

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller



**Regulation der Genexpression von *MYCN*
in humanen Neuroblastomzellen
durch Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Verena Knepe, ehemals Strieder
aus Frankenberg

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
15.06.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereich

Dekan: Prof. Dr. Maisch
Referent: Prof. Dr. Eilers
Korreferent: PD Dr. Westermann
2. Korreferent: Prof. Dr. Beck

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Neuroblastom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Symptomatik	1
1.1.3 Diagnostik und Staging	2
1.1.4 Prognose	4
1.1.5 Biologisches Verhalten	7
1.1.6 Therapie	8
1.2 Das Onkoprotein Myc	9
1.2.1 Allgemeine Eigenschaften von Myc	9
1.2.2 Amplifikation und Überexpression der <i>MYC</i> -Gene in Tumoren	9
1.2.3 Myc als Genaktivator und Repressor	10
1.2.4 Biologische Funktionen von c- und N-myc	12
1.3 Die Regulation der <i>MYCN</i>-Expression	14
1.4 Die E2F-Familie	17
1.4.1 Allgemeine Eigenschaften von E2F-Transkriptionsfaktoren	17
1.4.2 Funktionelle Eigenschaften von E2F-1 bis E2F-3	18
1.4.3 Funktionelle Eigenschaften von E2F-4 bis E2F-7	20
1.4.4 <i>MYCN</i> als potentiell E2F-Ziegen	22
1.5 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit	23
2 Materialien	24
2.1 Chemikalien	24
2.2 Zellkultur	24
2.2.1 Vollmedien	24
2.2.2 Einfriermedium	24

2.2.3	Konditioniertes RPMI-1640-Medium	24
2.2.4	Trypsin-EDTA	25
2.2.5	Selektionsantibiotika	25
2.2.6	PBS	25
2.2.7	Säugetierzelllinien	25
2.2.8	Chemikalien	26
2.2.9	Plastikwaren	26
2.2.10	Inkubator	26
2.2.11	Sterile Arbeitsbank	26
 2.3 Transfektionen und Luciferase-Assays		 27
2.3.1	Transfektionslösung	27
2.3.2	Plasmide	27
2.3.3	Amplifikation von Plasmid-DNA	29
2.3.4	Transiente Assays	29
2.3.5	Selektion von gegenüber einem Antibiotikum resistenten Zellen	30
 2.4 Infektion mit ekotrophen Retroviren		 30
2.4.1	Transfektion von Zellen der Phoenix-Linie	30
2.4.2	Retrovirale Infektion	30
2.4.3	Selektion von gegenüber einem Antibiotikum resistenten Zellen	31
 2.5 Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene		 31
2.5.1	Induktion der E2F-ER-Fusionsproteine	31
2.5.2	Behandlung der Zellen mit Modulatoren des Chromatins	31
2.5.3	Isolierung cytoplasmatischer RNA	31
2.5.4	Synthese von Erststrängen	31
2.5.5	RT-PCR	32
 2.6 Analyse der Genexpression auf Proteinebene		 33
2.6.1	Herstellung von Zellkernextrakten	33
2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.6.3	Western-Blotting	34
 2.7 FACS-Analysen		 35

2.8 Allgemeine Puffer	36
2.8.1 TE-Puffer	36
2.8.2 TAE-Puffer	36
3 Methoden	37
3.1 Zellkultur	37
3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen	37
3.1.2 Passagieren von Zellen	37
3.1.3 Einfrieren von Zellen	37
3.1.4 Auftauen von Zellen	38
3.1.5 Bestimmung der Zellzahl	38
3.2 Transfektionen und Luciferase-Assays	39
3.2.1 Amplifikation von Plasmid-DNA	39
3.2.2 Transiente bzw. stabile Transfektionen mittels Calciumphosphat-Präzipitation	40
3.2.3 Herstellung von Zelllysaten für transiente Assays	41
3.2.4 Luciferase-Assay	42
3.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford	42
3.3 Infektion mit ekotrophen Retroviren	43
3.3.1 Herstellung rekombinanter Retroviren	43
3.3.2 Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren	43
3.3.3 Selektion von gegenüber einem Antibiotikum resistenten Zellen	44
3.4 Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene	45
3.4.1 Induktion der E2F-ER-Fusionsproteine	45
3.4.2 Behandlung der Zellen mit Modulatoren des Chromatins	45
3.4.3 Isolierung cytoplasmatischer RNA	45
3.4.4 Synthese von Erststrängen	46
3.4.5 RT-PCR	46
3.4.6 Detektion mittels DNA-Gelelektrophorese	47

3.5 Analyse der Genexpression auf Proteinebene	48
3.5.1 Herstellung von Zellkernextrakten	48
3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
3.5.3 Western-Blotting	49
3.6 FACS-Analysen	51
4 Ergebnisse	52
4.1 E2F-1 und E2F-3 aktivieren den <i>MYCN</i>- Promotor in transienten Assays abhängig von E2F-Bindungsstellen	52
4.2 Blockade des E2F-pRB-Signalwegs reprimiert <i>MYCN</i> in Neuroblastomzellen	56
4.2.1 P16^{INK4A} reprimiert endogenes <i>MYCN</i>	56
4.2.1.1 Prinzip	56
4.2.1.2 P16 ^{INK4A} senkt die <i>MYCN</i> -Expression in Neuroblastomzellen mit <i>MYCN</i> -Amplifikation	57
4.2.2 Dominant negatives E2F und E2F-1 mit defekter DNA-Bindungsdomäne reprimieren das endogene <i>MYCN</i>-Onkogen	59
4.2.2.1 Prinzip	59
4.2.2.2 Herstellung und Auswahl von Klonen, die stabil regulierbares dominant negatives E2F und E2F-1 mit defekter DNA-Bindungsdomäne exprimieren	61
4.2.2.3 Repression der endogenen <i>CCNE1</i> - und <i>MYCN</i> -Gene durch dominant negatives E2F-1 sowie durch E2F-1 mit defekter DNA-Bindungsdomäne	62
4.3 E2F-Überexpression ist in Neuroblastomzellen nicht ausreichend, um den endogenen <i>MYCN</i>-Promotor zu aktivieren	65
4.3.1 Herstellung von Zellklonen mit stabiler Expression von E2F-ER-Fusionsproteinen	65
4.3.2 Aktiviertes E2F-1-ER-Fusionsprotein induziert Apoptose in Neuroblastomzellen und reguliert E2F-Zielgene	66
4.3.3 E2F-Proteine und Chromatinmodulatoren reichen nicht aus, um das	

<i>MYCN</i> -Gen zu aktivieren	74
5 Diskussion	77
5.1 E2F-Transkriptionsfaktoren regulieren die <i>MYCN</i> - Expression in humanen Neuroblastomzellen	77
5.2 E2F-Transkriptionsfaktoren stimulieren den Zellzyklus und induzieren Apoptose in Neuroblastomzellen	81
5.3 E2F reicht nicht aus, um den endogenen <i>MYCN</i> - Promotor in Neuroblastomzellen ohne Expression des Onkogens zu aktivieren	82
5.4 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick	84
6 Zusammenfassung	86
7 Literaturverzeichnis	88
8 Anhang	101
8.1 Abkürzungen	101
8.2 Lebenslauf	105
8.3 Akademische Lehrer	107
8.4 Danksagung	108
8.5 Erklärung	109

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor, der vorwiegend im Säuglings- und Kleinkindalter auftritt. Es geht aus Neuronen des sympathischen Nervensystems hervor und ist dementsprechend entlang des sympathischen Grenzstrangs oder im Nebennierenmark lokalisiert. Der Tumor zeichnet sich durch ein komplexes biologisches Verhalten aus, das z. T. aus seiner molekulargenetischen Heterogenität resultiert. Die Therapie des Neuroblastoms gestaltet sich insbesondere bei Tumoren mit Amplifikation des *MYCN*-Onkogens schwierig, da diese Tumoren sich häufig erst in fortgeschrittenen Stadien manifestieren, sehr aggressiv wachsen und häufig Resistenzen gegenüber gängigen Chemotherapeutika aufweisen.

1.1.1 Epidemiologie

Mit einer relativen Häufigkeit von etwa 8,3 % ist das Neuroblastom einer der häufigsten soliden malignen Tumoren des Kindesalters. Die altersstandardisierte Inzidenzrate in Deutschland betrug 1989 - 1998 1,2 Fälle pro Jahr und 100.000 Kindern unter 15 Jahren; die kumulative Inzidenz in der Kindheit lag bei 16,9 Fällen von 100.000 (Berthold und Hero, 2000) bei nahezu ausgeglichener Verteilung auf beide Geschlechter (47,6 % Mädchen, 52,4 % Jungen). Der Altersmedian zum Zeitpunkt der Diagnose beträgt 18 Monate; 40 % der Patienten sind jünger als 1 Jahr, 75 % bis 4 und 98% maximal 10 Jahre alt (Brodeur, 2003). In einem Teil der Fälle scheint ein autosomal dominanter Vererbungsmodus vorzuliegen, der auf eine Keimbahnmutation hinweist.

1.1.2 Symptomatik

Die häufigsten Symptome lassen sich auf massives Tumorwachstum und Knochenmetastasierung zurückführen (einen Überblick geben: Berthold und Hero, 2000). Nur 5 % der Patienten in fortgeschrittenen Stadien sind beschwerdefrei; zu den häufigsten Problemen zählen reduzierter Allgemeinzustand (54

%), Schmerzen (52%), Fieber (39%), Tumorschwellungen (36%) und Gewichtsverlust (22%). Proptosis und periorbitale Ekchymosen kommen häufig vor; sie entstehen durch retroorbitale Metastasen. Eine Panzytopenie kann durch exzessiven Knochenmarkbefall ausgelöst werden. Daraus resultieren eine gesteigerte Infektanfälligkeit und erhöhte Blutungsneigung. Besonders Säuglinge werden durch respiratorische Insuffizienz mit Dyspnoe und Zyanose auffällig, wenn eine sich vergrößernde Metastasenleber zu einer Kompression der Lungen führt. Ebenso kann die vergrößerte Leber eine Ileussyptomatik oder Niereninsuffizienz auslösen. Zu neurologischen Ausfällen kann es kommen, wenn der Tumor Spinalnerven oder, durch Invasion der Foramina intervertebrales, Spinalwurzeln bzw. das Rückenmark infiltriert. Gelegentlich treten Anämie und Hypertonie auf. Starke wässrige Diarrhoen können durch VIP (Vasoaktives Intestinales Polypeptid), welches von Neuroblastomen übermäßig stark sezerniert werden kann, verursacht werden. Seltene paraneoplastische neurologische Symptome wie zerebellare Ataxie und Opsoklonus / Myoklonus entstehen vermutlich durch noch nicht geklärte immunologische Prozesse (Rudnick et al., 2001).

1.1.3 Diagnostik und Staging

In der Diagnostik des Neuroblastoms kommen laborchemische, bildgebende und histologische Verfahren zur Anwendung (einen Überblick verschaffen Brodeur, 2003; Berthold und Hero, 2000). Meist sind im Serum und / oder Urin von an einem Neuroblastom leidenden Patienten erhöhte Katecholaminmetabolite (Vanillinmandelsäure, VMA, und Homovanillinsäure, HVA) nachweisbar. Mittels der Metaiodobenzylguanidin(mIBG)-Szintigraphie lässt sich der Primärtumor im Bereich der Nebennieren oder paravertebral darstellen; Knochenmarkbiopsien dienen dem feingeweblichen Nachweis typischer Tumorzellnester. Histologisch finden sich Tumorzellen, die embryonalen sympathischen Neuroblasten der Neuralleiste ähneln. Ihr Differenzierungsgrad zeigt erhebliche Variationen; das Spektrum reicht von völlig undifferenzierten kleinen, runden Zellen (ähnlich Lymphom- oder Rhabdomyosarkomzellen) bis zu hochdifferenzierten Ganglioneuroblastomzellen.

Um eine korrekte Stadieneinteilung vornehmen zu können, werden folgende Untersuchungen gefordert (Berthold and Hero, 2000):

Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT) oder Sonographie des Oberbauchs sowie konventionelle Röntgenthoraxaufnahmen in zwei Ebenen als bildgebende Methoden, mIBG- und evtl. Technetium 99-Szintigraphie, quantitative Bestimmung der VMA- und HVA-Konzentrationen in Urin oder Serum sowie vier separate Knochenmarkbiopsien aus dem linken und rechten Beckenkamm. Zudem sollten palpable Lymphknoten histologisch und nicht palpable auffällige Lymphknoten mit dreidimensionaler CT untersucht werden. Die neuronspezifische Enolase (NSE), die von Tumoren des APUD(*Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*)-Zellsystems produziert wird, dient als sog. „Tumormarker“ zur Verlaufskontrolle von Patienten mit Neuroblastomen (Brodeur, 2003).

Mit Hilfe des *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) lassen sich die Patienten hinsichtlich ihres Krankheitsstadiums in unterschiedliche Gruppen einteilen (einen Überblick verschaffen Berthold und Hero, 2000):

- *Stadium 1*: makroskopisch komplett resezierter lokal wachsender Tumor, mikroskopisch komplett oder inkomplett reseziert; ipsilaterale Lymphknoten sind mikroskopisch nicht befallen (an den Tumor adhärente und mit ihm resezierte Lymphknoten können befallen sein)
- *Stadium 2A*: makroskopisch inkomplett resezierter lokal wachsender Tumor; repräsentative ipsilaterale nichtadhärente Lymphknoten sind mikroskopisch nicht befallen
- *Stadium 2B*: makroskopisch komplett oder inkomplett resezierter lokal wachsender Tumor; ipsilaterale nichtadhärente Lymphknoten sind tumor-positiv, kontralaterale Lymphknoten sind tumor-negativ
- *Stadium 3*: nichtresezierbarer, einseitiger, aber die Mittellinie überschreitender Tumor mit oder ohne regionale Lymphknotenbeteiligung; oder: nichtresezierbarer Mittellinientumor mit bilateraler Ausbreitung durch Infiltration oder Lymphknotenbeteiligung (als Mittellinie dient die Wirbelsäule)

- *Stadium 4*: jeder Primärtumor mit Metastasierung in entfernte Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder andere Organe (Ausnahme: die in Stadium 4s genannten)
- *Stadium 4s*: lokal wachsender Primärtumor (Stadium 1, 2A oder 2B) mit auf Haut, Leber und/oder Knochenmark (für Kinder unter 1 Jahr, Knochenmarksbefall: weniger als 10 % maligne Zellen) begrenzter Metastasierung

1.1.4 Prognose

Die Prognose eines an einem Neuroblastom erkrankten Patienten ist von multiplen Variablen abhängig, welche die biologische Heterogenität des Tumors widerspiegeln. Die 10-Jahres-Überlebensrate unselektierter Neuroblastompatienten liegt bei 61 %; ab einer Überlebenszeit von etwa sechs Jahren erreicht die Kaplan-Meier-Überlebenskurve ein stabiles Plateau. Eine Aufteilung der Patienten in Gruppen verschiedener Stadien, unterschiedlichen Alters sowie in Tumoren mit oder ohne Amplifikation des *MYCN*-Onkogens ergibt jedoch deutlich abweichende Ergebnisse (Berthold und Hero, 2000).

Alter und Krankheitsstadium als prognostische Marker

Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt für Patienten mit den Tumorstadien 1 und 2 bei 90 %, für Patienten mit den Stadien 3 und 4s bei 60 – 75 % und für Patienten mit Tumorstadium 4 bei nur 20 – 30 %. Auch das Alter bei Diagnosestellung ist bedeutsam: Während Säuglinge die folgenden 18 Jahre mit 80 – 90 %iger Wahrscheinlichkeit überleben, ist dies bei Kindern im Alter von über einem Jahr in nur ca. 40 % der Fall (Berthold und Hero, 2000). Das Tumorstadium und das Alter bei Erstdiagnose verhalten sich jedoch nicht unabhängig voneinander: Mit dem Stadium steigt auch der entsprechende Altersmedian zum Zeitpunkt der Diagnosestellung an (Ausnahme: Stadium 4s), d. h., Patienten mit bei Erstdiagnose bereits fortgeschrittenen Krankheitsstadien sind in der Regel älter als Patienten mit einem Neuroblastom im Frühstadium (Berthold und Hero, 2000).

MYCN-Amplifikationsstatus als prognostischer Marker

Das Onkogen *MYCN* liegt in etwa 20% der Neuroblastome amplifiziert vor. Dabei finden sich meist 50 bis 100 Kopien des Gens, die entweder in extra-chromosomalen ringförmigen Molekülen (*Double Minutes*, DM) lokalisiert oder in Chromosomen integriert (*Homogenously Staining Region*, HSR) sind.

Betrachtet man Patienten mit lokalisiert wachsenden Tumoren über einen längeren Zeitraum (10 Jahre), so ergibt sich eine Überlebensrate von Kindern mit Tumoren ohne *MYCN*-Amplifikation von über 90%, mit *MYCN*-Amplifikation hingegen von nur etwa 40-50 % (Berthold und Hero, 2000; s. Abb. 1). Zum Zeitpunkt der Diagnose haben jedoch etwa 70 % der Kinder bereits Metastasen, was ihre Prognose weiter verschlechtert: In dieser Kategorie beträgt für Kinder in einem Alter von unter 12 Monaten die Wahrscheinlichkeit für „Ereignisfreies Überleben“ über 3 Jahre bei Tumoren ohne Amplifikation von *MYCN* 93%, bei Tumoren mit Amplifikation des Onkogens hingegen nur 10% (Brodeur, 2003). *MYCN*-Amplifikation als prognostischer Marker ist vom Alter der Patienten weitestgehend unabhängig. Zur Zeit wird kontrovers diskutiert, ob das Ausmaß der N-myc-Expression in nichtamplifizierenden Tumoren eine Rolle bezüglich der Prognose spielt (Brodeur, 2003).

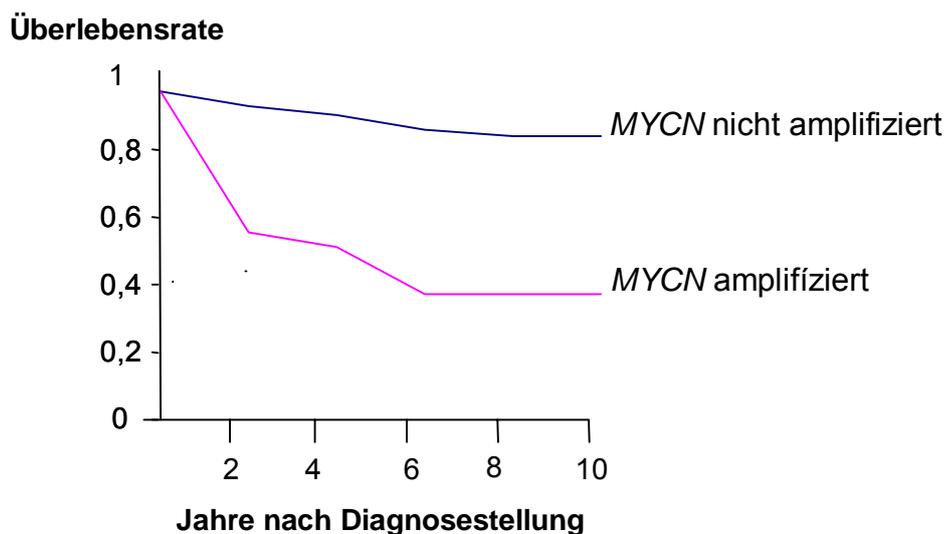


Abbildung 1: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von Patienten mit lokalisiert wachsenden Neuroblastomen ohne und mit Amplifikation von *MYCN*

Bedeutung von Grading, DNA-Gehalt und strukturellen chromosomalen Veränderungen als prognostische Marker

Wie bei den meisten Malignomen spielt die histopathologische Beurteilung eine erhebliche Rolle. Im *International Neuroblastoma Pathology System* (INPS) werden der Grad der Differenzierung, die Mitoserate, ein Mitose-Karyorrhexis-Index für neuroblastische Zellen und das Ausmaß der Kalzifizierung begutachtet (Shimada et al., 1999). Relevanz hat ebenfalls der DNA-Gehalt der Tumorzellen: Hyperdiploide oder nahezu triploide Karyotypen gehen mit einer vergleichsweise guten, nahezu diploide oder tetraploide mit einer mäßigen bis schlechten Prognose einher (Ladenstein et al., 2001). Strukturelle Veränderungen wie eine Deletion auf dem Chromosomenarm 1p oder eine Duplikation auf Chromosom 17q (Bown et al., 1999) sind als ungünstig zu bewerten.

Weitere Prognoseparameter

Für eine gute Prognose spricht die Expression des hochaffinen Neurotrophinrezeptors TrkA (Nakagawara et al., 1993). Schlechte Prognoseparameter sind hingegen die Expression des Neurotrophin-Rezeptors TrkB und seines Liganden BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) durch Tumorzellen sowie erhöhte Ferritin- und Laktatdehydrogenasespiegel im Serum (einen Überblick gibt Brodeur, 2003), die hohe Expression von MRP (*Multidrug Resistance associated Protein*) (Norris et al., 1996) und die Persistenz von Neuroblastomzellen im Knochenmark oder Blut nach erfolgter Therapie (Burchill et al., 2001; Seeger et al., 2000). Erhöhte Aktivität der *htert*-Telomerase korreliert in Neuroblastomen mit der Amplifikation von *MYCN* und stellt möglicherweise einen Mechanismus der Immortalisierung durch Myc dar (Hiyama et al., 1995). Reihen- und Screeninguntersuchungen ermöglichten bisher keine Prognoseverbesserung für Neuroblastompatienten, da in diesen Studien insbesondere Neuroblastome mit guten prognostischen Kriterien diagnostiziert wurden, die vermutlich aufgrund spontaner Regression (s. u.) nie klinisch auffällig geworden wären. Neuroblastome in höheren Stadien und mit ungünstigen biologischen Variablen, wie sie bevorzugt bei älteren Kindern auftreten, wurden durch die Studien nicht häufiger diagnostiziert, wodurch die Mortalität des Neuroblas-

toms letztlich unbeeinflusst blieb (Takeuchi et al, 1995; einen Überblick gibt Brodeur, 2003).

1.1.5 Biologisches Verhalten

Das Neuroblastom zeichnet sich durch extrem variable klinische Verläufe aus (einen Überblick geben Berthold und Hero, 2000). Besonders ungewöhnlich für maligne Tumoren, aber keine Seltenheit im Falle des Neuroblastoms, ist eine spontane Regression des Tumors, welche insbesondere im Stadium 4s (10,5 % aller Patienten bei Diagnosestellung) eindrucksvoll erscheint: Zunächst sind Leber, Haut und Knochenmark massiv tumorbefallen; wird die progressive Phase des Tumorwachstums unterbrochen, folgt häufig ein rapides Einschmelzen der Tumormassen bis zur völligen Symptombefreiheit und fehlenden Nachweisbarkeit der Erkrankung. Aber auch aus anderen Stadien heraus kann ein Neuroblastom klinisch völlig verschwinden, worauf die erhöhte Zahl von Neuroblastomen niedriger Stadien bei jüngeren Kindern in Screening-Untersuchungen hinweist (Brodeur, 2003). Meist sind bei diesen Tumoren prognostisch ungünstige molekulare Marker wie *MYCN*-Amplifikation nicht nachweisbar. Mittels einer Minimaltherapie aus milder Chemotherapie sowie Tumorresektion überleben 80 – 85 % der Patienten die Erkrankung.

Im Gegensatz dazu stehen Verläufe von Patienten im Tumorstadium 4 (36 – 38 % zum Zeitpunkt der Diagnose) oder in den Stadien 1 - 3 mit *MYCN* amplifizierenden Tumoren (3-4 %), deren Erkrankung typischerweise rasch fortschreitet und zunehmend schlecht auf die Therapie anspricht. Trotz maximaler Therapiemaßnahmen mit Polychemotherapie, Megatherapie mit autologer Stammzellentransplantation, wiederholten Tumorresektionen sowie Radio- und Immuntherapie überleben nur 30 % der Patienten die folgenden 5 Jahre ereignisfrei; die Langzeitüberlebenschance liegt lediglich bei 15 – 20%.

Eine dritte, ebenfalls ungewöhnliche Verlaufsmöglichkeit stellt die Reifung des Neuroblastoms in den Stadien 1 - 3 (ohne *MYCN*-Amplifikation) zu einem benignen Ganglioneurom dar. Diese tritt bei etwa 5 % der Neuroblastome spontan auf und lässt sich nach erfolgter Chemotherapie häufiger beobachten.

1.1.6 Therapie

Für die meisten klinischen Therapiestudien werden die Patienten entsprechend ihres Alters, Krankheitsstadiums und der Biologie des Tumors (Histologie, *MYCN*-Amplifikation, DNA-Ploidie, chromosomalen Veränderungen) in Risikogruppen eingeteilt, für die entsprechende Therapieoptionen zur Verfügung stehen (einen Überblick verschaffen Brodeur, 2003; Berthold und Hero, 2000). Meist wird zunächst eine Operation zur Tumorresektion oder –reduktion sowie zur histologischen Primärtumor- und Lymphknotenuntersuchung vorgenommen. Für Patienten in der Gruppe mit niedrigem Risiko (etwa 50 %) werden postoperativ klinische Verlaufskontrollen, Messungen der HVA- und MVA-Exkretion und sonographische Untersuchungen empfohlen; erst bei fehlender oder ungenügender Tumorrückbildung erfolgt eine milde Chemotherapie.

Patienten mit intermediärem Risiko (10 %) erhalten postoperativ für 12 - 24 Wochen eine Chemotherapie. Ziel ist es, die Progression des Tumors zu stoppen, ernsthafte Komplikationen und Symptome zu beseitigen und eine Regression des Tumors im Fall von großen Residualtumoren einzuleiten.

Patienten mit hohem Risiko (40 %) erhalten eine Hochdosis-Polychemotherapie und ggf. G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*). Nach erfolgreicher neo-adjuvanter Chemotherapie ist eine komplette Tumorresektion häufig auch in Fällen möglich, in denen der Tumor primär nicht radikal operabel erschien. Anschließend können eine myeloablative Chemotherapie, ggfs. Ganzkörperbestrahlung oder Bestrahlung von Residualtumoren und/oder Metastasen sowie autologe Stammzellentransplantation erfolgen. Sowohl die myeloablative Chemotherapie als auch die orale Anwendung von Retinolsäure für ein halbes Jahr nach erfolgter Chemotherapie verbessert die Prognose von Hochrisikopatienten (46 +/- 6% ereignisfreies Überleben über 3 Jahre unter Retinolsäure versus 29 +/- 5% ohne Retinolsäuretherapie) (Matthay et al., 1999).

Die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern, Impfung, gentherapeutische Methoden, Anwendung von Topoisomerase1- und Angiogeneseinhibitoren, Modulatoren der Chemoresistenz oder Apoptose und gezieltere Radiotherapie sind zwar noch entfernt von der routinemäßigen klinischen Anwendung, werden jedoch evtl. neue Möglichkeiten in der Therapie dieses aggressiven und wenig verstandenen Tumors liefern (Brodeur, 2003; Berthold und Hero, 2000).

1.2 Das Onkoprotein Myc

1.2.1 Allgemeine Eigenschaften von Myc

Die wichtigsten Mitglieder der Myc-Proteinfamilie sind c-, N- und L-Myc (eine Übersicht geben Grandori et al., 2000; Eisenman, 2001). Sie gehören zur Gruppe der Helix–Loop–Helix/Leuzin-Zipper(HLH/LZ)-Transkriptionsfaktoren. Die HLH/LZ-Domäne spielt eine Rolle in der Heterodimerisierung mit dem Partnerprotein Max und bei der Bindung an DNA. Über eine basische Aminosäurenregion, die direkt an die HLH/LZ-Domäne grenzt, findet die DNA-Bindung statt. Myc-Proteine binden an die palindromische Sequenz CACGTG, welche auch als E-Box bezeichnet wird. Die Bindung an DNA ist nur nach Bildung eines Komplexes mit dem Dimerisationspartner Max, ebenfalls ein HLH/LZ-Protein, möglich. Als Myc-Box 1 und Myc-Box 2 werden zwei innerhalb der Myc-Proteinfamilie hochkonservierte Regionen am amino-terminalen Ende der Proteine bezeichnet, welche für die transkriptionelle Aktivität sowie die Transformation durch Myc essentiell sind. Max/Myc-Dimere vermitteln in den meisten Fällen eine Aktivierung der Transkription von Myc-Zielgenen (s.Abb.2). Andererseits kann Max auch mit bHLH/LZ-Proteinen der Mad-Familie, wie Mad1, Mxi1, Mad3 und Mad4, über ihre Leuzin-Zipper interagieren. Max/Mad-Komplexe binden ebenfalls wie Max/Myc-Dimere an E-Boxen, haben aber reprimierende Funktion auf ihre Zielgene (eine Übersicht geben Baudino et al., 2001; Grandori et al., 2000; s. Abb.2).

1.2.2 Amplifikation und Überexpression der MYC-Gene in Tumoren

Viele maligne Tumoren weisen genetische Rearrangements auf, die zu einer gesteigerten Expression der Myc-Proteine führen (einen Überblick geben Grandori et al., 2000). 20 % der humanen Neuroblastome weisen eine Amplifikation des *MYCN*-Gens auf. In diesen Primärtumoren liegt das Gen meist in 50 bis 100 Kopien vor (Savelyeva und Schwab, 2001). Die RNA-Menge von *MYCN* ist in Neuroblastomen bis zu 80fach gesteigert (Schwab et al., 1984). Bisher fanden sich keine Hinweise auf eine Zunahme des Amplifikationsgrads im Rahmen des Krankheitsverlaufs in Neuroblastomen; vielmehr scheint die

Kopienzahl entsprechend vornherein bestehender heterogener Merkmale bereits während der Tumorigenese festgelegt (Brodeur et al., 1987). Tumoren ohne *MYCN*-Amplifikation exprimieren zwar variable Mengen des Gens, das Ausmaß der Expression erreicht jedoch nie das *MYCN*-Expressionsniveau der amplifizierenden Neuroblastome. *MYCN* kann zudem in einer Reihe anderer neuroektodermaler Tumoren wie dem Medulloblastom, Retinoblastom, Astrozytom und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom amplifiziert vorliegen (einen Überblick geben Strieder und Lutz, 2002), von denen zumindest die ersten drei für ihr Auftreten bei Kindern und jungen Erwachsenen bekannt sind. Im Wilms-Tumor, einem embryonalen Nierentumor des Kindesalters, welchem ein funktionales *WT-1* (*Wilms Tumour-1*)-Gen fehlt, ist das Onkoprotein N-myc überexprimiert. Im Fall von Brustkrebs ist eine Amplifikation von *c-MYC* (kurz: *MYC*) mit einer schlechten Prognose assoziiert (Übersicht in Liao und Dickson, 2000). Auch bei Prostatakarzinomen (Nupponen et al., 1998), Darmkrebs (Yang et al., 1996) und malignen Melanomen (Chana et al., 1998) spielt eine Überexpression von *c-Myc* (kurz: *Myc*) eine entscheidende Rolle. Translokationen des *MYC*-Gens können beim Menschen das Burkitt-Lymphom bzw. T-Zell-Leukämien (Erikson et al., 1986) hervorrufen.

