anzahl von Wachstumsfaktoren, die in der NF1 eine Rolle spielen, vollständig um. Verschiedene Wachstumsfaktoren sind in der Pathogenese der NF1 involviert (Mashour et al., 2001, 2004). So demonstrierten DeClue et al. (2000) eine Expression des EGFR in primären MPNST von NF1 Patienten und deren Zelllinien *in vitro* wie auch in nicht-NF1 MPNST-Zellen. Nach Stimulation mit EGF zeigte sich in allen Zelllinien eine Proliferation sowie die Aktivierung des Downstream-Effektors MAPK hinweisend auf eine pathogenetisch bedeutsame Rolle des Wachstumsfaktors EGF in der NF1. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte zwei Jahre später die Expression des EGFR sowie die Wirkung von EGF in mehreren *Nf1:p53* MPNST-Zelllinien. Hier wiesen 23 von 24 untersuchten Zelllinien eine Expression des EGFR auf. Alle Zelllinien, die EGFR expremierten, reagierten auf die EGFR-Stimulation mit der Aktivierung des Proliferations-Downstream-Signalweges MAP/ERK/ERK und P13k/AKT. Das Wachstum *in vitro* war durch EGF stimulierbar und konnte durch einen EGFR-Antagonisten blockiert werden (Li et al., 2002). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen führte EGF auch in der vorliegenden Studie zu einer dreifachen Proliferation der MPNST-Zellen und einer Aktivierung von ERK.

Der Wachstumsfaktor PDGF zeigte in der vorliegenden Studie in den MPNST-Zellen ebenfalls eine proliferative Wirkung mit einem dreifach erhöhten Wachstum der MPNST-Zellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten von Badache und De Vries (1998), die eine Wachstumsstimulation durch PDGF in humanen MPNST-Zellen nachwiesen. Auch die Expression des PDGFR war in MPNST-Zellen im Gegensatz zu normalen Schwannzellen und

Schwannomzellen eines nicht-NF1 Patienten stark verändert. So konnten Badache und De Vries eine Erhöhung der PDGFR-Expression in MPNST-Zellen mit einhergehender mitogener Aktivität von PDGF und von FGF2 demonstrieren. Weder in normalen Schwannzellen noch in Schwannomzellen ließ sich das Wachstum durch PDGF stimulieren, und auch die hohe PDGFR-Expression ließ sich nur in den Neurofibromin-defizienten Zellen nachweisen. In normalen Schwannzellen ist der PDGFR in der frühen neonatalen Entwicklungsphase in hohem Maße exprimiert, und nur in geringem Ausmaß bei Erwachsenen (Hardy et al., 1992). Die Autoren vermuten daher, dass die in MPNST nachgewiesene erhöhte Expression des Rezeptors diese Entwicklungsphase, in der es zu hoher Proliferation der Schwannzellen kommt, rekapituliert.

Die Wachstumsfaktoren bFGF und IGF-1 führten in der hier vorliegenden Studie zu einer zweifachen Zellwachstumsstimulation der murinen MPNST-Zellen. Dieses Ergebnis wird durch eine Studie von Kitano et al. (1992) unterstützt, in der eine Wachstumsstimulation durch bFGF in einer Neurofibromzellkultur nachgewiesen wurde. Kawachi et al. (2003) demonstrieren darüber hinaus eine erhöhte Expression von bFGF in kutanen Neurofibromproben von NF1-Patienten, hinweisend auf eine potentielle Rolle von bFGF in der Angiogenese und Hypervaskularität in NF1-assoziierten Tumoren. In Neurofibrombiopsien von Patienten mit NF1 zeigte sich ebenfalls eine erhöhte IGF-1-Immunreaktivität der Neurofibrome, verglichen mit normaler Haut von Kontrollpatienten (Hansson et al., 1988).

Die durch die Wachstumsfaktoren EGF, PDGF, bFGF und IGF-1 ausgelöste Wachstumsstimulation der MPNST-Zellen in unseren Experimenten wurde durch DHA komplett aufgehoben. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von Liu et al. (2001) überein. So demonstrierte die Arbeitsgruppe eine Hemmung der EGF-Wachstumsstimulation durch DHA in JB6 epidermalen Zellen, einem Zellmodell für das Nichtmelanom-Hautkarzinom. In dieser Studie wurden die Effekte der Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren auf die durch EGF induzierte Transaktivierung des Transkriptions-aktivierenden-Proteins 1 (AP-1), sowie die durch EGF induzierte Zelltransformation in JB6 epidermalen Zellen der Maus untersucht. DHA inhibierte in diesem Modell ebenfalls konzentrationsabhängig die durch EGF ausgelöste Transaktivierung des AP-1, wie auch die Zelltransformation.

Der Effekt von AA auf die durch die Wachstumsfaktoren ausgelöste Proliferationsstimulation der von uns untersuchten MPNST-Zellen war im Gegensatz zu der DHA-Wirkung variabel. AA zeigte keinen Effekt auf die Stimulation durch EGF und IGF-1, einen inhibierenden Effekt auf die Stimulation durch bFGF und einen synergistischen Effekt auf die PDGF- β Stimulation. Auch diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten in JB6 Zellen überein, bei denen AA ebenso keinen Effekt auf die durch EGF ausgelöste Transaktivierung des AP-1 zeigte. Darüber hinaus konnten wir eine signifikante Schwächung der inhibierenden Wirkung von DHA auf die Wachstumsfaktorstimulation der MPNST-Zellen durch AA nachweisen. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis zeigten Liu et al. in dem Hautkarzinommodell ebenfalls eine Schwächung der inhibierenden Wirkung von DHA auf die durch AA ausgelöste Transaktivierung des AP-1 und die Zelltransformation.

4.3 DHA beeinflusst die ERK-Phosphorylierung und die Caspase-Aktivierung in MPNST-Zellen

In den Proliferationsassays ließ sich eine Konzentrationsabhängigkeit der DHA-Wirkung auf das Wachstumsverhalten der MPNST-Zellen erkennen. Dieses Phänomen war ebenfalls bei der durch DHA ausgelösten Caspase-3-Aktivierung zu beobachten, nicht jedoch bei der ERK-Aktivierung. DHA in hoher Dosierung führte zu einer Apoptose nahezu aller MPNST-Zellen einhergehend mit einer Aktivierung des Schlüsselenzyms der Apoptose Caspase-3. Überraschenderweise wurde auch eine Aktivierung von ERK beobachtet. Niedrige Dosierung von DHA führte demgegenüber zu einer Proliferation der MPNST-Zellen. Dies war assoziiert mit einer Aktivierung von ERK, nicht hingegen mit einer Aktivierung von Caspase-3.

Die Ergebnisse früherer Studien in NF1-Tumormodellen ließen bisher auf eine tumorgene Wirkung der ERK-Signalkaskade in der NF1 schließen. Beispielsweise demonstrierten Ingram et al. (2001) eine Abhängigkeit der proliferativen Effekte durch Ras und die Signale kleiner Rho-GTPasen wie Rac und Rho von der ERK-Aktivierung. Die Arbeitsgruppe zeigte in Mäusen, die durch ein genetisches Intercross zwischen Nf1 (+/-) und Rac2(-)/(-) entstanden, eine Hyperaktivierung von ERK via Rac2 mit direkter Hyperproliferation der *Nf1*-Mastzellen *in vitro* und *in vivo*. In Schwanzzellen beobachteten Harrisingh et al. (2004) eine anhaltende

ERK-Aktivierung nach einer Nervschädigung, die mit einer Dedifferenzierung einherging. *NFI*-defiziente murine Embryofibroblasten zeigten darüber hinaus ebenfalls eine verlängerte Ras- und ERK-Aktivierung und proliferierten nach Wachstumsfaktorstimulation (Cichowski et al., 2003).

So war die durch DHA ausgelöste ERK-Aktivierung in den von uns untersuchten MPNST-Zellen, die zudem nach Behandlung mit DHA in hoher Dosierung mit Zellapoptose assoziiert war, zunächst überraschend. Die Signalspezifität von ERK scheint allerdings durch regulatorische Mechanismen bestimmt zu werden, die abhängig vom jeweiligen Genrepertoire des spezifischen Zelltyps sind. So ließ sich ein antiapoptotischer Effekt beispielsweise in Kardiomyozyten (Bueno et al., 2000), in Mammakarzinomzellen (Kurokawa et al., 2000) und in HT-29 D4 Kolonkarzinomzellen (Remacle-Bonnet et al., 2000) demonstrieren, während ein proapoptotischer Effekt beispielsweise in Mammakarzinomzellen (Persons et al., 2000) und in Oligodendrozyten (Bhat und Zhang, 1999) beobachtet wurde. Die konträre Wirkung des ERK-Signalweges zeigte auch die Arbeitsgruppe um Marshall (1994). Sie stellten aktivierte Mutanten der ERK Kinase Kinase1 sowie eine interferierende Mutante her. Die aktivierte Mutante stimulierte in PC12 Zellen die Zelldifferenzierung, führte in NIH 3T3 Zellen jedoch zu Zelltransformation. Abhängig vom zellulären Kontext, so schlossen die Autoren, scheint die ERK Kinase-Aktivierung notwendig und hinreichend für die Zelldifferenzierung und auch für die Zelltransformation zu sein (Cowley et al., 1994).

