

Kongressbericht

**International Tuberos Sclerosis Complex (TSC) Conference:
From DNA to Human Therapies
Bloomington, Illinois, USA, 23.-26.09.2009**



Die Veranstaltung wurde von der amerikanischen Patientenorganisation Tuberos Sclerosis Alliance organisiert. Es waren etwa 140 Teilnehmer aus insgesamt 14 Staaten angereist: neben den USA waren dies Australien, China, Deutschland, England, Italien, Japan, Kanada, Mazedonien, Niederlande, Nordirland, Norwegen, Schottland und Schweden. Unter den Teilnehmern waren neben Ärzten und Wissenschaftlern auch medizinisches Fachpersonal, Betroffene, Eltern und Patientenvertreter, sowie Vertreter aus der Industrie.

Die sieben Teilnehmer aus Deutschland waren aus dem Tuberos Sklerose Deutschland e.V. die med.-wiss. Vorstandsmitglieder Dr. Christoph Hertzberg und Dr. Karin Mayer sowie die stellv. Vorsitzende Angelika Kodat mit Mann Carsten Kodat, die Medizinstudentin Birte Japs von der Universität Heidelberg, Fr. Dr. Adelheid Wiemer-Kruel vom Epilepsiezentrum Kork, und Kathrin Aleksandrov, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Medizinischen Hochschule Hannover, die auch Mutter eines betroffenen Kindes ist.

Das wissenschaftliche Programm bestand aus insgesamt 35 Vorträgen in 5 Blöcken, sowie 23 Postern. Der Großteil (70%) der Referenten kam aus den USA, gefolgt von Beiträgen aus England (14%) und einzelnen Vorträgen aus Kanada, Italien, den Niederlanden, Polen und Spanien. Bei den Postern sah die Verteilung der Beiträge aus den verschiedenen Ländern ähnlich aus, mit 60% aus den USA, was insgesamt auch die Forschungssituation auf internationaler Ebene widerspiegelt. Aus Deutschland kamen zwei Posterbeiträge, einer von Birte Japs zum Thema Lernen und Gedächtnis bei Eker-Ratten nach induzierter Epilepsie und einer von Adelheid Wiemer-Kruel und Karin Mayer mit einer Fallvorstellung einer Patientin mit gleichzeitiger TSC und NF1, bei der die Auswirkungen von Rapamycin auf AML der Niere und Epilepsie beschrieben wurden.

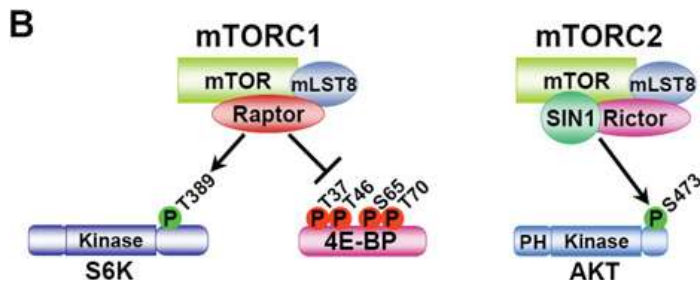
Das wissenschaftliche Programm war in fünf Schwerpunktthemen gegliedert:

- I. **Modelle und Mechanismen zur Pathologie bei TSC: Nicht-ZNS**
- II. **Modelle und Mechanismen zur Pathologie bei TSC: ZNS**
- III. **Entwicklung des Gehirns, Epileptogenese und Kognition**
- IV. **Aktuelle und zukünftige Therapien bei TSC und verwandten Erkrankungen**
- V. **Lässt sich mit veränderter mTORC1-Signaltransduktion alles erklären?**

Den Beginn jedes Themenblocks leitete wie bei den vorangegangenen Konferenzen ein persönlicher Erfahrungsbericht einer betroffenen Familie ein.