1.2.3 Myc als Genaktivator und –repressor

Zusammen mit seinem Dimerisierungspartner Max aktiviert *Myc* zahlreiche Gene, die als Zellzyklus- oder Apoptoseregulatoren sowie Modulatoren von Stoffwechselwegen und des Zellwachstums bekannt sind (Coller et al., 2000; Eisenman, 2001; s. Abb.2). Entsprechend reprimiert Max, gebunden an Mitglieder der Mad-Familie, zahlreiche Gene, die die Proliferation der Zelle hemmen (Eisenman, 2001; s. Abb.2). Während der Zelldifferenzierung kommt es zu einem Wechsel von der durch *Myc/Max*-Dimere vermittelten Aktivierung zur durch *Mad/Max*-Komplexe vermittelten Repression von Zielgenen. Die Expression einer ganzen Reihe von *Myc*-Zielgenen scheint durch Modifikation ihres Histonacetylierungsstatus und Chromatinaufbaus reguliert zu werden: Während *Myc* Histonacetyltransferasen (HAT) rekrutiert, die über eine Acetylierung der Histone zu gesteigerter Genexpression führen, scheinen Mitglieder der *Mad*-Protein-Familie, funktionell Antagonisten von *Myc*, mit Histondeacety-

lasen (HDAC) zu assoziieren, die durch Deacetylierung der Histone zu einer Repression der Zielgene beitragen (einen Überblick geben Grandori et al., 2000 und Eisenman, 2001; s. Abb.2). Beispielsweise bindet Myc TRRAP, welches Bestandteil der humanen HAT-Komplexe STAGA und Tip60 ist. Darüber hinaus kann es mit GCN5, der katalytischen Untereinheit des STAGA-Komplexes, sowie Tip48 und Tip49, beide Komponenten des Tip60-Komplexes, assoziieren. Max/Mad-Heterodimere dagegen können durch die Bindung von HDAC über das Adaptorprotein Sin3 die Genexpression senken. Auf eine Rolle von Myc im Chromatinumbau durch den humanen SWI/SNF-Komplex weisen die Beobachtungen hin, dass Myc mit INI, einer Untereinheit des Komplexes, interagieren kann und eine dominant-negative Mutante der katalytischen Untereinheit des Komplexes die transkriptionelle Aktivität von Myc senkt.

C-Myc hat neben seiner aktivierenden auch eine reprimierende Funktion auf die Expression einiger Zielgene; ein beschriebener Mechanismus ist die Assoziation mit dem Zinkfingerprotein Miz-1 (*Myc interacting zinc finger protein 1*). Die Interaktion von Miz-1 mit p300, einem HAT-beinhaltenen Protein, wird durch die Bindung von Myc verhindert. Auf diese Art und Weise kann Myc die Aktivierung von p15^{INK4b} durch Miz verhindern (Staller et al., 2001). P15 spielt eine Rolle als Inhibitor der Zellteilung. Hierbei sequestriert Myc nicht lediglich Miz-1, sondern wird zusammen mit Max an das sog. Initiator-Element (INR) des p15-Gens rekrutiert (s. Abb. 2). Gleichzeitig hebt Myc durch Interaktion mit Proteinen der TGF β -Kaskade (Smad 3 und 4) deren aktivierenden Einfluss auf die p15-Expression auf (Feng et al., 2002).

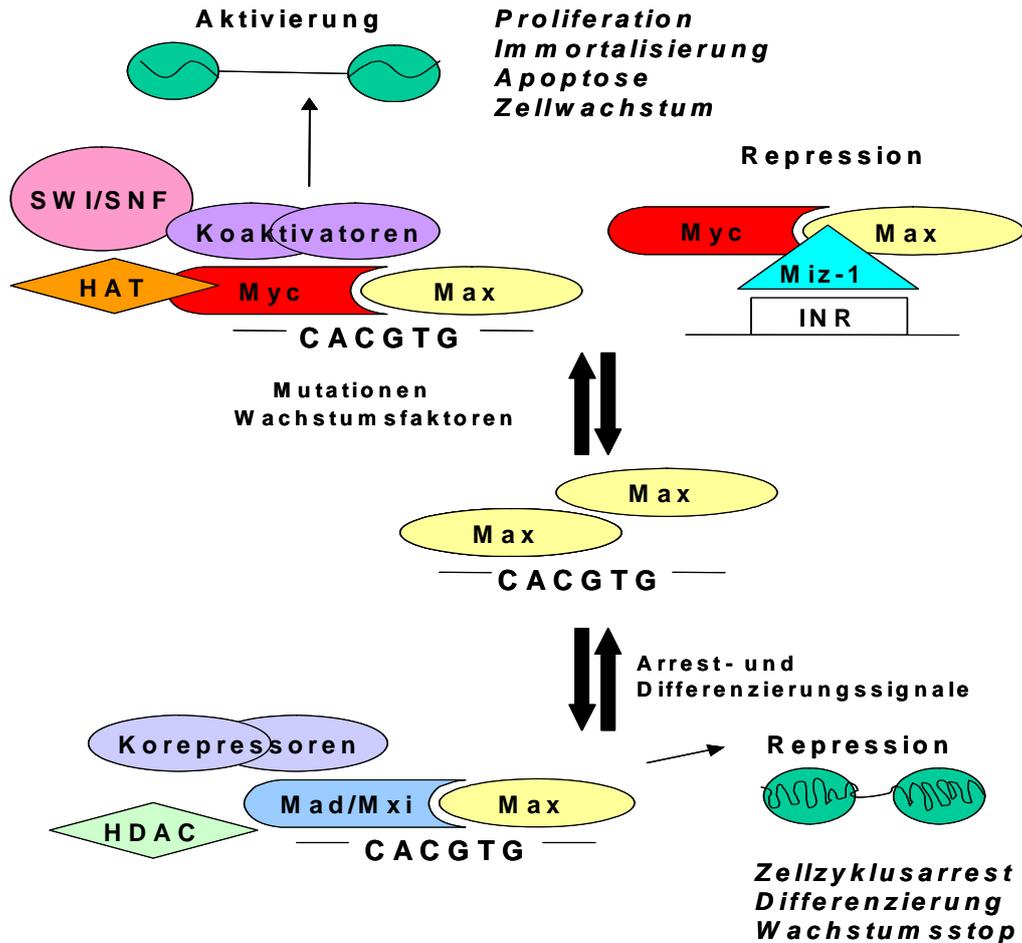


Abbildung 2: Mechanismen der Genaktivierung und -repression durch Myc bzw. Mad und deren Auswirkungen auf die Zelle

1.2.4 Biologische Funktionen von c- und N-Myc

Die Transkriptionsfaktoren der Myc-Familie sind Teil eines komplexen Netzwerks, das für die Tumorentstehung relevante zelluläre Vorgänge wie Zellzykluskontrolle, Zellwachstum und Apoptose steuert (einen Überblick geben Grandori et al., 2000; Lutz und Eilers, 2002):

Myc reduziert die Abhängigkeit einer Zelle von Wachstumsfaktoren, verhindert den Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus, beschleunigt die Zellteilung und blockiert antimitogene Signalwege wie die TGF β (Transforming Growth Factor β)-Kaskade. Es steigert das Zellwachstum durch Einflussnahme auf metaboli-

sche Schlüsselwege und die Proteinbiosynthese und verhindert Differenzierungsvorgänge. Darüber hinaus scheint Myc die Akkumulation sekundärer Mutationen in einer Zelle zu begünstigen und *Checkpoint*-Programme, die die Chromosomenzahl und Ploidie kontrollieren, außer Kraft zu setzen. Möglicherweise gilt dies auch für N-myc, denn im Fall des Neuroblastoms kennzeichnen tetraploide Chromosomensätze ebenso wie starke *MYCN*-Expression besonders aggressive Tumoren (vgl. Abschnitt 1.1.4). Im Rahmen der Tumorentstehung kann Myc die Angiogenese fördern. C-Myc kooperiert im Rahmen der Tumorigenese mit anderen Onkogenen, wie z.B. aktiviertem Ras. Zwar konzentrieren sich die meisten funktionellen Studien auf c-myc, während über N-myc und seine Regulation vergleichsweise wenig bekannt ist, aber dennoch scheinen sich die beiden homologen Proteine in ihrem biologischen Verhalten zu ähneln (Felsher et al., 1999). Homozygote *Knock-in*-Mäuse, in denen durch homologe Rekombination die kodierende Region des *MYC*-Gens durch die des *MYCN*-Gens ersetzt ist und der *MYC*-Promotor die *MYCN*-RNA-Synthese antreibt, sind überlebens- und reproduktionsfähig, ohne phänotypische Besonderheiten aufzuweisen (Malynn et al., 2000), was darauf hindeutet, dass N-myc zumindest in Entwicklungsprozessen die Funktion von c-myc imitieren kann. Während der Embryogenese scheinen c- und N-myc lebensnotwendig zu sein: Mausembryonen, die entweder c- oder N-myc nicht exprimieren, sterben in frühen Entwicklungsstadien. Zu diesem Zeitpunkt weisen sie überwiegend in den Organen pathologische Veränderungen auf, in denen das jeweilige Gen stark exprimiert werden sollte, im Fall von *MYCN* z.B. im Herzen und in der Lunge (Stanton et al., 1992; Charron et al., 1992; Davis et al., 1993). Mutierte *MYCN*-Allele verursachen Defekte in der Entwicklung von Lunge, Herz und Nieren während späterer Embryogenesestadien (Moens et al., 1992; Moens et al., 1993; Bates et al., 2000). Transgene Mäuse, die N-myc in neuroektodermalen Zellen überexprimieren, entwickeln Neuroblastome (Weiss et al., 1997). In Mausmodellen konnte eine teilweise reversible Tumorentstehung in der Haut, der Mamma und in hämatopoetischen Zellen mit Hilfe induzierbarer c-myc-Systeme dargestellt werden (Pelengaris et al., 1999; Felsher et al., 1999; D'Cruz et al., 2001). Unter fehlendem Einfluss von myc bildeten sich die Tumore zurück, was eine Abhängigkeit der malignen Zellen von permanenter Stimulation durch

das Onkoprotein nahelegt. Aus diesem Grund stellen Mitglieder der Myc-Proteinfamilie attraktive Ziele der Tumorthherapie dar.

Als direkte Zielgene von Myc wurden *Cyclin D2*, *Cdk*(*Cyclin dependent kinase*)4, *Cdc*(*Cell division cycle*)25A und *Id2* beschrieben. Alle führen über eine Inaktivierung von pRB zu einem Übergang von der G1 (für engl. *gap*)- in die S (Synthese)-Phase des Zellzyklus (einen Überblick gibt Eisenman, 2001). Darüber hinaus induziert Myc die transkriptionelle Aktivität von Mitgliedern der E2F-Familie (vgl. Abschnitt 1.4.) Gene, deren Aktivierung zu einem Proliferationsarrest führt, wie *p15^{INK4B}* (INK: *Inhibitor of Kinase*), *p21^{CIP1}* (Cip: *Cdk inhibitory protein*), *gadd* und *Gas-1*, werden typischerweise von Myc reprimiert. Ein Teil der Proteine, für die von Myc aktivierte Gene kodieren, begrenzen den Einfluss dieser den Zellzyklus bremsenden Faktoren: Cyclin D2 und Cul1, Teile des Ubiquitin-Ligase-Komplexes, führen über eine Inaktivierung von *p27^{Cip1}* zu einer Aktivierung von CyclinE/Cdk2-Kinase.

C-myc führt, ebenso wie N- und L-myc, teilweise durch Induktion von *p19^{ARF}* mit daraus resultierender Stabilisierung von p53, zu Apoptoseinduktion. Möglicherweise stellt dies einen Schutzmechanismus vor der Myc-induzierten Tumorentstehung dar (Eischen et al., 1999).

1.3 Die Regulation der *MYCN*-Expression

Angesichts aller biologischen Gemeinsamkeiten der Mitglieder der Myc-Familie erscheinen die sehr unterschiedlichen Genexpressionsprofile verwunderlich: Während c-Myc in nahezu allen proliferierenden Zellen eines Organismus exprimiert wird, ist die Expression von N-myc sowohl gewebespezifisch als auch zeitlich stark begrenzt. In der Embryonalentwicklung der Maus kann *MYCN*-RNS in Primitivstreifen, Herz, Neuralrohr und den Extremitätenknospen nachgewiesen werden. Während der Organogenese ist *MYCN* in Lunge, Leber, Magen und Haarfollikeln der Maus exprimiert. Zum Zeitpunkt der Geburt beschränkt sich die Expression auf Gehirn, Niere, Lunge, Herz und Darm, um in den ersten Tagen oder Wochen, je nach Gewebe, nahezu komplett zu verschwinden.

Im Gegensatz zum Promotor von *MYC*, welcher Ziel zahlreicher mitogener und antimitogener Signalwege ist, die teilweise von der E2F-Bindungsstelle des Promotors abhängig sind (Johansen et al., 2001; Zou et al., 1997), ist über die *MYCN*-Expression regulierende Faktoren nicht viel bekannt. In Zellkultursystemen zeigten sich z. B. Interleukin 7 (IL7), NF κ B, TGF β , IGF1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) sowie Retinolsäure und NGF (*Nerve Growth Factor*) als potentielle Regulatoren der Expression von N-myc.

Eine 200 Basenpaare lange, zwischen Mensch, Maus und Huhn zu 94 % konservierte Region unmittelbar oberhalb der multiplen Transkriptionsstartstellen des *MYCN*-Promotors ist an der Aufrechterhaltung eines basalen Transkriptionsniveaus sowie an der in *MYCN*-amplifizierenden Neuroblastomen defekten Autoregulation der Expression beteiligt (s. Abb. 3). Auch der Effekt von Retinolsäure auf die *MYCN*-Expression lässt sich auf diesen DNS-Abschnitt lokalisieren. Hier sind innerhalb von 40 Basenpaaren mit hoher Homologie zwischen dem *MYCN*- und *MYC*-Promotor zahlreiche potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren lokalisiert (s. Abb. 3). So finden sich ein Oktamer-motiv, mehrere Wt1-Bindungsstellen und zwei Sp-Bindungsstellen, die in humanen Neuroblastomzellen mit Amplifikation von *MYCN* von Sp1 und Sp3 besetzt sind, jedoch nicht in Zellen ohne Expression des Onkogens (Kramps et al., 2004). Hier kommt sich eine Bindungsstelle für E2F-Proteine vor, die im Fall des *MYC*-Promoters mit einem für die *MYC*-Repression durch TGF β relevanten TIE (*TGF β Inhibitory Element*) überlappt. Im *MYCN*-Promotor grenzt das TIE unmittelbar an die E2F-Bindungsstelle an. Zusätzlich existieren im *MYCN*-Promotor zwei weitere, überlappende E2F-Bindungsstellen in unmittelbarer Nachbarschaft zur ersten (s. Abb.3). Der reprimierende Effekt von TGF β scheint im Fall des *MYCN*-Promotors in humanen Keratinozyten durch die dem TIE benachbarten E2F-Bindungsstellen vermittelt zu werden (Strieder und Lutz, 2003). Angrenzend befindet sich in beiden Promotoren ein GC-reiches Element, welches im Fall von *MYCN* als CT-Box (s.Abb.3), im Fall von *MYC* als ME1a1-site bezeichnet wird. Die ME1a1-site ist an der Öffnung der Chromatinstruktur am P2-Promoter des *MYC*-Gens beteiligt; über die Funktion der CT-Box ist noch nichts bekannt. Derart dicht gepackte regulatorische Elemente finden sich häufig in proximalen Promotoren und dienen dem synergistischen Einfluss kooperierender Transkriptionsfaktoren (Tenen et al., 1997; Merika et al., 1998).

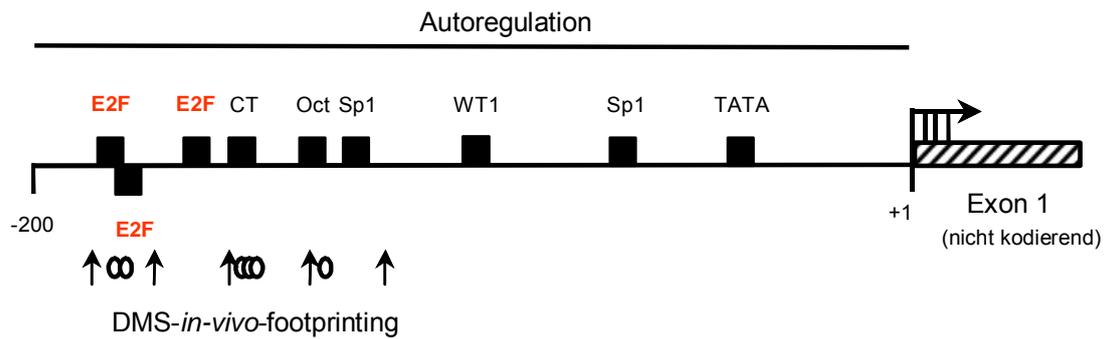


Abbildung 3: Schema möglicher regulatorischer Elemente des *MYCN*-Promoters

Die Ergebnisse aus dem *DMS-in-vivo-footprinting* entstammen Neuroblastomzellen (Lutz und Schwab, 1997). Die ovalen Strukturen kennzeichnen vor DMS-Modifikation geschützte Guanine, was auf einen Besatz mit Proteinen schließen lässt. Die Pfeile markieren gegenüber DMS hypersensitive Guanine.

Werden *MYCN* amplifizierende, das Onkoprotein stark exprimierende Neuroblastomzellen mit nicht exprimierenden fusioniert, so wird in ersteren die Expression des Onkogens abgeschaltet (Versteeg et al., 1990). Auf der Suche nach die *MYCN*-Expression senkenden Elementen fanden sich im zentralen Teil des ersten nichtkodierenden Exons eine Region, in der transkriptionelle Attenuierung stattfindet, und im ersten Intron ein TSE (*Tissue Specific Element*), welches an der gewebespezifischen Expression von *MYCN*, möglicherweise als posttranskriptioneller Regulator, beteiligt ist. Überlappend mit dem TSE befindet sich eine Region, die möglicherweise als sog. *Silencer* fungiert. Als posttranskriptionelle Regulationsmechanismen der *MYCN*-Expression sind die Herstellung sog. *Antisense*-Transkripte, RNA-Prozessierung und Veränderung der RNA-Stabilität, Verlängerung der Halbwertszeit des Proteins und Kernexport beschrieben. Für keinen dieser Mechanismen ist jedoch eine explizite Rolle in der Tumorentstehung bekannt.

Einen Überblick über die Genexpressionsprofile von *MYC* und *MYCN*, die bisher bekannten Regulationsmechanismen *MYCN*-Expression sowie über die Struktur des *MYCN*-Promoters geben Strieder und Lutz, 2002.

1.4 Die E2F- Familie

1.4.1 Allgemeine Eigenschaften von E2F-Transkriptionsfaktoren

Die E2F-Familie setzt sich aus sieben verschiedenen HLZ/LZ-Transkriptionsfaktoren, E2F-1 bis -7, und deren Dimerisierungspartnern, DP-1 und -2 (DP: *Differentiation regulated transcription factor Protein*), zusammen. Sie gilt als Schlüsselregulator der Zellproliferation sowie als Modulator von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen und scheint eine wesentliche Rolle im programmierten Zelltod, der Apoptose, zu spielen (einen Überblick geben Trimarchi und Lees, 2001; Harbour und Dean, 2000; Müller und Helin, 2000; Dyson, 1998). Die E2F-Transkriptionsfaktoren binden in den Promotoren ihrer Zielgene an die Nukleotidsequenz -TTTSSCGC-. Sie lassen sich sowohl strukturell als auch funktionell bisher in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe umfasst die aktivierenden E2F-Faktoren E2F-1 bis E2F-3, eine zweite Gruppe die reprimierenden Faktoren E2F-4 und E2F-5. E2F-6 hat offensichtlich ebenfalls reprimierende Eigenschaften, weist aber deutliche strukturelle Diskrepanzen zur zweiten Gruppe auf. Aus diesem Grund ist es einziges Mitglied der dritten Gruppe (Dyson, 1998; Trimarchi und Lees, 2001). Den Faktoren E2F-1 bis E2F-6 sind zwei Domänen gemeinsam, über die die Bindung an DNS und die Dimerisierung mit DP vonstatten geht. Die für die Dimerisierung relevante Region umfasst sowohl den Leuzin-Zipper als auch die *Marked box*. Am C-terminalen Ende von E2F-1 bis E2F-5 befindet sich die Transaktivierungsdomäne, in der die für die Bindung an Mitglieder der Pocket-Proteine (s.u.) notwendige Stelle enthalten ist. E2F-6 besitzt stattdessen an seinem C-Terminus eine Repressionsdomäne, welche die *Marked box* einschließt. Der ersten Gruppe aus E2F-1 bis E2F-3 ist ein aminoterminal von der DNA-Bindungsdomäne gelegenes NLS (*Nuclear Localization Signal*) gemein. E2F-4 und E2F-5 beinhalten stattdessen ein NES (*Nuclear Export Signal*).

Die transkriptionelle Aktivität von E2F-1 bis E2F-5 wird durch Bindung an Mitglieder der Pocket-Protein-Familie gebremst (s. Abb.4). Deren zellzyklus-spezifische Phosphorylierung durch Cyclin/Cdk-Komplexe behindert die Bindung von E2F, so dass freiwerdendes E2F-Protein transkriptionell aktiv sein kann (eine Übersicht gibt: Dyson, 1998; s.Abb.4). Kürzlich wurde ein neues

Mitglied der E2F-Familie identifiziert, E2F-7, welches sich nicht in die bisher bekannten E2F-Gruppen einordnen lässt: Es besitzt zwei DNA-Bindungsdomänen, aber weder eine Dimerisierungs- noch eine Transaktivierungs- oder pRB-Bindungsdomäne (De Bruin et al., 2003; Di Stefano et al., 2003).

1.4.2 Funktionelle Eigenschaften von E2F-1 bis E2F-3

Die Mitglieder der ersten E2F-Familie, E2F-1 bis E2F-3, spielen eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation (einen Überblick geben Dyson, 1998 sowie Trimarchi und Lees, 2001): Überexprimiert man E2F-1, E2F-2 oder E2F-3 in ruhenden Zellen, so treten diese in den Zellzyklus ein, wofür die DNA-Bindungs- und die Transaktivierungsdomäne der Proteine notwendig sind. Darüber hinaus sind sie in der Lage, den Effekt antiproliferativer Signale von TGF β und den Cdk-Inhibitoren p16, p21 und p27 aufzuheben. Entsprechend weisen E2F-3-defiziente Mausembryofibroblasten (MEF) durch mangelhafte Aktivierung mitogen-induzierter E2F-Zielgene eine reduzierte Proliferationsrate auf. MEF, in denen die für E2F-1 bis E2F-3 kodierenden Gene in mutierter Form vorliegen, proliferieren nicht mehr.

Weiterhin können Mitglieder dieser Gruppe Apoptose induzieren. Die für diesen Prozess relevanten Signalwege umfassen sowohl den p53-Pfad als auch p53-unabhängige Mechanismen wie z.B. Aktivierung von p73.

Durch Pocket-Proteine können E2F-Zielgene aktiv und passiv reprimiert werden. E2F-1 bis E2F-3 binden von den Mitgliedern der Pocket-Protein-Familie ausschließlich pRB, nicht aber p107 und p130 (s. Abb.4). Mutationen des *RB1*-Tumorsuppressorgens liegen in mindestens einem Drittel aller humanen Tumore vor.

Der Phänotyp E2F-1- bis E2F-3-überexprimierender Tumoren oder embryonaler Gewebe mit gesteigerter Proliferation auf der einen und erhöhten Apoptose-raten auf der anderen Seite kann auch durch Inaktivierung von pRB ausgelöst werden (eine Übersicht geben Mulligan und Jacks, 1998). In pRB-defizienten Embryonen kann hingegen durch Mutation des *E2F-1*- oder *E2F-3*-Gens dieser Phänotyp aufgehoben werden (Ziebold et al., 2001; Tsai et al., 1998). Aus dieser Beobachtung heraus entstand ein Modell, in dem ein Schwellenwert gesammelter E2F-Aktivität überschritten werden muss, um zu einer Zellzyklus-

progression zu führen. Steigt die Aktivität von E2F weiter, wird möglicherweise ein zweiter Schwellenwert überschritten, ab dem folglich zusätzlich Apoptose eingeleitet wird (Trimarchi und Lees, 2001). Diese Hypothese wird von der Beobachtung unterstützt, dass zumindest E2F-1 nicht nur tumorfördernde, sondern im Tiermodell auch tumorsuppressive Eigenschaften hat (Yamasaki et al., 1996).

Der Zellzyklus von Säugetierzellen unterliegt einem komplexen regulatorischen Netzwerk (einen Überblick geben Trimarchi und Lee, 2001 sowie Harbour und Dean, 2000; s. Abb.4). pRB liegt in ruhenden Zellen zum größten Teil hypophosphoryliert und in einem Komplex mit E2F-1, -2 oder -3 vor. Durch mitogene Wachstumsfaktoren wird die Synthese von Cyclin D sowie die Komplexbildung von Cyclin D mit cdk während der frühen G1-Phase des Zellzyklus gesteigert. Diese Cyclin D/Cdk4/6-Komplexe phosphorylieren ebenso wie ab dem Restriktionspunkt der späten G1-Phase synthetisierte Cyclin E/Cdk2-Komplexe pRB, wodurch dessen Bindung an E2F verlorenght (s. Abb.4). Freiwerdendes E2F kann nun die Synthese beispielsweise anderer Zellzyklusregulatoren (Cyclin E, Cyclin A, Cdc2, Cdc25A) oder der Nukleotidsynthese dienender Enzyme (Dihydrofolatreduktase, Thymidylatsynthetase, Thymidinkinase) vorantreiben. Auch für Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie kodierende sowie für die Regulation der Mitosephase relevante Gene wurden als E2F-Zielgene beschrieben (Ishida et al., 2001; Dyson, 1998). Zu Beginn der S-Phase wird die geringe pRB-Aktivität mittels Phosphorylierung durch Cyclin A/Cdk-Komplexe aufrechterhalten. Im weiteren Verlauf der späten Synthesephase und der G2-Phase wird wieder hypophosphoryliertes pRB regeneriert, welches durch erneute Bindung an E2F dessen Aktivität bremst.

Cdk können nur dann aktiv sein, wenn sie an Cycline gebunden und durch CAK (*Cdk Activating Kinase*) phosphoryliert sowie durch Cdc25A dephosphoryliert werden. Durch ihre Gegenspieler, die CDI-Proteine (CDI: *Cdk-Inhibitor*) werden die Cdk inaktiviert. Zu den CDI zählen z.B. die Proteine des *INK4A*-Lokus (*INK: Inhibitor of Kinase*) p16 und p19, welche die Phosphorylierung von Cdk4 und Cdk6 verhindern und damit deren Aktivität herabsetzen (Abb. 4). Sowohl Cdk4 und 6 als auch Cdk2 werden durch p21/p53 gehemmt (Abb. 4).

Viele antimitogene Signale wirken über eine Hemmung der pRB-Phosphorylierung auf die E2F-vermittelte Zellzyklusprogression, so z. B. TGF β (Schwarz et al., 1995).

Nahezu alle malignen Tumoren mit intaktem pRB weisen aktivierende Mutationen von *Cyclin D1* oder *Cdk4* oder inaktivierende Mutationen von *p16^{INK4A}* auf (Sherr et al., 1996). Doch pRB verhindert nicht nur durch Bindung an E2F dessen aktivierende Eigenschaften auf seine Zielgene, sondern es ist auch in der Lage, aktiv E2F-Zielgene zu reprimieren, indem es durch Rekrutierung von HDAC und HMT (Histonmethyltransferasen) sowie des humanen *Chromatin-Remodeling-Komplexes* BRG1/hBRM Einfluss auf die Chromatinstruktur nimmt (einen Überblick geben Zhang und Dean, 2001; Nielsen et al., 2001). Umgekehrt können E2F-Proteine durch ihre Interaktion mit HAT die Transkription ihrer Zielgene steigern (Lang et al., 2001; McMahon et al., 1998; Ait-Si-Ali et al., 2000).

1.4.3 Funktionelle Eigenschaften von E2F-4 bis E2F-7

Während E2F-1 bis E2F-3 vorwiegend von proliferierenden Geweben exprimiert werden, findet man E2F-4 und -5 überwiegend in ruhenden Zellen. Entsprechend ihrer prinzipiell eher reprimierenden Funktion scheinen sie an der Einleitung einer Ruhephase, z. B. durch p16-Überexpression und Kontaktinhibition, beteiligt zu sein und senken entsprechend die Expression von Zellzyklusgenen während der G₀-Phase (einen Überblick geben Trimarchi und Lees, 2001). Beide scheinen im Rahmen der Differenzierung des Nervensystems und der blutbildenden Gewebe bedeutsam zu sein.

E2F-4 kann alle Mitglieder der Pocket-Protein-Familie binden: in der G₀-Phase liegt es überwiegend an p130, in der frühen G₁-Phase an pRB und ab der späten G₁-Phase an p107 gebunden vor (s. Abb. 3). Im Gegensatz dazu bindet E2F-5 nur p130 (Dyson, 1998).

E2F-6 erwies sich in Überexpressionsexperimenten als E2F-Familienmitglied mit reprimierender Funktion (Gaubatz et al., 1998). Es sind derzeit jedoch noch keine deutlichen Hinweise auf eine direkte Funktion von E2F-6 als Onkoprotein oder Tumorsuppressor bekannt.

Das vor kurzem identifizierte E2F-7 scheint ebenfalls reprimierende Eigenschaften zu besitzen (de Bruin et al., 2003; di Stefano et al., 2003).