Die von uns beobachtete konträre Wirkung von ERK fand demgegenüber in gleichem zellulärem Kontext statt und bedarf daher anderer Erklärungsmodelle. Neben dem unterschiedlichen Genrepertoire der jeweiligen Zelle berichten verschiedene Arbeitsgruppen von einer Abhängigkeit der biologischen ERK-Funktion von der Länge und Stärke der ERK-Stimulation. So wurde beobachtet, dass die Aktivierung der ERK-Kaskade zu kontrastierenden physiologischen Antworten in gleichem zellulärem Kontext führen kann. Qui et al. (1992) demonstrierten beispielsweise in PC-12 Phäochromozytomzellen zunächst eine Zelldifferenzierungsinduktion durch die ERK1/2 Aktivierung. Diese wurde durch EGF oder durch NGF induziert, wobei EGF bekanntermaßen die Zellproliferation stimuliert, während NGF den Wachstumsstillstand und die Differenzierung induziert. Der Unterschied in der Wirkung beider Faktoren schien von der Differenz der Länge und der Stärke der ERK-Aktivierung abzuhängen. Während EGF zu einer

kurzzeitigen Stimulation der ERK-Aktivierung mit einem Rückgang zu basalem Level nach 1-2h führte, war die NGF-stimulierte Aktivität anhaltend. Die Autoren vermuteten, dass eine nur kurzzeitige Stimulation von ERK nicht ausreicht, um die Zelldifferenzierung zu induzieren (Qui et al., 1992). Auch Marshall (1995) fand in PC12 Zellen Hinweise, dass eine kurzzeitige Stimulation der ERK Kaskade zu Proliferation, eine anhaltende Stimulation von ERK demgegenüber zu Zelldifferenzierung führt. Eine weitere Arbeitsgruppe beobachtete in PC12 Zellen eine Veränderung der ERK-Aktivierung durch Überexpression des Insulin-Rezeptors. Normalerweise stimuliert Insulin in PC12 Zellen die Zellproliferation und führt zu einer kurzzeitigen ERK-Aktivierung, während die Stimulation durch NGF zu Wachstumsstillstand und Differenzierung einhergehend mit einer anhaltenden Aktivierung von ERK führt. Nach Überexpression des Insulinrezeptors in diesen Zellen führte Insulin nun zu einer Zelldifferenzierung, die der durch NGF hervorgerufenen Reaktion glich. Wie auch NGF induzierte Insulin in den Zellen nun eine anhaltende Aktivierung von ERK. Diese Resultate unterstützen die Vermutung, die Stärke und die Länge des durch ERK vermittelten Signals habe einen Einfluss auf die spezifische Zellantwort (Dikic et al., 1994). Auch in erythroleukämischen Zellen ließ sich diese Abhängigkeit demonstrieren. Die Arbeitsgruppe um Goldfarb untersuchte die Rolle der ERK-Aktivierung in der Differenzierung der K562 Erythroleukämischen Zellen zu Megakaryozyten, den Effekt auf den Differenzierungsinduzierer 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) sowie auf Bryostatin, einem Differenzierungsblocker. Wie erwartet, induzierte TPA die Zelldifferenzierung und rief eine anhaltende (>24h) Stimulation von ERK hervor. Der Differenzierungsblocker Bryostatin dagegen führte nur zu einer kurzzeitigen Stimulation von ERK und verminderte die Stimulation durch TPA (Racke et al., 1997). Die Signalspezifität ließ sich auch bei dem Downstream-Effektor Raf-1 durch die Modulation der Signalstärke beeinflussen. Während moderate Raf-Aktivität in murinen Fibroblasten die DNA-Synthese induzierte, führte nur ein starkes Raf-Signal zu einem G1-spezifischen Zellzyklusarrest (Sewing et al., 1997).

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeiten, so wäre auch in der vorliegenden Studie eine unterschiedliche Stärke des ERK-Signals ein Erklärungsansatz für die beobachtete konträre Zellantwort der MPNST-Zellen auf die durch DHA ausgelöste ERK-Aktivierung. So könnte DHA in niedriger Dosierung zu einem schwachen, kurzzeitigen Signal von ERK geführt haben und hätte so die Zellproliferation auslösen können. Ein langanhaltendes Signal, ausgelöst durch

eine hohe Dosis DHA, hätte demgegenüber zu einer Induzierung der Apoptose geführt. Für Retinoide, Vitamin A-Derivate, die Wachstumshemmung, Differenzierung und Apoptose induzieren, ließ sich ein solcher Mechanismus in Mammakarzinomzellen ebenfalls nachweisen. So zeigte sich eine Korrelation der durch einen PKC-Inhibitor in Kombination mit einem Retinoid ausgelösten Apoptose mit einer lang anhaltenden Aktivierung von ERK (Pettersson et al., 2004). Für DHA konnte ein solcher Effekt in Oligodendrozyten demonstriert werden. Zellen, die mit DHA angereichert waren, wiesen einen erhöhten Membranlipidanteil an DHA auf. H₂O₂-induzierter Stress rief dort eine bis zu 24h anhaltende Aktivierung von ERK, einhergehend mit einem massiven apoptotischen Zelltod, auf. Die Zellen, die demgegenüber nur einen geringen DHA-Anteil aufwiesen, zeigten eine nur kurzzeitige ERK-Aktivierung ohne Zelltod. Der H₂O₂-induzierte Zelltod in DHA-angereicherten Oligodendrozyten scheint folglich mit einer anhaltenden ERK-Aktivierung assoziiert zu sein (Brand et al., 2001). AA hingegen scheint nicht durch den ERK-Signalweg auf das Wachstum der MPNST-Zellen zu wirken. So induziert AA allein keine ERK-Phosphorylierung, inhibiert demgegenüber allerdings teilweise die durch DHA induzierte Phosphorylierung wie auch die durch DHA induzierte Zellwachstumshemmung.

Der in der vorliegenden Studie beobachtete DHA-Effekt scheint unabhängig zu sein von der durch die Arbeitsgruppe um DeClue in *Nf1:p53* MPNST-Zellen beobachteten Stimulation der ERK-Aktivierung durch EGF, die dort mit einer erhöhten Zellproliferation einherging (Li et al., 2002). Des weiteren demonstrierten Calviello et al. (2004) in HT-29 Kolonkarzinomzellen im Unterschied zu der von uns beobachteten DHA-induzierten ERK-Aktivierung in MPNST-Zellen eine Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung durch DHA, einhergehend mit einer Wachstumshemmung und einer Reduktion des Wachstumsfaktors VEGF sowie des Enzyms COX-2 *in vitro* und *in vivo* (Calviello et al., 2004). DHA scheint somit je nach zellulärem Kontext stimulierend oder hemmend auf die Aktivierung von ERK wirken zu können.

Neben der hypothetischen Involvierung von ERK in der durch DHA ausgelösten Apoptose der MPNST-Zellen, suchten wir nach weiteren Mechanismen, die dieses Phänomen erklären könnten. Wir analysierten daher, ob das Schlüsselenzym der Apoptose Caspase-3 in der durch DHA induzierten Apoptose involviert war. Die Aktivierung des Apoptoseweges via Caspase-3 durch DHA wurde bereits in verschiedenen Karzinomzelltypen demonstriert und ließ sich tatsächlich

auch in dem von uns untersuchten MPNST Zellmodell für DHA in hoher Dosierung nachweisen. Der Effekt konnte nicht durch EGF blockiert, und nur partiell durch AA gehemmt werden. Bei einer niedrigen Konzentration von DHA war demgegenüber zwar die ERK-Phosphorylierung, nicht jedoch eine Caspase-Aktivierung zu beobachten. Dieses Ergebnis lässt eine weiteren Erklärungsmöglichkeit für die konträren Zellantworten auf die DHA-Stimulation zu. So scheint DHA in Abhängigkeit von der Konzentration zwei Wege in MPNST-Zellen zu aktivieren, den P-ERK - Signalweg durch DHA in hoher und niedriger Dosierung, und den apoptotischen Weg via Caspase-3 nur durch DHA in hoher Dosierung.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wiesen zwei Studien in HL-60 Zellen eine Assoziation zwischen der durch DHA induzierten Apoptose und einer Aktivierung der Caspase-Kaskade nach. Während Arita et al. (2001) die Aktivierung der mitochondrialen Cytochrom C-Caspase-Kaskade demonstrierte, wurde von Miura et al. (2004) eine Aktivierung eines von der Bax- , einem proapoptotischen Mitglied der Bcl-2 Familie, -Mitochondrien-Kaskade unabhängigen Apoptoseweges postuliert. Alternativ erklärte man die Apoptose mit einer durch DHA induzierten Suppression des antiapoptotischen Enzyms Bcl-2 (Arita et al. 2001; Miura et al., 2004). Auch in humanen CaCo-2 Kolonkarzinomzellen scheint DHA zu einer Aktivierung von Cytochrom C und nachfolgender Stimulation der Caspase-3 zu führen (Narayanan et al., 2001). In einem nicht-tumorigenen Modell der durch Hypertension ausgelösten vaskulären Hypertrophie wurde ebenfalls ein Einfluss von DHA auf die Caspase-3 Aktivität demonstriert. Hier ließ sich ein antiproliferativer Effekt von DHA auf mesenteriale vaskuläre glatte Muskelzellen nachweisen. Wie in Tumormodellen fand sich auch in den glatten Muskelzellen eine Erhöhung der Caspase-3 Aktivität und der aktiven Form der Caspase-3 (Diep et al., 2000).

Um die Rolle der einzelnen Faktoren in der durch DHA ausgelösten Modulation der MPNST-Zellen weiter zu analysieren, wäre eine Analyse der Stärke und Länge der ERK-Aktivierung in Abhängigkeit von der Konzentration von DHA interessant. Ebenfalls könnte mittels einer Blockierung von Caspase-3 der Effekt der ERK-Aktivität auf die Apoptose der MPNST-Zellen beobachtet werden.