I und II: Modelle und Mechanismen zur Pathologie bei TSC

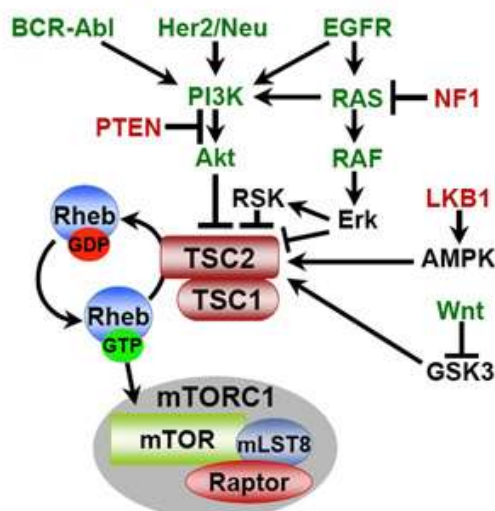
Zentrales Thema der beiden ersten Schwerpunktthemen war das Verständnis der Funktion von TSC1 und TSC2 innerhalb der mTOR-Signalübertragung anhand verschiedener Tiermodelle und die möglichen therapeutischen Ansatzpunkte. mTOR reguliert Zellwachstum, Zellteilung, das Überleben und den Stoffwechsel der Zellen in Form von zwei getrennten Proteinkomplexen mTORC1 und mTORC2.



Quelle: Huang and Manning, Biochem. J. (2008) 412, 179–190:
mTOR existiert in zwei funktionell getrennten Komplexen, mTORC1 and mTORC2, mit verschiedenen Substraten, die beeinflusst werden

Das Medikament Rapamycin und dessen Nachfolgepräparate, z.B. RAD001 hemmen mTOR im mTORC1-Komplex und können so die unphysiologische Aktivierung der mTOR-Signalübertragung wieder rückgängig machen, die z.B. durch den Ausfall des TSC1/TSC2-Komplexes hervorgerufen wird.

The TSC1-TSC2 complex is regulated by many **oncogenes** and **tumor suppressors**



Der TSC-Rheb-mTORC1 Signalübertragungsweg ist bei vielen Syndromen und den meisten Tumoren fehlreguliert. Durch die Aktivierung einer Reihe von Onkogenen (grün) bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (rot) stromaufwärts des TSC-Rheb-Kreislaufs kommt es zur unphysiologischen Aktivierung von mTORC1 und der Ausbildung von Tumoren bei verschiedenen genetischen Erkrankungen.

Quelle: Homepage Brendan Manning:
www.hsph.harvard.edu/faculty/brendan-manning/manning-lab/index.html

Anhand verschiedener, spezifischer TSC1- und TSC2-knockout-Mäuse, denen jeweils ein funktionsfähiges TSC1- oder TSC2-Gen fehlt, sowie unterschiedlicher Zellsysteme und dem Einsatz von Rapamycin konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

- Rapamycin hat unterschiedliche Effekte auf die Proteinsynthese in unterschiedlichen Zelltypen
- RagGTPasen spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Energiebilanz innerhalb der mTOR-Aktivierung
- Es besteht eine funktionelle Verbindung innerhalb der mTOR-Signalübertragung zwischen dem Tumorsuppressor LKB1 (unterdrückt das Tumorstadium), der bei Peutz-Jeghers-Syndrom inaktiviert ist, und TSC2 über die Proteinkinase AMPK. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Rapamycin-Analoga auch in Zellen effizient sind, in denen LKB1 fehlt.
- Aufschluss über molekulare Mechanismen der mTORC2-Regulation und dem Zusammenhang zwischen der Funktion des TSC1/TSC2-Komplexes bei der Hemmung von mTORC1 und der Aktivierung von mTORC2.
- Die Entstehung von Nierenzysten in TSC- und ADPKD-Patienten ist unabhängig von der mTOR-Signalübertragung. Die TSC-Genprodukte Hamartin und Tuberin konnten in Zilien (Flimmerhärchen) lokalisiert werden. Gemeinsam mit Polycystin-1, dem Genprodukt des PKD1-Gens, regulieren sie die Zilienlänge. Der Ausfall eines der Gene führt dazu, dass die Zellpolarität bei der Teilung von Nierentubuli-Zellen gestört ist, was ein frühes Ereignis bei der Zystenentstehung darstellt und neue therapeutische Ansätze unabhängig von Rapamycin ermöglicht.
- Knockout Maus-Modelle verschiedener Komponenten des mTOR-Signalübertragungswegs haben ähnliche Erscheinungsbilder bzgl. Verhalten und Epilepsie. Anhand einer PTEN-Knockout-Maus wurde der Einfluss von Rapamycin untersucht, wobei sowohl die Entstehung von Nierenzysten als auch die Epilepsie positiv beeinflusst wurde.
- Epilepsie bei TSC entsteht auch ohne Vorhandensein von kortikalen Tubera. Der TSC1/TSC2-Komplex ist notwendig für die Ausbildung von Verbindungen zwischen Nervenfasern und deren Umgebung mit Myelin Myelinisierung im Gehirn. In heterozygoten TSC1 oder TSC2-Mäusen, denen jeweils eine intakte Genkopie fehlt, ist dieser Prozess gestört, kann aber mit Rapamycin positiv beeinflusst werden. Derzeit läuft eine internationale Phase II-Studie zur Erfassung des Neurokognitionsstatus (Summe aller geistigen Fähigkeiten/Intelligenz) bei 55 Patienten zwischen 6 und 21 Jahren.
- Um die frühen Ereignisse infolge des Ausfalls von TSC1/TSC2 auf die Entwicklung des Gehirns zu untersuchen, wurde ein Gehirn-spezifisches Mausmodell erzeugt, dem das TSC2-Gen in Glia-Vorläuferzellen (strukturell und funktionell von den Neuronen abgrenzbare Zellen im Nervengewebe) fehlt. Das Gehirn der Mäuse weist Migrations (Wanderungs-)defekte auf, die zum Teil durch die Behandlung mit Rapamycin wieder rückgängig gemacht werden können. Diese Erkenntnisse eröffnen die Möglichkeit einer frühen Rapamycin-Behandlung bei TSC-Patienten, um die Entstehung von neurologischen Defekten zu verhindern.