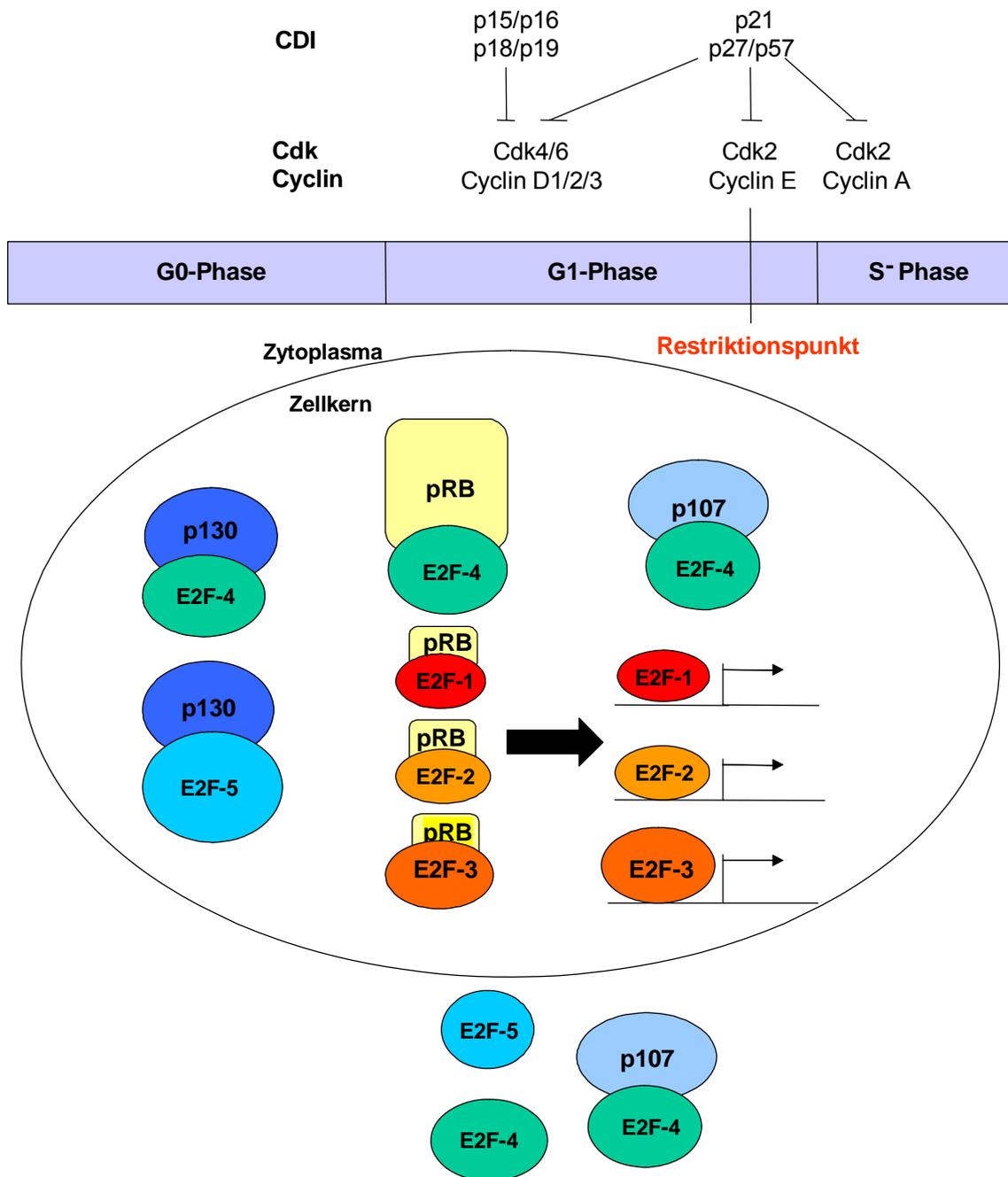


Abbildung 4: Regulation der E2F-Aktivität im Rahmen des Zellzyklus

Die Größe der einzelnen Strukturen symbolisiert deren relativen Anteil an den gesamten E2F- und Pocketproteinkomplexen der Zelle.

1.4.4 MYCN als potentielles E2F-Zielgen

Bislang sind nur wenige genetische Anomalitäten des Signalwegs $p16 \rightarrow Cdk \rightarrow Cyclin \rightarrow pRB/E2F$ in primären Neuroblastomen bekannt. Dennoch gibt es Hinweise auf Störungen innerhalb der Signalkaskade: In einigen Neuroblastomzelllinien mit Amplifikation von *MYCN* scheint der Transkriptionsfaktor Id-2, ein Antagonist von Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren, an einer Inaktivierung von pRB beteiligt zu sein (Lasorella et al., 2000). Zudem wird p16 von einem großen Teil primärer Neuroblastome (60%, Takita et al., 1998) sowie von einigen bislang untersuchten Neuroblastomzelllinien nicht exprimiert (Takita et al., 1997). In anderen Zelllinien sollen jedoch große Mengen funktionellen p16-Proteins vorhanden sein (Easton et al., 1998; Diccianni et al., 1999).

Das adenovirale Protein E1A (*Early Region 1A*) stimuliert die Expression von N-myc in LMTK-Zellen abhängig von den E2F-Bindungsstellen (Hiebert et al., 1991). In neuroektodermalen Tumoren transgener Mäuse, die E1A und E1B (*Early Region 1B*) überexprimieren, liegt eine Aktivierung von *MYCN* vor (Fukamizu et al., 1994). Durch Behandlung humaner embryonaler Karzinomzellen mit der differenzierenden Substanz HMBA sinkt die N-myc-Expression, während die Proteinbindung der E2F-Bindungsstelle verlorengeht (Hara et al., 1993). Darüber hinaus konnte mittels *In-vivo-footprinting* eine Proteinbindung an den überlappenden E2F-Bindungsstellen des *MYCN*-Promotors spezifisch in das Onkogen amplifizierenden humanen Neuroblastomzellen nachgewiesen werden (Lutz et al., 1997). Mutation der beiden in Richtung des 5'-Endes gelegenen E2F-Bindungsstellen schaltet den reprimierenden Effekt von TGF β in humanen Keratinozyten aus (Strieder und Lutz, 2003).

In der Zellzyklusprogression von Mausembryofibroblasten nach mitogener Stimulation beginnt die Expression von Myc jedoch, bevor E2F-1, E2F-2 und E2F-3 aktiv werden; in der Kontrolle des Zellzyklus scheint Myc folglich oberhalb von E2F zu agieren (Leone et al., 2001 und 1997). In der Tat können die Myc-Proteine mehrere *E2F*-Gene aktivieren (Adams et al., 2000; Sears et al., 1997).

1.5 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Die Amplifikation von *MYCN* in humanen Neuroblastomen ist ein Kennzeichen besonders aggressiver Tumoren und dementsprechend mit einer schlechten Prognose assoziiert. Mausmodelle mit an- und abschaltbarer Myc-Expression weisen darauf hin, dass ein Tumor möglicherweise auf einen kontinuierlichen Einfluss durch das Onkoprotein angewiesen ist und dass eine Repression des *MYC*-Gens zur Tumorregression führen könnte (Pelengaris et al., 1999; Felsher et al., 1999; D’Cruz et al., 2001). Diese Hypothese wird im Fall des Neuroblastoms durch die Beobachtung unterstützt, dass Neuroblastome ohne Amplifikation von *MYCN* im Gegensatz zu denen mit *MYCN*-Amplifikation häufig spontane Regression aufweisen und sich vollständig zurückbilden. Sollten Neuroblastome mit starker Expression von N-myc ebenfalls auf die gesteigerte Aktivität des Onkoproteins angewiesen sein, so könnte eine Ausschaltung oder Senkung der N-myc-Expression in den Tumoren eine spezifische und daher nebenwirkungsarme Therapie für die betroffenen Patienten darstellen.

Ziel dieser Arbeit war, die N-myc-Expression regulierende Faktoren in humanen Neuroblastomzellen zu finden und ihren Einfluss auf den *MYCN*-Promotor zu analysieren. Mit Hilfe der gewonnenen Kenntnisse könnte es langfristig möglich sein, am *MYCN*-Promotor eintreffende Signale oder deren Effekte auf den Promotor zu modifizieren, um die N-myc-Expression der Tumore zu senken und somit Fortschritte in der Therapie des Neuroblastoms zu erreichen. Aufgrund des eingeschränkten Genexpressionsprofils von N-myc nach der Geburt sind massive Nebenwirkungen einer *MYCN*-suppressiven Therapie primär nicht zu erwarten.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit den E2F-Pfad unterbindende Regulationsmechanismen wie Überexpression von p16 und dominant negativem E2F in der Lage sind, die N-myc-Expression in *MYCN*-amplifizierenden, stark exprimierenden humanen Neuroblastomzellen zu reduzieren. Als unabhängiger Hinweis auf eine Rolle von E2F bei der Regulation von *MYCN* sollte durch Expression von E2F-ER-Fusionsproteinen getestet werden, ob in menschlichen Neuroblastomzellen ohne *MYCN*-Amplifikation und –Expression die Aktivität des Protoonkogens gesteigert werden kann.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien in Analysenqualität von den Firmen Merck, Riedel-de Hann und Roth verwendet. Andere Lieferanten werden in Klammern nach dem jeweiligen Material angeführt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Vollmedien

- 500 ml RPMI-1640-Medium (PAA Laboratories) für Neuroblastomzelllinien bzw. 500 ml DMEM-Medium (Bio Whittaker) für Phoenix- und Rat1A-Zelllinien
- 50 ml fetales Kälberserum (Sigma) für Neuroblastom- und Mauszelllinien, wärmeinaktiviert (30 min bei 56°C); Serum supreme (Bio Whittaker) für Phoenix-Zellen; wärmeinaktiviert (30 min bei 56°C)
- 5 ml Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin; Gibco)
- 5 ml L-Glutamin (200 mM; Gibco)

2.2.2 Einfriermedium

- 70 % RPMI-1640-Vollmedium (s. Abschnitt 2.2.1)
- 20 % fetales Kälberserum (Sigma)
- 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) 100% (Merck)

2.2.3 Konditioniertes RPMI-1640-Medium

Vollmedium, welches seit zwei Tagen als Nährmedium für IMR-Zellen verwendet, durch einen Filter mit einer Porengröße von 200 nm (Sartorius) sterilisiert,

mit Glutamin angereichert (1:100) und anschließend in einem Verhältnis von 1:1 mit Frischmedium eingesetzt wurde

2.2.4 Trypsin-EDTA (1fach, Gibco)

2.2.5 Selektionsantibiotika

- G418-Sulfat (Neomycinderivat; Sigma)
Stammlösung: 200 mg/ml in Wasser, Endkonzentration: 200 µg/ml
- Hygromycin B (Calbiochem)
Stammlösung: 475 mg/ml in Wasser; Endkonzentration: 200 µg/ml für Rat1A, 100 µg/ml für IMR-32
- Puromycin
Stammlösung: 20 mg/ml in Wasser; Endkonzentration: 2 µg/ml für IMR-32, 5 µg/ml für Rat1A

2.2.6 PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

- 137nM NaCl
- 3mM KCl
- 6,4mM Na₂HPO₄
- 1,5mM KH₂PO₄
- pH 7,4 (mit HCl eingestellt)

2.2.7 Säugetierzelllinien

- SH-EP: humane Neuroblastomzelllinie ohne Amplifikation und detektierbare Expression des *MYCN*-Protoonkogens (zur Verfügung gestellt von M. Schwab)
- IMR-32: humane Neuroblastomzelllinie Amplifikation und starker Expression von *MYCN* (zur Verfügung gestellt von M. Schwab)
- Rat1A: MEF (Mausembryofibroblasten)-Zelllinie (zur Verfügung gestellt von D. Kleine-Kohlbrecher)

- PhoenixEco: humane *Packaging*-Zelllinie zur Herstellung rekombinanter, ekotropher Retroviren (Grignani et al. 1998; zur Verfügung gestellt von D. Kleine-Kohlbrecher)

2.2.8 Chemikalien

- 4-o-hydroxy-Tamoxifen (4-OHT, Sigma)
Stammlösung: 1 mM in Ethanol, Endkonzentration: 200 nM
- 5-aca-Cytidin (5aC)
Stockkonzentration: 1 mM in DMSO, Endkonzentration 0,2 nM
- Trichostatin A [TSA, 4-6-dimethyl-7-(p-dimethylaminophenyl)-7-oxahepta-2,4-dienohydroxanic acid; ICN]
Stockkonzentration: 0,2 µg/µl in DMSO bzw. Ethanol, Endkonzentration: 40 µg/ml

2.2.9 Plastikwaren

Kulturschalen sowie andere Einwegartikel für die Zellkultur wurden über die Firmen Greiner und Nunc bezogen.

2.2.10 Inkubator

Heraeus BBD 6220 mit einer Temperatur von 37 °C, CO₂-Gehalt 5 %, relative Luftfeuchtigkeit 96 %

2.2.11 Sterile Arbeitsbank

Heraeus Instruments Hera Safe

2.3 Transfektionen und Luciferase-Assays

2.3.1 Transfektionslösung

- durch CsCl aufgereinigte Plasmid-DNA in Wasser, pH 7,4; Konzentration: 1 µg/µl (Herstellung s. Kap. 3.3.1.)
- 2,5 M Calciumchlorid-Dihydrat, durch Nitrocellulosefilter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Schleicher und Schnell) sterilisiert
- BES-gepufferte Lösung (*BES Buffered Solution*, BBS) filter-sterilisiert durch Nitrocellulosefilter mit einer Porengröße von 0,45 µm
 - 25 mM N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-Aminoethanesulfonsäure
 - 140 mM NaCl
 - 0,75 mM Na₂HPO₄ (J.T. Baker), pH 6,95 (mit 1 N NaOH eingestellt)

2.3.2 Plasmide

- Expressionsplasmide in CMV-Promoter-basierten Vektoren
 - pCMV-DP-1 mit: humaner *DP-1*-cDNA (Jooss et al., 1995)
 - pCMV-E2F-1 mit: humaner *E2F-1*-cDNA (Helin et al., 1993)
 - pCMV-E2F-2 mit humaner *E2F-2*-cDNA (Lees et al., 1993)
 - pCMV-HA-E2F-3 mit humaner *E2F-3*-cDNA (Krek et al., 1994)
 - pCMV-HA-E2F-4 mit humaner *E2F-4*-cDNA (Ginsberg et al., 1994)
 - pcDNA3-HA-E2F-5 mit humaner *E2F-5*-cDNA (Lindeman et al., 1997)
 - pCMV-HA-ER-E2F-1 mit humaner cDNA, welche für ein Proteinchimeres kodiert, in dem humanes E2F-1 an ein HA-Tag und den Östrogen-Rezeptor der Maus (Littlewood et al., 1995) gekoppelt sind und cDNA, die Resistenz gegenüber G418 bewirkt (Vigo et al., 1999)
 - pCMV-HA-ER-E2F-2: siehe pCMV-HA-ER-E2F-1, mit *E2F-2*-cDNA anstelle von *E2F-1*-cDNA
 - pE2F-1(1-374)-ER: Vektor enthält *E2F-1*-cDNA mit Deletion der Basenpaare, die für die 73 C-terminalen Aminosäuren des E2F-1-Proteins kodieren (Helin und Harlow, 1994)

- pE2F-1(E132)-ER: Vektor enthält E2F-1-cDNA mit einer Mutation, die bewirkt, dass die Aminosäure Nr. 132 in der DNA-Bindungs-Domäne von E2F-1 ausgetauscht wird (Johnson, 1993)
- peGFP: eukaryonischer Expressionsvektor, der für eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) kodiert; Nhe1/Afl2-Fragment aus pd2eGFP-N1 (Clontech) in Nhe1/Afl2-Schnittstellen von pcDNA3
- Luciferase-Reporter-Konstrukte:
 - pMYCN-Luc: humanes 100 Basen langes DNA-Stück des Promotors des *MYCN*-Gens im pGL3-Basic-Reporterplasmid (Lutz und Schwab, 1997)Analog wurden verschiedene Punktmutanten des pMYCN-Luc-Reporters verwendet:
 - pMYCN Δ 5'E2F-Luc: entspricht pMYCN-Luc mit einer Mutation der in Richtung des 5'-Endes gelegenen E2F-Bindungsstelle
 - pMYCN Δ 5'3'E2F-Luc:: entspricht pMYCN-Luc mit einer Mutation der in Richtung des 5'- sowie des 3'-Endes gelegenen E2F-Bindungsstellen
- Expressionsplasmide für retrovirale Infektionen:
 - pER (Ekotropher Rezeptor): enthält cDNA, die für ein Adhäsionsprotein für Retroviren kodiert, das in Zellmembranen von Nagerzellen vorkommt
 - pBABEPuro-E2F-3-ER: pBABEPuro-Vektor (s. Leervektoren) mit humaner E2F-3-ER- cDNA
 - pBABEHygro-p16: pBABEHygro-Vektor (s. Leervektoren) mit humaner *p16*-cDNA (Schulze et al., 1994)
 - pBABE-H2B-GFP: pBABE-Leervektor (s. Leervektoren) mit humaner cDNA, die für an Histon H2 gekoppeltes eGFP kodiert
- Leervektoren:
 - pcDNA3: Eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV (Cytomegalievirus)- und T7-Promoter (Invitrogen)
 - pBABEPuro: Vektor für die Herstellung rekombinanter Retroviren im BOSC/Phoenix-System mit zusätzlichem Resistenzgen gegen Puromycin (Morgenstern und Land, 1990)

- pBABEHygro: Vektor zur Herstellung rekombinanter Retroviren im BOSC/Phoenix-System mit zusätzlichem Resistenzgen gegen Hygromycin (Morgenstern und Land, 1990)

Alle Plasmide wurden von Dr. Werner Lutz zur Verfügung gestellt.

2.3.3 Amplifikation von Plasmid-DNA

- Bakterientransformation
 - Bakterienstamm *XL-1 blue* : *E. coli* recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F'proABlacI^qZΔM15 Tn10 (tet^r))^c; Lagerung bei -80°C
 - Ca. 1 µg Plasmid
 - LB-Medium (pH 7,0):
 - für 1 l:10 g Trypton
 - 5 g Hefeextrakt
 - 5 g NaCl
 - 3 g Glucose
 - Ampicillin 100 µg/ml (Stock 100 mg/ml) bzw.
 - Kanamycin 100µg/ml (Gibco; Stock 10 mg/ml)
- Plasmid-Aufreinigung nach dem Qiagen-Plasmid-Maxi-Protokoll
 - Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen)
 - Isopropanol
 - 70 % Ethanol
 - UV-Spektrophotometer (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000)
 - Speed-Vac

2.3.4 Transiente Assays

- Lysepuffer zur Herstellung von Zelllysaten:
 - 100 mM Kaliumphosphat
 - 0,2 % Triton X-100 (Sigma)
 - 0,5 mM Dithiothreitol (DTT; Sigma; 1 M Stammlösung)
- Luciferase-Assay:
 - Reaktionspuffer:

- 25 mM Gly-Gly, pH 7,8 (Sigma)
- 10 mM MgSO₄ (Magnesiumsulfat-Heptahydrat)
- 2 mM ATP, pH 7,5 (Sigma)
- Luciferin-Lösung
 - 0,2 mM D-(-)-Luciferin-Natriumsalz (Applichem)
 - 25 mM Gly-Gly, pH 7,8
- Lumat (EG&G Berthold Lumat LB9507)
- Proteinbestimmung nach Bradford:
 - Bradford-Reagenzienlösung
 - 0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-25
 - + 4,75 % (v/v) Ethanol
 - + 10 % (v/v) Ortho-Phosphorsäure in H₂O
 - filtriert, lichtgeschützte Lagerung
- Referenzlösung:
 - bovines Serum-Albumin (Stock 1 mM; Fraktion V, AppliChem)
 - 1-6 mg/ml in Lysepuffer

2.3.5 Selektion von gegenüber einem Antibiotikum resistenten Zellen

- G418-Sulfat (Neomycinderivat; Sigma)
 - Stammlösung: 200 mg/ml in Wasser, Endkonzentration: 200 µg/ml

2.4 Infektion mit ekotrophen Retroviren

2.4.1 Transfektion von Zellen der Phoenix-Linie

Material siehe Abschnitt 2.3

2.4.2 Retrovirale Infektion

- Filter mit einer Porengröße von 200 nm (Sartorius) zur Abnahme des virenhaltigen Überstands
- Polybrene (Stock 4 µg/µl, Endkonzentration 8 µg/ml)

2.4.3 Selektion von gegenüber einem Antibiotikum resistenten Zellen

- Hygromycin B (Calbiochem)
Stammlösung: 475 mg/ml in Wasser; Endkonzentration: 200 µg/ml für Rat1A, 100 µg/ml für IMR-32
- Puromycin
Stammlösung: 20 mg/ml in Wasser; Endkonzentration: 4 µg/ml für IMR-32, 5 µg/ml für Rat1A

2.5 Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene

2.5.1 Induktion der E2F-ER-Fusionsproteine

- 5-o-Hydroxytamoxifen (OHT)
Stockkonzentration: 200 µM in Ethanol, Endkonzentration: 200 nM

2.5.2 Behandlung der Zellen mit Modulatoren des Chromatins

- 1 µM 5aC in DMSO (Stockkonzentration)
- 200 mg/ml TSA in Ethanol (Stockkonzentration)

2.5.3 Isolierung cytoplasmatischer RNA

- RNA-Isolierungskit (RNeasy, Qiagen)
- β-Mercaptoethanol (Merck)
- 100 % Ethanol
- UV-Spectrophotometer
- Sterile 1,5 ml große Gefäße (Eppendorf) und Pipettenspitzen

2.5.4 Synthese von Erststrängen

- 5x-Erststrangpuffer (Gibco)

- 250 mM Tris (Tris-hydroxymethylaminomethan)-HCl (pH 8,3 bei Raumtemperatur)
- 375 mM KCl
- 15 mM MgCl₂
- 0,1 M DTT (Gibco)
- SuperscriptTM2RnaseH⁻Reverse Transcriptase (200 U/μl, Gibco)
- RnaseInh (40 U/μl, Promega)
- Random Hexameres (250 μM, Pharmacia)
- 10 mM dNTP (2'Desoxynukleosidtriphosphat)-Mischung (Roche Diagnostics)

2.5.5 RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*)

- Primer:
 - *MYCN* for: 5'- AGC GGC GGC GAC CAC AAG GC -3'
rev:5'- CGA GTC AGA GTT TCG GGG GCT CAA GC -3'
 - *CCNE1* for: 5'- AGA CGG GGA GCT CAA AAC TG - 3'
rev:5'- CGG CCC GCT GCT CTG CTT CTT A -3'
 - *INHBA* for: 5'- AAG TCG GGG AGA ACG GGT ATG TGG -3'
rev:5'- CCT CCT CGG CCT CTT CCC CTG TGT -3'
 - *S14* for: 5'- GGC AGA CCG AGA TGA ATC CTC A- 3'
rev:5'- CAG GTC CAG GGG TCT TGG TCC- 3'
 - *mER* for: 5'- TTC CGG GGG TAT GTA GTA GGT TTG - 3'
rev:5'- CCT GCA GGG TGA AGA GTT TGT GT- 3'
- Red Taq-Polymerase (Sigma, 1 U/μl)
- Red Taq-10fach-Reaktionspuffer (Sigma)
- 10 mM dNTP (Roche Diagnostics)
- PCR-Cycler (MWG Biotech primus)

2.6 Analyse der Genexpression auf Proteinebene

2.6.1 Herstellung von Zellkernextrakten

- Puffer A zur Zellysierung (100 ml):
 - 1 ml 1 M HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid], Sigma)
 - 1 ml 1 M KCl
 - 20 µl 0,5 M EDTA (Sigma)
 - 20 µl 0,5 M EGTA (Sigma)frisch zugeben:
 - 0,1 mM DTT (Dithiothreitol)
 - 0,1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Sigma; Stock 0,2 M in Ethanol)
- Puffer C zur Extraktion von Kernprotein (100 ml):
 - 2 ml 1 M HEPES
 - 8 ml 5 M NaCl
 - 200 µl 0,5 M EDTA
 - 200 µl 0,5 M EGTAfrisch zugeben:
 - 0,1 mM DTT
 - 0,1 mM PMSF
 - Aprotinin 10 µg/ml (Roche Biochemica, Stock 5 mg/ml in PBS pH 7,4)
 - Leupeptin 10 µg/ml (Roche Biochemica, Stock 5 mg/ml in Wasser)
 - Pepstatin 2 µg/ml (Sigma, Stock 1 mg/ml in Methanol)
- 1fach-PBS
- Nonidet NP-40 (Nonidet-P-40, Stock 10 %, Fluka)

2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

- Sammelgelpuffer:
 - 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
 - 0,4 % (w/v) SDS (*sodiumdodecylphosphate*)
- Trenngelpuffer :

- 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
- 0,4 % (w/v) SDS
- 8 mM EDTA
- Laufpuffer pH 8,3 :
 - 25 mM Tris
 - 0,2 M Glycin
 - 0,1 % (w/v) SDS
- Acrylamidstammlösung
 - 30 % (w/v) Polyacrylamid (Acrylamid 4K-Lösung, 30 %, AppliChem)
 - 0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in H₂O
- 3fach-SDS- Probenpuffer
 - 4,8 ml 4fach-Trenngelpuffer
 - 0,6 g SDS (6 %)
 - 420 mg DTT (0,3 M DTT)
 - kleine Spatelspitze Bromphenolblau (Sigma)
 - 3,5 ml Glycerin
 - ad 10 ml H₂O
- Ammoniumpersulfat (APS) 10 % (w/v) in H₂O
- Tetramethylethyldiamin (TEMED)-Lösung
 - TEMED (Gibco)
 - mit Wasser gesättigtes Isobutanol
 - Molekulargewichtsmarker Full Range Rainbowmarker RPN 800 (Amersham)

2.6.3 Western-Blotting

- 10fach-Blotpuffer (1 l):
 - 30 g Tris
 - 144 g Glycin
 - ad 1 l H₂O
- Einfach-Blotpuffer:
 - 10 % 10fach-Blotpuffer
 - 20 % Methanol
 - 0,1 % SDS

- Waschpuffer:
 - 1fach-PBS
 - 0,1 %ige TWEEN-20-Lösung (Fluka)
- Blockierlösung:
 - Waschpuffer
 - 5 % (w/v) Magermilchpulver
- Methanol 100 %
- PVDF (Polyvinylidendifluorid)- Membran (Millipore Immobilon-P, Transfer-Membran)
- Entwicklerlösung ECL (*enhanced chemiluminescence*) plus Western Blotting Detektions-System (Amersham)
- Film (Amersham Pharmacia HyperfilmECL)
- Antikörper:
 - α -HA (AB 119) 12CA5 (Boehringer): Anti-HA-Antikörper (Maus), monoklonal, 400 μ g/ml (im Western-Blot 1:1000 verdünnt eingesetzt)
 - α -Maus (AB 8) NA 931 V (Amersham): an Peroxidase gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper (*Horseradish peroxidase conjugated anti-mouse-antibody*) (im Western-Blot 1:3000 verdünnt eingesetzt)

2.7 FACS-Analysen (FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*)

- 15 ml Polystyrolröhrchen (Falcon)
- 1fach PBS
- Gummi-Zellschaber (Greiner)
- 70 % Ethanol
- RNAase A
 - Stock: 10 mg/ml
 - Endkonzentration 0,2 mg/ml in PBS
- Propidiumiodid
 - Stock: 10 mg/ml (Sigma)
 - Endkonzentration 1 mg/ml
- FACS-Analyse-Röhrchen (Falcon)

2.8 Allgemeine Puffer

2.8.1 TE-Puffer (pH 8,0) (Tris/EDTA)

- 10 mM Tris/HCl pH 8,0
- 100 mM NaCl
- 1 mM EDTA

2.8.2 TAE-Puffer pH 8,0 (Tris-Azetat/EDTA)

- 40 mM Tris-Acetat
- 1 mM EDTA

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Arbeit an Säugetierzellkulturen unter einer sterilen Arbeitsbank orientierte sich an Standardmethoden. Humane Neuroblastomzelllinien sowie Phoenix- und Rat1A-Zellen wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96 % inkubiert. Für die Neuroblastomzellen wurde RPMI-1640-, für Rat1A- und Phoenix-Zellen DMEM-Vollmedium verwendet, welche jeweils 1 % Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin enthielten. Im Gegensatz zu allen anderen kultivierten Zelllinien, deren Medien zu 10 % fetales Kälberserum beinhaltete, erhielt Phoenix-Medium zu 10% Serum supreme.

3.1.2 Passagieren von Zellen

Abhängig von der jeweiligen Proliferationsrate wurden die Zelllinien alle zwei bis sieben Tage 1:2 bis 1:20 verdünnt und in frischem Medium ausgesäht. Zu diesem Zweck wurden sie nach dem Absaugen des Mediums zunächst mit 1fachem PBS gewaschen, so dass nach Möglichkeit alle Serumreste, die Proteaseinhibitoren enthalten, entfernt waren, und anschließend durch zwei- bis siebenminütige Behandlung mit der Protease Trypsin (Trypsin-EDTA) bei 37 °C von der Kulturschale abgelöst. Nach Resuspendierung der abgelösten Zellen in frischem Medium, welches gleichzeitig dazu diente, das Trypsin zu inaktivieren, wurden diese entsprechend der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturschalen verteilt, wo sie nach einigen Stunden wieder adhärent auf dem Boden der Kulturschale wuchsen.

3.1.3. Einfrieren von Zellen

Sollen Säugetierzellen über einen längeren Zeitraum gelagert werden, bietet sich eine Aufbewahrung bei -196 °C in flüssigem Stickstoff an. Um das Entste-

hen von Eiskristallen, welche die Zellen irreversibel schädigen können, während des Einfrierens zu verhindern, wurden diese in einem speziellen Einfriermedium langsam auf die Lagertemperatur abgekühlt. Zu diesem Zweck wurden sie nach Trypsin-EDTA-Behandlung (s. Abschnitt 3.1.2) in Suspension genommen, mit 900 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und das entstandene Pellet in eiskaltem Einfriermedium (ca. 2 ml pro Schale mit 10 cm Durchmesser und einer Konfluenz von 90 %) aufgenommen. Dieses Medium enthält zu 70 % das üblicherweise verwendete Vollmedium, zu 20 % fetales Kälberserum und zu 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Von der entstandenen Zellsuspension wurde jeweils 1 ml in vorgekühlte Kryo-Röhrchen gefüllt und für eine halbe Stunde auf Eis gelegt. Anschließend lagerten die Suspensionen für ca. 30 Minuten bei –20 °C und für 24 Stunden bei –80 °C. Die längerfristige Lagerung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff.

3.1.4 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von zuvor in flüssigem Stickstoff oder bei –80 °C gelagerten Zellen sollte möglichst schnell geschehen, um Zellschäden zu vermeiden. Nach einer Erwärmung der Zellsuspension in einem 37 °C warmen Wasserbad, die nicht länger dauern sollte als das Medium zur Verflüssigung benötigt, wurde diese mit 10 ml frischem Vollmedium vermischt und bei 900 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde nach Absaugen des DMSO-haltigen Überstands in 4 ml vorgewärmtem Vollmedium aufgenommen und die Suspension in eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 6 cm ausgesäht.

3.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden mit Hilfe einer modifizierten Neubauer-Zählkammer gezählt. Zu diesem Zweck wurde ein Deckglas so auf das Zählgitter der Kammer gebracht, dass sog. *Newton-Ringe* erkennbar waren. Durch Trypsin gelöste und in definierten Volumina des Vollmediums suspendierte Zellen wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette auf die Zählkammer unter das Deckglas gegeben und die

Zellen in 2 x 25 Feldern gezählt. Durch Multiplikation des Mittelwertes aus beiden Werten mit 10.000 erhält man die Anzahl der Zellen pro ml Medium.