4.4 DHA und AA: Die reziproke Aktivität auf das MPNST Zellwachstum

Die reziproke Aktivität der Omega-3 Fettsäure DHA und der Omega-6 Fettsäure AA in der Modulation verschiedener Tumorzellen sind Gegenstand multipler Studien (Hardman 2002). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Studien war die reziproke Wirkung der beiden Fettsäuren in den hier vorliegenden *in vitro* Studien über die Aktivität der Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren in MPNST-Zellen ebenfalls nachweisbar. Während DHA in hoher Konzentration nahezu zu komplettem Zelltod führte, induzierte AA ein zweifach höheres Zellwachstum. Im Einklang mit der demonstrierten proliferativen Wirkung von AA auf die MPNST-Zellen, zeigten Rose et al. (1991a) in einem Mausmodell, dass eine Diät mit einem hohen Anteil an Omega-6 Fettsäuren das Tumorwachstum und die Metastasierung von MDA-MB-435 Mammakarzinom-Xenotransplantaten verstärkt.

Es existiert eine Vielzahl an Studien, die die möglichen Mechanismen der tumorigenen Wirkung der Omega-6 Fettsäuren untersuchen. Beispielsweise haben die von AA-hergeleiteten Eicosanoide proinflammatorische Effekte (Cowing et al., 2001, Calder und Grimble 2002). Darunter sind PGE 2, Leukotriene B4 und Thromboxane A2, die mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht werden. Mechanismen wie die Hemmung der Apoptose, eine Stimulation der Zellproliferation oder die Tumorprogression durch Angiogenesepromotion durch PGE 2 wurden demonstriert (Cheuk et al., 2002; Leahy et al., 2002; Cianchi F et al., 2001).

Unsere *in vitro* Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Kombinationen von DHA und AA in variablen Konzentrationen zeigte einen dominanten Einfluss von DHA auf das Wachstumsverhalten der Zellen unabhängig von der Konzentration; AA scheint jedoch die durch DHA induzierte Tumorzellinhibition zu vermindern. Auch die Effekte von DHA auf die ERK-Phosphorylierung wurden durch AA umgekehrt, und die durch DHA vermittelte Caspase-3-Aktivierung reduziert. Insgesamt wurde das Zellwachstum demnach durch die Wirkung von DHA kontrolliert, es bestand dabei ein klarer Antagonismus der beiden Fettsäuren in der Modulation des Zellwachstums.

Ergebnisse früherer Studien unterstützen diese Beobachtung. So führte PGE 2 in verschiedenen Tumormodellen zur Induktion der Angiogenese, DHA zeigte demgegenüber in diesen Modellen

einen antiangiogenetischen Effekt auf Mammakarzinomzellen (Rose und Connolly 1999a). Auch in Prostatakarzinomzellen konnte eine Hemmung des Zellwachstum *in vitro* durch Omega-3 Fettsäuren gezeigt werden, während Omega-6 Fettsäuren proliferativ auf die Prostatakarzinomzellen wirkten (Rose und Connolly 1991b).

Studien über die Wirkung von Kombinationen der Fettsäuren demonstrierten vielfach einen direkten Einfluss der einen Fettsäure auf die Wirkung der anderen. So scheint einer der Mechanismen der Tumorsuppression durch DHA die Suppression der von AA abstammenden Eicosanoide zu sein, die an verschiedenen Stellen des Eicosanoid- Metabolismus stattfindet. Zunächst führt eine erhöhte Zufuhr an Omega-3 Fettsäuren zu einer Inkorporation in die Membranphospholipide, wodurch AA teilweise verdrängt (Lee et al., 1993) und so die Produktion von EPA-abstammenden 3- Prostaglandinen und 5-Leukotrienen erhöht wird. Auch beim nächsten Schritt im Metabolismus der Eicosanoide, der Spaltung durch Desaturasen und Elongasen, kompetetieren Omega-3 Fettsäuren erfolgreich durch eine im Vergleich zu Omega-6 Fettsäuren höheren Affinität zu diesen Enzymen. So kommt es bei erhöhter Omega-3 Zufuhr zu einer reduzierten Elongation von LA zu AA und zu reduzierter AA-Eicosanoidproduktion (Rose und Connolly 1999a). Zudem supprimieren Omega-3 Fettsäuren das induzierbare Enzym COX-2 direkt (Singh et al., 1997; Hamid et al., 1999; Ringbom et al., 2001) und kompetetieren mit Omega-6 Fettsäuren um COX, um Eicosanoide zu erzeugen (Corey et al., 1983). DHA scheint darüber hinaus direkt zu einer Inhibition von PGE₂ zu führen. So zeigte eine Studie mit athymischen Mäusen, bei denen durch die Injektion der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 solide Tumore gezüchtet wurden, einen Zusammenhang zwischen der beobachteten Tumorsuppression und Antiangiogenität von DHA und der durch DHA-initiierten Inhibition von PGE₂ (Rose und Connolly 1999b).

Die Ergebnisse der *in vitro* Studien wurden durch die Resultate der Untersuchungen in athymischen Mäusen *in vivo* bestätigt. DHA führte in den mit MPNST-Zellen inokulierten athymischen Mäusen zu einer Hemmung des Tumorwachstums sowie zu verlängerten Überlebenszeiten der Mäuse verglichen mit der Kontrollgruppe und mit der mit AA behandelten Gruppe. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis demonstrierten Karmali RA et al., (1984) in einem Rattenmodell die wachstumshemmende Wirkung von DHA auf Mammakarzinome *in vivo*, die mit einer Inhibition des AA-Metabolismus einherging. Auch in athymischen Mäusen führte

DHA zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums eines soliden Tumors durch die MDA-MB-321 Mammakarzinom-Zelllinie (Rose und Connolly 1999b).

In der hier vorliegenden *in vivo* Studie des MPNST Tumorwachstums zeigte sich jedoch im Gegensatz zu den oben zitierten Untersuchungen kein wachstumsstimulierender Effekt von AA, wie nach den Ergebnissen der *in vitro* Studien zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise ist dies durch den variablen Effekt von AA auf die Wachstumsfaktorstimulation zurückzuführen. So könnte die *in vitro* demonstrierte Hemmung des bFGFs durch AA einen stärkeren Einfluss auf das Tumorwachstum *in vivo* gehabt haben, als es auf die Stimulation der MPNST-Zellen *in vitro* hatte.

4.6 DHA Rezeptorexpression in Neurofibromen und in MPNST

In einer EGFR positiven Subpopulation Neurofibromin-defizienter Schwannzellen sowie in *nf1:p53* MPNST-Zellen wurde eine Überexpression des DHA-Rezeptors FABP-7 demonstriert (Miller et al., 2003). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten wir in der vorliegenden Studie ebenfalls eine erhöhte Expression von FABP-7 in humanen Neurofibromen und in MPNST-Zellen *in vitro* demonstrieren. In den Tumortransplantaten der *Nf1:p53* MPNST Zelllinien fand sich allerdings eine variable Expression von FABP-7, wobei die aggressivste Zelllinie keine Expression *in vivo* zeigte. Die variable MPNST Expression von FABP-7 *in vivo* deutet auf die Involvierung eines weiteren Mechanismus der DHA-vermittelten Tumorregression *in vivo* hin. Auch Miller et al. fanden die FABP-7 Expression in nur einer Subpopulation von EGFR positiven MPNST-Zellen. Die selektive Expression von FABP-7 könnte auf ein spezifisches Tumorstadium hinweisen, bei dem molekulare Veränderungen die FABP-7 Expression beeinflussen (Miller et al., 2003). In Prostatakarzinomzellen war die Expression von FABP-7 ebenfalls stadiumsabhängig (Das et al., 2001). Wie auch in der Studie von Kurtz et al. (1994), war keine Expression von FABP-7 in normalen Schwannzellen, in Nichttumorzellen eines NF1-Patienten oder in Wildtyp-Ischiasnerv nachweisbar.

4.7 DHA als möglicher Regulator der Entwicklung der MPNST während der Schwangerschaft

DHA ist essentiell für die Entwicklung der neuralen Strukturen im Fetus. Folglich besteht ein hoher Bedarf und somit die Notwendigkeit des Transports der Fettsäure vom maternalen zum fetalen Kreislauf. Man vermutet, dass DHA von Erythrozyten zum sich entwickelnden Fetus transportiert wird (Ruyle et al., 1990). So konnte man nachweisen, dass die DHA Level in den maternalen Erythrozyten während der Schwangerschaft abnehmen (Ghebremeskel et al., 2000). Dieser Transfer von DHA in den fetalen Kreislauf könnte begründen, warum die Neurofibrome während der Schwangerschaft in Größe und in Anzahl zunehmen (Dugoff und Sujansky 1996). Unsere Daten demonstrieren für DHA in niedriger Dosierung eine Tendenz zur Wachstumssteigerung der MPNST-Zellen und für DHA in hoher Dosierung eine Tendenz zur