III. Entwicklung des Gehirns, Epileptogenese und Kognition

- Für die Erprobung neuer effektiverer Antiepileptika wurde ein Gehirn-spezifisches Maus-Knockout-Modell entwickelt. In präklinischen Studien wurden Antiepileptika (Ceftriaxon) getestet, die einen Einfluss auf die Synthese von Glutamat-Rezeptoren (Proteine an der Oberfläche von Neuronen, die Glutamat binden) in Astrozyten (Glia-Zellart) haben. Das Medikament reduziert die Anfallshäufigkeit in den Mäusen.
- Trotz immer weiter wachsender Erkenntnisse und Tiermodellen zur molekularen Neuropathologie bei TSC bleiben immer noch Lücken zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung, der sog. *bench* und *bedside*:
 - 1. zwischen Grundlagenforschung und klinischen Studien
 - 2. zwischen klinischen Studien und der Umsetzung im klinischen Alltag
z.B. gibt es kein Tiermodell zur Untersuchung von Autismus

IV. Aktuelle und zukünftige Therapien bei TSC und verwandten Erkrankungen

- **Übersicht über präklinische und klinische Studien:**

Bereits 2003 sind die ersten präklinischen Studien mit mTOR-Inhibitoren bei Mäusen begonnen worden. 2008 gab es die Ergebnisse der ersten nationalen und internationalen Phase II-Studien mit Rapamycin oder RAD001 bei Patienten mit TSC oder LAM (TESSTAL, UK), AML (Cincinnati, UK, Schweiz) und SEGA (Cincinnati). 2009 sind die beiden großen internationalen multizentrischen Studien EXIST-1 zur Behandlung von Patienten mit subependymalen Riesenzellastrozytomen (SEGA) und EXIST-2 zur Behandlung von TSC- und LAM-Patienten mit Angiomyolipomen der Niere mit RAD001 und der Unterstützung von Novartis angelaufen. Eine Übersicht aller klinischen Studien gibt es bei www.clinicaltrials.gov.

- **Aktuelle klinische Studien:**

Derzeit laufen in den USA präklinische Studien an heterozygoten (mischerbigen) und homozygoten (reinerbigen) TSC2-Knockout-Mäusen mit den Kinase-Inhibitoren Sorafinib und Sunitinib (hemmen die Signalübertragung durch Hemmung der Übertragung von Phosphatgruppen zwischen Proteinen), dem Angiogenese-Hemmer Bevacizumab (hemmt das Wachstum kleiner Blutgefäße) und dem Zytostatikum Asparaginase (hemmt Zellwachstum und Zellteilung).

