

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



**Die Regulation der N-Myc-Stabilität ist eine wichtige
Funktion der Aurora-A-Kinase in MYCN-
amplifizierten Neuroblastomen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Lars Hendrik Schüttrumpf

geb. in Osnabrück

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
05. November 2010.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. M. Eilers

Korreferent: Prof. Dr. R. F. Maier

1 Einleitung	6
1.1 Das Neuroblastom.....	6
1.1.1 Inzidenz.....	6
1.1.2 Stadieneinteilung nach INSS	7
1.1.3 Diagnose.....	7
1.1.4 Therapie.....	10
1.1.5 Prognose.....	11
1.2 Genetische Faktoren bei der Onkogenese des Neuroblastoms	12
1.2.1 Verlust genetischen Materials	13
1.2.2 Amplifikationen und Zugewinne	14
1.2.2.1 MYCN – Funktion und Bedeutung für das Neuroblastom	14
1.2.2.2 Trisomie an Chromosom 17q.....	18
1.2.3 Molekulare Faktoren	19
1.2.3.1 Neurotrophin-Rezeptoren und P75	19
1.2.3.2 FYN.....	20
1.3 RNAi-Screens	21
1.3.1 RNAi-Screens: Funktionsweise, Vor- und Nachteile	21
1.3.2 RNAi-Screen in MYCN-amplifizierten Neuroblastomen	23
1.4 Fragestellung.....	26
2 Material.....	28
2.1 Stämme und Zelllinien.....	28
2.1.1 Säugerzellen	28
2.1.1.1 Neuroblastomzelllinien	28
2.1.1.2 Virusproduzierende Säugerzellen	29
2.1.2 Bakterienstämme.....	29
2.2 Medien	29
2.2.1 Medien für die Zellkultur	29
2.2.2 Medien für die Bakterienkultur	30
2.3 Lösungen.....	30
2.3.1 Lösungen für die Zellkultur	30
2.3.2 Allgemeine Lösungen	31
2.4 Puffer.....	32
2.5 Chemikalien	33
2.6 Standards und Enzyme.....	34
2.6.1 Standards.....	34
2.6.2 Polymerase und Reverse Transkriptase	34
2.7 Synthetische Oligonukleotide	34
2.7.1 Primer für die Q-PCR	34
2.7.2 Oligonukleotide für RNA-Interferenz (RNAi) Experimente.....	35
2.8 Plasmide.....	37
2.8.1 Grundvektoren.....	37
2.8.2 Expressionsplasmide für ecotrophe Rezeptoren	38
2.8.3 Plasmide für RNA-Interferenz (RNAi) Experimente	38
2.9 Filme, Filter und Geräte.....	40

2.10 Antikörper	41
2.10.1 Primäre Antikörper.....	41
2.10.2 Sekundäre Antikörper	41
2.11 Kit-Systeme.....	42
3 Methoden	43
3.1 Zellkultur.....	43
3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen.....	43
3.1.2 Passagieren von Zellen.....	43
3.1.3 Einfrieren von Zellen	44
3.1.4 Auftauen von Zellen.....	44
3.1.5 Bestimmung der Zellzahl	44
3.2 Zellbiologische Methoden	45
3.2.1 Transfektion von Säugerzellen durch Kalziumphosphatpräzipitation.....	45
3.2.2 Retrovirale Infektion zur Integration von Plasmid-DNA	46
3.2.2.1 Herstellung rekombinanter Retroviren.....	46
3.2.2.2 Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren	46
3.2.3 Prozessierung der siRNA	47
3.2.4 DNA-Schädigung durch UV-Licht Bestrahlung.....	48
3.2.5 Zellfärbung mit Kristallviolett	49
3.3 Proteinchemische Methoden.....	49
3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten	49
3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford	50
3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.3.4 Western-Blot	51
3.4 Molekularbiologische Methoden	51
3.4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	51
3.4.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	52
3.4.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	52
3.4.4 Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	52
3.4.5 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	52
3.4.6 Photometrische Bestimmung von DNA.....	53
3.4.7 Isolierung von RNA	53
3.4.8 Reverse Transkription	53
3.4.9 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	54
4 Ergebnisse.....	56
4.1 RNAi-Screen: Effektivität der shRNAs und Umfang der untersuchten Gene.....	56
4.2 Wachstumsarrest durch Aurora-A-Depletion in MYCN- amplifizierten Zellen gegenüber nicht amplifizierten Zellen – ein generelles Phänomen?.....	59
4.3 p53-Status im Neuroblastom - ist p53 verantwortlich für den durch Aurora-A-Depletion ausgelösten Wachstumsarrest?.....	62
4.3.1 Beobachtungen in IMR-32 und SH-EP Zellen	62
4.3.2 p53-Induktion in allen Zelllinien	63

4.3.3 Wie reagiert p53 in den verschiedenen Zelllinien auf die Aurora-A-Depletion?	64
4.4 Wird der Wachstumsarrest unter Aurora-A-Depletion durch MYCN ausgelöst?	65
5 Diskussion	67
6 Zusammenfassung – Summary	75
7 Literaturverzeichnis	78
8 Anhang	90
8.1 Neuroblastomstudie 2004	90
8.2 Abkürzungen-Glossar	91
8.3 Abbildungsverzeichnis.....	94
8.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer	95
8.5 Danksagung.....	96

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Neuroblastome sind nach Hirntumoren die häufigsten soliden Tumore im Kindes- und Jugendalter und für über 15% der Todesfälle durch Krebserkrankungen bei Kindern verantwortlich [Brodeur, 2003].

Neuroblastome entstehen aus unreifen Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems und bestehen histologisch im Wesentlichen aus Neuroblasten und Schwann-Zellen. Etwa die Hälfte aller Tumore ist im Nebennierenmark lokalisiert. Die andere Hälfte verteilt sich auf Ganglien des sympathischen Nervensystems in Brust- und Bauchhöhle sowie auf weitere Ganglien im Becken und seltenere Lokalisationen [Brodeur, 2003].

Bezogen auf ihr biologisches Verhalten sind Neuroblastome eine sehr heterogene Tumorgruppe. Sie besitzen die Fähigkeit zur spontanen Rückbildung, können zu gutartigen Tumoren ausreifen oder ein aggressives und invasives Wachstum zeigen. Die prognostisch günstigen Neuroblastome gehen nur sehr selten in ungünstige Stadien über.