3.2 Transfektionen und Luciferase-Assays

3.2.1 Amplifikation von Plasmid-DNA

Die verwendeten Plasmide tragen Gene, die Bakterien gegen bestimmte Antibiotika widerstandsfähig machen und sie auch in Gegenwart des jeweiligen Antibiotikums wachsen lassen. Während der Transformation nimmt ein Teil der Bakterien diese Plasmide auf; in der anschließenden Selektionsphase wird dem Nährmedium das jeweilige Antibiotikum zugesetzt. Somit lassen sich die Bakterien selektieren, welche die Plasmid-DNA beinhalten. Die exponentiell wachsenden Bakterien werden am nächsten Tag lysiert und die Plasmide aufgereinigt.

Zur Transformation wurden zuvor bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte kompetente XL-1Blue-Bakterien vom Stamm *E. coli* aufgetaut und jeweils 100 μl Bakterienlösung mit je 1 μg Plasmidlösung vermischt, anschließend für 30 - 60 Minuten auf Eis, exakt 90 Sekunden bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ und erneut 2 Minuten auf Eis gelagert. Nach Zugabe von je 500 μl vorgewärmtem LB-Medium wurden die Bakterien für 45 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und mindestens 550 Umdrehungen in einem Schüttler inkubiert. Über Nacht wuchsen die selektierten Bakterien in 400 ml LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin bzw. Kanamycin in Erlenmeyer-Kolben in einem Schüttler bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und ca. 250 Umdrehungen pro Minute.

Am nächsten Tag konnten die Bakterien durch 15-minütige Zentrifugation bei $6.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert werden. Zur Lyse der Bakterien und säulen-chromatographischen Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde ein Plasmid-Maxi-Kit der Firma Qiagen verwendet. Nach Fällung der DNA durch Zugabe von Isopropanol, Zentrifugation bei mindestens $9.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 Minuten, einem Waschschrift mit 70 % Ethanol und erneuter Zentrifugation für 10 Minuten wurden die DNA-Pellets für ca. 5 Minuten vakuumgetrocknet und in sterilem Wasser resuspendiert. UV-spektrophotometrisch konnte anschließend der DNA-Gehalt der Proben bestimmt und eine Reinheitskontrolle durchgeführt

werden. Hierzu wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 und 280 nm Wellenlänge gebildet. Liegt dieser zwischen 1,8 und 2,0, so kann von einer ausreichend reinen DNA-Lösung ausgegangen werden.

3.2.2 Transiente bzw. stabile Transfektionen mittels Calciumphosphat-Präzipitation

Um cDNA-haltige Plasmide transient in Zellen einzubringen und somit beispielsweise die Effekte verschiedener intrazellulär translatierter Transkriptionsfaktoren auf bestimmte ebenfalls transifizierte synthetische Promotoren, die an ein Luciferase-Gen gekoppelt sind, zu untersuchen, wurden Calcium-DNA-Komplexe in BES-gepufferter Lösung (pH ca. 7,1) verwendet (*Current protocols of molecular biology*). Die Aufnahme der Komplexe durch die Zellen geschieht bei diesem Verfahren durch Pinozytose.

Transiente Transfektionen für Reporterassays wurden zur Kontrolle der Streuung der Reporterexpression durch Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen grundsätzlich in Triplikaten durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm ausgesät (s. Abschnitt 3.1.2). Unmittelbar vor der Transfektion mussten die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit je 4 ml DMEM-Medium versorgt werden, da in dem für die Neuroblastomzelllinien verwendeten RPMI-1640-Medium keine Transfektion möglich ist (durch Addition von Calcium bildet sich in RPMI-Medium ein die Zellen schädigendes Präzipitat). Für jedes Triplet wurden 645 µl steriles Millipore-Wasser, 30 µg Plasmid-DNA und 75 µl 2,5 M CaCl₂ gründlich gemischt. Dabei wurden unterschiedliche Mengen an Expressionsvektoren durch Zugabe von Leervektoren, welche die entsprechende cDNA nicht enthalten, aufgefüllt. Auf einer sterilen Arbeitsbank wurde nun, unter kontinuierlicher Mischung der Lösung, tropfenweise je 750 µl 2faches BBS zugefügt und die Lösung aus BBS, CaCl₂ und Plasmid-DNA für 10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Während dieser Zeit bilden sich Komplexe aus Calcium und DNA. Nach der Inkubation wurde die Calcium-DNA-Lösung tropfenweise auf die Zellkulturschalen pipettiert, während diese permanent geschwenkt wurden, um die Zellen nicht unnötig starken Schwankungen des pH-Werts auszusetzen. Die Calcium-DNA-Komplexe wurden mit Hilfe eines

Lichtmikroskops auf ihre Größe bzw. Feinheit untersucht, da sowohl zu grobe als auch sehr feine Komplexe nur ineffizient die Zellmembran durchdringen können. 15 bis 22 Stunden nach der Transfektion folgte ein Waschschrift mit PBS, nach dem die Zellen wieder mit dem üblicherweise verwendeten Vollmedium versorgt wurden. Nach weiteren 24 Stunden ließ sich die Transfektionseffizienz fluoreszenzmikroskopisch beurteilen, da pro Schale bei jedem Experiment 2 µg eGFP-Plasmid transfiziert worden waren. Das resultierende GFP leuchtete unter UV-Licht. Dabei entsprach die Anzahl fluoreszierender Zellen der Anzahl transfizierter Zellen, da bei der Transfektion einer Zelle meist alle im Reaktionsansatz vorhandenen Plasmide in die Zelle gelangen. Anschließend wurden Zelllysate für die folgenden Assays hergestellt.

Um eine stabile Expression der transfizierten Gene in Einzelklonen zu ermöglichen, wurden die Zellen nicht geerntet, sondern zwei Tage nach der Transfektion in Selektionsmedium gebracht, welches das Antibiotikum Neomycin (G418) in einer Konzentration von 200 µg/ml Medium enthält. Um Einzelklone gewinnen zu können, mussten die Zellen stark ausgedünnt und nach ca. 5 bis 7 Tagen mit Hilfe von Metallringen und Vaseline (zur Abdichtung zwischen Kulturschale und Ring) sowie Trypsin „gepickt“ werden. Zunächst erfolgte die Kultivierung der Einzelklone in Platten mit 12 oder 24 Vertiefungen; je nach Proliferationsrate fanden zunehmend größere Schalen Verwendung. Die Selektion wurde permanent durch G418-Zusatz zu dem Kulturmedium aufrechterhalten; teilweise erhielten die Einzelklone im weiteren Verlauf konditioniertes Selektionsmedium, wenn das Wachstum sehr langsam vonstatten ging oder der Anteil sterbender Zellen sehr groß war.

3.2.3 Herstellung von Zelllysaten für transiente Assays

39 bis 46 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zur Entfernung von Medienresten zweimal mit PBS gewaschen. Ein Lysepuffer (TritonX-100- und DTT-haltig; 200 µl pro Platte; s. Abschnitt 2.3.4) löste die Zellen von ihrer Unterlage, während er gleichzeitig die Zellmembran aufschloss. Durch Zentrifugation der Lysate bei 14.000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten bei 4 °C wurden Zelltrümmer pelletiert; lediglich der Überstand fand für die weiteren Untersuchungen Verwendung.

3.2.4 Luciferase-Assay

Die transfizierten Reporterkonstrukte enthalten das Gen für das Enzym Luciferase, dessen Expression von benachbarten Promotoren angetrieben wird. Wird nun neben den Reporterplasmiden gleichzeitig cDNA, die beispielsweise für Transkriptionsfaktoren kodiert, in Form sog. Expressionsplasmide in die Zellen transfiziert und sind die entstehenden Transkriptionsfaktoren in der Lage, an den Promotor des Reportergens zu binden und diesen zu beeinflussen, so verändert sich die Aktivität der Luciferase entsprechend. Die enzymatische Aktivität kann gemessen werden, indem man den Zelllysaten in einem geeigneten Puffer das Substrat des Enzyms, Luciferin, zufügt und die Chemilumineszenz quantifiziert, die durch ein lumineszierendes Reaktionsprodukt entsteht.

In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils 50 µl frisches Zelllysat in 350 µl Pufferlösung pipettiert, bevor das verwendete Messgerät automatisch definierte Mengen an D-Luciferin in das Reaktionsgefäß injizierte und sogleich die Intensität des Lumineszenzsignals aufzeichnete.

3.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Da die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide für Transkriptionsfaktoren die Aktivität der β -Galaktosidase beeinflussen, indem sie den ihr angekoppeelten Promotor regulieren, konnte der standardmäßig als Normalisierungsmethode eingesetzte β -Galaktosidase-Assay in dieser Arbeit nicht verwendet werden. Die Anzahl an transfizierten Zellen verhält sich, solange die Zellen zu exponentiellem Wachstum fähig und nicht durch Kontakt mit anderen Zellen inhibiert sind, annähernd proportional zur Zelldichte auf der transfizierten Platte und somit auch zum Proteingehalt der Lysate. Durch die Bestimmung des Proteingehalts ließ sich folglich die Luciferaseaktivität annähernd normalisieren. Die von Bradford 1976 beschriebene Methode zur Proteinquantifizierung basiert auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung aus Coomassie-Brilliant-Blau G-250 von 465 zu 595 nm verschiebt, wenn Proteine gebunden werden. Dabei verhalten sich die Extinktion und der Proteingehalt annähernd proportional. Als Referenz diente eine mit Rinderserumalbumin aufgestellte Eichkurve: Hierzu wurden 1, 2, 3, 4, 5 sowie 6 µg BSA in 0,8 ml

H₂O mit je 200 µl Bradford-Reagenzienlösung gemischt und anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm die Gleichung einer nahezu linear verlaufenden Eichgerade bestimmt, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der Lysate berechnet wurde.

3.3 Infektion mit ekotrophen Retroviren

3.3.1 Herstellung rekombinanter Retroviren

Rekombinante Retroviren wurden wie von Morgenstern und Land (1990) sowie Pear et al. (1993) beschrieben hergestellt. Jeweils 5×10^6 Zellen der Phoenix-*Packaging*-Zelllinie wurden auf eine Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser ausgesät und am folgenden Tag (ca. 20 Stunden nach der Passage) mit 20 µg Plasmid-DNA mittels Calciumphosphat-Präzipitation transfiziert (s. Abschnitt 3.2.1). 24 Stunden später, nach einem Waschschrift mit PBS, erhielten die Zellen 6 ml frisches Medium, so dass nach wiederum einem Tag das virushaltige Medium abgenommen und mit Nitrocellulosefiltern mit einer Porengröße von 200 nm steril filtriert werden konnte. Parallel erhielten die Zellen 6 ml frisches Medium. Der Überstand bzw. das Filtrat wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Infektion der Zelllinien bei -80 °C gelagert. Am dritten Tag nach der Transfektion der Phoenix-Zellen wurde erneut virushaltiges Medium geerntet, filtriert und eingefroren.

3.3.2 Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren

Da humanen Zellen der Rezeptor fehlt, über den die verwendeten Retroviren in die Zellen eindringen können, mussten die menschlichen Neuroblastomzelllinien zunächst stabil mit einem Plasmid, welches für den *Ekotrophen Rezeptor* kodiert, transfiziert und die den Rezeptor exprimierenden Zellen selektiert werden (s. Abschnitt 3.2.2). Diese Selektion wurde durch ein Gen im selben Plasmid, welches Resistenz der Zellen gegen Neomycin (G418) hervorruft, ermöglicht. Für die folgenden Infektionen wurde ein mit dem Ekotrophen Rezeptor stabil transfizierter Mischklon verwendet, welcher permanent in G418

kultiviert wurde. 16 Stunden vor der Infektion wurden 5×10^5 Zellen dieses Klons auf Schalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Nach dem Absaugen des Kulturmediums erhielten die Zellen zusätzlich zu 3 ml frischem Medium 2 ml des retroviralen Überstands, dem zuvor 16 µg Polybrene (Stammlösung 4 mg/ml) beigefügt worden waren. Polybrene soll die Oberflächenspannung der zu infizierenden Zelle derart herabsetzen, dass die Retroviren leichter in die Zellen gelangen können. Nach 3-stündiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde derselbe Vorgang, d. h. Zugabe von 2 ml Virusüberstand mit Polybrene und 3 ml RPMI-Medium, zweimal wiederholt, so dass die Zellen insgesamt über einen Zeitraum von 3 x 3 Stunden infiziert wurden. Anschließend wurden weitere 5 ml frischen Vollmediums in die Kulturschale pipettiert und nach Inkubation über Nacht das Medium komplett gewechselt. Parallel zu den humanen Neuroblastomzellen wurden MEF (Rat1A), die den Ektrophen Rezeptor natürlicherweise besitzen, infiziert.

3.3.3 Selektion von gegenüber einem Antibiotikum resistenten Zellen

48 Stunden nach der Infektion wurde das bisher verwendete Medium durch ein Medium, welches entsprechend der infizierten Resistenzgene ein Antibiotikum enthielt, ausgetauscht und die Zellen in diesem Selektionsmedium weiter kultiviert. Während die Konzentration an Puromycin für IMR-32-Zellen 2 µg/ml und für parallel als Kontrolle infizierte Rat1A-MEF 5,2 µg/ml betrug, wurden für IMR-32-Zellen 100 µg/ml und für Rat1A-MEF 200 µg/ml Hygromycin verwendet. Anhand von Wildtyp-Zellen, denen das jeweilige Resistenzgen fehlte, wurde die Vollständigkeit der Selektion mikroskopisch überprüft. Durch Beobachtung der infizierten, die Selektion überlebenden Rat1A-Zellen wurde die Effizienz der Infektion überprüft.

3.4 Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene

3.4.1 Hormoninduktion der E2F-ER-Fusionsproteine

In Zellen, welche die durch den synthetischen Östrogenantagonisten 4-OHT aktivierbaren E2F-ER-Fusionsproteine exprimieren, kann durch Zugabe von 4-OHT E2F zeitlich beliebig aktiviert werden. Zu diesem Zweck wurde dem Vollmedium exponentiell wachsender Klone, die das Fusionsprotein exprimieren, 200 nM 4-OHT zugesetzt. Nach einer für das jeweilige Experiment erforderlichen Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und analysiert.

3.4.2 Behandlung der Zellen mit Modulatoren des Chromatins

Zur Analyse des Einflusses von 5aC bzw. TSA auf die Genexpression wurden die beiden Substanzen gemeinsam oder getrennt dem Medium zugesetzt. Die verwendeten Endkonzentrationen lagen für 5aC bei 0,2 nmol/l, für TSA bei 40 µg/ml (beide Angaben entsprechen 2 µl Pharmakonlösung auf 10 ml Medium). Die Behandlung mit 5aC bzw. dessen Lösungsmittel DMSO (100 %, 2 µl) dauerte 24 Stunden, die mit TSA bzw. dessen Lösungsmittel Ethanol (100 %, 2 µl) 12 Stunden, und fand jeweils unmittelbar vor Ernte der Zellen statt.

3.4.3 Isolierung cytoplasmatischer RNA

Die Isolierung cytoplasmatischer RNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kitsystems (Qiagen). Grundlagen dieser Methode sind die Zelllyse durch Guanidinium-Isothiocyanat in Gegenwart von β-Mercaptoethanol, Abzentrifugation des Kernmaterials (bei 2.200 Umdrehungen pro Minute, 4 °C, 2 Minuten) und selektive Absorption von RNA an eine Membran auf Basis von Silicagel. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Konzentration und Reinheit der RNA wurden spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. In RNase-freiem Wasser gelöste RNA wurde anschließend bei –80 °C aufbewahrt.

3.4.4 Synthese von Erststrängen

Für jede Erststrangsynthese-Reaktion wurden 8 ml RNase-freies Wasser, 2 µl *Random Hexamers*-Lösung (250µM), 1 µl dNTP-Lösung (1 mM) und 1 µg RNA (1 µl) gemischt und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl 5fach-Erststrang-Pufferlösung, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase-Inhibitor-Lösung, 200 U *Reverse Transkriptase* (1µl) wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen, bevor während einer 50-minütigen Inkubation bei 42 °C die Synthese der cDNA erfolgte. Durch Inkubation bei 70 °C für 15 Minuten wurde die Reaktion gestoppt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei –20 °C.

3.4.5 RT- PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*)

Jeder Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

1 µl cDNA-Lösung
5 µl 10fach-*RedTaq*-Reaktionspuffer
1 µl 10mM dNTP
1 µl 10 pM *forward* Primer
1 µl 10 pM *reverse* Primer
2,5 µl *RedTaq-Polymerase*-Lösung
38,5 µl Wasser

In einer PCR-Maschine fand folgendes Grundprogramm Verwendung:

- *Hotstart* bei 95 °C
- 25-40 x 1 Min. 95 °C
1 Min. X °C (s. Tabelle)
1 Min. 72 °C
- 5 Minuten 72°C
- Abkühlung auf und evtl. Lagerung bei 4°C

Für jedes Primerpaar wurde ein geeignetes PCR-Programm entwickelt, so dass die Menge des Endprodukts im linearen Bereich der Reaktion lag und eine semiquantitative Analyse zuließ:

Gen	Name der Primer	Annealing-Temperatur (°C)	Zyklenzahl
<i>MYCN</i> (human)	MYCN for MYCN rev	62	30 bzw. 40
<i>CCNE1</i> (human)	CCNE1 for CCNE1 rev	60	25
<i>INHBA</i> (human)	INHBA for INHBA rev	60	28
<i>S14</i> (human)	S14 for S14 rev	62	32
<i>ER</i> (Maus)	mER for mER rev	62	28
<i>CDKN2A</i> (<i>p16^{INK4a}</i>) (human)	CDKN2A for CDKN2A rev	62	34

3.4.6 Detektion mittels DNA-Gelelektrophorese

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden in einem 2 %igen TAE-Agarosegel, welches 4 µl Ethidiumbromid/100 ml enthielt, in TAE-Puffer bei einer angelegten Spannung von 150 V aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht detektiert

und fotografiert. Die Größe der Fragmente gab Aufschluss über die Spezifität des Amplifikats.

3.5 Analyse der Genexpression auf Proteinebene

3.5.1 Herstellung von Zellkernextrakten

Um überwiegend Kernproteine zu gewinnen, muss zunächst die Zellmembran aufgeschlossen und der Zellkern vom Zytosol abgetrennt werden. Nach der Extraktion von Proteinen des Kerns können resultierende Kernextrakte zum Beispiel per Western-Blot untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit fand die *Mini-extract*-Methode (Schreiber et al., 1989) Verwendung.

Subkonfluent gewachsene Zellen auf Schalen mit 10 cm Durchmesser wurden durch Trypsin von der Platte gelöst, in Medium aufgenommen und durch Zentrifugation bei 300 x g für 3 Minuten bei 4 °C pelletiert. Nach Suspension des Zellpellets in Puffer A und Inkubation auf Eis für 20 Minuten löste sich durch Zugabe von 25 µl 10 % NP-40 die Plasmamembran auf; erneute Zentrifugation bei 900 Umdrehungen für 5 Minuten führte zur Pelletierung der Kerne, die in 50 µl Puffer C gelöst und für 15 Minuten bei 4 °C auf einem Rotor geschwenkt wurden. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei höchstmöglicher Geschwindigkeit (2.000 x g) zur Abtrennung von Zelltrümmern wurde der resultierende Überstand als Proteinextrakt abgenommen, die Konzentration an Protein mittels der Methode nach Bradford (s. Abschnitt 3.2.5) bestimmt und das Kernextrakt bei –80 °C gelagert.

3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aus Kernextrakten erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dabei denaturiert SDS die Proteine und geht nichtkovalente Wechselwirkungen mit deren hydrophoben Bereichen ein. Das Verhältnis von SDS pro Aminosäure bleibt annähernd konstant, so dass durch die komplette Entfaltung der Proteine und den Besatz mit SDS, welches eine negative Nettoladung hat, Ladungsunterschiede zwischen den

Eiweißen ausgeglichen werden. Die negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode. Da die spezifische Ladung für alle Eiweiße gleich ist, hängt die Wandergeschwindigkeit neben der Durchlässigkeit der Matrix nur vom Molekulargewicht der Proteine ab. Im vorliegenden Fall dienten vertikale Gele aus Polyacrylamid, welche aus einem 8,9 %igem Sammelgel und einem 7,5 %igen Trenngel bestehen, als Matrix. Bei dieser Methode gewährleisten die Pufferbedingungen im großporigen Sammelgel die Bildung einer einheitlichen Proteinfront und sorgen für eine optimale Auftrennung im kleinporigen Trenngel. Beide Gele wurden durch Mischen von AcrylamidstammLösung (30 % v/v) mit dem jeweiligen Gelpuffer im erforderlichen Verhältnis hergestellt. Die Acrylamidpolymerisation ist eine Kettenreaktion, welche durch den Zerfall von TEMED-Molekülen (0,08 %) eingeleitet wird. In einem zweiten Schritt spalten diese Radikale Peroxidsulfationen (APS 10 % w/v); die in dieser Reaktion entstehenden Radikale sind die eigentlichen Initiatoren der Radikalkettenpolymerisation. Das Trenngel wurde bis zur vollständigen Acrylamidpolymerisation mit wassergesättigtem Isobutanol beschichtet, so dass eine horizontale Oberfläche entstand, auf die das Sammelgel gegossen wurde. Die aufzutrennende Proteinlösung wurde mit 1/4 Volumen des 5fachen SDS-Puffers gemischt, bei 100 °C 5 Minuten aufgekocht und anschließend mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen des Sammelgels übertragen. Eine für ca. eine Stunde angelegte Spannung von 150V führte zur Auftrennung der Proteine, wobei der Auftrennungsgrad anhand eines mitlaufenden Größenstandards nachvollzogen werden konnte. Die aufgetrennten Proteine konnten anschließend mittels *Western-Blotting* sichtbar gemacht werden.

3.5.3 Western- Blotting

Diese Methode ermöglicht den Nachweis zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennter Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper. In einem ersten Schritt treten die Proteine durch ein transversal zur Oberfläche des Acrylamidgels angelegtes elektrisches Feld auf der Anodenseite des Gels aus und werden auf eine PVDF-Membran übertragen, auf der sie exakt dieselbe Position einnehmen, welche sie auch im Gel belegten. Die auf der Oberfläche der Membran immobilisierten Eiweiße sind anschließend immunologischen Reaktionen zugänglich. Zu diesem

Zweck wird die Membran in einer Lösung inkubiert, die einen gegen das zu untersuchende Protein gerichteten Antikörper in einer optimierten Konzentration enthält. Ein Zweitantikörper, der die konstanten Domänen der schweren Kette des Primärantikörpers erkennt, ist z. B. mit einer aus Meerrettich gewonnenen Peroxidase gekoppelt. Deren enzymatische Aktivität erzeugt nach Substratzugabe ein chemilumineszierendes Produkt, welches mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann.

Zunächst wurde die Membran aus PVDF für eine Minute in 100 % Methanol eingeweicht und dann zusammen mit den verwendeten SDS-Gelen, speziellen Papieren (Whatman-3M) und Kunststoffschwämmen in Transferpuffer equilibriert. Der elektrophoretische Proteintransfer vollzog sich nach dem Aufbau eines „Sandwiches“ aus Kathode, Schwamm, Papier, Gel, Membran, Papier, Schwamm und Anode in einer *Submarine Blotting*-Apparatur (Biorad) unter einer konstant angelegten Spannung von 135 V bei einer maximalen Stromstärke von 500 mA. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Nitrocellulosemembran zu vermeiden und die Membran mit Proteinen abzusättigen, wurde sie für 2 Stunden bei Raumtemperatur in 5 %iger Magermilch auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend rotierte sie unter permanenter, gleichmäßiger Benetzung der Oberfläche in frischer, den Primärantikörper in definierter Konzentration enthaltender Milchlösung über Nacht bei 4 °C und wurde am nächsten Tag auf einem Schüttler mindestens 4 x 15 Minuten in jeweils frischer Waschlösung (TBS-T) gewaschen, bevor der Sekundärantikörper, erneut in Magermilch, gemeinsam mit der Membran auf einem Rotor für 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt wurde. Nach nochmals vier 15-minütigen Waschschritten wurde die Substratlösung für fünf Minuten auf die Membran gegeben und diese auf einen Hyperfilm gelegt, auf welchem nach 1 Sekunde bis 5 Minuten durch aufgetretene Chemilumineszenz eine Schwärzung eintrat. Nach Filmentwicklung lässt sich die Menge an detektiertem Protein abschätzen, da sich die Signalintensität annähernd proportional zur Menge an gebundenem Antikörper und somit auch zur Menge an nachzuweisendem Protein verhält. Mittels der verwendeten Standardproteinlösung aus Markerproteinen bekannter Größe ließ sich die Größe der detektierten Proteine abschätzen und mit der erwarteten Größe vergleichen, wodurch eine spezifische Bindung der verwendeten Antikörper kontrolliert werden konnte.

3.6 FACS-Analysen

Fixierte Zellen wurden mit Propidiumiodid, einem DNA-bindenden und in einem Laserstrahl fluoreszierenden Farbstoff, markiert. In einem Durchfluss-Zytometer erfolgte die Auftrennung der Zellen, während die Fluoreszenz durch einen fokussierten Laserstrahl angeregt wurde. Ein Photomultiplier misst bei dieser Methode das Ausmaß der Fluoreszenz und kann, da diese proportional zum DNA-Gehalt der einzelnen Zelle ist, bestimmen, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zelle zum Zeitpunkt der Fixation befand bzw. ob ihr Kernmaterial bereits aufgelöst wurde, die Zelle also apoptotisch war. In diesen Experimenten wurden Triplikate von Zellschalen verwendet, um durch Bestimmung von Mittelwerten und Standardabweichungen eine Aussage über die Genauigkeit der Methode und die Signifikanz der Ergebnisse treffen zu können.

Nach Ablösung der Zellen von der Platte mittels Trypsin wurden diese bei 500 x g für 5 Minuten bei 4 °C in Röhrchen aus Polystyrol abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 500 µl PBS aufgenommen. Tropfenweise wurden die Zellen zur Fixierung in 2 ml permanent gemischtes eiskaltes 70 %ige Ethanollösung pipettiert und anschließend für 30 Minuten auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation und Aufnahme der Zellen in 300 µl PBS wurde die noch vorhandene RNA durch 50 µg RNase über Nacht bei 4 °C verdaut, bevor am nächsten Morgen die Färbung der Zellen mit 30 µl Propidiumiodid begann. Die Messung des DNA-Gehalts erfolgte in einem Becton-DickinsonFACScalibur. Für jede einzelne Auswertung wurden ca. 10^4 Zellen vermessen. Mittels des Programms *Modifit* (Verify Software House) konnten die erhaltenen Daten maschinell ausgewertet werden.

Zusätzlich zur Analyse des DNA-Gehalts mittels FACS wurde die Größe der Zellen gemessen. Zu diesem Zweck wurde die Vorwärtsstreuung des Laserstrahls an den vermessenen 10^4 Zellen bestimmt (Iritani und Eisenman, 1999). Die Darstellung als Histogramm veranschaulicht die Größenverteilung der untersuchten Zellpopulation.

4 Ergebnisse

4.1 E2F-1 und E2F-3 aktivieren den *MYCN*-Promotor in transienten Assays abhängig von E2F-Bindungsstellen

Um zu testen, ob die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie in humanen Neuroblastomzellen ohne *MYCN*-Amplifikation und -Expression einen Einfluss auf die Aktivität des *MYCN*-Promotors haben, wurden ein Luciferase-Konstrukt, welches die 200 Basenpaare des basalen *MYCN*-Promotors beinhaltet, mittels Calciumphosphat-Präzipitation in SH-EP-Zellen transfiziert (Lutz et al. 1997). Der *MYCN*-Promotor enthält drei potentielle E2F-Bindungsstellen, wovon zwei überlappend und in umgekehrter Orientierung auf den beiden komplementären DNA-Strängen liegen und die dritte einige Basenpaare von den beiden erstgenannten entfernt (Abb. 3). In SH-EP-Neuroblastomzellen liegt das Protoonkogen nicht amplifiziert vor; Transkripte des Gens sind nicht detektierbar (Schwab et al., 1984). Daher eignen sich diese Zellen für Experimente, in denen die Möglichkeit einer Aktivierung der Genexpression von *MYCN* durch E2F untersucht werden soll. Gleichzeitig wurden Expressionsplasmide transfiziert, welche für die Transkriptionsfaktoren E2F-1 bis -5 bzw. für den E2F-Dimerisierungspartner DP-1 kodieren.

E2F-1 aktivierte den Promotor 4,2fach und E2F-3 8,3fach (Abb. 5), während der Effekt durch E2F-2, E2F-4 und E2F-5 gering ausfiel (2,8fache Aktivierung durch E2F-2; 1,7fache Aktivierung durch E2F-4 und E2F-5; Abb. 5).

Um festzustellen, ob die Aktivierung des Promotors durch E2F eine intakte E2F-Bindungsstelle voraussetzt, oder ob sie durch einen indirekten, von der in Richtung des 5'-Endes gelegenen E2F-Bindungsstelle unabhängigen Effekt zustandekommt, wurde in einem parallelen Experiment anstelle des Wildtyp-*MYCN*-Reporters ein Luciferasekonstrukt verwendet, in dem durch Punktmutationen die in Richtung des 5'-Endes gelegenen E2F-Bindungsstellen zerstört sind. Da sich E2F-1 und E2F-3 als die stärksten Transaktivatoren gezeigt hatten, wurden sie in diesem und den folgenden Experimenten als Repräsentanten der „aktivierenden“ E2F-Gruppe eingesetzt. E2F-1 aktivierte den Wildtyp-Reporter 2,5fach und E2F-3 10,1fach, während der mutierte Promotor hingegen durch E2F-1 nicht und durch E2F-3 nur 5,6fach aktiviert wurde (Abb. 6).