Wachstumshemmung auch in Anwesenheit von AA. Ein ähnlicher Prozess könnte auch für das Wachstum der Neurofibrome verantwortlich sein. Wir fanden den DHA-Rezeptor FABP-7 in Schwannzellen von embryonalen peripheren Nerven expremiert (Daten werden hier nicht gezeigt), und in Ischiasnervgewebe von erwachsenen *Nf1*^{+/-}-Mäusen, sowie in 3 von 7 klinischen Neurofibromproben. Sobald DHA die maternale Zirkulation verlässt, könnten die schon vorbestehenden maternalen Neurofibrome und in situ Läsionen von einem Ruhe-Status zu einem Wachstumsstatus transformiert werden. Der Verlust an maternalem DHA führt möglicherweise zu einer Umgebung, die die Stimulation der Tumorgenese durch Wachstumsfaktoren wie EGF, PDGF- β , bFGF und IGF-1 erleichtert. So wie die Expression des Progesteronrezeptors in Neurofibromen eine potentielle Relevanz für die Tumorgenese in der Schwangerschaft besitzt (McLaughlin und Jacks T, 2003), sollte auch die Rolle der Fettsäurenumverteilung während der Schwangerschaft untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine der häufigsten genetischen Erkrankungen des Nervensystems mit einer Inzidenz von ca. 1:3500. NF1 ist eine autosomal-dominante Erkrankung, gekennzeichnet durch eine hohe Ausprägungsvariabilität und die Involvierung multipler Organsysteme. Unter den verschiedenen Tumoren, die Patienten mit NF1 entwickeln, sind die benignen Neurofibrome des peripheren Nervensystems am häufigsten. Das Verständnis der Pathogenese der NF1 ist in den letzten Jahren durch die Identifizierung des *NF1* Gens und die Erkenntnisse über das Protein Neurofibromin und seine Funktionen weit vorangeschritten. Insbesondere die Ursachen der ausgeprägten Heterogenität und der Variabilität des natürlichen Verlaufs der NF1 sind jedoch noch weitgehend unklar. Es werden epigenetische Mechanismen untersucht, die die hohe Variabilität des Wachstumsverhalten der Neurofibrome erklären könnten. So wurde beispielsweise in Neurofibromen und in MPNST-Zellen eine stark erhöhte Expression des Docosahexaensäure (DHA) Rezeptors FABP-7 (engl., Fatty-acid binding protein 7) gefunden, hinweisend auf eine potentiell pathogenetisch bedeutsame Rolle des Liganden DHA. In verschiedenen Tumormodellen zeigten Omega-3 Fettsäuren im Unterschied zu Omega-6 Fettsäuren eine antiproliferative Wirkung.

Wir untersuchen in der vorliegenden Studie erstmals den Effekt der Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren auf *nf1/p53* Maligne periphere Nervscheidentumor (MPNST) -Zellen, einem Tumormodell für die Neurofibromatose Typ 1. Unsere Ergebnisse geben bedeutende Hinweise auf eine Rolle eines diätetischen Faktors in der Entwicklung der NF1. Dabei scheint die biologische Funktion von DHA in MPNST-Zellen abhängig von der Konzentration zu sein. In niedriger Dosierung stimulierte die Omega-3 Fettsäure DHA das Wachstum der meisten *Nf1:p53* MPNST-Zellen, assoziiert mit einer Aktivierung des Extrazellulären Rezeptorregulierten Kinase (ERK) - Signalweges. Höhere Dosierung von DHA führten demgegenüber zu einer Apoptoseinduktion via ERK und Caspase-3. Die Zellproliferation der MPNST-Zellen wird durch eine Anzahl von Wachstumsfaktoren ausgelöst. DHA in hoher physiologischer Dosierung hemmte die Proliferationsstimulation aller getesteten Wachstumsfaktoren, einhergehend mit einem durch *in vivo* Studien demonstrierten antiproliferativen Effekt auf Tumore der NF1. Das Tumorwachstum wurde gehemmt, und wir beobachteten eine erhöhte Überlebensrate in der mit DHA behandelten Gruppe.

Ein überraschendes Ergebnis war die Aktivierung von ERK durch DHA in MPNST-Zellen, begleitet von entgegengesetzten DHA-Effekten. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die ERK-Aktivierung durch DHA, z.B. durch eine langanhaltende Stimulation von ERK einen Downstream-Weg aktiviert, der zu Apoptose führt. Frühere Studien demonstrierten in verschiedenen neoplastischen Zelltypen bereits eine reziproke Aktivität von DHA und Arachidonsäure (AA). Im Einklang mit diesen Ergebnissen haben wir zeigen können, dass DHA und AA eine reziproke Aktivität auf das MPNST Zellwachstum *in vitro* haben. So stimuliert AA das Wachstum der MPNST-Zellen alleine und in Kombination mit DHA. AA scheint dabei die Effekte der durch DHA ausgelösten Tumoringhibition zu vermindern. AA bewirkt darüber hinaus eine Umkehrung der DHA-Effekte auf die ERK Phosphorylierung, wie auch eine Reduzierung der durch DHA vermittelten Caspase-3 Aktivierung. Diese Phänomene könnten den Antagonismus von DHA und AA auf das Zellwachstum erklären. Das Tumorstadium *in vivo* wurde jedoch nicht durch AA stimuliert. Begründet sein könnte dies durch den variablen Effekt von AA auf die Wachstumsfaktorstimulation. So konnten wir zeigen, dass AA bFGF (engl. Basic fibroblast growth factor) *in vitro* hemmt, welches einen stärkeren Effekt *in vivo* auslösen könnte, als es für die Stimulation der MPNST-Zellen *in vitro* hatte. Um die Rolle von AA in der Tumorentstehung der MPNST zu verstehen, werden weitere Untersuchungen benötigt, besonders, betrachtet man die potentiell therapeutische Rolle der (Cyclooxygenase) COX-2 Inhibitoren auf die Tumore, bei denen eine ähnliche Modulation durch Fettsäuren gezeigt werden konnte. FABP-7 ist ein Ligand für DHA, der in Neurofibromin-defizienten Schwannzellen hochreguliert wird. Wir demonstrieren hier eine Verstärkung der FABP-7-Expression in humanen Neurofibromen und MPNST-Zellen *in vitro*. Allerdings fanden wir eine variable Expression von FABP-7 in den Tumorgeweben der *Nf1:p53*-Zelllinien mit einer Tendenz der Gewebeproben der aggressiven Zelllinien, die Expression *in vivo* zu verlieren. Die variable MPNST Expression von FABP-7 *in vivo* lässt darauf schließen, dass andere Mechanismen in der durch DHA vermittelten Tumorentstehung *in vivo* eine Rolle spielen könnten.

Zusammenfassend stellen diese Studien erstmals die Modulation der Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren als einen Mechanismus der Tumorzellregulation in MPNST-Zellen vor. Anhand der Datenlage schließen wir auf eine potentielle Rolle von DHA in der Pathogenese der NF1. Weitere Studien werden notwendig sein, um die Rolle von DHA und seinem Liganden FABP-7 in dem natürlichen Krankheitsverlauf und auch in der Therapie der NF1 zu untersuchen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Ahmadian M, Wiesmuller L, Lautwein A, Bischoff F, Wittinghofer A. Structural differences in the minimal catalytic domains of the GTPase-activating proteins p120GAP and neurofibromin. *J Biol Chem* 1996; 271: 16409-16415

Anderson RE, Maude MB, Bok D. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segment membranes of mice with rds/peripherin and P216L peripherin mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1715–1720

Anderson RE, Maude MB, McClellan M, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segments of rats with P23H and S334ter rhodopsin mutations. *Mol Vis* 2002; 8: 351–358

Anti M, Armelao F, Marra G, Percesepe A, Bartoli GM, Palozza P, Parrella P, Canetta C, Gentiloni N, De Vitis I, et al. Effects of different doses of fish oil on rectal cell proliferation in patients with sporadic colonic adenomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1709-1718

Anti M, Marra G, Armelao F, Bartoli GM, Ficarelli R, Percesepe A, De Vitis I, Maria G, Sofo L, Rapaccini GL, et al. Effect of omega-3 fatty acids on rectal mucosal cell proliferation in subjects at risk for colon cancer. *Gastroenterology*. 1992; 103: 883-891

Arita K, Kobuchi H, Utsumi T, Takehara Y, Akiyama J, Horton AA, Utsumi K. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Pharmacol*. 2001; 62: 821-828

Babcock T, Helton WS, Espat NJ. Eicosapentaenoic acid (EPA): an antiinflammatory ω -3 fat with potential clinical applications. *Nutrition* 2000; 16: 1116–1118

Badache A, DeVries GH. Neurofibrosarcoma-derived Schwann cells overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and are induced to proliferate by PDGF BB. *J Cell Physiol* 1998; 177: 334-342

Barber MD, Fearon KC, Tisdale MJ, McMillan DC, Ross JA. Effect of a fish oil-enriched nutritional supplement on metabolic mediators in patients with pancreatic cancer cachexia. *Nutr Cancer* 2001; 40: 118–124

Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J. Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature* 1992; 356: 713-715

Bazan NG. Supply of polyunsaturated fatty acids and their significance in the central nervous system. In: Wurtman RJ, Wurtman J J, eds. *Nutrition and the Brain*. New York : Raven Press 1990; 8: 1-24

Bernardis V, Sorrentino D, Snidero D, Avellini C, Paduano R, Beltrami CA, Digito F, Bartoli E. Intestinal leiomyosarcoma and gastroparesis associated with von Recklinghausen's disease. *Digestion*. 1999; 60: 82-85

Bernards A. Neurofibromatosis type 1 and Ras-mediated signalling: filling in the GAPs. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1242: 43-59

Bhat NR, Zhang P. Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurochem*. 1999; 72: 112-119

Bollag G, Clapp DW, Shih S, Adler F, Zhang YY, Thompson P, Lange BJ, Freedman MH, McCormick F, Jacks T, Shannon K. Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nat Genet*. 1996; 12: 144-148

Bollag G, McCormick F, Clark R. Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *EMBO J* 1993;12: 1923-1927

Bollag G, McCormick F. Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature* 1991; 351: 576-579

Bornfeldt KE, Campbell JS, Koyama H, Argast GM, Leslie CC, Raines EW, Krebs EG, Ross R. The mitogen-activated protein kinase pathway can mediate growth inhibition and proliferation in smooth muscle cells. Dependence on the availability of downstream targets. *J Clin Invest*. 1997; 100: 875-885

Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-4689

Boudreau MD, Sohn KH, Rhee SH, Lee SW, Hunt JD, Hwang DH. Suppression of tumor cell growth both in nude mice and in culture by n-3 polyunsaturated fatty acids: mediation through cyclooxygenase-independent pathways. *Cancer Res*. 2001; 61: 1386-1391