Das Lebensalter zum Diagnosezeitpunkt ist ein entscheidender Prognosefaktor. Säuglinge und Kleinkinder haben eine deutlich bessere Prognose bezüglich des Überlebens als ältere Kinder.

1.1.1 Inzidenz

Die Neuerkrankungsrate (Inzidenz) liegt in Deutschland bei 1,1/100.000 Kinder unter 15 Lebensjahren pro Jahr, wobei 90% der Fälle in den ersten fünf Lebensjahren diagnostiziert werden [Powell et al., 1998].

Nach dem Jahresbericht 2004 des „Deutschen Kinderkrebsregisters“ erkrankten in Deutschland jährlich etwa 150 Kinder neu, wobei 88% der Patienten jünger als fünf Jahre waren. 40% aller Erkrankten waren Neugeborene und Säuglinge. Das Geschlechterverhältnis war mit 1:1,1 Mädchen pro Jungen annähernd gleich [Kaatsch et al., 1999]. Der Anteil an allen Krebserkrankungen im Kindesalter betrug ca. 8%.

1.1.2 Stadieneinteilung nach INSS

Das Neuroblastom wird nach dem „International Neuroblastoma Staging System“ (INSS) in 5 Stadien eingeteilt. Die Klassifikation berücksichtigt dabei die lokale Ausbreitung des Primärtumors, die Durchführbarkeit der vollständigen oder unvollständigen chirurgischen Tumorresektion, den regionalen oder fernen Lymphknotenbefall sowie das Metastasierungsmuster.

Das Stadium 1 des Neuroblastoms beschreibt einen lokal begrenzten, makroskopisch vollständig resezierbaren Tumor mit oder ohne mikroskopisch nachweisbarem Residualtumor. Die Lymphknoten dürfen nicht befallen sein. Das Stadium 2A ist durch einen nicht vollständig resezierbaren Primärtumor ebenfalls ohne Lymphknotenbefall definiert, im Stadium 2B liegt ein ipsilateraler Lymphknotenbefall vor. Für Stadium 3 ist im Wesentlichen ein Befall beider Körperhälften charakteristisch. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um einen einseitig begrenzten Primärtumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall oder einen nicht resezierbaren, über die Mittellinie wachsenden Primärtumor handelt. Im Stadium 4 liegt eine Fernmetastasierung in Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut oder anderen Organen vor. Eine besondere Situation ergibt sich im Stadium 4S. Dieses Stadium ist durch einen kleinen, einseitig begrenzten Primärtumor in der Brust- oder Bauchhöhle bei gleichzeitiger Metastasierung in Leber und Haut gekennzeichnet. Ein leichter Befall des Knochenmarks ist ebenfalls mit den Kriterien des Stadium 4S vereinbar. Um dem Stadium 4S zugeteilt werden zu können, müssen die Kinder bei Diagnosestellung im Säuglingsalter (<12 Monate) sein [Brodeur et al., 1993].

Neben dem Alter des Kindes spielen zytogenetische Analysen eine wichtige Rolle für die Einteilung der Tumore in Risikogruppen und die resultierenden Therapieoptionen [Ikeda et al., 2002].

1.1.3 Diagnose

Bei vielen Patienten ist die Diagnose des Neuroblastoms ein Zufallsbefund, der bei einer Routineuntersuchung oder bei der Abklärung einer anderen Fragestellung auffällt. Ist das Tumorwachstum fortgeschritten und werden bereits lokale Nachbarstrukturen infiltriert oder komprimiert oder sind andere Organe durch Fernmetastasen befallen, entsteht ein buntes Bild an Symptomen. Tumore im Bauchraum können durch Druck

auf den Harnleiter Harnstau verursachen. Ein Tumor im Brustraum kann zu Atemnot führen. Wächst das Neuroblastom im Halsbereich und komprimiert die sympathischen Neurone kann es eine Trias aus hängendem Augenlid (Ptosis), kleiner Pupille (Miosis) und Hebung des Unterlids mit scheinbarem Enophthalmus verursachen (Horner-Syndrom).

Zur Abklärung der Verdachtsdiagnose Neuroblastom benötigt man neben der Anamnese und der körperlichen Untersuchung bildgebende Verfahren, laborchemische Untersuchungen und die Histologie:

Ultraschall	- im Bauch- und Halsbereich: Suche nach dem Primärtumor - in Leber, Milz und Lymphknoten: Suche nach Metastasen
Kernspintomographie	- Suche und Beurteilung der Lokalisation und Ausdehnung des Primärtumors und der Metastasen
Szintigraphie	- Metastasierungsorte lassen sich durch den radioaktiv markierten Indikator des Katecholaminstoffwechsels ¹³¹ I-Metajodbenzylguanidin (mIBG) auffinden - Skelettszintigraphie bei Knochenmetastasen
Labor: Blut	- Tumormarker: neuronenspezifische Enolase (NSE) [Zeltzer et al., 1986] - Laktatdehydrogenase (LDH) [Shuster et al., 1992] - Ferritin [Hann et al., 1985]
Labor: Urin	- Adrenalin- und Noradrenalinabbauprodukte (Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure)

Grundlage des so genannten „Windeltest-Screening“ ist die Suche von Katecholaminmetaboliten im Urin. Von 1995 bis 2000 wurde in 6 von 16 Ländern der Bundesrepublik Deutschland bei fast 1,5 Millionen Kindern im Alter von einem Jahr ein solches Screening durchgeführt. Über 2 Millionen Kinder der übrigen Bundesländer dienten als Kontrollgruppe.

Bei 149 Kindern führte die Untersuchung zur Diagnose Neuroblastom. Drei dieser Kinder verstarben im weiteren Verlauf. Bei weiteren 55 Kindern mit negativem

Ergebnis wurde zu einem späteren Zeitpunkt ein Neuroblastom diagnostiziert. In dieser Gruppe verstarben 14 Patienten an den Folgen des Neuroblastoms.

Die Auswertung der Studie ergab, dass die Inzidenz des fortgeschrittenen Stadium 4 im Screening-Kollektiv (3,7/100.000) und der Kontrollgruppe (3,8/100.000) nahezu gleich war. Auch die Mortalitätsrate zeigte zwischen untersuchter Gruppe (1,3/100.000) und Kontrollgruppe (1,2/100.000) keinen Unterschied. Hingegen stieg im Früherkennungsprogramm die Inzidenz der Neuroblastome insgesamt stark an. Nachuntersuchungen haben ergeben, dass über die Hälfte der Tumore in solchen Screening-Kollektiven normalerweise nicht diagnostiziert worden wären, da sie sich ohne Behandlung zurückbilden und keine Therapie benötigen.