- **Soll eine antiepileptische Behandlung bei Kindern bereits erfolgen, bevor eine Epilepsie aufgetreten ist?**

Die Ergebnisse von Sergiusz Jozwiak an der Kinderklinik in Warschau sprechen dafür. Bei 57% der TSC-Patienten manifestiert sich eine Epilepsie innerhalb der ersten 6 Monate und bei 75% innerhalb des ersten Lebensjahres. Entwicklungsverzögerungen und geistige Behinderung treten fast ausschließlich in der Gruppe der Patienten mit Epilepsie auf. Da die Diagnose TSC oft bereits pränatal anhand kardialer Rhabdomyome und mithilfe von fetalem MRT gestellt werden kann, hat sich eine prophylaktische Behandlung mit Vigabatrin innerhalb der ersten beiden Lebensjahre in Fällen mit auffälligem EEG-Befund bewährt.

- **Optische Kohärenztomographie (OCT):**

Vigabatrin führt bei bis zu 50% der behandelten Patienten zu Gesichtsfeldausfällen. Die konventionelle Perimetrie (Augenheilkunde zur systematischen Verbesserung des Gesichtsfeldes) ist erstens bei vielen Patienten mit geistiger Behinderung nicht zuverlässig auswertbar und erkennt zweitens geringe Veränderungen der Netzhaut

nicht. Vigabatrin führt zum Verlust von Ganglienzellen (bilden Nervenknotten) in der Nervenfaserschicht der Netzhaut. Die Dicke der Nervenfaserschicht korreliert mit dem Maß des Gesichtsfeldausfalls. Mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie (OCT) wird in der Augenheilkunde die Netzhaut im Bereich der Stelle des schärfsten Sehens schichtweise (tomographisch) abgebildet. Die OCT ist ein Verfahren, das die Darstellung von Gewebestrukturen bis zu einer Tiefe von einigen Millimetern gestattet. Ähnlich wie beim Ultraschall werden dabei Schnittbildern senkrecht zur Oberfläche erzeugt. Es lassen sich jedoch ca. 100fach kleiner Strukturen darstellen, d. h. auch Objekte mit einer Größe unter 10µm. Es wurden die Erfahrungen aus der Untersuchung von 36 in London parallel mit Perimetrie und OCT untersuchten Patienten vorgestellt.

V. Lässt sich mit veränderter mTORC1-Signaltransduktion alles erklären?

- Neue Erkenntnisse in der Pathogenese (Entstehung und Entwicklung einer Erkrankung) der Lymphangioliomyomatose (LAM): Elizabeth Petri Henske aus Boston stellte die Ergebnisse ihrer Forschung zum Modell der benignen (gutartigen) Metastasierung bei LAM und zur Entstehung von Nierenzysten vor.
 - Östrogen (17-beta-estradiol (E(2))) führt zu einer 3- bis 5-fachen Erhöhung der Lungenmetastasen in einem TSC2-defizienten Mausmodell für LAM. Die Östrogen-induzierte Metastasierung ist mit einer Aktivierung der p42/44 MAPK assoziiert und kann durch Behandlung mit dem MEK1/2 Hemmstoff CI-1040 unterdrückt werden. Dies stellt ein neues Modell für die Pathogenese von LAM dar.
 - Zystische Nierenerkrankungen die sowohl bei TSC als auch bei ADPKD vorkommen, zeichnen sich durch eine Fehlfunktion der primären Zilien (Flimmerhärchen) aus. Die Zilien Zellen, denen entweder beide TSC1-Genkopien oder beide TSC2-Genkopien fehlen, sind um 17-27% länger als in normalen Zellen. Der TSC1/TSC2-Komplex hemmt mTORC1. Jedoch hat Rapamycin in den Zellen, denen TSC1- oder TSC2 fehlt, keinen Einfluss auf die verlängerten Zilien und weist auf einen mTORC1-unabhängigen Mechanismus hin.
- Raymond Yeung aus Seattle stellte ein neues Modell vor, das die abnorme Teilungsrate von glatten Muskelzellen in AML der Niere und LAM der Lunge erklären kann und damit neue therapeutische Ansätze ermöglicht: die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT). EMT ist ein umkehrbarer Mechanismus, der während der Embryonalentwicklung stattfindet und bei der Metastasierung von Tumorzellen ausgenutzt wird. In Epithelzellen (bilden Deck- und Drüsengewebe), denen TSC2 fehlt, führt der Abbau von E-Cadherin zum Verlust der Zellkontakte Das invasive Erscheinungsbild der Zellen wird durch die Aktivierung von β -Catenin und die Synthese der Matrix Metalloproteinase 7 (MMP7) verursacht. Die Verzahnung von TSC2/mTORC1- und E-Cadherin/ β -Catenin-Signalübertragung bei dem EMT-Mechanismus bietet neue therapeutische Ansatzpunkte β -Catenin, MMP7, TGF β , Smad und Caspase 3.