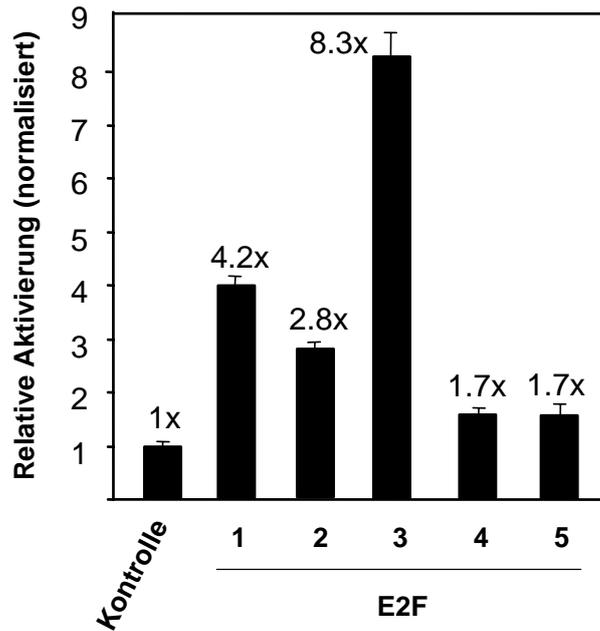


Abbildung 5: Aktivierung des *MYCN*-Promotors durch E2F-1, E2F-2 und E2F-3 in SH-EP

SH-EP-Zellen wurden mit dem *MYCN*-Wildtyp-Reporterplasmid (PMYCN-Luc) sowie Expressionsplasmiden für E2F-Transkriptionsfaktoren bzw. dem Leervektor pcDNA3 als Kontrolle kotransfiziert. Die anhand der Zahl der GFP-positiven Zellen bestimmte Transfektionseffizienz war in allen Zellschalen vergleichbar (etwa 40 %). Die nach zwei Tagen gemessene Luciferase-Aktivität wurde mittels Division durch den Proteingehalt der Lysate normalisiert. Dargestellt ist die normalisierte enzymatische Aktivität der Luciferase in mit E2F-Expressionsplasmiden transfizierten Zellen in Relation zu mit nur dem Leervektor transfizierten Zellen.

Folglich ist die Aktivierung des *MYCN*-Promotors durch E2F-1 vollständig von der in Richtung des 5'-Endes gelegenen E2F-Bindungsstelle abhängig; der Effekt von E2F-1 auf die Promotoraktivität kommt vermutlich durch direkte Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promotor und anschließende Transaktivierung zustande. Um zu testen, ob in SH-EP-Zellen die Aktivierung des *MYCN*-Promotors durch E2F-3 möglicherweise teilweise durch Bindung an die in Richtung des 3'-Endes gelegene E2F-Bindungsstelle erfolgt, wurde dasselbe Experiment mit einem *MYCN*-Luciferasereporter wiederholt, in dem alle drei der potentiellen E2F-Bindungsstellen durch Punktmutationen zerstört sind.

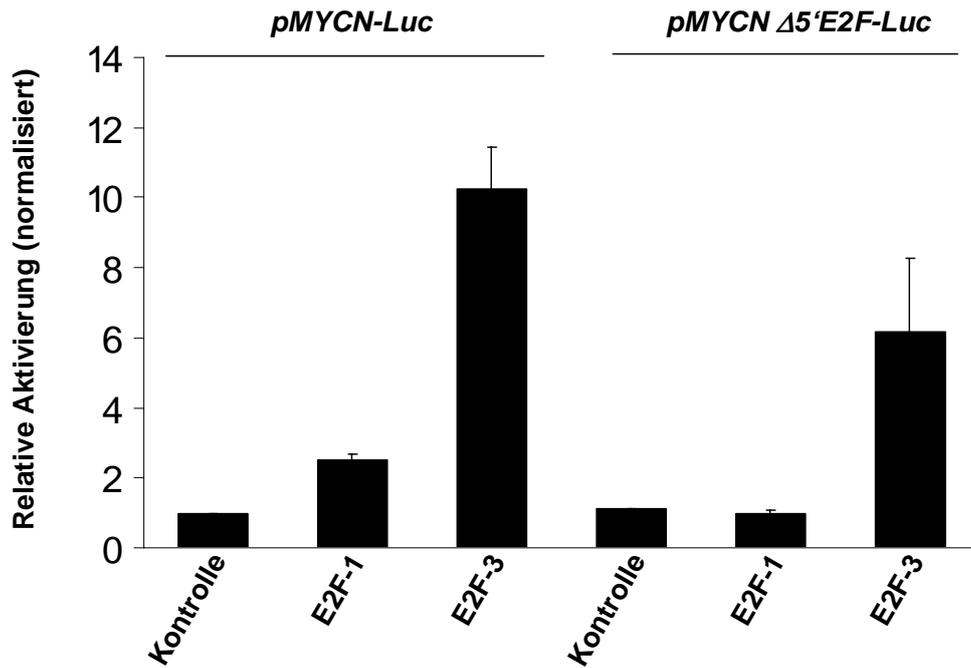


Abbildung 6: Aktivierung des *MYCN*-Promotors durch E2F-1 und E2F-3 in SH-EP in partieller Abhängigkeit von der in Richtung des 5'-Endes gelegenen E2F-Bindungsstelle

SH-EP-Zellen wurden mit dem *MYCN*-Wildtyp-Reporterplasmid pMYCN-Luc bzw. dem Reporterplasmid pMYCNΔ5'E2F-Luc, in dem die in Richtung des 5'-Endes gelegene E2F-Bindungsstelle eine Punktmutation aufweist, sowie Expressionsplasmiden für E2F und DP-1 bzw. dem Leervektor pcDNA3 als Kontrolle kotransfiziert. Die anhand der Zahl der GFP-positiven Zellen bestimmte Transfektionseffizienz war in allen Zellschalen vergleichbar (etwa 40 %). Nach zwei Tagen wurden die Luciferaseaktivität und der Proteingehalt der Lysate gemessen und die enzymatische Aktivität der Luciferase durch Bildung eines Quotienten aus beiden Werten normalisiert. Dargestellt ist die normalisierte Luciferaseaktivität in mit E2F- und DP-1-Expressionsplasmiden transfizierten Zellen in Relation zu nur mit dem Leervektor transfizierten Zellen.

Um unspezifische Effekte auf die Aktivität des *MYCN*-Promotors, bedingt durch zu hohe Mengen des transfizierten Konstrukts, auszuschließen, wurden in diesem Experiment geringere Konzentrationen an E2F-3-Expressionsplasmid eingesetzt und entsprechend größere Mengen des Leervektors verwendet (s. Abschnitt 3.2.2).

Mit der reduzierten Plasmidmenge ließ sich die Aktivierung des Promotors mit defekten E2F-Bindungsstellen auf etwa 30 % im Vergleich zu der des Wildtyp-

reporters reduzieren (Abb.7). Es wurde deutlich, dass das Ausmaß der Promotoraktivierung klar von der eingesetzten Menge an E2F-3-Expressionsplasmid abhängig war, d. h. mit ansteigender E2F-3-Expression stieg auch die Luciferaseaktivität (Abb.7).

Es lässt sich zusammenfassen: E2F-1 und E2F-3 sind aktivieren den *MYCN*-Promotor in SH-EP-Zellen; ihr Einfluss ist zumindest größtenteils von funktionellen E2F-Bindungsstellen abhängig.

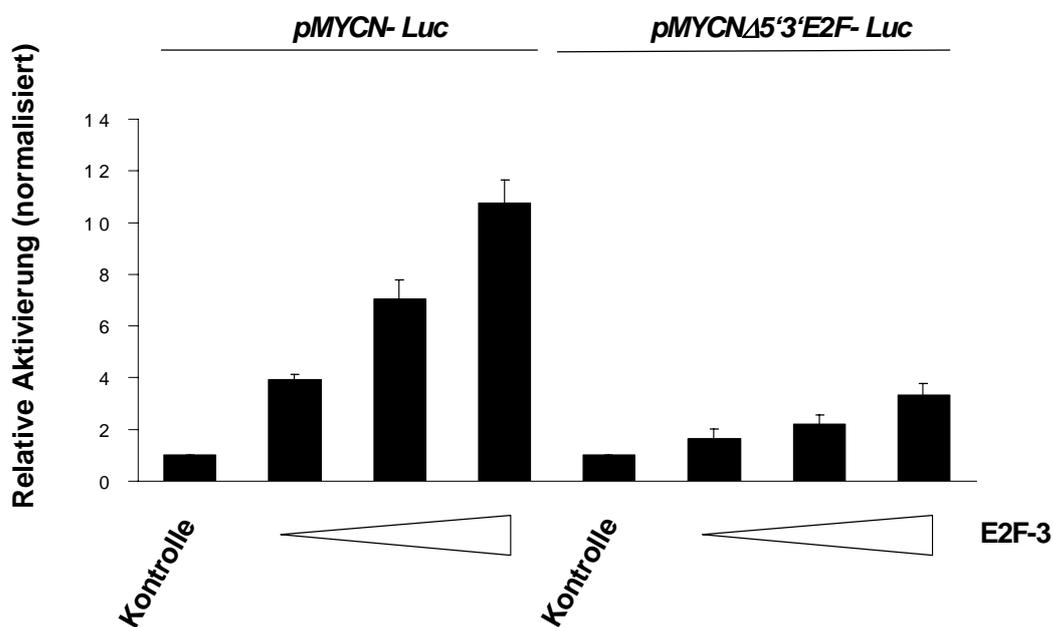


Abbildung 7: Abhängigkeit der Aktivierung des *MYCN*-Wildtyp-Promotors durch E2F-3 von funktionellen E2F-Bindungsstellen

SH-EP- Zellen wurden mit dem *MYCN*wt-Reporter *pMYCN-Luc* bzw. dem an beiden E2F-Bindungsstellen punktmultierten *MYCN*-Reporterplasmid *pMYCN Δ 5'3'E2F-Luc* sowie mit ansteigenden Konzentrationen an E2F-3-Expressionsplasmid bzw. dem Leervektor pcDNA3 als Kontrolle kotransfiziert. Der Anteil GFP-positiver Zellen an der Zahl der gesamten Zellen war in allen Zellschalen vergleichbar (etwa 40 %). Nach 24 Stunden erfolgte die Messung von Luciferaseaktivität und Proteingehalt. Dargestellt sind die durch Bildung eines Quotienten aus beiden Werten normalisierten Luciferaseaktivitäten in Relation zur Basalaktivität des jeweils verwendeten Promotors.

4.2 Blockade des E2F-pRB-Signalwegs reprimiert *MYCN* in Neuroblastomzellen

4.2.1 P16^{INK4A} reprimiert endogenes *MYCN*

4.2.1.1 *Prinzip*

In den in Abschnitt 4.1 beschriebenen transienten Assays wurde der Effekt von E2F auf einen artifiziellen, den basalen *MYCN*-Promotor beinhaltenden, vermutlich stark überexprimierten Luciferasereporter untersucht. Da sich die Ergebnisse transientscher Transfektionen nicht ohne weiteres auf den endogenen *MYCN*-Promotor in Neuroblastomzellen übertragen lassen, wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss von E2F auf das endogene *MYCN*-Gen analysiert. Im folgenden Experiment sollte die Aktivität von endogenem E2F-1, E2F-2 und E2F-3 in Neuroblastomzellen gesenkt werden, um feststellen zu können, ob sich durch Blockade der E2F-Funktionen das Onkogen *MYCN* reprimieren ließe. IMR-32-Zellen sind humane Neuroblastomzellen, die sich durch starke Amplifikation des *MYCN*-Gens (etwa 100 Kopien sind pro Zelle vorhanden) und hohe Expression des Onkoproteins N-myc (Schwab et al., 1984) auszeichnen und sich daher gut für dieses Experiment eignen. Durch Überexpression von p16 in IMR-32-Zellen, welche normalerweise kein oder sehr geringe Mengen an p16 exprimieren (Takita et al., 1997), sollte die Cyclin D/Cdk4/6-Aktivität gesenkt und damit die Hyperphosphorylierung endogenen pRB-Proteins weitgehend verhindert werden, so dass pRB möglichst stark an endogenes E2F binden und z.B. durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen die E2F-abhängige Aktivierung von Zielgenen verhindern sollte. Stimmt die Hypothese, dass E2F maßgeblich an der Aufrechterhaltung einer starken Expression von N-myc beteiligt sei, dann sollte durch Überexpression von p16 und somit durch Hemmung E2F-abhängiger Promotoraktivierung *MYCN* reprimierbar sein. Eine Infektion der Neuroblastomzellen mit rekombinanten Retroviren, die das *p16*-Gen in die DNA der Wirtszellen transduzieren, sollte die p16-Überexpression gewährleisten.

Durch künstliche Expression des Ekotrophen Rezeptors, der sich natürlicherweise nur auf der Oberfläche von Zellen der Maus findet, können auch humane

Zellen mit für Mäuse pathogenen Viren infiziert werden (s. Abschnitt 3.3.2). Um dies zu gewährleisten, wurden IMR-32-Neuroblastomzellen stabil mit einem Plasmid transifiziert, welches für den Ekotrophen Rezeptor der Maus kodiert und gleichzeitig ein Resistenzgen für das Antibiotikum Neomycin aufweist. Die den Ekotrophen Rezeptor exprimierenden IMR-32-Zellen wurden folglich durch Zugabe von G418 zu dem Zellmedium selektiert. Es wurden Ekotrophe Retroviren hergestellt, die das *p16*-Gen oder einen entsprechenden Leervektor in die Neuroblastomzellen transduzieren können. Mit diesen Viren wurden die den Ekotrophen Rezeptor exprimierenden IMR-32-Zellen infiziert. Auf dem für *p16* kodierenden Plasmid sowie dem Leervektor befindet sich wiederum ein Resistenzgen für das Antibiotikum Hygromycin, so dass infizierte IMR-32-Zellen durch Zugabe von Hygromycin zu dem Zellmedium ausselektiert werden konnten. Nach der Gewinnung von RNA aus den infizierten Zellen und Synthese von cDNA konnte die Expression von E2F-Zielgenen sowie *MYCN* auf RNA-Ebene untersucht werden (s. Abschnitt 3.4).

4.2.1.2 P16^{NK4A} senkt die MYCN-Expression in Neuroblastomzellen mit MYCN-Amplifikation

Nach der retroviralen Infektion fielen bei den zur Kontrolle der Infektionseffizienz parallel infizierten MEF eine veränderte Zellmorphologie und Wachstumskinetik spezifisch in den *p16*, nicht jedoch in lediglich den Leervektor exprimierenden Zellen, auf. Erstere sahen wesentlich kleiner und abgerundeter aus; sie schienen zudem kaum noch zu proliferieren, was in Anbetracht der Überexpression von *p16* und der resultierenden Hemmung der E2F-Aktivität plausibel erschien (Daten nicht gezeigt). Bei den infizierten Neuroblastomzellen zeigten sich diese Unterschiede in geringerem Ausmaß. Vielmehr schienen diese bereits durch die Infektion selbst in ihrer Proliferation beeinträchtigt, denn sowohl die *p16* als auch die den Leervektor exprimierenden Zellen wiesen ein deutlich verlangsamtes Wachstum und eine erhöhte Apoptoserate auf.

Im Anschluss an die Selektion mit Hygromycin wurde aus den resistenten IMR-32-Zellen RNA isoliert und die Expression von *p16*-, *CCNE1*- und *MYCN*-mRNA in *p16* überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Leervektor exprimierenden Zellen mit Hilfe einer RT-PCR getestet.

Diese verdeutlichte die stark gesteigerte *p16*-mRNA-Menge (Abb. 8). Die Expression des E2F-Zielgens *CCNE1* sank, wie erwartet, durch Überexpression von *p16* ab (Abb. 8), was die Funktion der verwendeten Viren einerseits und die Intaktheit des Signalwegs *p16*→*Cdk*→*Cyclin*→*pRB* in IMR-32-Zellen nahelegt. Die Expression von *MYCN*-mRNA schien durch Überexpression von *p16* deutlich abzunehmen (Abb. 8).

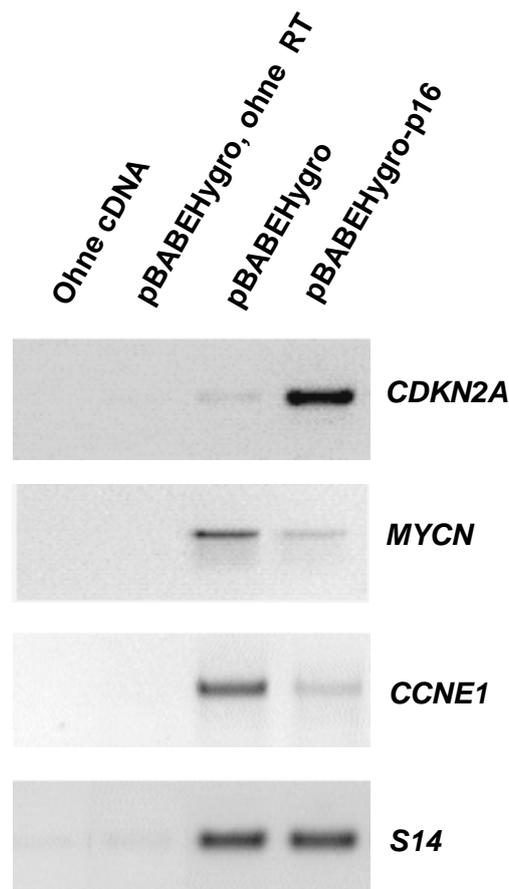


Abbildung 8: P16 reguliert die Expression von *MYCN* in humanen Neuroblastomen.

Mit dem Ekotrophen Rezeptor stabil transifizierte IMR-32-Zellen wurden mit pBABEHygro-p16 bzw. den Leervektor transduzierenden Retroviren infiziert. 48 Stunden später begann die Selektion der infizierten Zellen mittels des Antibiotikums Hygro, weitere 48 Stunden danach wurden die Zellen geerntet und ihre RNA in cDNA umgeschrieben. Für die Negativkontrolle wurde in der Erststrangsynthesereaktion die Reverse Transkriptase weggelassen (pBABEHygro, ohne RT). Es wurden RT-PCR mit Primern für *CDKN2A* (*p16*)-, *MYCN*-, *CCNE1*- und *S14* (Ladekontrolle)-cDNA durchgeführt. Ein Reaktionsansatz ohne cDNA diente als Negativkontrolle.

4.2.2 Dominant negatives E2F-1 und E2F-1 mit defekter DNA-Bindungsdomäne reprimieren das endogene MYCN-Onkogen

4.2.2.1 Prinzip

Wie in Kap. 4.2.1 geschildert, ließ sich durch p16 in IMR-32-Zellen die Menge der endogenen *MYCN*-RNA senken. Daraus lässt sich zumindest eine partielle Intaktheit des Signalwegs $p16 \rightarrow Cdk \rightarrow Cyclin \rightarrow pRB/E2F$ in den Neuroblastomzellen ableiten. Um festzustellen, ob der durch Überexpression von p16 ausgelöste Effekt tatsächlich durch Senkung der endogenen E2F-Aktivität zustande gekommen sein konnte, wurden dominant negatives E2F-1 (E2F-1(1-374)) und E2F-1 mit defekter DNA-Bindungsdomäne (E2F1(E132)), beide mit dem Östrogen-Rezeptor der Maus fusioniert, stabil in IMR-32-Zellen transfiziert. Dem dominant negativen E2F-1-Protein, für das das E2F-1(1-374)-ER-Plasmid kodierte, fehlte die gesamte Transaktivierungs- und pRB-Bindedomäne, während die verbleibenden Domänen des Transkriptionsfaktors intakt waren (Helin et al., 1994). Folglich sollte das chimäre Protein in der Lage sein, an DNA und den Dimerisierungspartner DP-1 zu binden. Allerdings sollte es ihm nicht mehr möglich sein, den jeweiligen Promotor, an den es gebunden hat, in diesem Fall den *MYCN*-Promotor, zu transaktivieren. Durch die Überexpression des transfizierten chimären Proteins wurde erwartet, dass es in der Lage sei, endogenes Wildtyp-E2F von den E2F-Bindungsstellen der Zielgenpromotoren zu verdrängen und damit die Funktionen der endogenen E2F-Proteine zu antagonisieren. Bei dem parallel transfizierten E2F-1 mit afunktionaler DNA-Bindungsdomäne lag lediglich eine Mutation in dem für die DNA-Bindedomäne kodierenden DNA-Abschnitt vor (Johnson et al., 1993). Folglich sollte das entsprechende chimäre Protein in der Lage sein, endogene transkriptionelle Koregulatoren der E2F-Familie zu rekrutieren und von der Bindung an Promotorregionen unabhängige E2F-Funktionen auszuüben. Dagegen sollte es ihm nicht möglich sein, an E2F-Bindungsstellen endogener Promotoren zu binden und diese zu transaktivieren. Wenn nun endogenes E2F-1 in *MYCN*-amplifizierenden Tumoren daran beteiligt wäre, als ein die *MYCN*-Transkription aktivierender Faktor die starke Expression des Onkoproteins aufrechtzuerhalten, so sollte es möglich sein, mit dominant negativem E2F-1 die Expression des endogenen N-myc-Proteins zu

senken. Für den Fall, dass die Rolle der E2F-Proteine in der Regulation der N-myc-Expression zum großen Teil von transkriptionellen Kofaktoren abhängig wäre, wäre es denkbar, mit in der DNA-Bindungsdomäne mutiertem E2F-1, welches eben diese Kofaktoren sequestriert, aber nicht an die spezifischen E2F-Bindungsstellen gelangen kann, ebenfalls die N-myc-Expression zu beeinflussen. Um den Einfluss zusätzlicher, E2F-unabhängiger oder indirekter Faktoren auf die Genregulation, welche zum Beispiel durch Transfektion oder retrovirale Infektion von Zellen hervorgerufen werden können, nach Möglichkeit ausschließen und gleichzeitig eine möglichst homogene Zellpopulation benutzen zu können, wurden Einzelklone hergestellt, die ein funktionierendes, durch stabile Transfektion übertragenes E2F-ER-System beinhalten (Vigo et al., 1999). In diesem System liegt E2F-1 bzw. E2F-2 gekoppelt an die Liganbindedomäne des Östrogen-Rezeptors der Maus vor. Dieser Rezeptor ist durch eine Punktmutation so verändert, dass natürlicherweise vorkommendes Östrogen, das z.B. auch in fetalem Kälberserum vorhanden ist, nicht mehr an ihn binden kann. Stattdessen besitzt er eine hohe Affinität für 4-Hydroxy-Tamoxifen, ein synthetisches Östrogen-derivat mit östrogenantagonistischen Eigenschaften, welches weder intrazellulär noch im Medium der Zellen vorkommt und zudem nicht in der Lage ist, an humane Steroidrezeptoren zu binden (Littlewood et al., 1995). Ohne Zugabe von Hydroxytamoxifen liegt das chimäre Protein im Zytoplasma in inaktivem Zustand vor. Behandelt man die Zellen nun mit Hydroxytamoxifen durch Zugabe des Pharmakons zu dem Nährmedium, so bindet dieses im Zytoplasma an den im Fusionsprotein enthaltenen Östrogen-Rezeptor; das chimäre Protein aus E2F und Rezeptor wandert in den Kern. Der Transkriptionsfaktor E2F kann nun an seine Bindungsstellen gelangen und die Genexpression seiner endogenen Zielgene beeinflussen. Somit lässt sich mit Hilfe dieses Systems die Präsenz und Aktivität von E2F im Kern der Tumorzelle an- und abschalten, ohne dass das zelluläre Milieu in anderer Weise beeinflusst wird.

4.2.2.2 Herstellung und Auswahl von Klonen, die stabil regulierbares dominant negatives *E2F-1* und *E2F-1* mit defekter DNA-Bindungsdomäne exprimieren

IMR-32-Zellen wurden mit für die mutierten E2F-ER-Fusionsproteine kodierenden Expressionsplasmiden stabil transfiziert und als Einzelklone kultiviert (s. Abschnitt 3.2.2). Bei der Kultivierung der Klone fiel eine wesentlich geringere Proliferationsrate, verglichen zu den Wildtyp-IMR-32-Zellen, sowie ein gesteigertes Vorkommen von Apoptose auf. So konnten sie lediglich alle zwei bis drei, teilweise auch erst nach vier Wochen neu gesplittet werden und durften nur 1 : 2 verdünnt werden, während Wildtypzellen durchaus nach 3 bis 4 Tagen 1 : 10 gesplittet werden konnten. Zudem waren sie auf konditioniertes Medium (1 : 1 verdünnt mit Frischmedium) angewiesen. [Als konditioniertes Medium bezeichnet man ein Medium, welches zunächst als Frischmedium gut proliferierenden Zellen zugesetzt und später wieder aus der Kulturschale abgesaugt und steril filtriert wird. Während der Wachstumsphase sondern die Zellen Wachstumsfaktoren in das Medium ab, welche anschließend zur Stimulation der Zellproliferation anderer Zellen eingesetzt werden können (s. Abschnitt 2.2.3)]. Diese Veränderungen waren bei allen Klonen und ohne Zugabe von OHT zu beobachten. Zudem war das morphologische Erscheinungsbild aller Klone gegenüber den Wildtypzellen verändert: Die Klone wuchsen nicht nur adhärent auf der Kulturschalenoberfläche in zweidimensionaler Form, sondern bildeten dreidimensionale Aggregate von Zellen, welche teilweise den Kontakt zur Kulturschalenoberfläche komplett verloren hatten, aber auf einer Gelatineoberfläche wieder adhärent weiterwuchsen. Durch Zugabe von OHT änderte sich an diesem Wachstumsverhalten, der hohen Apoptoserate und dem morphologischen Erscheinungsbild nichts. Das transfizierte Fusionsprotein wurde auf RNA-Ebene mittels Primern, welche mRNA des Östrogen-Rezeptors der Maus binden, nachgewiesen: Drei von neun Klonen exprimierten *E2F-1(E132)-ER*-mRNA [hier mit (E132) abgekürzt], sieben von acht Klonen *E2F-1(1-374)-ER*-mRNA [abgekürzt (1-374)] .

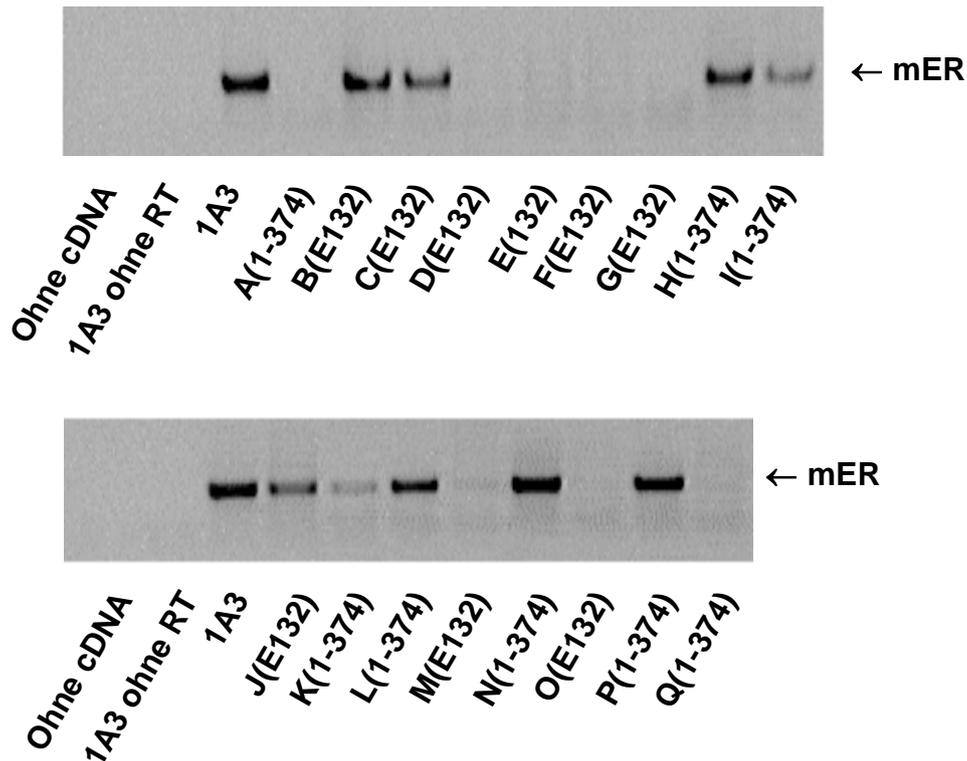


Abbildung 9: Drei IMR-32-Klone exprimierten E2F-1(E132)-ER [Klone B-,C- und G-(E132)], sechs E2F-1(1-374)-ER [Klone H-, I-, K-, L-, N- und P-(1-374)] auf RNA-Ebene.

Zellen der Klone wurden geerntet und ihre RNA in cDNA transkribiert. Als Positivkontrolle diente parallel transkribierte RNA des E2F-1(wt)-ER-überexprimierenden Klons 1A3 (s. Abschnitt 4.3), als Negativkontrolle eine Probe ohne Reverse Transkriptase. Die resultierenden Erststränge wurden für eine RT-PCR des Östrogen-Rezeptors der Maus (mER) eingesetzt. Eine Probe ohne cDNA diente als Negativkontrolle.

Abkürzungen: E132: E2F-1(E132)-ER; 1-374: E2F-1(1-374)-ER

4.2.2.3 *Repression der endogenen CCNE1- und MYCN-Gene durch dominant negatives E2F-1 sowie durch E2F-1 mit defekter DNA-Bindungsdomäne*

Eine mögliche Erklärung für das veränderte Wachstumsverhalten und die Morphologie der Klone wäre gewesen, dass das transfizierte Fusionsprotein bereits ohne Induktion durch OHT im Kern der Zellen aktiv war. Dies war jedoch insofern unwahrscheinlich, als nicht in allen Klonen, die die genannten Auffälligkeiten aufwiesen, die *mER*-mRNA detektierbar war. Dennoch wurde in einem

ersten Experiment zur *MYCN*-Regulation durch mutiertes E2F in Neuroblastomzellen die *MYCN*-Expression von IMR-32-Wildtypzellen mit den stabil E2F-1(E132)- und E2F-1(1-374)-ER exprimierenden Klonen verglichen. Es stellte sich heraus, dass die Expression von *MYCN*-mRNA in allen Klonen mit Ausnahme des Klons K(1-374) offensichtlich stärker war als in untransfizierten Wildtyp-Zellen (Daten nicht gezeigt). Um jedoch besser vergleichbare Daten zu erhalten, wäre es nötig gewesen, IMR-32-Zellen mit einem Leervektor zu transfizieren, welcher lediglich *mER*-mRNA, idealerweise gekoppelt an eine für ein komplett afunktionelles Protein kodierende cDNA, beinhaltet. Die Expression von *MYCN* ließ sich durch Aktivierung von E2F-1(E132)-ER in Klon J(E132) sowie von E2F-1(1-374)-ER in Klon L(1-374) absenken (Abb. 10), während es in den anderen Klonen offensichtlich nicht durch Aktivierung des E2F-ER-Systems zu beeinflussen war (Daten nicht gezeigt). Somit war die Menge detektierbarer *MYCN*-mRNA durch Aktivierung von dominant negativem E2F-1 bzw. E2F-1 ohne intakte DNA-Bindungsdomäne in je einem Klon absenkbar (Abb. 10). Gleichzeitig bestätigte die Ladekontrolle, in welcher mRNA des *S14*-Gens nachgewiesen wurde, dass bei Klon J(E132) gleiche Mengen an RNA für beide Proben, bei Klon K(1-374) sogar eine etwas größere Menge für die Probe des mit OHT behandelten Klons als für die des nur mit Ethanol behandelten Klons eingesetzt worden waren (Abb. 10). Um herauszufinden, welchen Einfluss die chimären mutierten E2F-ER-Proteine auf die Regulation klassischer, bekannter E2F-Zielgene haben, wurde aus RNA der Klone eine RT-PCR durchgeführt, in der mRNA des Zellzyklusgens *CCNE1* nachgewiesen werden sollte. *CCNE1* erwies sich in diesem Experiment als durch dominant negatives E2F-1 sowie durch E2F-1 mit defekter DNS-Bindungsdomäne in ähnlicher Weise reguliert wie *MYCN*: In den Klonen K(1-374) und J(E132) wurde seine Expression durch Aktivierung des E2F-ER-Systems gesenkt. Es lässt sich festhalten: Sowohl *CCNE1* als bekanntes Zielgen von E2F als auch *MYCN* wurden durch E2F-1 mit defekter DNA-Bindungsdomäne als auch durch dominant negatives E2F-1 in IMR-32-Neuroblastomzellen reprimiert [in den Klonen J(E132) und K(1-374)].