Die Erwartung, Tumore mit besonders ungünstiger Prognose frühzeitig zu erkennen, konnte durch das Screening nicht erfüllt werden. Die Mortalität des aggressiven Stadium 4 sowie der Neuroblastome insgesamt konnte nicht gesenkt werden. Das Screening im Alter von einem Jahr wird daher nicht mehr empfohlen [Schilling et al., 2002]. Eine kanadische Studie (Quebec Neuroblastoma Screening Project) konnte ein ähnliches Ergebnis für die Früherkennung im Alter von 3 Wochen und 6 Monaten zeigen. Auch in diesem Alter ist das Screening nicht zu empfehlen [Woods et al., 1996].

Zur endgültigen Diagnosesicherung dient die mikroskopische Untersuchung des entnommenen Gewebes: Neuroblastome bestehen aus kleinen, undifferenzierten Zellen, den Neuroblasten. Das Zytoplasma ist spärlich entwickelt. Die rundlichen bis ovoiden Zellkerne sind polymorph und stark hyperchromatisch. Die Zellen liegen dicht beieinander und sind teilweise von neurofibrillären Strukturen umgeben. In der Hälfte der Proben findet man diagnostisch wichtige neuroblastomatöse Pseudorosetten, in deren Zentrum sich Neurofibrillen befinden [Remmele, 1997]. Sie können Anzeichen einer beginnenden Differenzierung sein [Böcker et al., 2004]. Im Zentrum der Tumore entstehen oft Nekroseherde und Verkalkungen.

Neuroblastome können zu Ganglioneuroblastomen ausreifen. Diese enthalten neben den stark proliferierenden Neuroblasten größere, ausgereifte, zytoplasmareiche Ganglienzellen. Ein Teil der Neuroblastome einschließlich ihrer Metastasen differenzieren sich komplett zu verdrängend wachsenden Ganglioneuromen. Sie bestehen aus reifen Ganglienzellen, sind deutlich zellärmer und enthalten keine Neuroblasten. Ganglioneurome sind sekundär benigne gewordene primäre Malignome [Remmele, 1997].

1.1.4 Therapie

Die risikobasierte Therapie zeigt große Unterschiede in der Eskalation und reicht von abwartenden Beobachtungsstrategien bis zu operativer Entfernung, kombiniert mit aggressiver Chemotherapie und Bestrahlung. Welche Behandlungsoption gewählt wird, hängt von der Risikogruppe ab. Die Gruppeneinteilung erfolgt neben dem Tumorstadium (nach INSS) und dem Alter des Patienten (> oder <12 Monate) auch nach biologischen Eigenschaften (MYCN-Status, Histopathologie, DNA-Index) [Berthold et al., 1997].

NB2004 RISK GROUP DEFINITION

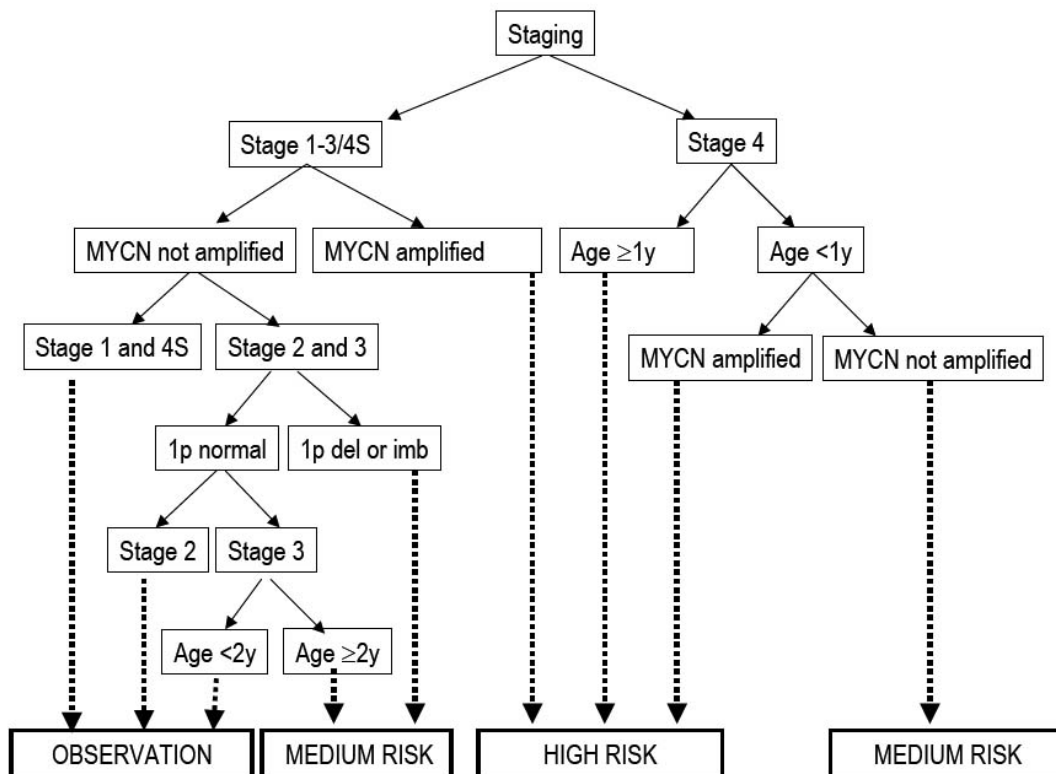


Abbildung 1: Risikogruppen-Definition der Neuroblastomstudie 2004 [Prof. Dr. Frank Berthold (Principal investigator), 2004]

Bei Tumoren der Stadien 1-3 und 4S ohne molekulargenetische Risikofaktoren oder klinisch bedrohliche Zustände, besteht prinzipiell die Möglichkeit, eine abwartende Strategie zu wählen. Nach initialer Biopsie oder Operation können sie 6-12 Monate beobachtet werden. Tritt eine vollständige Remission ein, müssen keine weiteren Maßnahmen ergriffen werden. Bleibt der Tumor jedoch unverändert oder zeigt eine

Progredienz, gelangen die Patienten in die „Mittlere Riskogruppe“ [Reinhardt; Dietrich, 2007] [Berthold and Hero, 2000]. Nach Übergang in Stadium 4 werden sie nach dem Schema der Hochrisikogruppe behandelt.