Molekulargenetik

Im Gegensatz zu vorangegangenen TSC-Konferenzen blieb bei den Vorträgen aufgrund des starken Fokus auf Zellbiologie und molekularer Pathologie wenig Raum für Molekulargenetik. Die seit 2005 existierende von der TSAlliance finanziell unterstützte LOVD TSC Variation Database (http://chromium.liacs.nl/LOVD2/TSC/home.php?select_db=TSC1 und http://chromium.liacs.nl/LOVD2/TSC/home.php?select_db=TSC2) bietet mittlerweile die Klassifikation von TSC1- und TSC2-Missense-Mutationen (sinnveränderte Mutation) anhand eines Algorithmus (PolyPhen (=Polymorphism Phenotyping)) und eines funktionellen Assays, der die Auswirkung der Mutation auf die mTOR-Signalübertragung vorhersagt. Die funktionelle Analyse wird von Mark Nellist am Department of Clinical Genetics der Erasmus-

Universität in Rotterdam durchgeführt. Der Anteil von Missense-Mutationen macht bei TSC1 12% und bei TSC2 23% aus. Entgegen früheren Annahmen sind auch TSC1-Missense-Mutationen pathologisch. Mittlerweile sind 25% der 80 verschiedenen TSC1-Varianten und 12% der insgesamt 455 verschiedenen TSC2-Varianten funktionell charakterisiert.

Poster-Session

- **Next Generation Sequencing:**

Aus der Arbeitsgruppe von David Kwiatkowski hatten zwei Poster die Technologie Next Generation Sequencing zum Thema:

 - In kortikalen Tubern konnte bisher kaum die zweite somatische (nicht vererbare) TSC-Mutation nachgewiesen werden. Erklärungen dafür sind entweder technischer Natur oder die Inaktivierung des TSC1/TSC2-Komplexes hat einen anderen Mechanismus. Mit Hilfe des 454 Genome Sequencer FLX Systems von Roche konnte in zwei von 32 untersuchten Tubern die zweite somatische Mutation in der nicht von der Keimbahnmutation betroffenen Kopie des jeweiligen TSC-Gens nachgewiesen werden. Die Mutation lag in beiden Fällen als geringgradiges somatisches Mosaik in jeweils 7,2% bzw. 6,3% der untersuchten Zellen vor. Next Generation Sequencing ist somit geeignet, Punktmutationen zu identifizieren, die nur in einem geringen Anteil der Zellen in TSC-Tumoren vorhanden sind und mit konventioneller Sequenzierung nicht aufzuspüren sind. Allerdings handelt es sich wahrscheinlich bei der molekularen Ursache der kompletten TSC-Inaktivierung in Tubern häufiger um große genomische Deletionen oder einen komplett anderen Mechanismus.
 - Trotz methodischer Verbesserungen in der Mutationssuche innerhalb der letzten Jahre kann bei 10-15% der Patienten mit der klinischen Diagnose TSC derzeit keine Mutation in einem der beiden TSC-Gene identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung dafür sind genetische Mosaik, die nur einen Teil der untersuchten peripheren Leukozyten betreffen und z.B. mit konventioneller Sequenzierung nicht nachweisbar sind. Um diese Hypothese zu testen, wurden 33 TSC-Patienten, bei denen bisher keine Mutation identifiziert werden konnte, mit Hilfe von Next Generation Sequencing nachuntersucht. Dabei konnte bei zwei Patienten in jeweils 5,3% der untersuchten Zellen eine Punktmutation identifiziert werden, was mit einem Mosaik erklärt werden kann. Somit ist Next Generation Sequencing auch hier geeignet, Punktmutationen zu entdecken, die nur in einem geringen Anteil der Zellen vorhanden sind und mit konventioneller Sequenzierung nicht aufzuspüren sind. Da der Anteil der Mosaik in der untersuchten Patientengruppe nur 6% ausmachte, handelt es sich wahrscheinlich bei der molekularen Ursache der meisten genetisch nicht geklärten Fälle um Mosaik mit noch niedrigerem Anteil an Zellen mit Mutation, der unter der Nachweisgrenze liegt, oder um Mutationen in regulatorischen Bereichen beider TSC-Gene.
- **Aktivierung der mTORC1-Signalübertragung in sporadischen Chordomen**