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990; 348: 125-132

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991; 349: 117-127

Brand A, Gil S, Seger R, Yavin E. Lipid constituents in oligodendroglial cells alter susceptibility to H₂O₂-induced apoptotic cell death via ERK activation. *J Neurochem*. 2001; 76: 910-918

Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, Ratner N, Nordlund ML, Reid SW, Buchberg AM, Jenkins NA, Parada LF, Copeland NG. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes and Development* 1994; 8: 1019-1029

Brennan MF, Casper ES, Harrison LB, Shiu MH, Gynor J, Hajdu SI. The role of multimodality therapy in soft-tissue sarcoma. *Ann Surg* 1991; 214: 328-336

Buchberg AM, Cleveland LS, Jenkins NA, Copeland NG. Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway. *Nature*. 1990; 347: 291-294

Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefler DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*. 2000; 19: 6341-6350

Burden S, Yarden Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 1997; 18: 847-855

Calder PC, Davis J, Yaqoob P, Pala H, Thies F, Newsholme EA. Dietary fish oil suppresses human colon tumor growth in athymic mice. *Clin Sci* 1998; 94: 303-311

Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56: S14-19

Calviello G, Di Nicuolo F, Gragnoli S, Piccioni E, Serini S, Maggiano N, Tringali G, Navarra P, Ranelletti FO, Palozza P. n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE₂ induced ERK-1 and -2 and HIF-1 α induction pathway. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 2303-2310

- Carr NJ, Warren AY. Mast cell numbers in melanocytic naevi and cutaneous neurofibromas. *J Clin Pathol* 1993; 46: 86-87
- Casey PJ, Solski PA, Der CJ, Buss JE. p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 8323-8327
- Casillas AM, Amaral K, Chegini-Farahani S, Nel AE. Okadaic acid activates p42 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase; ERK-2) in B-lymphocytes but inhibits rather than augments cellular proliferation: contrast with phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochem. J* 1993; 290: 545-550
- Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P, et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell.* 1990; 62: 193-201
- Celis JE, Ostergaard M, Basse B, Celis A, Lauridsen JB, Ratz GP, Andersen I, Hein B, Wolf H, Orntoft TF, Rasmussen HH. Loss of adipocyte-type fatty acid binding protein and other protein biomarkers is associated with progression of human bladder transitional cell carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56: 4782-4790
- Chen ZY, Istfan NW. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 63: 301-308
- Cheuk BL, Chew SB, Fiscus RR, Wong PY. Cyclooxygenase-2 regulates apoptosis in rat epididymis through prostaglandin D2. *Biol Reprod.* 2002; 66: 374-380
- Chiu LC, Wan JM. Induction of apoptosis in HL-60 cells by eicosapentaenoic acid (EPA) is associated with downregulation of bcl-2 expression. *Cancer Lett* 1999; 145: 17-27
- Chuang SM, Wang IC, Yang JL. Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 1423-1432
- Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O, Langenbach R. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res.* 2000; 60: 4705-4708

Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2001; 121: 1339-1347

Cichowski K, Santiago S, Jardim M, Johnson BW, Jacks T. Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor. *Genes Dev*. 2003; 17: 449-454

Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T. Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science* 1999; 286: 2172-2176

Clark GJ, Der CJ. In: Dickey BF, Birnbaumer L eds. *GTPases in Biology*. Berlin: Springer-Verlag 1993: 259-288

Collett ED, Davidson LA, Fan YY, Lupton JR, Chapkin RS. n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1066-1075

Connolly JM, Coleman M, Rose DP. Effects of dietary fatty acids on DU145 human prostate cancer cell growth in athymic nude mice. *Nutr Cancer* 1997; 29: 114-119

Connolly JM, Gilhooly EM, Rose DP. Effects of reduced dietary linoleic acid intake, alone or combined with an algal source of docosahexaenoic acid on MDA-MB-231 breast cancer cell growth and apoptosis in nude mice. *Nutr Cancer* 1999; 35: 44-49

Conquer JA, Holub BJ. Effect of supplementation with different doses of DHA on the levels of circulating DHA as non-esterified fatty acid in subjects of Asian Indian background. *J Lipid Res*. 1998; 39: 286-292

Corey EJ, Shih C, Cashman JR. Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80: 3581-3584

Cowing BE, Saker KE. Polyunsaturated fatty acids and epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase signaling in mammary cancer. *J Nutr*. 2001; 131: 1125-1128

Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*. 1994; 77: 841-852

Craven PA, DeRubertis FR. Role of activation of protein kinase C in the stimulation of colonic epithelial proliferation by unsaturated fatty acids. *Gastroenterology* 1988; 95: 676–685

Crawford M, Galli C, Visioli F, Renaud S, Simopoulos AP, Spector AA. Role of plant-derived omega-3 fatty acids in human nutrition. *Ann Nutr Metab.* 2000; 44: 263-265

Custer RP, Sorof S. Target polypeptide of a carcinogen is associated with normal mitosis and carcinogen-induced hyperplasias in adult hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ;81: 6738-6742

Damtew B, Spagnuolo PJ. Tumor cell-endothelial cell interactions: evidence for roles for lipoxygenase products of arachidonic acid in metastasis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1997; 56: 295-300

Das R, Hammamieh R, Neill R, Melhem M, Jett M. Expression pattern of fatty acid-binding proteins in human normal and cancer prostate cells and tissues. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1706-1715

Daston M, Scrabble H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N. The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron* 1992; 8: 415-428

De Gomez IN, Brenner, RR. Oxidative desaturation of alpha-linolenic, linoleic and stearic acids by human liver microsomes. *Lipids* 1975; 10: 315–317

De Salis HM, Meckling-Gill KA. EPA and DHA alter nucleoside drug and doxorubicin toxicity in L 1210 cells but not in normal murine S1 macrophages. *Cell Pharmacol* 1995; 2: 69-74

DeClue J, Heffelfinger S, Benvenuto G, Ling B, Li S, Rui W, Vass WC, Viskochil D, Ratner N. Epidermal growth factor receptor expression in neurofibromatosis type 1-related tumors and NF1 animal models. *J Clin Invest* 2000; 105: 1233-1241

DeClue JE, Cohen BD, Lowy DR. Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9914-9918

DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR, Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell* 1992; 69: 265-273

Deschner EE, Lytle H, Wong G, Ruperto JF, Newmark HL. The effect of dietary omega-3 fatty acids (fish oil) on azoxymethanol-induced focal areas of dysplasia and colon tumor incidence. *Cancer* 1990; 66: 2350-2356

Diep QN, Intengan HD, Schiffrin EL. Endothelin-1 attenuates omega3 fatty acid-induced apoptosis by inhibition of caspase 3. *Hypertension*. 2000; 35: 287-291

Dikic I, Schlessinger J, Lax I. PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Curr Biol*. 1994; 4: 702-708

Dugoff L, Sujansky E. Neurofibromatosis type 1 and pregnancy. *Am J Med Genet* 1996; 66: 7-10

Evans DG, Huson SM, Donnai D, Neary W, Blair V, Newton V, Harris R. A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med* 1992;84:603-618

Feng L, Hatten ME, Heintz N. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 1994; 12: 895-908

Ferner RE, Hughes RA, Weinman J. Intellectual impairment in neurofibromatosis 1. *J Neurol Sci* 1996; 138: 125-133

Fisher ER, Vuzevski VD. Cytogenesis of schwannoma (neurilemoma), neurofibroma, dermatofibroma and dermatofibrosarcoma as revealed by electron microscopy. *Am J Clin Pathol* 1968; 49: 141-154

Foey AD, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BM, Brennan FM. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol*. 1998;160: 920-928

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31

Frahm S, Mautner VF, Brems H, Legius E, Debiec-Rychter M, Friedrich RE, Knofel WT, Peiper M, Kluwe L. Genetic and phenotypic characterization of tumor cells derived from malignant peripheral nerve sheath tumors of neurofibromatosis type 1 patients. *Neurobiol Dis*. 2004; 16: 85-91

Friedman J, Birch PH. Type 1 neurofibromatosis: a descriptive analysis of the disorder in 1728 patients. *Am J Med Genet* 1997; 70: 138-143

Friedman JM, Riccardi VM. Clinical and Epidemiologic Features. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM, eds. Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History, and Pathogenesis, 3rd ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press 1999: 29-86

Germain E, Lavandier F, Chajès V, Schubnel V, Bonnet P, Lhuillery C, Bougnoux P. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and oxidants increase rat mammary tumor sensitivity to epirubicin without change in cardiac toxicity. *Lipids* 1999; 34: S203

Ghebremeskel K, Min Y, Crawford MA, Nam JH, Kim A, Koo JN, Suzuki H. Blood fatty acid composition of pregnant and nonpregnant Korean women: red cells may act as a reservoir of arachidonic acid and docosahexaenoic acid for utilization by the developing fetus. *Lipids*. 2000; 35: 567-574

Ginsburg DS, Hernandez E, Johnson JW. Sarcoma complicating von Recklinghausen disease in pregnancy. *Obstet Gynecol* 1981; 58: 385-387

Glover TW, Stein CK, Legius E, Andersen LB, Brereton A, Johnson S. Molecular and cytogenetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Genes Chromosomes Cancer* 1991; 3: 62-70

Golubic M, Roudebush M, Dobrowolski S, Wolfman A, Stacey DW. Catalytic properties, tissue and intracellular distribution of neurofibromin. *Oncogene* 1992; 7: 2151-2159

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878

Gregory PE, Gutmann DH, Mitchell A, Park S, Boguski M, Jacks T, Wood DL, Jove R, Collins FS. Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associates with microtubules. *Somat Cell Mol Genet* 1993; 19: 265-274