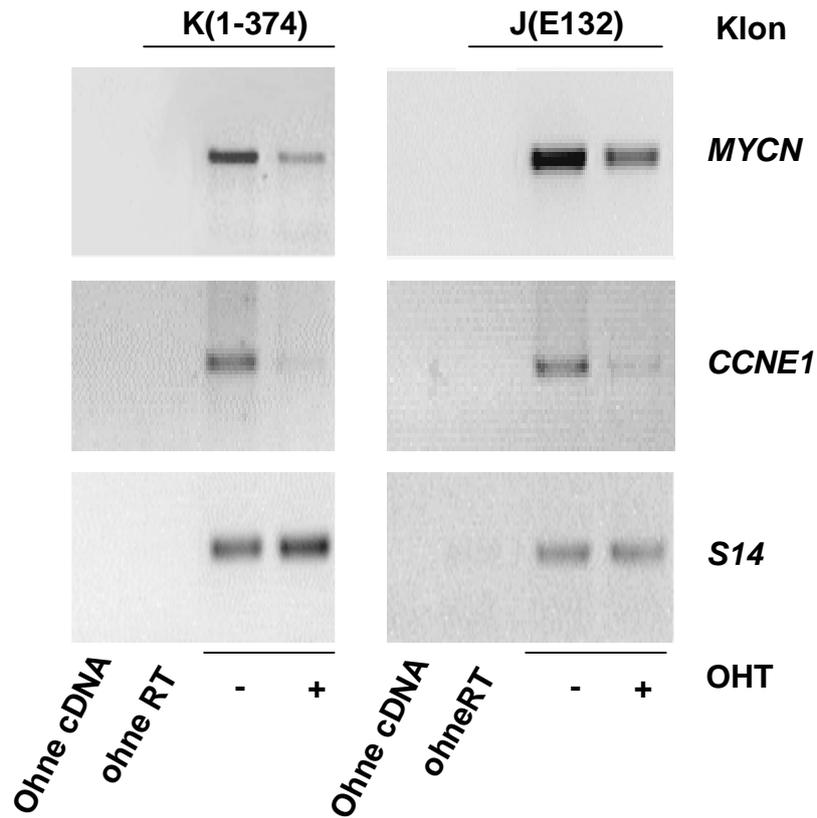


Abbildung 10: Das endogene MYCN-Gen wird durch dominant negatives E2F-1 und durch E2F-1 mit afunktionaler DNA-Bindungsdomäne reprimiert.

Die IMR-32-Klone J(E132) und K(1-374) wurden für 24 Stunden mit OHT bzw. Ethanol (Kontrolle) behandelt. Ihre RNA wurde in cDNA transkribiert. In einem Reaktionsansatz wurde als Negativkontrolle keine Reverse Transkriptase hinzugefügt. Die entstandenen Erststränge wurden für RT-PCR mit Primern für MYCN- CCNE1- und S14 (Ladekontrolle)-cDNA eingesetzt. Eine Probe ohne cDNA diente als Negativkontrolle.

Abkürzungen: E132: E2F-1(E132)-ER; 1-374: E2F1(1-374)-ER

4.3 E2F-Überexpression ist in Neuroblastomzellen nicht ausreichend, um den endogenen *MYCN*-Promotor zu aktivieren

4.3.1 Herstellung von Zellklonen mit stabiler Expression von E2F-ER-Fusionsproteinen

In den bisherigen Experimenten hatte sich bereits gezeigt, dass für eine hohe Expression von *MYCN*-mRNA endogene E2F-Aktivität benötigt wird. Nun stellte sich die Frage, ob E2F-Aktivität auch *hinreichend* ist, um den endogenen *MYCN*-Promotor zu aktivieren.

Analog zu den Experimenten, in denen durch Inhibierung endogener Funktion von E2F-1 die Expression von *MYCN*-mRNA gesenkt wurde, sollte durch Überexpression von E2F-Proteinen in SH-EP-Zellen, welche das Onkogen nicht exprimieren, die *MYCN*-Expression aktiviert werden. Durch die Verwendung von E2Fwt-ER-exprimierenden Einzelklonen mit durch OHT regulierbarer E2F-Aktivität sollte es möglich sein, den spezifischen Effekt von E2F-Proteinen auf die Expression von *MYCN* zu untersuchen.

Plasmide, welche die cDNA der E2F-ER-Fusionsproteine beinhalten, wurden mittels Calciumphosphat-Präzipitation in SH-EP-Zellen transfiziert (s. Abschnitt 3.2.2). Diese Plasmide enthalten neben dem chimären Konstrukt cDNA für einen Hämagglutinin/Agglutinin (HA)-Tag, welcher in untransfizierten Zellen nicht vorkommt und dem experimentellen Nachweis des Genprodukts des transfizierten Plasmids dient. Darüber hinaus beinhalten sie ein Resistenzgen für das Aminoglykosid Neomycin (G418), das eine Selektion der Zellen ermöglicht, die das chimäre Protein exprimieren. Alle unter G418 überlebenden Einzelklone (17 mit E2F-1-ER- und 20 mit E2F-2-ER-transfizierte Klone) wurden für 12 Stunden mit OHT bzw. Ethanol, dem Lösungsmittel, in welchem OHT gelöst vorlag, behandelt und anschließend ihr Kernprotein extrahiert. So konnten mittels eines Western-Blots die Klone identifiziert werden, welche das chimäre Protein exprimierten (s. Abschnitt 3.5). Für den Proteinnachweis fand ein monoklonaler Antikörper Verwendung, der den HA-Tag erkennt. Von den 37 Klonen exprimierten nur je einer das E2F-1- und das E2F-2-ER-Fusionsprotein in detektierbarem Ausmaß auf Proteinebene (Abb. 11). Für Klon 1A3, welcher E2F-1-ER exprimierte, ließ sich durch OHT-Zugabe eine Anreicherung des

Fusionsproteins im Kern feststellen, was jedoch bei dem E2F-2-ER-exprimierenden Klon 2B3 nicht erkennbar war. Das positive Signal in der Spur links neben dem Proteinextrakt aus dem nicht mit OHT behandelten Klon 2B3 war vermutlich durch eine Kontamination mit Protein aus der Nachbarspur bedingt, da bei dem betreffenden Klon nach OHT-Zugabe kein Fusionsprotein erkennbar war (Abb. 11).

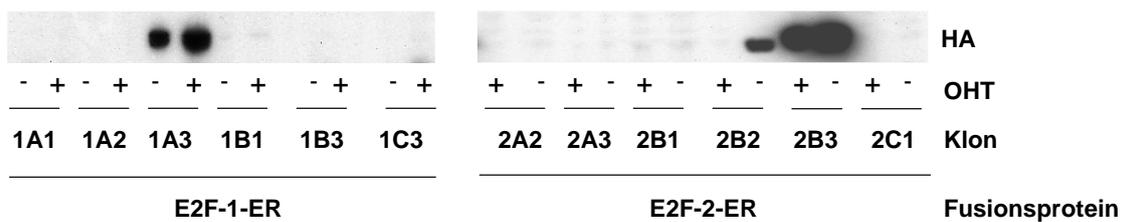


Abbildung 11: Jeweils ein SH-EP-Klon exprimiert das stabil transfizierte E2F-1- und E2F-2-ER-Fusionsprotein.

Um von den durch stabile Transfektion mit den Plasmiden pCMV-HA-ER-E2F-1 bzw. pCMV-HA-ER-E2F-2 entstandenen SH-EP-Klonen diejenigen zu identifizieren, welche das transfizierte Fusionsprotein exprimierten, wurden die Klone mit OHT bzw. Ethanol (Kontrolle) behandelt, Kernextrakte hergestellt und äquivalente Mengen an Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der anschließende Western-Blot mit einem Antikörper gegen den HA-Tag, der an die chimären Proteine gekoppelt ist, zeigt, dass der Klon 1A3 das E2F-1-ER- und der Klon 2B3 das E2F-2-ER-Fusionsprotein exprimierten.

4.3.2 Aktiviertes E2F-1-ER-Fusionsprotein induziert Apoptose in Neuroblastomzellen und reguliert E2F-Zielgene

Um festzustellen, ob das E2F-ER-System in den beiden Klonen 1A3 und 2B3 tatsächlich funktionstüchtig war, wurde überprüft, ob durch Zugabe von 4-OHT zu dem Medium der Klone und somit durch Aktivierung des E2F-ER-Proteins bekannte E2F-Zielgene reguliert werden. Zu diesem Zweck wurden die *CCNE1*- und *INHBA*-Gene ausgewählt. *INHBA* kodiert für den durch E2F-1 und E2F-2 reprimierbaren Angiogeneseinhibitor Inhibin β A (Ishida et al., 2001). Parallel zur

Aktivierung von E2F-ER durch OHT wurden die Chromatinmodulatoren 5aC und TSA eingesetzt. Beide Substanzen sind in der Lage, abgeschaltete Gene zu dereprimieren, indem sie eine repressive Chromatinstruktur aufheben (El-Osta et al, 2002). 5aC ist ein Hemmstoff von DNA-Methyltransferasen, der ermöglichen sollte, das Chromatin für Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie zugänglicher zu machen, da die Methylierung sog. *CpG-Islands*, wie sie im *MYCN*-Promotor vorhanden sind, die Bindung der Proteine erschweren kann (DiFiore et al., 1999; Campanero et al., 2000). TSA, ein Hemmstoff von Histondeacetylasen, zeigte sich in transienten Transfektionen als Aktivator des *MYCN*-Promotors (nicht gezeigte Daten). Nach Behandlung der E2F-ER-exprimierenden Klone mit OHT, 5aC und / oder TSA bzw. den entsprechenden Lösungsmitteln, Extraktion von mRNA und Erststrangsynthese wurden RT-PCR für cDNA von *CCNE1*, *INHBA* und dem ribosomalen Gen *S14* durchgeführt (s. Abschnitt 3.4.5). Es wurde deutlich, dass durch E2F-1-ER in dem Klon 1A3 *CCNE1* aktiviert wurde (Abb. 12), während Klon 2B3 auf die OHT-Behandlung nicht mit einer Expressionssteigerung von *CCNE1* reagierte (Daten nicht gezeigt). Folglich wurde für die weiteren Experimente zur Genexpression lediglich Klon 1A3 eingesetzt. *CCNE1* war in allen Proben aus dem mit OHT behandelten Klon 1A3 aktiviert, blieb jedoch unbeeinflusst von 5aC und TSA (Abb.12), was darauf hinweist, dass die Chromatinstruktur des *CCNE1*-Gens in SH-EP-Zellen, welche hohe Proliferationsraten aufweisen, möglicherweise schon soweit „geöffnet“ ist, dass einer Bindung von Transkriptionsfaktoren nichts im Wege steht. *INHBA* als von E2F reprimiertes Gen wurde durch Aktivierung des E2F-1-ER-Systems mit OHT tatsächlich reprimiert (Abb. 12; vgl. „Ethanol“ mit „OHT“), durch TSA aktiviert (vgl. „Ethanol“ mit „TSA“) und durch 5aC kaum beeinflusst (vgl. „DMSO“ mit „5aC“). Durch kombinierte Behandlung mit OHT und TSA wurde deutlich, dass die Repression von *INHBA* durch E2F-1-ER offensichtlich dessen Aktivierung durch TSA aufhob (Abb. 12). Möglicherweise liegt E2F-1 in der auf den *INHBA*-Promotor einwirkenden Regulationskaskade unterhalb von HAT, was mit gängigen Modellen übereinstimmt, in denen durch HAT und Chromatinremodeling Transkriptionsfaktoren der Zugang zu ihrem Zielpromotor erleichtert wird. Eine RT-PCR des ribosomalen *S14*-Gens diente als Kontrolle dafür, dass gleiche Mengen cDNA eingesetzt

worden waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass das transfizierte E2F-1-ER-Fusionsprotein in Klon 1A3 die Funktionen des endogenen E2F-1 imitierte. Unklar blieb, weshalb sich in dem E2F-2-ER-exprimierenden Klon 2B3 die Expression von *CCNE1* nicht durch das Fusionsproteins aktivieren ließ.

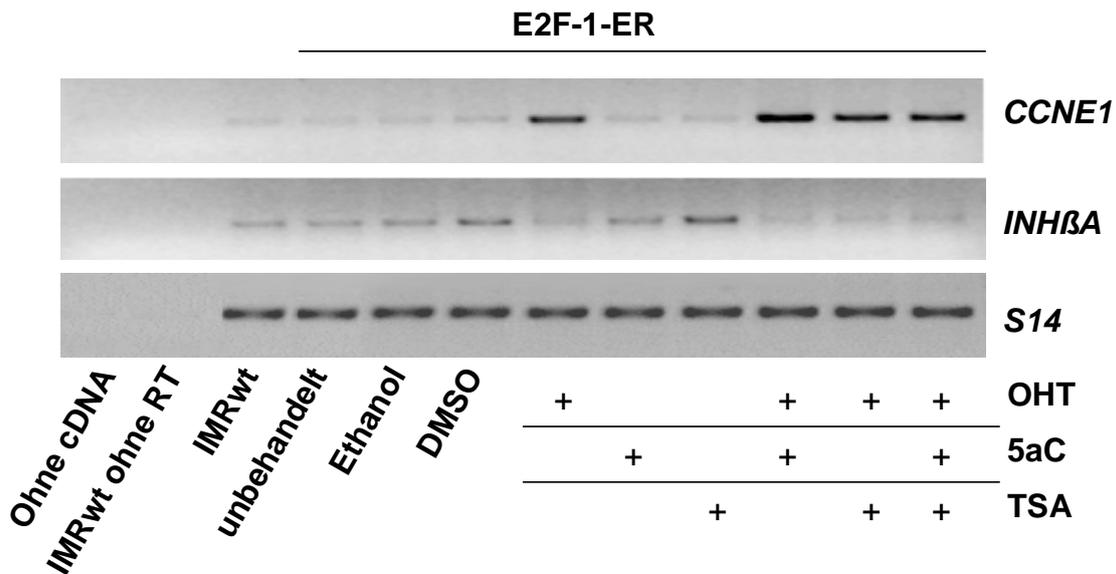


Abbildung 12: E2F-1-ER aktiviert *CCNE1* und reprimiert *INHBA* in humanen Neuroblastomzellen.

Zellen des Klons 1A3 wurden mit OHT, 5aC und / oder TSA bzw. deren Lösungsmitteln Ethanol oder DMSO (Kontrolle) behandelt oder unbehandelt (Kontrolle) gelassen. Zellen des Klons 1A3 sowie parallel kultivierte IMR-32-Zellen wurden lysiert und ihre RNA in cDNA transkribiert. Die resultierenden Erststränge wurden für RT-PCR mit Primern für *CCNE1*-, *INHBA*- und *S14* (Ladekontrolle)-cDNA eingesetzt. Als Negativkontrollen diente eine Erststrangsyntheseprobe ohne Reverse Transkriptase sowie ein PCR-Probe ohne cDNA.

Bei der Behandlung der Zellen mit OHT fiel auf, dass Klon 1A3 auf Zugabe von OHT, nicht aber nach Behandlung mit Ethanol, mit Apoptose reagierte. Zum Erntezeitpunkt 24 Stunden nach OHT-Zugabe war bereits ein Großteil der Zellen abgestorben. Dies war bei Klon 2B3 nicht der Fall. Bei längerer Induktion des E2F-ER-Systems (über 2 Tage) in Klon 2B3 wurde auch dieser apoptotisch. Von Klon 1A3 waren nach 2 Tagen unter OHT-Einfluss keine lebenden

Zellen mehr auf der Kulturschale; bei Klon 2B3 dauerte es hingegen 4 bis 6 Tage, bis keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren. Nach unterschiedlich langer Behandlung der Klone mit OHT bzw. Ethanol wurde daher eine FACS-Analyse zur Bestimmung des DNA-Gehalts jeder einzelnen Zelle durchgeführt (s. Abschnitt 3.6). Apoptotische Zellen haben durch enzymatische Restriktion ihrer Nukleinsäuren einen DNA-Gehalt von weniger als $2n$; die Population dieser Zellen wird im folgenden mit *Sub-G1-Pool* bezeichnet. Klon 1A3 zeigte 24 Stunden nach Behandlung mit OHT einen Anstieg apoptotischer Zellen von 2,4 % auf 17,5 % der Gesamtpopulation; nach 36 Stunden waren 33,3 % der noch adhären Zellen apoptotisch (Abb. 13). Da zum Erntezeitpunkt jedoch nur noch sehr wenige Zellen auf den Zellkulturschalen vorhanden waren, war der reale Anteil apoptotischer Zellen sehr viel höher.

Klon 2B3 verhielt sich ähnlich, jedoch begann das Zellsterben wesentlich später (nach 2 bis 3 Tagen) und zog sich über einen längeren Zeitraum (3 bis 4 Tage) hin: nach 2 Tagen fand sich ein Anstieg des Anteils der Zellen im Sub-G1-Pool von 3,6 % auf 29,1 %, nach 4 Tagen waren 50 % und nach 4,5 Tagen 40 % der verbliebenen Zellen apoptotisch (Abb. 13).

Die E2F-Transkriptionsfaktoren E2F-1 bis -3 haben die Eigenschaft, die Proliferation von Säugetierzellen zu steigern, indem sie den Zellzyklus beschleunigen. Sie stimulieren den Eintritt einer Zelle, welche sich in der G1- oder G0-Phase des Zyklus befindet, in die S-Phase (s. Abschnitt 1.4). Um zu überprüfen, ob sich die Zellzyklusverteilung nach Aktivierung des E2F-ER-Fusionsproteins ändert, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt, welche es ermöglicht, den Anteil der Zellen einer Gesamtpopulation, der sich gerade in der G0/G1-Phase (DNA-Gehalt von $2n$), der S-Phase (DNA-Gehalt $2n$ bis $4n$) sowie der G2-Phase oder Mitose (DNA-Gehalt jeweils $4n$) befindet, zu bestimmen.

Für den Klon 1A3 lieferte die Zellzyklusanalyse folgende Ergebnisse (Abb. 14): Der Prozentsatz von Zellen in der G0- oder G1-Phase, welcher durch 10-stündige OHT-Behandlung noch nicht wesentlich verändert war (67 vs. 71 %), sank nach 25-stündiger Aktivierung der Fusionsproteine deutlich ab (48 vs. 74 %), was nach 36 Stunden Induktion noch eindrucksvoller zu beobachten war (37 vs. 68 %). Der Anteil der Zellen in der S-Phase war nach 10 Stunden kaum beeinflusst (20 vs. 18 %), stieg nach 25 Stunden an (28 vs. 13 %) und fiel nach 36 Stunden wieder ab (10 vs. 20 %).

Für den E2F-2-ER-exprimierenden Klon 2B3 fiel das Ergebnis etwas anders aus (Abb. 15): Der Anteil der Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus fiel nach zweitägiger Aktivierung des Fusionsproteins geringfügig ab (59 vs. 62 %), um nach 4 Tagen weiter zu sinken (41 vs. 63 %) und nach 4,5 Tagen nahezu nicht mehr nachweisbar zu sein (2 vs. 62 %). Der Anteil der Zellen in der S-Phase sank sowohl zwei (8 vs. 22 %) als auch 4 Tage (0 vs. 22 %) nach Beginn der OHT-Behandlung ab. Erst nach 4,5 Tagen war ein leichter Anstieg an Zellen in der S-Phase zu erkennen (38 vs. 23 %). Ähnlich wie der S-Phasen-Anteil verhielt sich der Anteil von Zellen in der G₂- und Mitosephase an der Gesamtpopulation: nach 2 Tagen (2 vs. 12 %) sowie nach 4 Tagen (3 vs. 12 %) sank er ab, um nach 4,5 Tagen ganz leicht zu steigen (14 vs. 13 %).

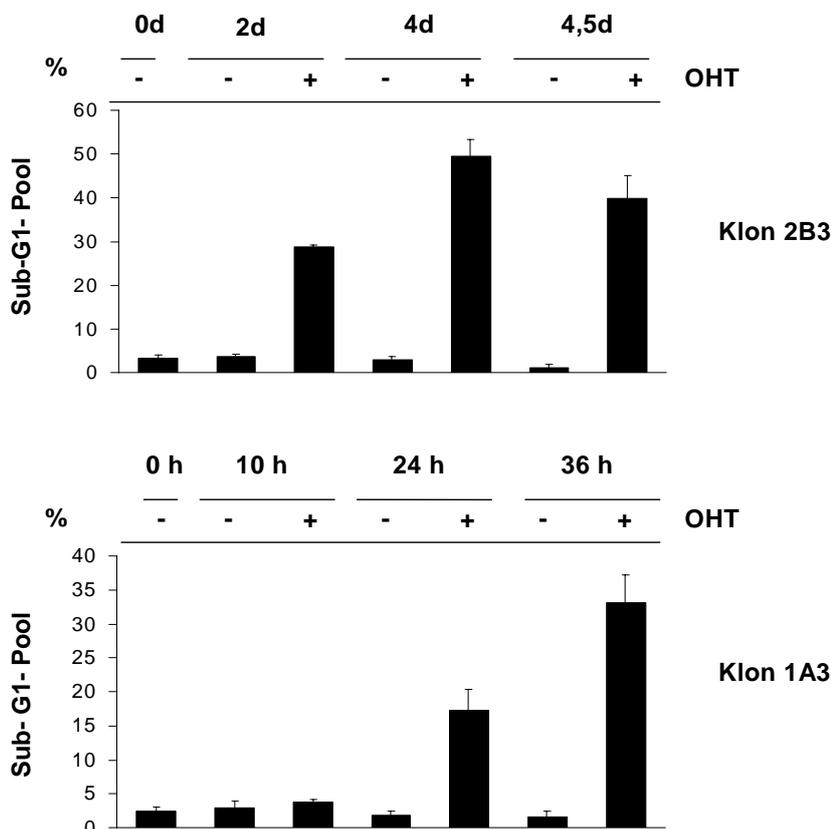


Abbildung 13: Aktivierung des E2F-1- bzw. E2F-2-ER-Systems in den SH-EP-Klonen induziert Apoptose.

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach OHT- bzw. Ethanolzugabe (Kontrolle) zu dem Nährmedium wurden die Zellen der E2F1-ER bzw. E2F2-ER überexprimierenden Klone 1A3 und 2B3 lysiert und ihr DNA-Gehalt durch FACS-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen mit einem DNA-Gehalt von weniger als 2n.

Ergebnisse

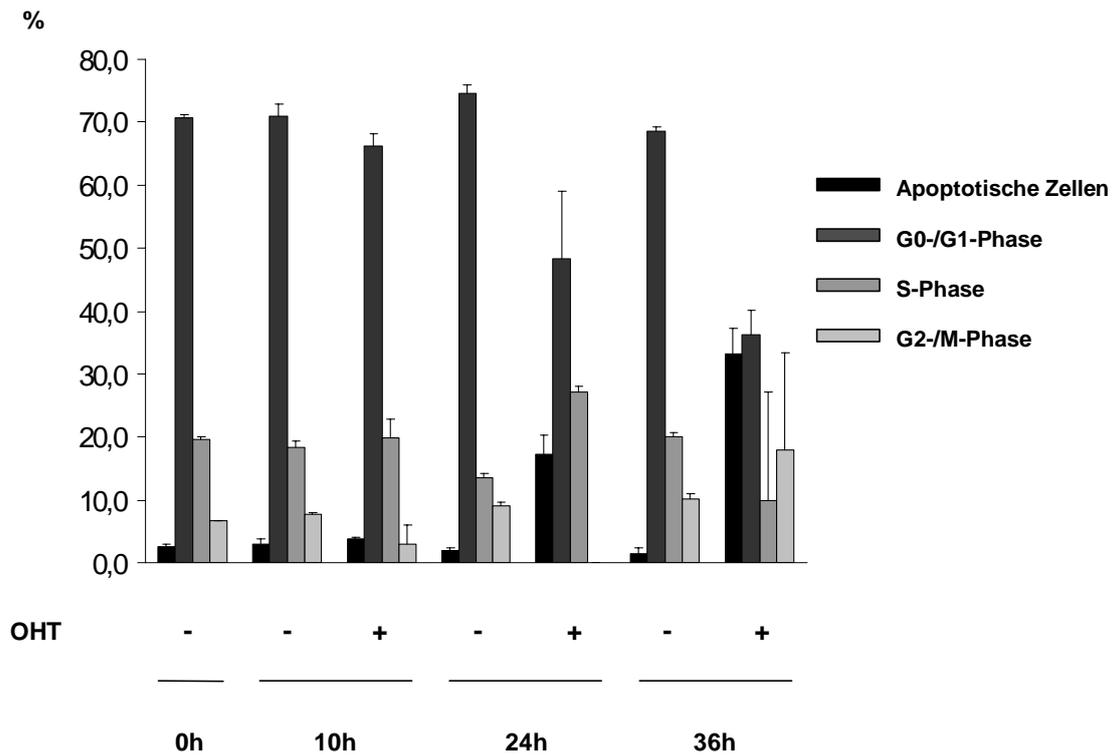


Abbildung 14: Zellzyklusverteilung des stabil E2F-1-ER exprimierenden SH-EP-Klons 1A3 zu Beginn des Experiments sowie nach 10-, 24- und 36-stündiger Aktivierung des E2F-1-ER-Fusionsproteins

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe von OHT bzw. Ethanol (Kontrolle) zu dem Kulturmedium wurden die Zellen lysiert und ihr DNS-Gehalt mittels FACS-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Zellen mit einem DNS-Gehalt von weniger als 2n (Sub-G1-Pool), 2n (G1-Phase), 2n bis 4n (S-Phase) und 4n (G2- und Mitosephase).

Es lässt sich folglich insgesamt feststellen, dass die Aktivierung vor allem des E2F-1-ER-Systems zu einer Verschiebung des Zellzyklus der Neuroblastomzellen von der G0/G1-Phase in die S-Phase bzw. zur Apoptose der Zellen führt.

Ergebnisse

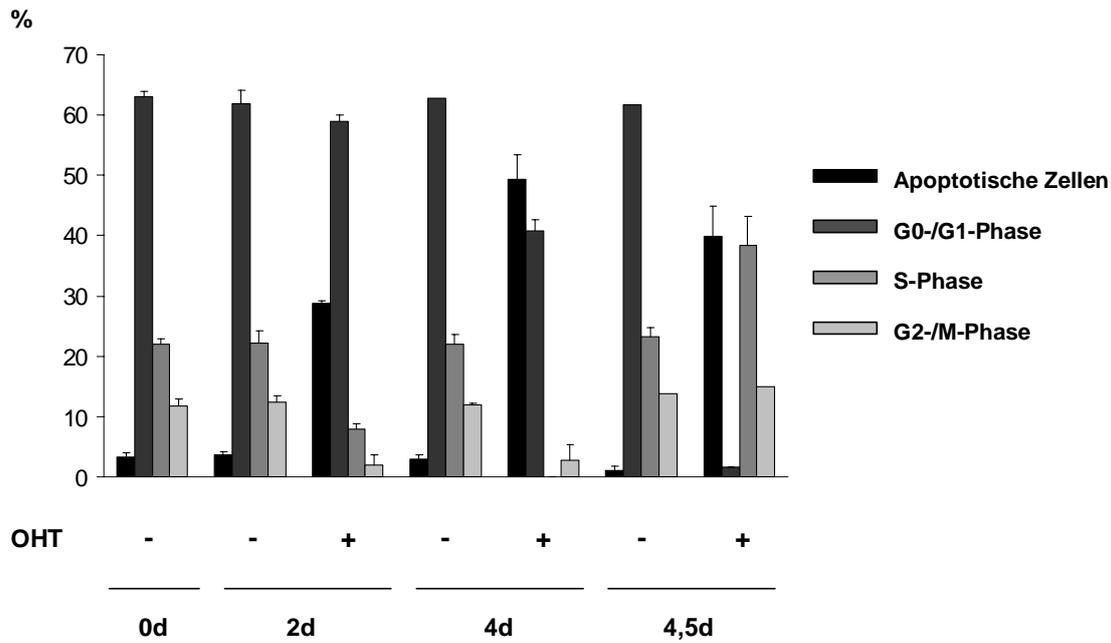


Abbildung 15: Zellzyklusprofil des stabil E2F-2-ER-exprimierenden SH-EP-Klons 2B3 zu Beginn des Experiments und nach unterschiedlich langer Aktivierung des Fusionsproteins

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung der Zellen des Klons 2B3 mit OHT bzw. Ethanol (Kontrolle) wurden die Zellen lysiert und mittels FACS-Analyse ihr DNA-Gehalt bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Zellen mit einem DNA-Gehalt von weniger als 2n (Sub-G1-Pool), 2n (G0- und G1-Phase), 2n bis 4n (S-Phase) und 4n (G2- und Mitosephase).

Nach Aktivierung der E2F-ER-Fusionsproteine wiesen die Klone auch mikroskopisch deutlich sichtbare Zeichen für Apoptose auf, welche auf den abgebildeten Fotografien (Abb. 16) erkennbar sind. Man sieht eine Kondensierung und Fragmentierung zunächst nur der Kerne, dann der ganzen Zelle, die sich letztendlich in membranumhüllte Apoptosekörperchen auflöst. (Ein *Tunel*-Assay veranschaulichte parallel das Auftreten von Apoptose in Klon 1A3 nach OHT-Behandlung; Sovana Adhikary, persönliche Mitteilung).

Die Expressionssteigerung von *CCNE1*, die Repression von *INHBA*, die Induktion von Apoptose sowie die Zellzyklusprogression nach Aktivierung des E2F-1-ER-Systems belegten somit die Funktionalität des transfizierten Fusionsproteins. Der Klon 1A3 wurde folglich zur Klärung der Frage, ob E2F-1 in

Neuroblastomzellen an der Regulation der *MYCN*-Expression beteiligt ist, verwendet.