Patienten der „Mittleren Risikogruppe“ (zum Beispiel: Stadium 1-3 mit molekulargenetischen Risikofaktoren oder Stadium 4 eines Säuglings ohne MYCN-Amplifikation) werden nach initialer Operation mit mehreren Zyklen Chemotherapie und einer Bestrahlung behandelt.

Bei Patienten der Hochrisikogruppe kommen neben der Chemotherapie und der Bestrahlung weitere Maßnahmen zum Einsatz um das Langzeitüberleben zu verbessern. Hierzu gehören die Dauer- und Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Blutstammzelltransplantation (ASCT) und bei gut „speichernden“ Neuroblastomen die Gabe einer therapeutischen Dosis des sonst zur szintigraphischen Diagnostik eingesetzten, radioaktiv markierten Metajodbenzylguanidin [Hoefnagel et al., 1994] [Matthay et al., 2006].

Zusätzlich wird sowohl bei der „Mittleren Risikogruppe“ als auch bei der „Hochrisikogruppe“ zum Abschluss der Therapie Retinolsäure verabreicht, um die Ausreifung der verbliebenen Zellen zu induzieren [Matthay et al., 1999]. Nähere Informationen zu den einzelnen Therapiegruppen sind unter 8.1 zu finden.

1.1.5 Prognose

Unter Einschluss aller Tumorstadien betrug die 10-Jahres-Überlebensrate in einem Studienkollektiv von 2151 Patienten 61% [Berthold and Hero, 2000].

Die Prognose der Neuroblastome ist jedoch sehr unterschiedlich und hängt von vielen Faktoren ab. Die klinischen Verläufe reichen von lebensbedrohlichen Zuständen, über Differenzierung und Ausreifung der Tumore zu verdrängend wachsenden Ganglioneuromen bis hin zu spontanen Remissionen. Die wichtigsten klinischen Parameter für den Verlauf sind das Tumorstadium nach INSS, das Alter des Patienten zum Diagnosezeitpunkt und die Lokalisation des Tumors [Maris and Matthay, 1999] [Brodeur and Maris, 2002].

Bei Betrachtung der Einzelstadien unterscheiden sich die Prognosen zum Teil erheblich. Daten aus der Neuroblastomstudie '97, basierend auf 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten, zeigten ein Überleben von 99% für das Stadium 1, 93% für das Stadium 2 und 83% für das Stadium 3. Beim Stadium 4 kam es zu einer

deutlichen Verschlechterung der Prognose auf 31% Überlebenschancen. Trotz der Metastasierung und einem mittelgroßen Primärtumor zeigte Stadium 4S ein Überleben von 77%. Diese verhältnismäßig gute Prognose lässt sich durch die beschriebenen Differenzierungsprozesse und spontane Remissionen der Tumore erklären.

Obwohl die spontane Remission hauptsächlich bei Patienten im Stadium 4S beobachtet wird, ist sie auch für die Stadien 1-3 sowohl bei Kindern als auch bei älteren Patienten beschrieben worden [Eklof et al., 1983] [Fiorillo et al., 1982].

Eine spontane Remission zeigt sich bei einem erheblichen Teil der Tumore (>10%) ohne oder mit einer nur geringen therapeutischen Anstrengung [Schwab et al., 2003]. Neuroblastome haben eine 10-100mal höhere spontane Remission als andere Malignome [Pritchard and Hickman, 1994].

Neben der genannten Einteilung ist eine weitere Charakterisierung durch andere prognostische Marker möglich: Besonders wichtig ist hierbei die Analyse genetischer Faktoren, wie beispielsweise numerische Chromosomenaberrationen oder strukturelle Veränderungen (MYCN-Onkogenamplifikation / 1p-Deletion), um günstige und ungünstige Verläufe vorherzusagen.

Patienten in Europa, Japan und den USA werden grundsätzlich in Studien behandelt. Wegen der prognostischen Signifikanz für maligne Verläufe, wird der MYCN-Status immer bestimmt [Brodeur, 2003]. Weisen die Tumore viele Kopien des Protoonkogens MYCN auf, haben die Patienten eine besonders schlechte Prognose.

Auch histopathologische Untersuchungen nach der „International Neuroblastoma Pathology Classification“ (INPC) können durch Aussagen über Differenzierung und Morphologie des Tumors prognostische Informationen liefern [Shimada et al., 1999a] [Shimada et al., 1999b].

1.2 Genetische Faktoren bei der Onkogenese des Neuroblastoms

Für das Verständnis der Krebsentstehung und zur Verbesserung gezielter, individueller Therapien ist die systematische Suche und Analyse genetischer Faktoren unumgänglich. Etwa 30% der Neuroblastome mit guter Prognose und 85% derjenigen mit schlechter Prognose zeigen bereits heute mindestens einen gut bekannten molekulargenetischen Risikofaktor.

Im Folgenden werden zunächst genomische Veränderungen und anschließend molekularbiologische Faktoren des Neuroblastoms vorgestellt. Die genomischen Veränderungen lassen sich in Verluste und Zugewinne unterteilen. Eine Besonderheit stellt die Amplifikation von Genen da, bei der einzelne Genorte in vielfacher Kopie hintereinander vorliegen, ohne dass die umgebenden chromosomalen Strukturen verändert sind.

1.2.1 Verlust genetischen Materials

Eine mögliche genetische Alteration, die zur Tumorentstehung beitragen kann, ist der Verlust von genetischem Material. Dabei verliert das zelluläre Genom Gensequenzen von der Länge mehrerer Megabasen. Solche Deletionen treten beim Neuroblastom regelmäßig an bestimmten Genorten auf. Besonders häufig findet man sie am kurzen Arm des Chromosom 1 (1p) und dem langen Arm des Chromosom 11 (11q) [Spitz et al., 2003] [Maris et al., 2000].

Durch den Verlust der dort lokalisierten Allele ist der Genort nur noch auf dem homologen Chromosom zu finden. Der verbleibende Genort kann inaktiviert werden und der Heterozygotiestatus der Zelle geht verloren (Loss of heterozygosity/ LOH).