Guha A, Lau N, Huvar I, Gutmann D, Provias J, Pawson T, Boss G. Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors. *Oncogene* 1996; 12: 507-513

Guo HF, The I, Hannan F, Bernards A, Zhong Y. Requirement of Drosophila NF1 for activation of adenylyl cyclase by PACAP38-like neuropeptides. *Science* 1997; 276: 795-798

Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, Rubenstein A, Viskochil D. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 1997a; 278: 51-57

Gutmann DH, Wood DL, and Collins FS. Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 9658-9662

Gutmann DH. Molecular insights into neurofibromatosis 2. *Neurobiology Dis* 1997b; 3: 247-261

Hagve TA und Christophersen BO. Effect of dietary fats on arachidonic acid and eicosapentaenoic acid biosynthesis and conversion of C₂₂ fatty acids in isolated liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1984; 796: 205-217

Hall JG. Possible maternal and hormonal factors in neurofibromatosis. *Adv Neurol*. 1981; 29: 125-131

Hamid R, Singh J, Reddy BS, Cohen LA. Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and -2 in N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Int J Oncol*. 1999; 14: 523-528

Hansson HA, Lauritzen C, Lossing C, Petruson K. Somatomedin C as tentative pathogenic factor in neurofibromatosis. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1988; 22: 7-13

Hardman WE, Avula CP, Fernandes G, Cameron IL. Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2041–2049

Hardman WE, Barnes CJ, Knight CW, Cameron IL. Effects of iron supplementation and ET-18-OCH₃ on MDA-MB 231 breast carcinomas in nude mice consuming a fish oil diet. *Br J Cancer* 1997; 76: 347–354

Hardman WE, Moyer MP, Cameron IL. Dietary fish oil sensitizes A549 lung xenografts to doxorubicin chemotherapy. *Cancer Lett* 2000; 151: 145–151

Hardman WE, Moyer MP, Cameron IL. Fish oil supplementation enhanced CPT-11 (Irinotecan) efficacy against MCF7 breast carcinoma xenografts and ameliorated intestinal side effects. *Br J Cancer* 1999; 81: 440–448

Hardman WE. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. *J Nutr* 2002; 132: 3508S-12S

Hardy M, Reddy UR, Pleasure D. Platelet-derived growth factor and regulation of Schwann cell proliferation in vivo. *J Neurosci Res*. 1992; 31: 254-262

Harrisingh MC, Perez-Nadales E, Parkinson DB, Malcolm DS, Mudge AW, Lloyd AC. The Ras/Raf/ERK signalling pathway drives Schwann cell dedifferentiation. *EMBO J*. 2004; 23: 3061-3071

- Hiatt KK, Ingram DA, Zhang Y, Bollag G, Clapp DW. Neurofibromin GTPase-activating protein-related domains restore normal growth in Nf1^{-/-} cells. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7240-7245
- Holman RT. The slow discovery of the importance of omega-3 essential fatty acids in human health. *J Nutr* 1998; 128: 427S-433S
- 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* 1989a; 26: 704-711
- Huson SM, Compston DA, Harper PS. A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in South east Wales. II Guidelines for genetic counselling. *J Med Genet* 1989b;26: 712-721
- Huson SM, Harper PS, Compston DA. Von Recklinghausen neurofibromatosis. A clinical and population study in south-east Wales. *Brain* 1988; 111: 1355-1381
- Huson SM. Neurofibromatosis 1: a clinical and genetic overview. In: Huson SM, Hughes RAC, eds. *The Neurofibromatoses: A Pathogenetic and Clinical Overview*. 1st ed. London: Chapman & Hall Medical, 1994b: 160-203
- Huson SM. Neurofibromatosis: Historical perspective, classification, and diagnostic criteria. In: Huson SM, Hughes RAC eds. *The Neurofibromatoses: A Pathogenetic and Clinical Overview*. 1st ed. London: Chapman & Hall Medical, 1994a: 1-22
- Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 455-460
- Ingram DA, Hiatt K, King AJ, Fisher L, Shivakumar R, Derstine C, Wenning MJ, Diaz B, Travers JB, Hood A, Marshall M, Williams DA, Clapp DW. Hyperactivation of p21(ras) and the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, cooperate to alter the proliferation of neurofibromin-deficient mast cells in vivo and in vitro. *J Exp Med* 2001; 194: 57-69
- Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*. 1998; 10: 205-219
- Jacks T, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernards A, Weinberg RA. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nature Genet* 1994; 7: 353-361

Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, Kelloff G, Lubet RA The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res* 2000; 60: 5040-5044

Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 2556–2559

Karmali RA, Marsh J, Fuchs C. Effect of omega-3 fatty acids on growth of a rat mammary tumor. *J Natl Cancer Inst.* 1984; 73: 457-461

Kawachi Y, Xu X, Ichikawa E, Imakado S, Otsuka F. Expression of angiogenic factors in neurofibromas. *Exp Dermatol.* 2003; 12: 412-417

Kayes LM, Riccardi VM, Stephens K. Evidence for a microdeletion in a patient with Neurofibromatosis 1 and mental retardation. *Am J Hum Genet* 1990; 47: A233 (abstract)

Kim HA, Ling B, Ratner N. 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* 1997; 17: 862-872

Kim HJ, Vosseler CA, Weber PC, Erl W. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in proliferating human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2005; 204: 881-888

Kim HY, Akbar M, Kim KY. Inhibition of neuronal apoptosis by polyunsaturated fatty acids. *J Mol Neurosci* 2001; 16: 223-227

Kim HY, Akbar M, Lau A, Edsall L. Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. *J Biol Chem* 2000; 275: 35215–35223

Kim SJ, Ju JW, Oh CD, Yoon YM, Song WK, Kim JH, Yoo YJ, Bang OS, Kang SS, Chun JS. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *J Biol Chem.* 2002; 277: 1332-1339

Kishida E, Yano M, Kasahara M, Masuzawa Y. Distinctive inhibitory activity of docosahexaenoic acid against sphingosine-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1391: 401-408

Kitano Y, Okamoto E, Saito K, Okano Y. Effects of several growth factors on cultured neurofibroma cells. *J Dermatol Sci.* 1992; 3: 137-144

Kley N, Whaley J, Seizinger BR. Neurofibromatosis type 2 and von Hippel-Lindau disease: from gene cloning to function. *Glia* 1995;15: 297-307

Kluwe L, Friedrich RE, Mautner VF. Allelic loss of the NF1 gene in NF1-associated plexiform neurofibromas. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 113: 65-69

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823

Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, Okami J, Ito Y, Shimizu J, Eguchi H, Miyamoto A, Dono K, Umeshita K, Matsuura N, Wakasa K, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 4005-4012

Korf BR, Huson SM, Needle M, Ratner N, Rutkowski L, Short PM, Tonsgard J, Viskochil D. Report of the working group on Neurofibroma. The National Neurofibromatosis Foundation Inc 1997: 4-27

Korf BR. Diagnostic outcome in children with multiple café au lait spots. *Pediatrics* 1992; 90: 924-927

Korf BR. Neurofibromas and Malignant Tumors of the Peripheral Nerve Sheath. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM, eds. *Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History, and Pathogenesis.* 3rd ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press 1999: 142-161

Krasnoselsky A, Massay MJ, DeFrances MC, Michalopoulos G, Zarnegar R, Ratner N. Hepatocyte growth factor is a mitogen for Schwann cells and is present in neurofibromas. *J Neurosci* 1994; 14: 7284-7290

Kurokawa H, Lenferink AE, Simpson JF, Pisacane PI, Sliwkowski MX, Forbes JT, Arteaga CL. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 5887-5894

Kurtz A, Zimmer A, Schnutgen F, Bruning G, Spener F, Müller T. The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* 1994; 120: 2637-2649

Lau N, Feldkamp MM, Roncari L, Loehr AH, Shannon P, Gutmann DH, Guha A. Loss of neurofibromin is associated with activation of RAS/MAPK and PI3-K/AKT signaling in a neurofibromatosis 1 astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000; 59: 759-767

Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res.* 2002; 62: 625-631

Lee DY, Lupton JR, Aukema HM, Chapkin RS. Dietary fat and fiber alter rat colonic mucosal lipid mediators and cell proliferation. *J Nutr* 1993; 123: 1808-1817

Legius E, Marchuk DA, Collins FS, Glover TW. Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis. *Nat Genet* 1993; 3: 122-126

Lewis RA, Riccardi VM. Von Recklinghausen neurofibromatosis. Incidence of iris hamartomata. *Ophthalmology* 1981; 88: 348-354

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 1998; 74: 49-139

Li D, Ng A, Mann NJ, Sinclair AJ. Contribution of meat fat to dietary arachidonic acid. *Lipids* 1998; 33: 437-440

Li H, Velasco-Miguel S, Vass WC, Parada LF, DeClue JE. Epidermal growth factor receptor signaling pathways are associated with tumorigenesis in the Nf1:p53 mouse tumor model. *Cancer Res* 2002; 62: 4507-4513

Lisch K. Über Beteiligung der Augen, insbesondere das Vorkommen von Irisknötchen bei der Neurofibromatose (Recklinghausen). *Z Augenheilkd* 1937; 93: 137-143

Litman BJ, Niu SL, Polozova A, Mitchell DC. The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction. *J Mol Neurosci* 2001; 6: 237-242

Liu G, Bibus DM, Bode AM, Ma WY, Holman RT, Dong Z. Omega 3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-1 activity and cell transformation in JB6 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7510–7415

Lott IT, Richardson EP Jr. Neuropathological findings and the biology of neurofibromatosis. *Adv Neurol* 1981; 29: 23-32

Maemura M, Iino Y, Koibuchi Y, Yokoe T, Morishita Y. Mitogen-activated protein kinase cascade in breast cancer. *Oncology*. 1999; 57: 37-44