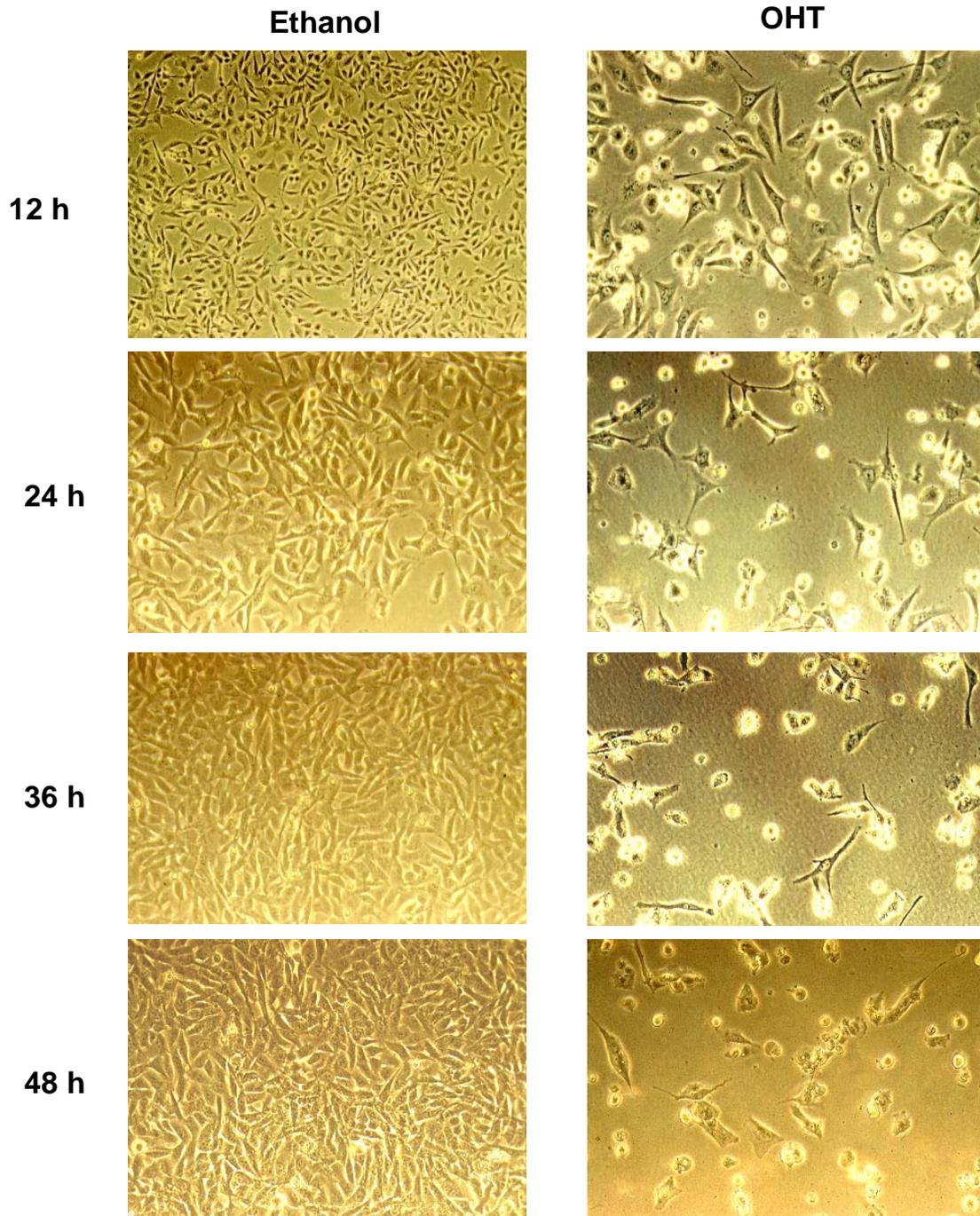


Abbildung 16: Fotografien des Klons 1A3 nach unterschiedlich langer E2F-1-ER-Aktivierung

Vergrößerung: 1 : 400 (Ausnahme: Foto 1. Reihe links 1 : 100)

4.3.3 E2F-Proteine und Chromatinmodulatoren reichen nicht aus, um das MYCN-Gen zu aktivieren

Da nun klar war, dass Klon 1A3 ein funktionsfähiges E2F-1-ER-System enthielt, welches in der Lage war, klassische E2F-Zielgene wie *CCNE1* und *INHBA* zu regulieren (Abb. 12), galt es, die Frage zu beantworten, ob es mit Hilfe dieses Systems gelingen könnte, das in SH-EP-Zellen nahezu komplett abgeschaltete *MYCN*-Gen zu reaktivieren. Die Expression von *MYCN*- und *S14*-mRNA wurde nach Behandlung des Klons mit OHT, 5aC und / oder TSA mittels RT-PCR untersucht.

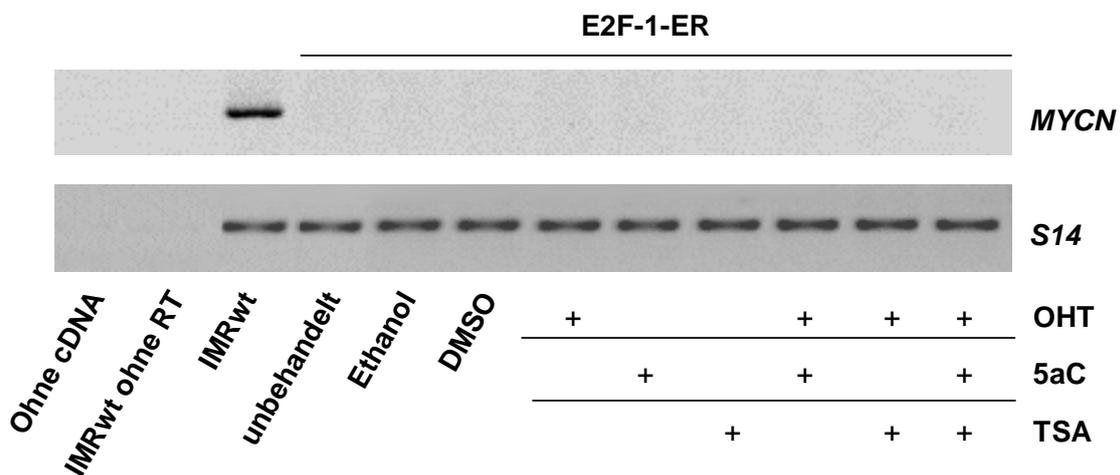


Abbildung 17: Die *MYCN*-Expression lässt sich in Neuroblastomzellen weder durch Aktivierung von E2F-1-ER noch durch Hemmung der Histondeacetylasen- bzw. Methyltransferasenaktivität oder Kombination dieser Maßnahmen steigern.

Zellen des Klons 1A3 wurden mit oben angegebenen Pharmaka bzw. deren Lösungsmitteln (Kontrolle) behandelt oder unbehandelt gelassen (Kontrolle). Nach der Lyse von Zellen des Klons 1A3 sowie von parallel kultivierten IMR-32-Zellen wurde die RNA in cDNA transkribiert und die resultierenden Erststränge für RT-PCR mit Primern für *MYCN*- und *S14*(Ladekontrolle)-mRNA eingesetzt. Hierbei wurden die Erststränge der IMR-32-Zellen 1 : 100 verdünnt, um die hohe Kopienzahl des *MYCN*-Gens in diesem Zelltyp auszugleichen. Als Negativkontrollen dienten ein Erststrangsynthese-Ansatz ohne Reverse Transkriptase sowie eine PCR-Probe ohne cDNA.

Der endogene *MYCN*-Promotor war in SH-EP-Zellen weder durch E2F-1-ER noch durch Beeinflussung der Chromatinstruktur mittels Hemmung von Histondeacetylasen (durch TSA) und Methyltransferasen (durch 5aC) oder durch eine Kombination der genannten Maßnahmen aktivierbar (Abb. 17).

Da sich in transienten Assays E2F-3 als stärkerer Transaktivator des *MYCN*-Promotors als E2F-1 erwiesen hatte (s. Abschnitt 4.1), stellte sich die Frage, ob es möglich sei, den Promotor durch Überexpression von E2F-3 zu aktivieren. Zu diesem Zweck wurden SH-EP-Zellen, die den Ekotrophen Rezeptor stabil exprimieren, mit rekombinanten Retroviren infiziert, welche gewährleisten, dass die infizierten Wirtszellen das chimäre E2F-3-ER-Protein exprimieren. Wieder fanden TSA und 5aC Verwendung, um potentiell negative Einflüsse auf das Bindungspotential von E2F durch eine repressive Chromatinstruktur zu reduzieren. Die Expression des *MYCN*-Gens sowie als Kontrolle des E2F-Zielgens *CCNE1* sollte durch eine RT-PCR überprüft werden.

Nach erfolgter Infektion wurde die Expression der *E2F-3-ER*-mRNA mittels Primern, die an ER-cDNA binden, untersucht. Sie schien in allen infizierten Zellpopulationen annähernd gleich stark zu sein (Abb.18). *MYCN* ließ sich weder durch E2F-3-ER noch durch Behandlung der Zellen mit 5aC und / oder TSA aktivieren (Abb. 18). *CCNE1* hingegen erwies sich, wie erwartet, als durch E2F-3-ER regulierbares Zielgen, dessen Expression durch Einflussnahme auf die Chromatinstruktur mittels 5aC und TSA nochmals deutlich gesteigert werden konnte (Abb. 18). Diese Beobachtung belegte die Funktionalität der E2F-3-ER-Fusionsproteine sowie der Chromatinmodulatoren. E2F-3 ist jedoch, ebenso wie E2F-1, nicht ausreichend, um den endogenen *MYCN*-Promotor in Neuroblastomzellen zu aktivieren.

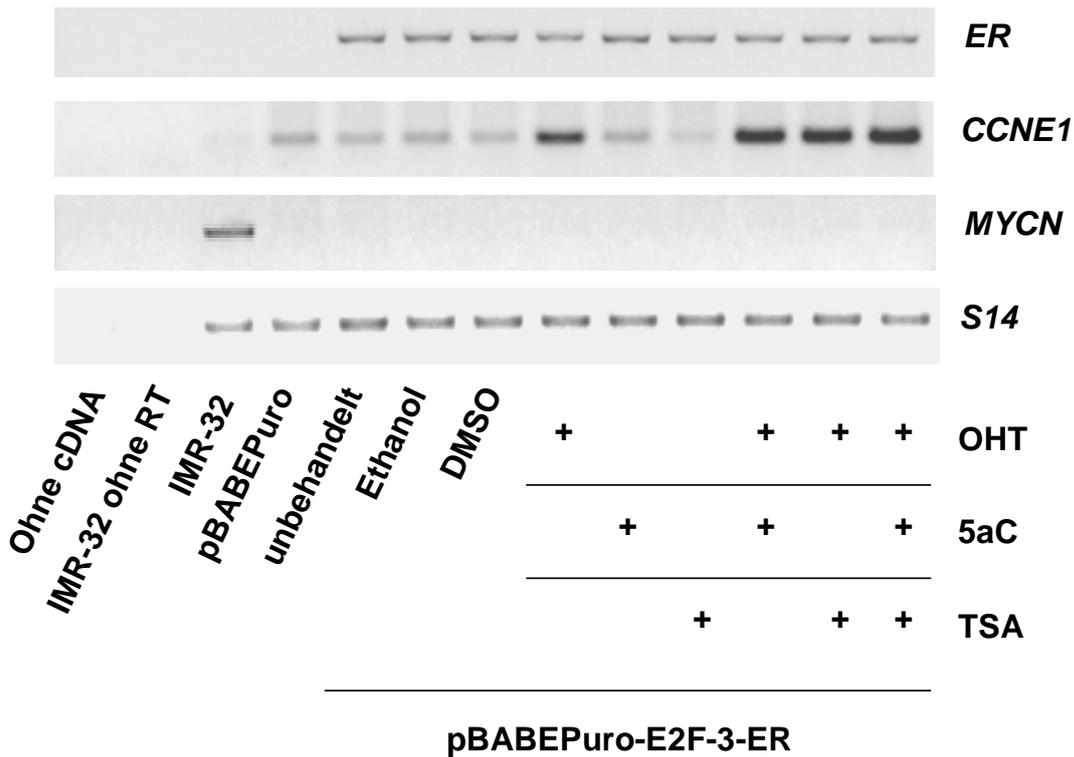


Abbildung 18: In SH-EP überexprimiertes E2F-3-ER-Fusionsprotein ist auch bei gleichzeitiger Anwendung von Histondeacetylaseinhibitoren und Methyltransferaseinhibitoren nicht ausreichend, um das endogene *MYCN-Gen* zu aktivieren.

Den Ekotrophen Rezeptor exprimierende SH-EP-Zellen wurden mit rekombinanten Retroviren infiziert, welche entweder PBABEPuro-E2F-3-ER oder den entsprechenden Leervektor PBABEPuro in die Zellen transduzieren. Die optisch anhand von H2B-GFP kontrollierte Effizienz der Infektion war in allen Kulturschalen vergleichbar. Nach Selektion der infizierten Zellen mittels Puromycin wurden diese mit OHT, 5aC und/oder TSA bzw. den entsprechenden Lösungsmitteln behandelt. Nach der Zellyse wurde die isolierte RNA in cDNA transkribiert und die resultierenden Erststränge für RT-PCR mit Primern, welche *ER*-, *CCNE1*-, *MYCN*- und *S14* (Ladekontrolle)-cDNA binden, verwendet.

5 Diskussion

5.1 E2F-Transkriptionsfaktoren regulieren die *MYCN*-Expression in humanen Neuroblastomzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Mitgliedern der E2F-Familie auf die Expression des *MYCN*-Gens in humanen Neuroblastomzellen untersucht. Es stellte sich heraus, dass E2F-1 und E2F-3 in transienten Assays in der Lage waren, den *MYCN*-Promotor abhängig von der Präsenz funktionaler E2F-Bindungsstellen zu aktivieren. Durch Hemmung endogener E2F-Aktivität in humanen Neuroblastomzellen mit starker Expression von N-myc ließ sich die Expression von *MYCN*- ebenso wie die von *CCNE1* absenken. Dieser Effekt war sowohl durch Überexpression von p16 als auch durch Aktivierung von dominant negativem E2F-1 sowie von E2F-1 mit defekter DNA-Bindungsdomäne zu beobachten. Diese Daten liefern Hinweise auf eine Rolle der E2F-Transkriptionsfaktoren in der Aufrechterhaltung einer starken N-myc-Expression in humanen Neuroblastomzellen mit Amplifikation des Onkogens.

Durch transiente Überexpression insbes. von E2F-1, -2 und -3, kaum jedoch von E2F-4 und -5, jeweils in Kombination mit DP-1, ließ sich in SH-EP-Zellen, die natürlicherweise N-myc nicht exprimieren, ein den basalen *MYCN*-Promotor beinhaltender Luciferasereporter aktivieren. Eine Punktmutation der beiden überlappenden in Richtung des 5'-Endes gelegenen E2F-Bindungsstellen schaltete den durch E2F-1 ausgelösten Effekt komplett aus. Die Aktivierung des *MYCN*-Promotors durch E2F-3 ging durch Mutation aller drei potentiellen E2F-Bindungsstellen größtenteils verloren. Diese Experimente veranschaulichen die Funktionalität der potentiellen E2F-Bindungsstellen im *MYCN*-Promotor, wenngleich sie keine Aussagen über die Promotoraktivierung des endogenen *MYCN*-Gens durch natürlich vorkommendes E2F im Neuroblastom erlauben.

Mittels Überexpression von p16 in N-myc stark exprimierenden IMR-32-Zellen ließ sich die Menge an *MYCN*- und *CCNE1*-mRNA deutlich senken, was auf einen zumindest teilweise intakten Signalweg unterhalb von p16 in IMR-32-Zellen hinweist. Bisher sind keine Anomalien der für p16, pRB, Cyclin D und

cdk4/6 kodierenden Gene in primären Neuroblastomen gesichert, so dass sich die Frage stellt, auf welcher Ebene des Signalwegs der die E2F-Aktivität in Neuroblastomen deregulierende Schritt erfolgt. *CDKN2A (p16/INK4A)* soll in einigen Neuroblastomen durch Methylierung des Promotors inaktiviert vorliegen, in anderen sollen jedoch große Mengen funktionellen p16-Proteins vorhanden sein (vgl. Abschnitt 1.4.4).

Id2, ein dominant negativer Antagonist von Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren sowie von Mitgliedern der pRB-Proteinfamilie und gleichzeitig Zielgen von Myc-Proteinen, wird von *MYCN*-amplifizierenden und -überexprimierenden Tumorzellen ebenso wie von unreifen Vorläuferzellen neuraler Gewebe reichlich exprimiert (vgl. Abschnitt 1.4.4). Anlass zur Diskussion liefern die Beobachtungen, dass einerseits N-myc in einigen Neuroblastomzelllinien mit Amplifikation von *MYCN* die Expression von Id2 steigern kann, welches durch Sequestration aktiven pRB-Proteins zur Generierung freien E2F-Proteins beiträgt, und andererseits E2F eine Rolle in der Regulation der *MYCN*-Expression zu spielen scheint. In IMR-32-Zellen liegen zwar große Mengen des Id2-Proteins vor; Id2 scheint jedoch nicht in der Lage zu sein, den pRB-Signalweg komplett auszuschalten. Wäre dies der Fall, so würde man nach Überexpression von p16 keine Senkung der *MYCN*-mRNA-Menge erwarten. Zudem scheint pRB, wie auch in anderen *MYCN*-amplifizierenden Neuroblastomzelllinien, in IMR-32-Zellen zum größten Teil als hyperphosphoryliertes und damit inaktives Protein vorhanden zu sein (Lasorella et al., 2000), welches durch Id2 gar nicht sequestriert werden kann. Dagegen deutet die Hyperphosphorylierung des Pocket-Proteins auf eine Deregulation der Signalkette oberhalb von pRB hin, was z.B. durch Überexpression von Cyclin D und / oder Cdk4/6 oder auch durch Inaktivierung oder Mutation des *p16^{INK4A}*-Gens zustande kommen könnte.

Überexpression von regulierbarem dominant negativem E2F-1 sowie E2F-1 mit funktionsloser DNA-Bindungsdomäne in IMR-32-Zellen reduzierte in jeweils einem Einzelklon die Menge an *MYCN*-mRNA und reprimierte das E2F-Zielgen *CCNE1*. Dieses Resultat weist auf eine die volle Expression des Onkogens *MYCN* aufrechterhaltende Funktion der E2F-Transkriptionsfaktoren in humanen Neuroblastomzellen hin. Es unterstützt die Hypothese, dass in der Ätiologie der

Tumoren mit Amplifikation und starker Expression von *MYCN* möglicherweise die Abschaltung der Transkription des während der Embryogenese noch natürlicherweise exprimierten Onkogens misslingt.

Das außergewöhnliche Wachstumsverhalten und die gesteigerte Apoptoserate in den IMR-32-Klonen scheint hingegen nicht aus der Blockade endogener E2F-Aktivität zu resultieren, da die morphologischen Auffälligkeiten erstens durch Aktivierung der E2F-ER-Fusionsproteine mittels OHT zum Kulturmedium nicht deutlicher zu Tage traten als ohne OHT-Behandlung, und zweitens auch in Klonen zu erkennen waren, welche das transfizierte chimäre Protein offensichtlich nicht exprimierten. Vielmehr könnten die beobachteten Phänomene eine unspezifische Reaktion auf die Transfektion im Sinne einer Stressantwort darstellen.

Unklar bleibt, weshalb von den Klonen, die dominant negatives E2F-1 bzw. E2F-1 mit defekter DNA-Bindungs-Domäne exprimieren, nur jeweils einer auf die Blockade der E2F-Funktionen mit einer Repression von *MYCN* und *CCNE1* reagierte. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtungen wären eine Inaktivierung oder ein beschleunigter Abbau der Fusionsproteine nach erfolgter Translation oder bereits eine fehlende Biosynthese von E2F-ER-Fusionsprotein in den Klonen, die nicht auf die Aktivierung der chimären Proteine durch OHT reagierten. Auch eine kompensatorische Steigerung der N-myc-Expression nach Senkung des aktivierenden E2F-Einflusses auf den Promotor durch unbekannte Regulationsmechanismen wäre denkbar.

Mittlerweile gibt es eine Reihe weiterer Hinweise auf die Bedeutung der E2F-Transkriptionsfaktoren in der Regulation der *MYCN*-Aktivität:

In Neuroblastomzellen mit *MYCN*-Expression, nicht jedoch in solchen ohne endogenes N-myc, binden die aktivierenden E2F-Transkriptionsfaktoren E2F-1, E2F-2 und E2F-3 an ihre Bindungsstellen im *MYCN*-Promotor, was kürzlich mittels *ChIP* (Chromatin-Immünpräzipitation) gezeigt werden konnte (Strieder und Lutz, 2003; Kramps et al., 2004). Der Besatz der E2F-Bindungsstellen durch E2F-1 bis -3 korreliert mit einer lokalen Acetylierung der Histonproteine H3 und H4 und dem Nachweis von Tip-60, der katalytischen Untereinheit einiger HAT-Komplexe (Kramps et al., 2004). Möglicherweise rekrutiert E2F-1 Tip-60 an den *MYCN*-Promotor, denn für andere E2F-Zielgene konnte eine

Rekrutierung von HAT zu dem Promotor des Gens durch E2F bereits belegt werden (vgl. Abschnitt 1.4.2). Zudem ließ sich als Zeichen aktiver Transkription in diesen N-myc exprimierenden Zellen die RNA-Polymerase am *MYCN*-Promotor nachweisen (Kramps et al, 2004).

Inzwischen ließ sich beobachten, dass während der durch Retinolsäure ausgelösten Differenzierung der Neuroblastomzellen LAN-5 deren N-myc-Expression sank, während die Bindung von endogenem E2F-2, E2F-3 und E2F-4 an den *MYCN*-Promotor verloren ging. E2F-1 blieb auch in differenzierten LAN-5-Zellen an den Promotor gebunden. Da gleichzeitig die Bindung endogenen pRB-Proteins an den *MYCN*-Promotor zunahm, stellt sich die Frage, ob E2F-1 eine Rolle in der Differenzierung von Neuroblastomzellen spielt (Strieder und Lutz, 2003).

Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Beobachtungen sprechen für eine Rolle deregulierter E2F-Aktivität in der Überexpression des endogenen *MYCN*-Gens in das Onkogen amplifizierenden Neuroblastomen. Gleichzeitig wird die E2F-Genfamilie als Ziel der Transaktivierung durch Myc-Proteine diskutiert (vgl. Abschnitt 1.4.4). Die vorliegenden Daten weisen auf die Existenz einer positiven Rückkopplungsschleife mit E2F-Transkriptionsfaktoren auf der einen und N-myc auf der anderen Seite hin, die in humanen Neuroblastomen die Expression von N-myc aufrechterhält. Zusätzlich zur gegenseitigen direkten transkriptionellen Aktivierung von N-myc und E2F könnte ein indirekter „Teufelskreislauf“ existieren, in dessen Rahmen N-Myc die Expression von Id2 und Cyclin D2 steigert (vgl. Abschnitt 1.2.4), welche anschließend durch Sequestrierung (Id2) und Phosphorylierung (Cyclin D2) pRB inaktivieren können. Freiwerdendes E2F würde dann wiederum *MYCN* transaktivieren (s. Abb. 19).

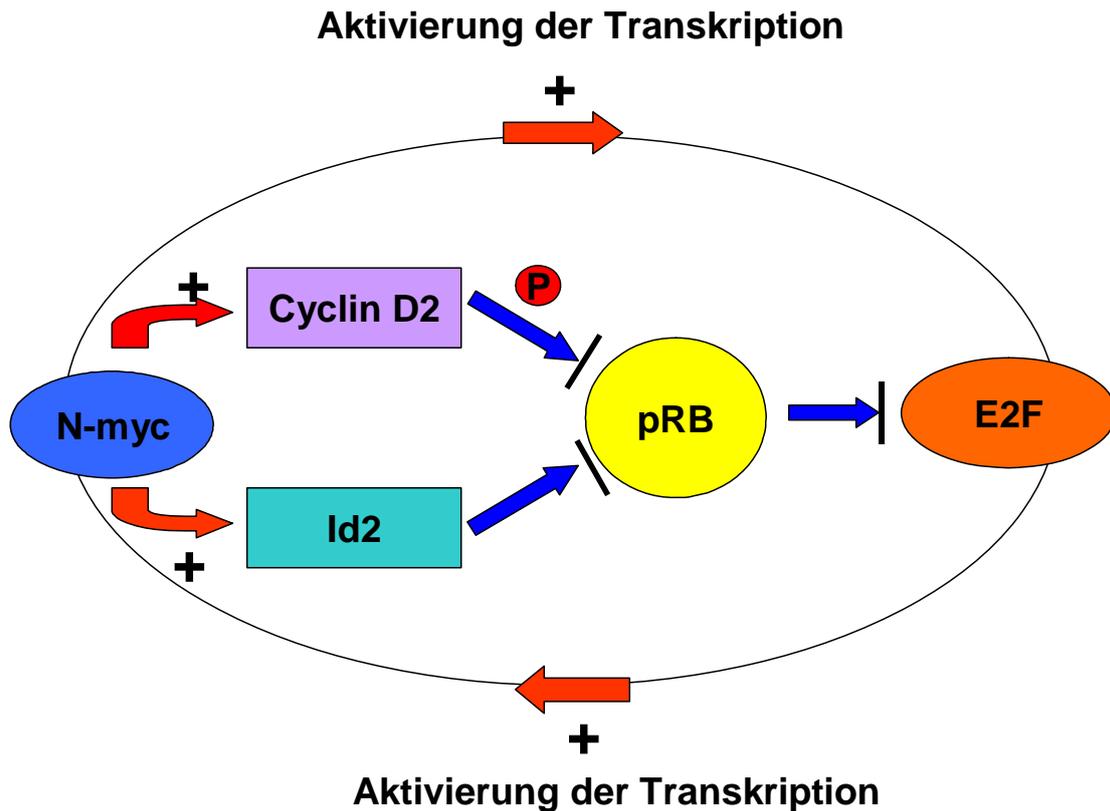


Abbildung 19: Modell einer positiven Rückkopplungsschleife zwischen N-myc und E2F in *MYCN*-amplifizierenden Neuroblastomen (s. Text)

5.2 E2F-Transkriptionsfaktoren stimulieren den Zellzyklus und induzieren Apoptose in Neuroblastomzellen

Für E2F-1-ER- und E2F-3-ER-überexprimierende Klone wurde der Einfluss aktivierter E2F-Proteine auf die Genexpression klassischer E2F-Zielgene analysiert. Wie erwartet, stieg die Expression von *CCNE1* durch Aktivierung von E2F-1- und E2F-3-ER, während die von *INHBA* zurückging. TSA und 5aC verstärkten die Effekte auf die *CCNE1*-Expression, wiesen jedoch alleine keine Wirkung auf *CCNE1* auf. Dies deutet darauf hin, dass das Chromatin des *CCNE1*-Promotors durch Histonacetylierung bzw. -demethylierung und *Remodelling* bereits vor der Bindung von E2F weitestgehend „geöffnet“ ist. Gleichzeitig konnten 5aC und TSA die Repression von *INHBA* durch E2F-1 und E2F-3 nicht verhindern, obwohl zumindest TSA allein offensichtlich die Expression von

INHBA steigerte. Eine Erklärung wäre, dass Komplexe aus E2F und Pocket-Proteinen in der Abschaltung ihrer Zielgene „antagonistisch“ zu 5aC und TSA die Chromatinstruktur in Richtung Repression verändern, z.B. durch Rekrutierung von Histondeacetylasen oder Methyltransferasen. Beide Mechanismen wurden für pRB bereits gezeigt (vgl. Abschnitt 1.4.2).

Weshalb das E2F-2-ER-Fusionsprotein in Klon 2B3 in diesem Experiment nicht in der Lage war, *CCNE1* zu aktivieren, obwohl es wie E2F-1 in Klon 1A3 zur Apoptose und Zellzyklusstimulation führte, ist jedoch unklar.

Die FACS-Analysen zur Beurteilung des Apoptoseverhaltens und der Zellzyklusverteilung unterstrichen die Funktionalität der transfizierten E2F-ER-Fusionsproteine, denn sowohl die Einleitung der S-Phase als auch die Induktion von Apoptose sind typische Funktionen der „aktivierenden“ E2F-Transkriptionsfaktoren. Da sich sowohl bei dem E2F-1-ER- als auch dem E2F-2-ER-überexprimierenden Klon der Anteil der Zellen in der G₀- oder G₁-Phase annähernd reziprok zu dem im Sub-G₁-Pool verhielt, könnte man schließen, dass die Zellen bereits während des Übergangs von der G₁- in die S-Phase oder zu Beginn der frühen S-Phase, also während der Zeit der maximalen natürlichen E2F-Aktivität, die Apoptose einleiteten.

5.3 E2F reicht nicht aus, um den endogenen *MYCN*-Promotor in Neuroblastomzellen ohne Expression des Onkogens zu aktivieren

Das endogene *MYCN*-Gen ließ sich in „Single-copy“-Neuroblastomzellen ohne Expression des Onkoproteins N-myc im Gegensatz zu klassischen E2F-Zielgenen weder durch ein regulierbares E2F-1- noch durch ein E2F-3-ER-System aktivieren. Durch Zugabe chromatinmodulierender Pharmaka zu dem Zellmedium änderte sich nichts an dieser Beobachtung. Für den E2F-1-ER-überexprimierenden SH-EP-Klon 1A3 konnte inzwischen mittels *ChIP* gezeigt werden, dass das überexprimierte E2F-1-ER-Fusionsprotein selbst nach Vorbehandlung der Zellen mit 5aC und TSA nicht in der Lage war, sich an die E2F-Bindungsstellen des *MYCN*-Promotors anzulagern (Kramps et al., 2004). Durch *Nucleosome-mapping* ließ sich kürzlich feststellen, dass sich kein Nukleosom an der

E2F-Bindungsstelle befindet, welches die Bindung der Transkriptionsfaktoren behindern könnte (Kramps et al., 2004). Eine Blockade der DNA-Bindung durch E2F mittels CpG-Methylierung erscheint ebenfalls unwahrscheinlich: CpG-Methylierung führt zu einer Ansammlung großer Multiproteinkomplexe, welche eine Kondensierung der DNA bewirkt und Transkriptionsfaktoren den Zugang zu Promotoren erschwert. Die Promotorregion war in den *Nucleosome-mapping*-Experimenten jedoch gut zugänglich für die Nuklease und scheint somit nicht hochkondensiert vorzuliegen. In *In-vivo-footprinting*-Experimenten konnten zudem keinerlei Proteinkomplexe an dieser Stelle detektiert werden (Lutz und Schwab, 1997), was den Besatz der Promotorelemente durch andere Proteine, die die Bindung von E2F verhindern könnten, ebenfalls unwahrscheinlich macht. Zudem führte auch die Zugabe von 5aC zu dem Zellmedium nicht zu einer Bindung von E2F an den Promotor. Somit bleibt unklar, weshalb E2F-1 und E2F-3 sich nicht an ihre Bindungsstelle im *MYCN*-Promotor anlagern konnten. Möglicherweise liegt hier ein zelltyp- und zielgenspezifischer Regulationsmechanismus auf der Ebene der DNA-Bindung vor, dessen Installation in N-myc exprimierenden Tumoren selektiv die Aktivität des Onkogens absenken könnte.