Zugehörige Tumorsuppressorgene, die das onkologische Potential durch den Verlust dieser Regionen erklären würden, konnten bisher lediglich für eine Region im Bereich 1p gefunden werden [Westermann and Schwab, 2002] [Bagchi et al., 2007].

Die Deletionen auf Chromosom 1 sind bei etwa 30% der Tumore zu beobachten. Sie sind häufiger bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium und MYCN-Amplifikation zu finden [Spitz et al., 2002] [Maris et al., 2001]. Die eigenständige prognostische Signifikanz von 1p LOH ist im Moment eher fragwürdig [Maris et al., 2000] [Gehring et al., 1995].

Durch mehrere Studien konnten verschiedene Bereiche auf 1p auffindig gemacht werden, die regelmäßige Deletionen zeigten [Ejeskar et al., 2001] [Martinsson et al., 1995] [Bauer et al., 2001] [Hogarty et al., 2000]. Die große Variabilität wirft weiterhin die Frage der Bedeutung und Funktionalität dieser Regionen auf. Die Bande 1p36 scheint von besonderer Wichtigkeit zu sein. Dort wurden ein Tumorsuppressorgen (Chd5) und ein Transkriptionsfaktor (Miz1) identifiziert, welche die Wachstumsvorteile der Tumore durch Deletion dieser Region erklären [Bagchi et al., 2007] [Herold et al., 2002].

LOH auf Chromosom 11 tritt ebenfalls bei etwa 30% der Neuroblastome auf [Spitz et al., 2003] [Guo et al., 1999], wobei es sich keineswegs um die gleichen Tumore wie bei LOH 1p handelt. Die 11q-Deletionen bilden eine andere Subgruppe an Neuroblastomen [McArdle et al., 2004], die trotz fehlender MYCN-Amplifikationen zu der Hochrisikogruppe gehören und mit chromosomalen Strukturveränderungen wie LOH in 3p [Spitz et al., 2003] [Plantaz et al., 2001] und Verstärkung in 17q [Plantaz et al., 2001] [Simon et al., 2006] vergesellschaftet sein können. Die 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt durch die 11q-Deletion bei nicht MYCN-amplifizierten Tumoren von 94% auf 80% ab. Kommt eine MYCN-Amplifikation hinzu ist die Prognose deutlich schlechter. Bei normalem Chromosom 11 liegt das Überleben dann bei 60% und nimmt bei vorhandener 11q-Deletion auf 25% ab [Spitz et al., 2006].

1.2.2 Amplifikationen und Zugewinne

1.2.2.1 MYCN – Funktion und Bedeutung für das Neuroblastom

Myc-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die durch Überexpression zu unkontrolliertem Zellwachstum führen können [Brodeur, 2003]. Sie gehören zur Gruppe der Proto-Onkogene, die häufig eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung spielen.

Zu den Genen der Myc-Familie gehören c-Myc, N-Myc, L-Myc, S-Myc und B-Myc. Am C-terminalen Ende besitzen die Proteine eine basische Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Domäne (HLH/LZ) mit der sie an ihren Bindungspartner Max und ihre Zielsequenzen an der DNA binden können [Blackwood and Eisenman, 1991]. Die aktiven Heterodimere Myc-Max sind in wachsenden Zellen vorherrschend, während man in ruhenden Zellen nur geringe Mengen des Myc Proteins findet und Max an andere Proteine (Mad/Mnt) gebunden vorliegt [Ayer and Eisenman, 1993].

Alle Myc-Max-Dimere binden an die gleiche DNA-Zielsequenz (CACCA/CTG) und aktivieren dort die Transkription [Blackwell et al., 1993]. Häufiger wird das Heterodimer jedoch durch Vermittlung weiterer Proteine (z.B. Miz1) zu anderen Promotorregionen ohne die spezifische Zielsequenz rekrutiert und wirkt dort reprimierend [Herold et al., 2002] [Mao et al., 2003].

Die Varianten c-Myc, N-Myc, L-Myc sind alle im Rahmen der Entstehung verschiedener Krebserkrankungen beschrieben worden. Dazu zählen unter anderem das

Mammakarzinom, das Burkitt-Lymphom, das Dickdarmkarzinom, das kleinzellige Bronchialkarzinom sowie Melanome [Nesbit et al., 1999] [Schlagbauer-Wadl et al., 1999]. In diesen Tumoren ist die Expression der Myc-Gene heraufreguliert und die Zellen zeigen deutlich erhöhte Proteinspiegel im Vergleich zum umliegenden Gewebe [Pelengaris and Khan, 2003].

Es ist bekannt, dass Myc uneingeschränkte Zellvermehrung begünstigt [Eilers et al., 1991] und die Differenzierung von Zellen hemmt [Freytag and Geddes, 1992]. Es fördert das Zellwachstum [Iritani and Eisenman, 1999] und die Gefäßneubildung [Baudino et al., 2002], reduziert die Verankerung der Zellen an ihrer Umgebung [Arnold and Watt, 2001], begünstigt somit die Metastasenbildung [Pelengaris et al., 2002] und sorgt schließlich für genomische Instabilität [Frye et al., 2003], was zu weiteren Mutationen und dem Fortschreiten der Onkogenese führen kann.

Der Myc-Verlust hingegen führt zur Hemmung der Zellteilung und des Wachstums, löst die Ausreifung der Zelle aus, erhöht ihre Adhäsion in der Umgebung und führt zu einer starken Antwort auf DNA-Schäden.

Myc ist allerdings auch in der Lage die Apoptose zu induzieren, wodurch die Entartung der Zellen begrenzt wird [Evan et al., 1992]. Dieses kann grundsätzlich über zwei verschiedene Wege geschehen.

Erstens induziert Myc die Expression von p19^{ARF}, einem Inhibitor der E3-Ligase MDM2. p53 wird durch MDM2 nicht mehr abgebaut und reichert sich in der Zelle an [Zindy et al., 1998]. p53, als „Wächter des Genoms“ bekannt [Lane, 1992], ist in der Lage das Zellwachstum zu stoppen um Reparaturvorgänge zu ermöglichen oder bei starker Schädigung die Apoptose einzuleiten. Die Deletion von p19 oder p53 führt zur Unterbrechung des Signalweges und ist in verschiedenen Tumoren nachweisbar [Martins et al., 2006].