Makrides M, Neumann M, Simmer K, Pater J, Gibson R. Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy? *Lancet*. 1995; 345: 1463-1468

Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 1994; 265: 966-970

Marais R, Marshall CJ. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv* 1996; 27: 101-125

Marchuk DA, Saulino AM, Tavakkol R, Swaroop M, Wallace MR, Andersen LB, Mitchell AL, Gutmann DH, Boguski M, Collins FS, cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product. *Genomics* 1991; 11: 931-940

Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995; 80: 179-185

Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, o'Connell P, Cawthon RM, Innis MA, McCormick F. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 1990; 63: 843-849

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995; 182: 1545-1556

Mashour GA, Driever PH, Hartmann M, Drissel SN, Zhang T, Scharf B, Felderhoff-Muser U, Sakuma S, Friedrich RE, Martuza RL, Mautner VF, Kurtz A. Circulating growth factor levels are associated with tumorigenesis in neurofibromatosis type 1. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 5677-5683

Mashour GA, Ratner N, Khan GA, Wang HL, Martuza RL, Kurtz A. The angiogenic factor midkine is aberrantly expressed in NF1-deficient Schwann cells and is a mitogen for neurofibroma-derived cells. *Oncogene*. 2001; 20: 97-105

Matsui I, Tanimura M, Kobayashi N, Sawada T, Nagahara N, Akatsuka J. Neurofibromatosis type 1 and childhood cancer. *Cancer* 1993; 72: 2746-2754

McCarron KF, Goldblum JR. Plexiform neurofibroma with and without associated malignant peripheral nerve sheath tumor: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 54 cases. *Mod Pathol* 1998; 11: 612-617

McCarty MF. Fish oil may impede tumour angiogenesis and invasiveness by down-regulating protein kinase C and modulating eicosanoid production. *Med Hypotheses* 1996; 46: 107-115

McCawley LJ, Li S, Wattenberg EV, Hudson LG. Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration. *J Biol Chem*. 1999; 274: 4347-4353

McLaughlin ME, Jacks T. Progesterone receptor expression in neurofibromas. *Cancer Res* 2003; 63: 752-755

Menon AG, Anderson KM, Riccardi VM, Chung RY, Whaley JM, Yandell DW, Farmer GE, Freiman RN, Lee JK, Li FP, Barkker DF, Ledbetter DH, Kleider A, Matuza RL, Gusella JF, Seizinger BR. Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 5435-5439

Merendino N, Molinari R, Loppi B, Pessina G, D' Aquino M, Tomassi G, Velottia F. Induction of apoptosis in human pancreatic cancer cells by docosahexaenoic acid. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 1010: 361-366

Miller SJ, Li H, Rizvi TA, Huang Y, Johansson G, Bowersock J, Sidani A, Vitullo J, Vogel K, Parysek LM, DeClue JE, Ratner N. Brain lipid binding protein in axon-Schwann cell interactions and peripheral nerve tumorigenesis. *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 2213-2224

Minoura T, Takata T, Sakaguchi M, Takada H, Yamamura M, Hioki K, Yamamoto M. Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res*. 1988; 48: 4790-4794

Miura Y, Takahara K, Murata Y, Utsumi K, Tada M, Takahata K. Docosahexaenoic acid induces apoptosis via the Bax-independent pathway in HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004; 68: 2415-2417

Murray NR, Weems C, Chen L, Leon J, Yu W, Davidson LA, Jamieson L, Chapkin RS, Thompson EA, Fields AP. Protein kinase C betaII and TGFbetaRII in omega-3 fatty acid-mediated inhibition of colon carcinogenesis. *J Cell Biol.* 2002; 157: 915-920

Narayanan BA, Narayanan NK, Reddy BS. Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 2001; 19: 1255–1262

Narayanan BA, Narayanan NK, Simi B, Reddy BS. Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2003; 63: 972-979

Needleman P, Raz A, Minkes MS, Ferrendelli JA, Sprecher H. Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 944–948

Neuringer M, Connor WE, Lin DS, Barstad L, Luck S. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4021–4025

Neuringer M, Connor WE, Van Petten C, and Barstad L. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkeys. *J Clin Invest* 1984; 73: 272-276

Nordlund M, Gu X, Shipley MT, Ratner N. Neurofibromin is enriched in the endoplasmatic reticulum of CNS neurons. *J Neurosci* 1993; 13: 1588-1600

Obringer AC, Meadows AT, Zackai EH. The diagnosis of neurofibromatosis-1 in the child under the age of 6 years. *Am J Dis Child* 1989; 143: 717-719

Okami J, Yamamoto H, Fujiwara Y, Tsujie M, Kondo M, Noura S, Oshima S, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Ishikawa O, Sakon M, Matsuura N, Nakamori S, Monden M. Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2018–2024

Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 8319-8323

Pai EF, Krenkel U, Petsko GA, Goody RS, Kabsch W, Wittinghofer A. Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J* 1990; 9: 2351-2359

Paulussen RJ, van der Logt CP, Veerkamp JH. Characterization and binding properties of fatty acid-binding proteins from human, pig, and rat heart. *Arch Biochem Biophys*. 1988; 264: 533-545

Paumelle R, Tulasne D, Leroy C, Coll J, Vandebunder B, Fafeur V. Sequential activation of ERK and repression of JNK by scatter factor/hepatocyte growth factor in madin-darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 2000; 11: 3751-3763

Persons DL, Yazlovitskaya EM, Pelling JC. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J Biol Chem* 2000; 275: 35778-35785

Pettersson F, Couture MC, Hanna N, Miller WH. Enhanced retinoid-induced apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells by PKC inhibitors involves activation of ERK. *Oncogene*. 2004; 23: 7053-7066

Puls LE, Chandler PA. Malignant schwannoma in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1991; 70: 243-244

Qui MS, Green SH. PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron*. 1992; 9: 705-717

Racke FK, Lewandowska K, Goueli S, Goldfarb AN. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Biol Chem*. 1997; 272: 23366-23370

Rao CV, Rivenson A, Simi B, Zang E, Kelloff G, Steele V, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by Sulindac, a nonsteroidal antiinflammatory agent. *Cancer Res* 1995; 55: 1464-1472

Rasmussen HH, Orntoft TF, Wolf H, Celis JE. Towards a comprehensive database of proteins from the urine of patients with bladder cancer. *J Urol*. 1996; 155: 2113-2119

Ratner N, Lieberman MA, Riccardi VM, Hong DM. Mitogen accumulation in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Ann Neurol* 1990; 27: 298-303

Reddy BS, Burill C, Rigotty J. Effect of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51: 487-491

Reddy BS, Nayini J, Tokumo K, Rigotty J, Zang E, Kelloff G. Chemoprevention of colon carcinogenesis by concurrent administration of piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug with D,L,- α -difluoromethylornithine, an ornithine decarboxylase inhibitor, in diet. *Cancer Res* 1990; 50: 2562–2568

Remacle-Bonnet MM, Garrouste FL, Heller S, Andre F, Marvaldi JL, Pommier GJ. Insulin-like growth factor-I protects colon cancer cells from death factor-induced apoptosis by potentiating tumor necrosis factor alpha-induced mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB signaling pathways. *Cancer Res.* 2000; 60: 2007-2017

Riccardi VM, Womack JE, Jacks T. Neurofibromatosis and related tumors. Natural occurrence and animal models. *Am J Pathol* 1994; 145: 994-1000

Riccardi VM. Cell-cell interaction as an epigenetic determinant in the expression of mutant neural crest cells. *Birth defects Orig Artic Ser* 1979; 15: 89-98

Riccardi VM. Cutaneous manifestations of neurofibromatosis: cellular interaction, pigmentation, and mast cells. *Birth defects Orig Artic Ser* 1981b; 17: 129-145

Riccardi VM. Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History and Pathogenesis, 2nd ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press 1992

Riccardi VM. Von Recklinghausen neurofibromatosis. *N Engl J Med* 1981a; 305: 157-166

Ringbom T, Huss U, Stenholm A, Flock S, Skattebol L, Perera P, Bohlin L. Cox-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. *J Nat Prod.* 2001; 64: 745-749

Rose DP, Connolly JM, Meschter CL. Effect of dietary fat on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1991a; 83: 1491-1495

Rose DP, Connolly JM. Antiangiogenicity of docosahexaenoic acid and its role in the suppression of breast cancer cell growth in nude mice. *Int J Oncol.* 1999b; 15: 1011-1015

Rose DP, Connolly JM. Effects of fatty acids and eicosanoid synthesis inhibitors on the growth of two human prostate cancer cell lines. *Prostate* 1991b; 18: 243-254

Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Therap* 1999a; 83: 217-244

Rose DP, Connolly JM. Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids. *Nutr Cancer* 2000; 37: 119-127

Rotstein NP, Politi LE, German OL, Girotti R. Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 2252-2259

Roudebush M, Slabe T, Sundaram V, Hoppel CL, Golubic M, Stacey DW. Neurofibromin colocalizes with mitochondria in cultured cells. *Exp Cell Res* 1997; 236: 161-172

Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature* 1993; 363: 515-521

Ruyle M, Connor WE, Anderson GJ, Lowensohn RI. Placental transfer of essential fatty acids in humans: venous-arterial difference for docosahexaenoic acid in fetal umbilical erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 7902-7906

Salem N Jr, Kim HY, Yergey JA. Docosahexaenoic acid: membrane function and metabolism. In: Simopoulos AP, Kifer RR, Martin R, eds. *The Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods.* New York: Academic 1986: 263-317

Sawada S, Florell S, Purandare SM, Ota M, Stephens K, Viskochil D. Identification of NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofibroma. *Nat Genet* 1996; 14: 110-112