Chordome sind seltene maligne (bösartige) Knochentumore, deren molekulare Entstehung und Herkunft unbekannt ist. Tuberöse Sklerose ist bisher das einzige Syndrom, bei dem Chordome auftreten können. In den untersuchten sporadischen Chordomen konnte keine PTEN-Expression nachgewiesen werden. PTEN ist ein negativer Regulator von mTORC1. Der Verlust von PTEN führt zur andauernden und nicht mehr regulierbaren Aktivierung der Akt/mTORC1-Signalübertragung und ist damit wahrscheinlich eine wesentliche Ursache der Entstehung von sporadischen Chordomen. Rapamycin führte zu einer Hemmung der mTOR

C1-Aktivierung und konnte das Wachstum der Chordome im Zellsystem stoppen. Für die Behandlung von Patienten mit Chordomen erscheint eine Kombination der Hemmung von Akt und mTORC1 sinnvoll zu sein.

- **NF2 ist ein neuer Regulator von mTORC1 und die Aktivierung von mTORC1 ist mit dem Wachstum von Meningiomen und Schwannomen assoziiert**

Die Tumorsuppressor-Funktion des NF2-Proteins Merlin, das bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 2 inaktiviert ist, ist weitgehend unbekannt. Mit Hilfe von NF2-defizienten Tumoren von NF2-Patienten und Maus-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass auch hier die mTORC1-Signalübertragung aktiviert ist. Dabei reguliert NF2 die mTORC1-Signalübertragung auf einem anderen Weg als die bekannte PI3K-Akt oder MAPK/ERK-vermittelte TSC2/mTOR Inaktivierung. Die Hemmung dieser neu entdeckten mTORC1-Signalübertragung eröffnet die Möglichkeit einer Behandlung von NF2-Patienten mit Rapamycin, um die NF2-assoziierten Tumore in ihrem Wachstum zu hemmen.

Treffen der verschiedenen nationalen Vertreter von TSC International

Am Rande des wissenschaftlichen Programms trafen sich die Repräsentanten der nationalen TSC-Organisationen aus den USA, Deutschland, England, Norwegen, Schweden, Kanada und Australien, um organisatorische Fragen zu besprechen:

- Internationale TSC-Konferenzen

Es wurde ein Zeitplan mit etwa 18 monatigen Abständen für zukünftige internationale TSC-Konferenzen mit wechselnder nationaler Organisation vorgeschlagen. Die nächste internationale TSC-Konferenz findet vom 22.-24.09.2011 in Belfast, Nordirland statt. Für 2013 ist eine Konferenz in Australien und danach eine Konferenz in Norwegen in Planung.

- Clinical Consensus Conference

Im nächsten Jahr ist eine internationale Konferenz geplant, an der aus jedem Land jeweils mindestens ein Vertreter aus Medizin und Forschung und ein Vertreter der jeweiligen nationalen Patientenorganisation teil nimmt. In Analogie zu der 1998 stattgefundenen Konferenz, bei der die diagnostischen Kriterien festgelegt wurden, sollen jetzt Behandlungsempfehlungen erarbeitet werden.

- TSC International Network

Obwohl die amerikanische TSalliance mit Mitteln aus dem department of defense auch Forschungsprojekte aus anderen Ländern unterstützt, soll innerhalb der europäischen TSC-Organisationen ein Netzwerk geschaffen werden, mit dem die Forschung koordiniert und die Beantragung von EU-Forschungsmitteln erleichtert werden soll.

- TSC International Alert

Die Übersicht der nationalen TSC-Organisationen innerhalb der Dachorganisation Tuberous Sclerosis International mit Kontaktdaten auf der Seite www.tsalliance.org/documents/Tuberous%20Sclerosis%20International.doc ist leider noch nicht aktualisiert.

Parallel zum monatlich erscheinenden TSC Alert soll es einen weiteren Alert geben,

- in dem die verschiedenen TSI Repräsentanten gelistet sind
- in dem die Krankheitsbeschreibung in verschiedenen Sprachen verfügbar ist
- in dem die TSC-Forschungsprojekte auf internationaler Ebene gelistet und aktualisiert werden
- in dem auf Möglichkeiten zur Forschungsförderung hingewiesen wird

23.11.2009, Karin Mayer