Zweitens fördert Myc durch indirekte Hemmung anti-apoptotischer Proteine (BCL-X₁/BCL2) und Aktivierung pro-apoptotischer Proteine (BIM) die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien [Eischen et al., 2001] [Egle et al., 2004]. Auch durch Myc-induzierte DNA-Schäden kann es zur Apoptose kommen [Vafa et al., 2002].

MYCN spielt für das Neuroblastom eine besondere Rolle. Es wurde vor über 20 Jahren von Schwab und Brodeur das erste Mal im Neuroblastom beschrieben [Schwab et al.,

1984]. Das Gen ist auf Chromosom 2p24 lokalisiert. Liegt es allerdings in vielfacher Kopie vor (amplifizierter MYCN-Status), ist es oft zusätzlich in „homogeneously staining regions“ (HSRs) und extrachromosomal in „double-minutes“ (DMs) zu finden [Corvi et al., 1994]. Solche Amplifikationen zeichnen Tumore mit einer schlechten Prognose aus [Brodeur et al., 1984]. Die MYCN-Prävalenz insgesamt beträgt ca. 22% [Brodeur et al., 1997]. Aus der MYCN-Amplifikation resultieren erhöhte MYCN-mRNA-Spiegel und daraus erhöhte N-Myc-Proteinkonzentrationen. Das Protein hat eine Größe von 64kDa [Ramsay et al., 1986] und entspricht in seinen funktionellen Eigenschaften den anderen Myc-Proteinen [Schwab et al., 1985]. Trotz seiner kurzen Halbwertszeit können die sehr hohen N-Myc-Spiegel in amplifizierten Zellen (100fach höher als normal) dafür sorgen, dass sich die Zelle fortlaufend teilt und im Zellzyklus bleibt [Brodeur, 2003].

Diese Beobachtung lässt sich molekularbiologisch durch die Betrachtung der bereits bekannten N-Myc-Zielgene teilweise klären. Im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung Marburg durchgeführte Microarray-Analysen, die Neuroblastome mit und ohne MYCN-Amplifikation verglichen, zeigten jedoch, dass hunderte von Genen dereguliert sind [Berwanger et al., 2002]. Neuere Publikationen, die in 251 Neuroblastomproben über 10.000 Gene in ihrer Expression analysierten, brachten 144 differentiell regulierte Gene hervor, mit denen eine präzise Microarray basierte Prognosestellung eines individuellen Patienten möglich wird [Oberthuer et al., 2006]. Die Menge an differentiell regulierten Genen ist jedoch deutlich größer. Myc-Max-Dimere interagieren über ihre HLH/LZ-Domäne mit ihrer Zielsequenz (auch E-Box genannt) in der DNA. Aus dieser Interaktion resultiert in den meisten Fällen eine Aktivierung der Genexpression. Da viele Promotorregionen eine E-Box enthalten, werden in Säugetieren 10-15% der Genorte durch c-Myc gebunden [Fernandez et al., 2003] [Li et al., 2003a] [Zeller et al., 2006]. Diese repräsentieren eine Vielzahl an Funktionen, die durch Myc moduliert werden können. Hierzu zählen die Aktivierung des Stoffwechsels, der Proteinbiosynthese und die Induktion weiterer Transkriptionsfaktoren [Morrish et al., 2008] [Li et al., 2005]. Zellzyklusinhibitoren werden gehemmt und MikroRNAs positiv und negativ reguliert [Staller et al., 2001] [Herold et al., 2002] [Chang et al., 2008]. Um deutlich zu machen zu welchen unterschiedlichen Veränderungen die MYCN-Amplifikation im Neuroblastom auf molekularer Ebene führen kann, sollen nachfolgend einige Zielgene exemplarisch herausgegriffen und beschrieben werden.

In Microarray-Analysen zeigen MYCN-amplifizierte Tumore bis zu 10-fach höhere MCM7-Spiegel [Shohet et al., 2002]. Weitere Experimente bestätigten deutlich erhöhte mRNA- und Protein-Spiegel in MYCN-amplifizierten Zelllinien und Tumoren. MCM7 bildet gemeinsam mit den anderen Proteinen der MCM-Familie (MCM2-MCM7) ein Hexamer, den „Replikations-Lizensierungs-Faktor“. Dieser bindet am Ende der G₁-Phase des Zellzyklus über den „origin recognition complex“ (OCR) an die Stellen der DNA, an denen in der S-Phase die Replikation gestartet wird [Maiorano et al., 2000]. Die MCM- gesteuerte DNA-Synthese sorgt dafür, dass die DNA nur einmal pro Zellzyklus repliziert wird und ist so für die Erhaltung der Euploidy essentiell. Verschiedene MCM-Gene zeigen in ihrer Promotorregion Transaktivierungsstellen für den Transkriptionsfaktor E2F, was vermuten lässt, dass E2F diese Gene physiologischerweise gleichsam reguliert [Ohtani et al., 1999] [Suzuki et al., 1998]. Unterschiedlich stark erhöhte MCM2, MCM5 und MCM7-Expressionen wurden in verschiedenen soliden Tumoren und prämaligen Geweben nachgewiesen [Todorov et al., 1998] [Freeman et al., 1999].

Der MCM7-Promoter besitzt neben drei Bindungsstellen für E2F eine E-Box-Bindungsstelle an der prinzipiell Myc-Proteine binden können [Suzuki et al., 1998]. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine induzierte N-Myc-Expression einen schnellen Anstieg der MCM7-Konzentration nach sich zieht, dass das MYCN/MAX-Heterodimer an die MCM7-Promotorregion bindet und so möglicherweise die Replikation vorangetrieben wird [Shohet et al., 2002].

Ein weiteres interessantes Zielgen ist HMGA1 [Giannini et al., 2005]. HMGA-Proteine sind eine Subgruppe der „High-Mobility-Group-Proteins“. Ihre vermehrte Expression wurde schon vor über 20 Jahren mit der Krebsentstehung in Verbindung gebracht. Man findet erhöhte Expressionen in Mamma-, Kolon- und Schilddrüsentumoren [Chiappetta et al., 1998] [Abe et al., 1999]. HMGA können Protein-Protein-Interaktionen mit zahlreichen nukleären Partnern eingehen [Reeves, 2001]. Sie selbst besitzen keine transkriptionsaktivierende Domäne. HMGA-Proteine sind in der Lage an die DNA zu binden um dort gemeinsam mit ihren Partnerproteinen die Chromatinstruktur zu modifizieren und so die Genexpression zu beeinflussen. HMGA1 ist an bestimmten Chromosomenbanden in der Metaphase zu finden und könnte an der Regulation der Chromosomenorganisation und -kondensation während der Zellteilung beteiligt sein [Disney et al., 1989]. Überexprimiertes HMGA in Krebszellen steht unter Verdacht

genomische Instabilität durch veränderte DNA-Reparatur und Alterationen in der Chromosomenstruktur zu verursachen [Takaha et al., 2002].