Da sich in SH-EP-Zellen weder E2F-1 noch E2F-2 oder -3 mittels ChIP an der E2F-Bindungsstelle des *MYCN*-Promotors nachweisen ließen (Strieder und Lutz, 2002), erscheint es unwahrscheinlich, dass die E2F-Bindungsstellen des *MYCN*-Promotors in embryonalen Neuralrohrzellen eine reprimierende Funktion haben, und dass sie nur durch pathophysiologische Mechanismen, wie z. B. durch Inaktivierung des pRB-Signalwegs, zu aktivierenden regulatorischen Elementen in folglich N-myc exprimierenden Tumoren werden. Alternativ könnte *MYCN* nur während limitierter Phasen der Embryonalentwicklung, in denen *MYCN*-amplifizierende Neuroblastome entstehen, ein spezifisches E2F-Zielgen sein. Da *MYCN*-amplifizierende Tumoren eher undifferenzierter sind als die sog. „Single-copy“-Neuroblastome, erscheint es möglich, dass sie bereits während früherer Stadien der Embryogenese entstehen als die weniger aggressiven und differenzierteren Tumoren ohne *MYCN*-Amplifikation.

5.4 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Die vorliegenden Daten weisen auf eine Rolle von E2F-Transkriptionsfaktoren in der Aufrechterhaltung einer starken N-myc-Expression in humanen Neuroblastomzelllinien hin.

Mit Hilfe von Tiermodellen müsste weiterhin untersucht werden, ob endogene E2F-Proteine an der Regulation der Expression von N-myc in primären Tumoren beteiligt sind. Darüber hinaus stellt sich die Frage, welche den Signalweg $p16 \rightarrow \text{Cyclin}/\text{cdk} \rightarrow p\text{RB}/\text{E2F}$ unterbrechenden bzw. deregulierenden Mutationen in humanen Neuroblastomen vorhanden sind und in welcher Weise sie sich auf die E2F-Aktivität sowie die Expression des *MYCN*-Onkogens auswirken.

Der Mechanismus, der die Bindung der E2F-Proteine an ihre Bindungsstelle im *MYCN*-Promotor in SH-EP-Zellen verhindert, könnte zu einem späteren Zeitpunkt therapeutisch genutzt werden, um die Anlagerung von E2F an den Promotor zu verhindern und somit die Expression des N-myc-Onkoproteins in Neuroblastomen abzusenken. In der Tat scheinen einige maligne Tumoren auf eine kontinuierliche hohe Expression von Myc-Proteinen angewiesen zu sein (vgl. Abschnitt 1.2.4).

Zudem scheint es denkbar, durch gentherapeutische Ansätze, in denen z.B. neuro- und onkotrope Viren zum Einsatz kommen könnten, den $p\text{RB}/\text{E2F}$ -Signalweg in menschlichen N-myc stark exprimierenden Neuroblastomzellen zu restaurieren und damit die Aktivität von *MYCN* zu senken. Ein weitgehend selektiver Einfluss auf die Aktivität von *MYCN* in neuronalen Tumorzellen könnte weitreichende, die Prognose der Neuroblastompatienten verbessernde Folgen haben, ohne gravierende systemische Nebenwirkungen aufzuweisen. Zur Zeit werden gentechnisch veränderte Adenoviren, die zu einer Transduktion des *p53*-Wildtyp-Gens in Kolonkarzinomzellen mit Mutation des Tumorsuppressorgens führen, in klinischen Studien erprobt (einen Überblick gibt Kerr, 2003).

Eine weitere Möglichkeit in der Therapie des *MYCN*-amplifizierenden Neuroblastoms wäre, in Viren anstelle eines natürlichen Promotors einen modifizierten *MYCN*-Promotor einzusetzen, der spezifisch in den Neuroblastomzellen aktiviert werden könnte, um dann dort die Expression eines Tumorsuppressorgens anzukurbeln oder zur Virusreplikation und Lyse der Tumorzellen zu führen. Spezifisch in Krebszellen mit defekter $p\text{RB}$ -

Signalkaskade oder mutiertem *p53*-Gen replizierende Viren scheinen im Fall des Kolonkarzinoms bereits erfolgversprechend (Kerr, 2003).

Die Beantwortung der Frage, ob und inwiefern gentherapeutische Ansätze im Fall des Neuroblastoms zum Einsatz kommen könnten, erfordert jedoch noch weitreichende Untersuchungen sowohl zum Verständnis der Biologie dieses Tumors als auch auf dem Gebiet der Gentherapie.

6 Zusammenfassung

Seit fast 30 Jahren ist bekannt, dass die Amplifikation und Expression des Onkogens *MYCN* in Neuroblastomen mit einer sehr ungünstigen Prognose für die Patienten einhergeht. Dennoch liegen die Mechanismen der Genregulation von *MYCN* weiterhin größtenteils im Dunkeln.

Die Präsenz potentieller Bindungsstellen für E2F-Proteine im Promotor des *MYCN*-Gens sowie Zellkulturexperimente lieferten Hinweise auf eine Rolle der Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie in der Regulation der N-myc-Expression.

Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob E2F-Proteine *notwendig* sind, um eine primär hohe Expression von N-myc in Neuroblastomzellen mit Amplifikation des Onkogens aufrechtzuerhalten, und ob sie *hinreichend* sind, um die Transkription von *MYCN* in Zellen ohne endogene Expression von N-myc einzuleiten.

Durch Überexpression des Tumorsuppressorproteins p16, welches zu einer Inaktivierung endogener E2F-Proteine führt, konnte die *MYCN*-mRNA-Menge in Neuroblastomzellen deutlich gesenkt werden. Vergleichbare Resultate wurden durch Expression von dominant negativem E2F-1 erzielt. Da in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass Myc-Proteine ihrerseits *E2F*-Gene aktivieren können, nehmen wir an, in aggressiven Neuroblastomen könnte eine positive Rückkopplungsschleife zwischen E2F-Transkriptionsfaktoren auf der einen und N-myc auf der anderen Seite existieren, die die gesteigerte Aktivität des *MYCN*-Onkogens aufrechterhält.

Stabil transfizierte E2F-ER-Fusionsproteine waren jedoch nicht in der Lage, das endogene *MYCN*-Gen in Neuroblastomzellen ohne Expression von N-myc anzuschalten. E2F-Proteine werden folglich für das volle Ausmaß der starken Expression von N-myc in Neuroblastomen *benötigt*, sind aber *nicht ausreichend*, um das Onkogen *MYCN* in Zellen ohne endogenes N-myc zu aktivieren. In der Zukunft könnte durch Verhinderung der Bindung von E2F-Proteinen an den *MYCN*-Promotor oder durch gentherapeutische Ansätze, die z.B. mittels viraler Infektion den Signalweg zwischen p16 und E2F rekonstruieren, die Expression von N-myc in Neuroblastomen gesenkt werden, so dass die Aggressi-

vität der Tumore reduziert und die individuelle Prognose der Patienten verbessert werden könnte.

7 Literaturverzeichnis

Adams, M.R., Sears, R., Nuckolls, F., Leone, G. und Nevins, J.R. (2000): Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Mol Cell Biol* 20, 3633-3639

Ait-Si-Ali, S., Polesskaya, A., Filleur, S., Ferreira, R., Duquet, A., Robin, P., Ver-vish, A., Trouche, D., Cabon, F. und Harel-Bellan, A. (2000): CBP/p300 histone acetyl-transferase activity is important for the G1/S transition. *Oncogene* 19, 2430-2437

Bates, C.M., Kharzai, S., Erwin, T., Rossant, J., und Parada L.F. (2000): Role of N-myc in the developing mouse kidney. *Dev Biol* 222, 317-325

Baudino, T.A. und Cleveland, J.L. (2001): The max network gone mad. *Mol Cell Biol* 21, 691-702

Berthold, F. und Hero, B. (2000): Neuroblastoma- current drug therapy recom-mendations as part of the total treatment approach. *Drugs* 59, 1261-1277

Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M. , O'Neill, S., Pearson, A.D.J., Plantaz, D., Meddeb, M., Danglot, G., Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Laureys, G. und Speleman, F. (1999): Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 340, 1954-1964

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254

Brodeur, G.M. (2003): Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3, 203-16

Brodeur, G.M., Hayes, F.A., Green, A.A., Casper, J.T., Wasson, J., Wallach, S. und Seeger, J.C. (1987): Consistent *N-myc* copy number in simultaneous or

constitutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res* 47, 4248-4253

Bruin, A. de, Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R. und Leone, G. (2003): Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member. *J Biol Chem* 278, 42041-42049

Burchill, S.A., Lewis, I.J., Abrams, K.R. et al. (2001): Circulating neuroblastoma cells detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA are an independent poor prognostic indicator in stage 4 neuroblastoma in children over 1 year. *J Clin Oncol* 19, 1795-1801

Campanero, M.R., Armstrong, M.I. und Flemington, E.K. (2000): CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6481-6486

Chana, J.S., Grover, R., Wilson, G.D., Hudson, D.A., Forders, M., Sanders, R. und Grobbelaar, A.O. (1998): The clinical significance of *c-myc* oncogene expression in melanomas of the scalp. *Br J Plast Surg* 51, 191-194

Charron, J., Malynn, B.A., Fisher, P., Stewart, V., Jeannotte, L., Goff, S.P., Robertson, E.J. und Alt, F.W. (1992): Embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption of the *N-myc* gene. *Genes Dev* 6, 2248-2257

Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N. und Golub, T.R. (2000): Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that *MYC* regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling and adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3260-3265

d'Cruz, C.M., Gunther, E.J., Boxer, R.B., Hartman, J.L., Sintasath, L., Moody, S.E., Cox, J.D., Ha, S.I., Belka, G.K., Golant, A., Cardiff, R.D. und Chodosh, L.A. (2001): *C-MYC* induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous *Kras2* mutations. *Nat Med* 7, 235-239

Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R. und Bradley, A. (1993): A null *c-myc* mutation causes lethality before 10,5 days of gestation in homozygous and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 7, 671- 682

Diccianni, M.B., Omura-Minamisawa, M., Batova, A., Le, T., Bridgeman, L. und Yu, A.L. (1999): Frequent deregulation of p16 and the p16/G1 cell cycle-regulatory pathway in neuroblastoma. *Int J Cancer* 80, 145-154

Dyson, N. (1998): The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-2262

Easton, J., Wei, T., Lahti, J.M. und Kidd, V.J. (1998): Disruption of cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma. *Cancer Res* 58, 2624-2632

Eischen, C.M., Weber, J.D., Roussel, M.F., Sherr, C.J. und Cleveland, J.L. (1999): Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 13, 2658-2669

Eisenman, R.N. (2001): Deconstructing myc, *Genes Dev* 15, 2023-2030

El-Osta, A., Kantharidis, P., Zalcborg, J.R. und Wolffe, A.P. (2002): Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene *MDR1* on activation. *Mol Cell Biol* 22, 1844-1857

Erikson, J., Finger, L., Sun, L., ar-Rushdi, A., Nishikura, K., Minowada, J., Finan, J., Emanuel, B.S., Nowell, P.C. und Croce, C.M. (1986): Deregulation of *c-myc* by translocation of the alpha-locus of the t-cell receptor in t-cell leukemias. *Science* 232, 884-886

Felsher, D.W. und Bishop, J.M. (1999): Reversible tumorigenesis by *MYC* in hematopoietic lineages. *Mol Cell* 4, 199-207

Feng, X.H., Liang, Y.Y., Liang, M., Zhai, W. und Lin X. (2002): Direct interaction of c-myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Mol Cell* 9,133-43

Fiore, B. di, Palena, A., Felsani, A., Palitti, F., Caruso, M. und Lavia, P. (1999): Cytosine methylation transforms an E2F site in the retinoblastoma gene promoter into a binding site for the general repressor methylcytosine-binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 27, 2852-2859

Fukamizu, A., Sagara, M., Sugiyama, F., Horiguchi, H., Kamma, H., Hatae, T., Ogata, T., Yagami, K. und Murakami, K. (1994): Neuroectodermal tumors expressing c-, L-and N-myc in transgenic mice that carry the *E1A/E1B* gene of human adenovirus type 12. *J Biol Chem* 269, 31252-31258

Gaubatz, S., Wood, J.G. und Livingston, D.M. (1998): Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9190-9195

Gingsberg, D., Vairo, G., Chittenden, T., Xiao, Z.X., Xu, G., Wyner, K.L., Caprio, J.A. de, Lawrence und J.B., Livingston, D.M. (1994): E2F-4, a new member of the E2F transcription factor family, interacts with p107. *Genes Dev* 8, 2665-2679

Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P. und Eisenman, R.N. (2000): The myc/max/mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-699

Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G.P. und Pelicci, P.G. (1998): High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res* 58, 14-19

Hara, E., Okamoto, S., Nakada, S., Taya, Y., Sekiya, S. und Oda, K. (1993): Protein phosphorylation required for the formation of E2F-complexes regulates

N-myc transcription during differentiation of human embryonal carcinoma cells. *Oncogene* 8, 1023-1032

Harbour, J.W. und Dean, D.C. (2000): The Rb/E2F pathway: Expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14, 2393-2409

Helin, K und Harlow, E. (1994): Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 is required for binding to the adenovirus E4 (ORF6/7) protein. *J Virol* 68, 5027-5035

Helin, K., Harlow, E. und Fattaey, A. (1993): Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 13, 6501-6508

Hiebert, S.W., Blake, M., Azizkhan, J. und Nevins, J.R. (1991): Role of E2F transcription factor in E1A-mediated transactivation of cellular genes. *J Virol* 65, 3547-3552

Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Matsuura, Y., Piatyszek, M.A. und Shay, J.W. (1995): Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1, 249-255

Iritani, B.M. und Eisenman, R.N. (1999): C-myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13180-13185

Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M. und Nevins, J.R. (2001): Role for E2F in both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* 21, 4684-4699

Johansen, L.M., Iwama, A., Lodie, T.A., Sasaki, K., Felsher, D.W., Golub, T.R. und Tenen, D.G. (2001): C-myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol* 21, 3789-3806

Johnson, D.J., Schwarz, J.K., Cress, W.D. und Nevins, J.R. (1993): Expression of transcription factor E2F-1 induces quiescent cells to enter s-phase. *Nature* 365, 349-352

Jooss, K., Lam, E.W., Bybee, A., Girling, R., Muller, R. und LaThangue, N.V. (1995): Proto-oncogenic properties of the DP family of proteins. *Oncogene* 10, 1529-15336

Kerr, D. (2003): Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. *Nat Rev* 3, 615-622

Kramps, C., Strieder, V., Sapetschnig, A., Suske, G. und Lutz, W. (2004): E2F and Sp1/Sp3 synergize but are not sufficient to activate the *MYCN* gene in neuroblastomas. *J Biol Chem* 279, 5110-7

Krek, W., Ewen, M.E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W.G. Jr. und Livingston, D.M. (1994): Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 78, 161-172

Ladenstein, R., Ambros, I.M., Potschger, U., Amann, G., Urban, C., Fink, F.M., Schmitt, K., Jones, R., Slociak, M., Schilling, F., Ritter, J., Berthold, F., Gadner, H. und Ambros, P.F. (2001): Prognostic significance fo DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. *Med pediatr oncol* 36, 83-92

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lang, S.E., McMahon, S.B., Cole, M.D. und Hearing, P. (2001): E2F transcriptional activation requires TRRAP and GCN5 cofactors. *J Biol Chem* 276, 32627-32634

Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M. und Iavarone, A. (2000): Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by myc oncoproteins. *Nature* 407, 592-599

Lees, J.A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N. und Helin, K.: The Retinoblastoma Protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol* 13, 7813-7825

Leone, G., Gregori, J. de, Sears, R., Jakoi, L. und Nevins, J.R. (1997): Myc and ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 387, 422-426

Leone, G., Sears, R., Huang, E., Rempel, R., Nuckolls, F., Park, C., Giangrande, P., Wu, L., Saavedra, H.I., Field, S.J., Thompson, M.A., Yang, H., Fujiwara, Y., Greenberg, M.E., Orkin, S. und Smith, C. (2001): Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis. *Mol Cell* 8, 105-113

Liao, D.J. und Dickson, R.B. (2000): C-myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 7, 143-64

Lindeman, G.J., Gaubatz, S., Livingston, D.M. und Ginsberg, D. (1997): The subcellular localization of E2F-4 is cell-cycle dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 5095-5100

Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danelian, P.S., Parker, M.G. und Evan, G.I. (1995): A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic acids res* 23, 1686-1690

Lutz, W. und Eilers, M. (2002): Contributions of myc to tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1602, 61-71

Lutz, W. und Schwab, M. (1997): In vivo regulation of single copy and amplified *N-myc* in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 15, 305-315

Malynn, B.A., Alboran, I.M. de, O'Hagan, R., Bronson, R., Davidson, L., Pinho, R.A. de und Alt, F.W. (2000): N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev* 14, 1390-1399

Matthay, K.K., Villablanca, J.G., Seeger, R.C., Stram, D.O., Harris, R.E., Ramsay, N.K., Swift, P., Shimada, H., Black, C.T., Brodeur, G.M., Berbing, R.B. und Reynolds, C.P. (1999): Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *N Engl J Med* 341, 1165-1173

McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D. und Cole, M.D. (1998): The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363-374

Merika, M., Williams, A.J., Chen, G., Collins, T. und Thanos, D. (1998): Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell* 1, 277-287

Moens, C.B., Stanton, B.R., Parada, L.F. und Rossant, J. (1993): Defects in heart and lung development in compound heterozygotes for two different targeted mutations at the N-myc locus. *Development* 119, 485-499

Moens, C.B., Auerbach, A.B., Conlon, R.A., Joyner, A.L. und Rossant, J. (1992): A targeted mutation reveals a role for N-myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Genes Dev* 6, 691-704

Morgenstern, J.A. und Land, H. (1990): Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucl Acid Res* 18, 3587-3596

Müller, H. und Helin, K. (2000): The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1470, M1-M12

Mulligan, G. und Jacks, T. (1998): The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *TIG* 14, 223-229

Nakagawara, A., Arima-Nakagawara, M., Scavarda, N.J., Azar, C.G., Cantor, A.B. und Brodeur, G.M. (1993): Association between high levels of expression

of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. N Engl J Med 328, 847-854

Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E. und Kouzarides, T. (2001): Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. Nature 412, 561-566

Norris, M.D., Bordow, S.B., Marshall, G.M., Haber, P.S., Cohn, S.L. und Haber, M. (1996): Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. N Engl J Med 334, 231-238

Nupponen, N.N., Kakkola, L., Koivisto, P. und Visakorpi, T. (1998): Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. Am J Pathol 153, 141-148

Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L und Baltimore, D. (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. Proc Natl Acad Sci USA 90, 8392-8396

Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G. und Evan, G. (1999): Reversible activation of *c-myc* in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. Mol Cell 3, 565-577

Rudnick, E., Khakoo, Y., Antunes, N.L., Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Shimada, H., Gerbing, R.B., Stram, D.O. und Matthay, K.K. (2001): Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: clinical outcome and antineuronal antibodies- a report from the Children's Cancer Group Study. Med pediatr oncol 36, 612-622

Savelyeva, L. und Schwab, M. (2001): Amplification of oncogenes revisited: from expression profiling to clinical application. Cancer Lett 167, 115-123

Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. und Schaffner, W. (1989): Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17, 6419

Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Henglein, B. und Jansen-Durr, P. (1994): Activation of the E2F transcription factor by cyclin D1 is blocked by p16INK4, the product of the putative tumor suppressor gene MTS1. *Oncogene* 9, 3475-3482

Schwab, M., Ellison, J., Busch, M., Rosenau, W., Varmus, H.E. und Bishop, J.M. (1984): Enhanced expression of the human gene *N-myc* consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 81, 4940-4945

Schwarz, J.K., Bassing, C.H., Kovesdi, I., Datto, M.B., Blazing, M., George, S., Wang, X.F. und Nevins, J.R. (1995): Expression of the E2F1 transcription factor overcomes type- β transforming growth factor-mediated growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 483-487

Sears, R., Ohtani, K. und Nevins, J.R. (1997): Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the *E2F2* gene in response to cell growth signals. *Mol Cell Biol* 17, 5227-5234

Seeger, R.C., Reynolds, C.P., Gallego, R., Stram, D.O., Gerbing, R.B. und Matthay, K.K. (2000): Quantitative tumor cell content of bone marrow and blood as a predictor of outcome in stage IV neuroblastoma: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 18, 4067-4076

Sherr, C.J. (1996): Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677

Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V., Roald, V., Stram, D.O., Gerbing, R.B., Lukens, J.N., Matthay, K.K. und Castleberry, R.P. (1999): The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 82, 364-372

Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunsky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F. und Eilers, M. (2001): Repression of p15INK4b expression by myc through association with miz-1. *Nat Cell Biol* 3, 392-399

Stanton, B.R., Perkins, A.S., Tessarollo, L., Sassoon, D.A. und Parada, L.F. (1992): Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev* 6, 2235-2247

Stefano, L. di, Jensen, M.R. und Helin, K. (2003): E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *Embo J* 22, 6289-6289

Strieder, V. und Lutz, W. (2002): Regulation of N-myc expression in development and disease. *Cancer Lett* 180, 107-119

Strieder, V. und Lutz, W. (2003): E2F proteins regulate *MYCN* expression in neuroblastomas. *J Biol Chem* 278, 2983-2989

Takeuchi, L.A., Hachitanda, Y., Woods, W.G., Tuchman, M., Lemieux, B., Brisson, L., Bernstein, M., Brossard, J., Leclerc, J.M., Byrne, T.D., Triche, T.J. und Shimada, H. (1995): Screening for neuroblastoma in North America. Preliminary results of a pathology review from the Quebec project. *Cancer* 76, 2363-2371

Takita, J., Hayashi, Y., Kohno, T., Shiseki, M., Yamaguchi, N., Hanada, R., Yamamoto, K. und Yokota, J. (1997): Deletion map of chromosome 9 and p16 (*CDKN2A*) gene alterations in neuroblastoma. *Cancer Res* 57,907-912

Takita, J., Hayashi, Y., Nakajima, T., Adachi, J., Tanaka, T., Yamaguchi, N., Ogawa, Y., Hanada, R., Yamamoto, K. und Yokota, J. (1998): The *p16* (*CDKN2A*) gene is involved in the growth of neuroblastoma cells and its expression is associated with prognosis of neuroblastoma patients. *Oncogene* 17, 3137-3143

Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D. und Zhang, D.E. (1997): Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90, 489-519

Trimarchi, J.M. und Lees, J.A. (2001): Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 11-20

Tsai, K.Y., Hu, Y., Macleod, K.F., Crowley, D., Yamasaki, L. und Jacks, T. (1998): Mutation of E2F-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol Cell* 2, 293-304

Versteeg, R., Minne, C. van der, Plomp, A., Sijts, A., Leeuwen, A. van und Schrier, P. (1990): N-myc expression switched off and class 1 human leukocyte antigen expression switched on after somatic cell fusion of neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* 10, 5416-5423

Vigo, E., Müller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C. und Helin, K. (1999): *CDC25A* phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol* 9, 6379-6395

Wang, J., Xie, L.Y., Allan, S., Beach, D. und Hannon, G.J. (1998): Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12, 1769-1774

Weiss, W.A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B.G. und Bishop, J.M. (1997): Targeted expression of *MYCN* causes neuroblastoma in transgenic mice. *Embo J* 16, 2985-2995

Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, P., Goillot, E., Harlow, E. und Dyson, N.J. (1996): Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* 85, 537-548

Yang, J.L., Ow, K.T., Russell, P.J., Ham, J.M. und Crowe, P.J. (1996): Higher expression of oncoproteins c-myc, c-erb B-2/neu, PCNA and p53 in metastasizing colorectal cancer than in nonmetastasizing tumors. *Ann Surg Oncol* 3, 574-579

Zhang, H.S. und Dean, D.C. (2001): Rb-mediated chromatin structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene* 20, 3134-3138

Ziebold, U., Reza, T., Caron, A. und Lees, J.A. (2001): E2F-3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes Dev* 15, 386-391

Zou, X., Rudchenko, S., Wong, K. und Calame, K. (1997): Induction of c-myc transcription by the v-Abl tyrosine kinase requires Ras, Raf1 and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 11, 654-662

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

A	Adenosin
AB	Antikörper (antibody)
Abb.	Abbildung
5aC	5-aca-Cytidin
α	anti-
APS	Ammoniumperoxidsulfat
APUD	<i>Amine Precursor Uptake and Decarboxylation</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BBS	BES-gepufferte Salzlösung
B/HLH/LZ	Basische Region/Helix-Loop-Helix/Leuzinzipper- motiv
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
Bp	Basenpaare
β -Gal	β -Galaktosidase
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
C	Cytosin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CAK	<i>Cdk Activating Kinase</i>
ca.	circa
Cdc	<i>Cell division cycle</i>
CDE	<i>Cell cycle Dependent Element</i>
CDI	<i>Cdk Inhibitor</i>
Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CDNA	copy DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Cip	<i>Cdk inhibitory protein</i>
CKI	<i>Cyclin dependent Kinase Inhibitor</i>
CMV	Cytomegalievirus
CT	Computertomographie

Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DM	<i>Double Minute</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's minimal essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DP	<i>Differentiation regulated transcription factor (DRTF) Protein</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL™	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E1A	<i>Early region 1A</i>
ER	Estrogen Receptor
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fetal Calf Serum
G	Guanosin
G418	Neomycinderivat (Proteinsyntheseinhibitor)
G-CSF	<i>Granulocyte Colony Stimulating Ffactor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde (hour)
HAT	Histonacetyltransferase
HEPES	N2-Hydroxyethylpiperazin-N2-Ethansulfonsäure
HLH	<i>Helix-Loop-Helix-Domäne</i>
HMT	Histonmethyltransferase
HSR	<i>Homogenously Staining Region</i>
HVA	Homovanillinmandelsäure
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
Ink4	<i>Inhibitor of kinase 4</i>
INPS	<i>International Neuroblastoma Pathology System</i>
INR	Initiator-Element
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
kb	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
LZ	<i>Leuzin-Zipper</i>
M	molar
mER	<i>mouse Estrogen Receptor</i>
MEF	Mausembryofibroblasten
mIBG	Metaiodobenzylguanidin
Miz-1	<i>Miz interacting zinc finger protein 1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>Multidrug Resistance associated Protein</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
Myc	<i>Myelocytomatosis protein</i>
μ	mikro
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NP40	Nonidet P-40
NSE	neuronspezifische Enolase
4-OHT	4-Hydroxy-Tamoxifen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	<i>Retinoblastoma Protein</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rb	Retinoblastom
RNA	rubonucleic acid
RNase	Rubonuklease
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SDS	sodiumdodecylphosphate
SV40	<i>Simian Virus</i>
T	Thymidin
TAE	Tris-Azetat/EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung

TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA (Puffer)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIE	<i>TGFβ Inhibitory Element</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TSA	Trichostatin A
TSE	<i>Tissue Specific Element</i>
U	unit (Einheit)
UV	ultraviolett
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
VMA	Vanillinmandelsäure
wt	Wildtyp
WT	<i>Wilms Tumour</i>

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Verena Knepe, ehemals Strieder
Adresse: Lüsbergstr. 3
57074 Siegen
Deutschland
Telefon: dienstlich: 0271 - 2310
privat: 02737 - 226262
Email: Verena.Knepe@web.de
Geburtstag: 28.02.1978
Geburtsort: Frankenberg
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

September 1984 - Juli 1988 Grundschule in Allendorf / Eder
September 1988 - Juli 1997 Gymnasium in Frankenberg / Eder
Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

Oktober 1997 - September 1999 Grundstudium Humanmedizin in Marburg
Abschluss: Ärztliche Vorprüfung
September 1999 - Mai 2004 Hauptstudium Humanmedizin in Marburg und
Absolvierung des Praktischen Jahres in
Siegen
Abschluss: Ärztliche Prüfung

Promotion

seit März 2001

Promotion in Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Universität Marburg im Labor von Prof. Dr. Eilers mit dem Thema: „Regulation der Genexpression von *MYCN* in humanen Neuroblastomzellen durch Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie“

8.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Beato, Behr, Berger, Bertalanffy, Biens, Cetin, Daut, Eilers, Engehart-Cabillic, Gemsa, Geus, Gotzen, Griss, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Heeg, Hofmann, Kern, Klenk, Klose, Koch, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lange, Lennartz, Lill, Löffler, Lorenz, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, R., Müller, U., Neubauer, Oertel, Rehder, Renschmidt, Renz, Röhn, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Schulze, Schwarz, Seifart, Seitz, Seyberth, Steiniger, Vogelmeier, Weihe und Werner *in Marburg* sowie Strunk, Tauber und Trux *in Siegen*

8.4 Danksagung

Ich möchte allen herzlich danken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Werner Lutz für die engagierte Betreuung während der gesamten Arbeit und Prof. Dr. Martin Eilers für die Bereitstellung des Projekts und alle anregenden Diskussionen und Ratschläge.

Für die Hilfe bei den FACS-Analysen möchte ich mich bei Mary-Lou Zouzarte bedanken.

Für die angenehme Zusammenarbeit und Hilfestellung bei vielen Problemen danke ich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe:

Sovana Adhikary, Rudi Beier, Eckhardt Bergmann, Sandra Bernard, Dr. Bernd Berwanger, Vincent Beuger, Dorothee Beul, Dr. Caroline Bouchard, Sven Gallinat, Stefan Göttlich, Steffi Herold, Daniela Kleine-Kohlbrecher, Dirk Nielsen, Bozena Polok, Jens-Peter Reese, Johanna Stock und Michael Wanzel.

Ganz besonders danke ich Philipp Knepe für die seelisch-moralische Unterstützung während der Arbeit.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Regulation der Genexpression von MYCN in humanen Neuroblastomzellen durch Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie“

im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Martin Eilers mit Unterstützung durch Dr. Werner Lutz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Daten aus der vorliegenden Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Originalarbeiten:

V. Strieder und W. Lutz (2002): Regulation of N-myc expression in development and disease. *Cancer Letters* 180, 107-119

V. Strieder und W. Lutz (2003): E2F proteins regulate MYCN expression in neuroblastomas. *Journal of biological chemistry* 278, 2983-2989

C. Kramps, V. Strieder, A. Sapetschnig, G. Suske und W. Lutz (2004): E2F and Sp1/Sp3 synergize but are not sufficient to activate the *MYCN* gene in neuroblastomas. *Journal of biological chemistry* 279, 5110-5117

Marburg, den 28.06.2004

Verena Knepe