Scheffzek K, Ahmadian MR, Wiesmuller L, Kabsch W, Stege P, Schmitz F, Wittinghofer A. Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications. *EMBO J* 1998; 17: 4313-4327

Schwartz SA, Hernandez A, Evers BM. The role of NF- κ B/I κ B proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. *Surg Oncol* 1999; 8: 143-153

Scott BL, Bazan NG. Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2903-2907

Scotti G, Filizolo F, Scialfa G, Tampieri D, Versari P. Repeated subarachnoid hemorrhages from a cervical meningioma. Case report. *J Neurosurg* 1987; 66: 779-781

Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995; 9: 726-735

Serra E, Puig S, Otero D, Gaona A, Kruyer H, Ars E, Estivill X, Lazaro C. Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 512-519

Serra E, Rosenbaum T, Winner U, Aledo R, Ars E, Estivill X, Lenard HG, Lazaro C. Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 3055-3064

Sewing A, Wiseman B, Lloyd AC, Land H. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 5588-5597

Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1229–1238

Shannon KM, O'Connell P, Martin GA, Paderanga D, Olson K, Dinndorf P, McCormick F. Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med* 1994; 330: 597-601

Sherman LS, Atit R, Rosenbaum T, Cox AD, Ratner N. Single cell Ras-GTP analysis reveals altered Ras activity in a subpopulation of neurofibroma Schwann cells but not fibroblasts. *J Biol Chem.* 2000; 275: 30740-30745

Shirahama T. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in transitional cell carcinoma and its preneoplastic lesions in the human urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2424-2430

Silva AJ, Frankland PW, Marowitz Z, Friedman E, Lazlo GS, Cioffi D, Jacks T, Bourtchuladze R. A mouse model for the learning and memory deficits associated with neurofibromatosis type 1. *Nature Genetics* 1997; 15: 281-284

Simopoulos AP. Summary of the NATO advanced research workshop on dietary omega 3 and omega 6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality. *J Nutr.* 1989; 119: 521-528

Singh J, Hamid R, Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 1997; 57: 3465-3470

Skuse GR, Kosciolk BA, Rowley PT. Molecular genetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis: loss of heterozygosity for chromosome 17. *Genes Chromosomes Cancer*. 1989 ; 1: 36-41

Smith A, Ramos-Morales F, Ashworth A, Collins M. A role for JNK/SAPK in proliferation, but not apoptosis, of IL-3-dependent cells. *Curr Biol* 1997; 7: 893-896

Smith MR, DeGudicibus SJ, Stacey DW. Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation. *Nature*.1986; 320: 540-543

Stefansson K, Wollmann R, Jerkovic M. S-100 protein in soft-tissue tumors derived from Schwann cells and melanocytes. *Am J Pathol* 1982; 106: 261-268

Stinson AM, Wiegand RD, Anderson RE. Recycling of docosahexaenoic acid in rat retinas during n-3 fatty acid deficiency. *J Lipid Res* 1991; 32: 2009–2017

Subramaniam S, Zirrgiebel U, von Bohlen Und Halbach O, Strelau J, Laliberte C, Kaplan DR, Unsicker K. ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3. *J Cell Biol*. 2004; 165: 357-369

Swapp GH, Main RA. Neurofibromatosis in pregnancy. *Br J Dermatol*. 1973; 88: 431-435

Tanaka K, Lin BK, Wood DR, Tamanoi F. IRA2, an upstream negative regulator of RAS in yeast, is a RAS GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 468-472

The I, Hannigan GE, Cowley GS, Reginald S, Zhong Y, Gusella JF, Hariharan IK, Bernard A. Rescue of a *Drosophila* NF1 mutant phenotype by protein kinase A. *Science* 1997; 276: 791-794

Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulsaski K et al. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 1993; 72: 791-800

Viskochil DH. The Structure and Function of the NF1 Gene: Molecular Pathophysiology. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM, eds. *Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History, and Pathogenesis*. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 1999: 119-141

Vogel KS, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, Meyers K, Rushing EJ, Parada LF. Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. *Science*. 1999; 286: 2176-2179

Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL, Brownstein B, Collins F. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 1990; 249: 181-186

Wang M, Liu YE, Ni J, Aygun B, Goldberg ID, Shi YE. Induction of mammary differentiation by mammary-derived growth inhibitor-related gene that interacts with an omega-3 fatty acid on growth inhibition of breast cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 6482–6487

Wang N, Wiegand RD, Anderson RE. Uptake of 22-carbon fatty acids into rat retina and brain. *Exp Eye Res* 1992; 54: 933-939

Wen B, Deutsch E, Opolon P, Auperin A, Frascogna V, Connault E, Bourhis J. n-3 polyunsaturated fatty acids decrease mucosal/epidermal reactions and enhance antitumour effect of ionising radiation with inhibition of tumour angiogenesis, *Br J Cancer* 2003; 89: 1102-1107

Wheeler TG, Benolken RM, Anderson RE. Visual membranes: specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination. *Science* 1975; 188: 1312–1314

Wiestler OD, Radner H. Pathology of neurofibromatosis 1 and 2. In: Huson SM, Hughes RAC eds. *The Neurofibromatoses: A Pathogenetic and Clinical Overview*. 1st ed. London: Chapman & Hall Medical 1994: 135-159

Wolkenstein P, Freche B, Zeller J, Revuz J. Usefulness of screening investigations in neurofibromatosis type 1. A study of 152 patients. *Arch Dermatol* 1996; 132: 1333-1336

Woodruff JM. Pathology of the major peripheral nerve sheath tumors. In: Weiss SW, Brooks JSJ, eds. *Soft Tissue Tumors, International Academy of Pathology Monograph*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996

Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, et al. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*. 1990; 62: 599-608

Xu LZ, Sanchez R, Sali A, Heintz N. Ligand-specificity of brain lipid-binding protein. *J Biol Chem* 1996; 271: 24711-24719

Yan N, Ricca C, Fletcher J, Glover T, Seizinger BR, Manne V. Farnesyltransferase inhibitors block the neurofibromatosis type 1 (NF1) malignant phenotype. *Cancer Res* 1995; 55: 3569-3575

Zhang K, DeClue JE, Vass WC, Papageorge AG, McCormick F, Lowy DR. Suppression of c-ras transformation by GTPase-activating protein. *Nature* 1990; 346: 754-756

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie gilt mein Dank George Mashour, der mich von Beginn meiner wissenschaftlichen Arbeit an begleitete und diese Arbeit durch die Bereitstellung des Themas überhaupt erst ermöglichte. Insbesondere möchte ich ihm danken für seine stetige Geduld und die vielen wertvollen Ratschläge.

Diese Arbeit wurde durch Herrn PD Dr. Andreas Kurtz betreut, bei dem ich mich für die fachliche Unterstützung und die konstruktive Diskussionsbereitschaft bedanken möchte.

Mein großer Dank gilt Herrn PD Dr. Udo Schmitz für die Bereitschaft zur Betreuung meiner Arbeit, die wertvollen Anregungen und nützlichen Ratschläge bei der Abfassung meiner Dissertation.

Durch die Kooperation mit dem Neuropathologischen Institut der Universitätsklinik Bonn mit dem Molecular Neurosurgery Laboratory des Massachusetts General Hospital der Harvard Medical School in Boston wurde mir ermöglicht, diese Arbeit in Bonn absolvieren zu können. Allen Beteiligten, insbesondere Frau PD Dr. Andrea Kindler Röhrborn, deren Laborräume zur Verfügung gestellt wurden und deren Mitarbeiter stets hilfreich zur Seite standen, gilt mein großer Dank.

Ein besonderer Dank gilt der Studienstiftung des Deutschen Volkes für das Vertrauen, das sie mir stets entgegenbrachte und die herausragende ideelle und finanzielle Unterstützung meiner Forschungsvorhaben.

Einen herzlichen Dank richte ich an dieser Stelle an meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mich gemeinsam mit Joachim Trojan und Christa Drissel vom ersten Tag an unterstützten.

Meinen Freunden und Freundinnen möchte ich für ihre Hilfe und ihr Verständnis in der Studien- und Forschungszeit in Münster, Washington, Bonn und Boston danken.

Martin Sippel danke ich für die tägliche hilfreiche Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit und das Verständnis für all die Stunden, die es in Anspruch nahm.

Publikationen und Präsentationen

- 2000 Drissel SN, Chen CC, Zimmer A. Investigating a H-gated channel in nociceptive circuits: from cell biology to molecular genetics. Vortrag, 4th EURON Graduate Student Conference, Maastricht, Niederlande
- 2003 Hartmann M, Mashour GA, Drissel SN, Scharf B, Sadatoshi S, Driever PH, Mautner VM, Kurtz A. Midkine serum levels are associated with tumorigenesis in neurofibromatosis type 1 Poster, International Consortium for the Molecular Biology of Neurofibromatosis, Aspen, USA
- 2003 Mashour GA, Drissel SN, Farrasati F, Kindler-Röhrborn A, Kurtz A. Fatty acid modulation of malignant peripheral nerve sheath tumor growth: implications for the pathogenesis of neurofibromatosis type 1. Poster, International Consortium for the Molecular Biology of Neurofibromatosis, Aspen, USA
- 2004 Mashour GA, Hartmann M, Drissel SN, Scharf B, Sadatoshi S, Driever PH, Mautner VM, Kurtz A. Circulating growth factor serum levels are associated with tumorigenesis in neurofibromatosis type 1. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 5677-5683
- 2005 Mashour GA, Drissel SN, Frahm S, Farassati F, Martuza RL, Mautner VF, Kindler-Rohrborn A, Kurtz A. Differential modulation of malignant peripheral nerve sheath tumor growth by omega-3 and omega-6 fatty acids. *Oncogene* 2005; 24: 2367-2374