Ein anderes MYCN-Zielgen ist MRP1 („multidrug resistance-associated protein 1“). Es erklärt das schlechtere Ansprechen und die vermehrte Resistenzbildung bei der Chemotherapie in MYCN-amplifizierten Tumoren.

MYCN reguliert über ein im Promotor gelegenes E-Box-Element die MRP1-Expression. Der MYCN-Induktion folgt eine Zunahme der MRP1-mRNA und des Proteinspiegels [Manohar et al., 2004]. MRP1 führt zu einer verstärkten Ausschleusung von Zytostatika aus der Zelle und fördert so die Resistenzbildung gegen eine Chemotherapie. Es besteht eine enge Korrelation zwischen MYCN- und MRP1-Expression in primären Neuroblastomen und Zelllinien [Bader et al., 1999] [Bordow et al., 1994]. In einer prospektiven Analyse von 209 Tumoren konnte gezeigt werden, dass die MRP1-Expression in MYCN-amplifizierten Tumoren stark erhöht ist und mit signifikant schlechterem Gesamtüberleben (overall survival) und kürzerem ereignisfreien Überleben (event free survival) korrelieren [Haber et al., 2006].

Wie die Beispiele zeigen, bewirkt die MYCN-Amplifikation verschiedenste Veränderungen auf molekularer Ebene.

Im Gegensatz zur Amplifikation ist die alleinige erhöhte N-Myc-Expression kein prognostischer Marker. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine verstärkte N-Myc-Proteinexpression ohne vorhandene MYCN-Amplifikation durch vermehrte Induktion der Apoptose und Aktivierung von Genen, die prognostisch günstige Tumore auszeichnen (CD44), zu einer reduzierten Vitalität des Tumors führt [Tang et al., 2006].

1.2.2.2 Trisomie an Chromosom 17q

Bei diesem Zugewinn an genetischem Material ist der lange Arm des Chromsoms 17 in dreifacher anstatt normalerweise zweifacher Kopie vorhanden. Studien zeigen, dass mehr als die Hälfte der untersuchten Neuroblastome diese numerische Chromosomenaberration aufweisen [Caron, 1995] [Bown et al., 1999]. Häufig handelt es sich dabei um eine unbalancierte Translokation zwischen Chromosom 1 und 17 [Van Roy et al., 1997]. Trisomie 17q ist mit aggressivem Wachstum von Neuroblastomen vergesellschaftet. Die prognostische Signifikanz ist unklar.

1.2.3 Molekulare Faktoren

1.2.3.1 Neurotrophin-Rezeptoren und P75

Die Entwicklung der Zellen des sympathischen Nervensystems und des Nebennierenmarks wird über ein komplexes Muster an neurotrophen Botenstoffen, den Neurotrophinen, gesteuert. Die Neurotrophine binden an der Zelloberfläche an die Neurotrophin-Rezeptoren (TrkA, TrkB, TrkC), die über ihre Tyrosin-Kinaseaktivität eine Signalkaskade in der Zelle in Gang setzen [Klein, 1994] [Snider, 1994].

Bestimmte Neuroblasten induzieren die Einwanderung und Vermehrung von Schwann-Zellen. Diese Stützzellen produzieren im Gegenzug solche neurotrophen Faktoren, die die Neuroblasten über ihre Rezeptoren ausreifen lassen [Ambros et al., 1996] [Ambros et al., 2001]. In der späten neuroembryonalen Entwicklung wird das Expressionsmuster der Zellen von TrkB oder TrkC auf TrkA umgeschaltet [Birren et al., 1993]. Die meisten Neurone der sympathischen Ganglien zeigen dann hohe TrkA-Konzentrationen. Es folgt eine massive physiologische Apoptose [Schwab et al., 2003].

Der bevorzugte Ligand von TrkA, der „nerve growth factor“ (NGF), begünstigt nach Bindung an den Rezeptor das Überleben und die Ausreifung der Zellen.

Fehlt hingegen ausreichend NGF zur TrkA-Aktivierung, kann es abhängig vom Reifungsgrad der Zelle, zum programmierten Zelltod kommen. Unausgereifte TrkA-produzierende Neuroblasten werden abgeräumt [Nakagawara and Brodeur, 1997].

Es könnte sich daher bei der spontanen Remission bei TrkA-exprimierenden Neuroblastomen junger Patienten um eine verzögerte Aktivierung des programmierten Zelltods aufgrund fehlender Neurotrophine handeln. TrkA korreliert mit jungem Alter, niedrigen Tumorstadien und Abwesenheit einer MYCN-Amplifikation [Brodeur, 2003].

In aggressiven Tumoren ist es herunterreguliert [Schwab et al., 2003].

Die Expression von TrkB ist häufig bei MYCN-amplifizierten Tumoren zu finden [Nakagawara et al., 1994]. Einige dieser Tumore produzieren und sezernieren zusätzlich den TrkB stimulierenden Liganden BDNF („brain-derived neurotrophic factor“). Durch die eigenständige Stimulation (autokrin oder parakrin) könnte den Tumoren so ein Überlebens- oder Wachstumsvorteil zugute kommen [Acheson et al., 1995]. Zusätzlich scheint der TrkB/BDNF-Signalweg zu einer gewissen Resistenz gegen Chemotherapeutika beizutragen [Ho et al., 2002].

TrkC wird ähnlich wie TrkA vorwiegend in Tumoren niedriger Stadien exprimiert, nicht aber in MYCN-amplifizierten Tumoren [Ryden et al., 1996].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass TrkA mit oder ohne TrkC eher gutartige Tumore auszeichnet, während TrkB gemeinsam mit seinem Liganden BDNF in bösartigen Tumoren gebildet wird [Brodeur, 2003]. Ob eine neuronale Vorläuferzelle in ihrer Entwicklung zu einer hoch spezialisierten Nervenzelle ausreift oder den programmierten Zelltod eingeht, wird durch das komplexe Expressionsmuster an Neurotrophin-Rezeptoren und deren Liganden bestimmt [Schwab et al., 2003].

Ein weiterer Transmembran-Rezeptor an den Neurotrophine mit geringer Affinität binden können ist P75. Dieser Rezeptor gehört allerdings zur Familie der „Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren“ (TNFR). Abhängig vom Expressionsmuster der anderen Rezeptoren kann P75 sowohl den Zelltod als auch die Ausreifung der Zelle als Antwort auf seine Aktivierung hervorrufen [Hempstead, 2002]. Das Vorkommen von P75 korreliert mit gutartigen Verläufen [Kogner et al., 1993].

1.2.3.2 FYN

Fyn ist eine (nicht-Rezeptor) Tyrosin-Kinase. Sie scheint den positiven Verlauf von Neuroblastomen zu begünstigen. Durch eine Genexpressionsanalyse bei 94 Neuroblastomen konnte gezeigt werden, dass Fyn einen von MYCN-unabhängigen Prognosefaktor für das Neuroblastom darstellt und mit prognostisch günstigen Tumoren korreliert. Im Stadium 1 ist Fyn fast immer nachweisbar, während es im Stadium 4 meist nicht exprimiert wird. Die Expression von Fyn führt morphologisch zur Ausreifung der Zellen. Es werden Zellfortsätze ausgebildet und die Zellteilung stagniert. In Zelllinien aus Tumoren des Stadium 4, sowohl mit als auch ohne MYCN-Amplifikation, lassen sich die Differenzierungsvorgänge bei Fyn-Expression beobachten. Umgekehrt könnte eine Herunterregulierung von Fyn in fortgeschrittenen Tumorstadien zu einem Verlust von Differenzierungseigenschaften und zu einer allgemeinen Zellproliferation beitragen. Die genetischen Mechanismen, die zur Herunterregulierung der Fyn-Expression führen sind bis heute unklar [Berwanger et al., 2002].

1.3 RNAi-Screens

1.3.1 RNAi-Screens: Funktionsweise, Vor- und Nachteile

Mittels RNA-Interferenz (RNAi) lässt sich die Expression einzelner Gene spezifisch hemmen. Zunächst funktionierte RNAi lediglich in niederen Organismen (Würmern, Pflanzen und Fruchtfliegen) [Fire, 1999] bis T. Tuschl 2001 erkannte, dass kurze 21 Nukleotide große RNA-Fragmente (small interfering RNA) auch in komplexeren Säugerzellen die Möglichkeit der Genregulation erlauben [Elbashir et al., 2001]. Dabei interagieren die siRNAs sequenzspezifisch mit der passenden messengerRNA und führen über die Rekrutierung des „RISC-Komplexes“ zum Abbau. Es handelt sich also um eine posttranskriptionale Hemmung der Genexpression (näheres zur Funktionsweise und Prozessierung siehe 3.2.3).

Die Vorteile von siRNAs sind konstant gute Qualität, die Möglichkeit der genauen Dosierung, die appliziert und von den Zellen aufgenommen werden soll sowie die Möglichkeit der chemischen Modifikation der RNA-Stränge und somit die Beeinflussung der Stabilität und der Aufnahmeeigenschaften in die Zellen.

Deutliche Nachteile sind die Kurzlebigkeit der siRNAs, wodurch es bei einmaliger Applikation nur zu einer transienten Hemmung der Genexpression kommt, Probleme der effizienten Einschleusung in die Säugerzellen sowie die Kosten der siRNAs in größeren Mengen [Bernards et al., 2006].

Um diese Probleme zu verbessern wurden Vektoren entwickelt, die siRNA-Vorläufermoleküle produzieren [Brummelkamp et al., 2002a] und in Viren verpackt in viele verschiedene Zelltypen geschleust werden können [Brummelkamp et al., 2002b]. Unter Verwendung retroviraler Fahren werden die Vektoren fest in das Genom integriert. Des Weiteren wurden Vektoren entwickelt, die nach der Integration in die Zelle beliebig an- und ausgeschaltet werden können [van de Wetering et al., 2003].

Durch diese neuartigen Systeme lässt sich eine Vielzahl an Genen in großem Umfang ausschalten. Dieses erlaubt in umfassenden Screens die Identifikation von Genen, die an bestimmten Signalwegen physiologischer Funktionen aber auch pathologischen Abläufen in der Zelle beteiligt sind. Je nach Aufbau der Experimente lassen sich so verschiedene Fragestellungen klären.

So konnten beispielsweise neben dem bereits bekannten HDM2 noch fünf neue Regulatoren des p53-Signalweges gefunden werden. Dazu wurde in einem bestimmten Zellsystem ein p53-abhängiger Zellzyklusarrest ausgelöst. Gleichzeitig wurden 7.914

verschiedene Gene mittels RNAi herunterreguliert. Durch das Ausschalten von HDM2 und den fünf neuen Genen, konnte der p53-abhängige Wachstumsarrest aufgehoben werden und die Zellen bekamen im Vergleich zur Kontrolle einen wesentlichen Wachstumsvorteil [Berns et al., 2004].

Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der gegen das Transmembran-Protein HER2 gerichtet ist. Es wurde für die gezielte Brustkrebstherapie entwickelt, da einige der Tumoren eine Amplifikation im ERBB2/HER2-Onkogen zeigen. Bei einigen Frauen wurden gute Therapieerfolge erzielt. Es gibt allerdings auch Tumoren, die trotz HER2-Überexpression nicht auf die Therapie reagieren und andere, die nach kurzer Zeit resistent werden. Aufgrund der hohen Therapiekosten (50.000US\$) ist es wichtig weitere prädiktive Faktoren zu finden, durch die sich gut ansprechende Tumoren von schlecht ansprechenden unterscheiden. Des Weiteren ist ein Verständnis der molekulargenetischen Signalwege, die an der Trastuzumab-Resistenz beteiligt sind, notwendig [Park and Davidson, 2007].

Einen Ansatz konzipierten Berns et al. mittels eines RNAi-Screens, bei dem Gene gesucht werden sollten, deren Suppression zur Aufhebung des durch Trastuzumab ausgelösten Zellzyklusarrests führt. Hierzu wurde eine HER2-überexprimierende Brustkrebszelllinie mit verschiedenen siRNA-Vektoren infiziert und anschließend mit Trastuzumab behandelt. Trastuzumab induzierte bis auf eine Zellreihe bei allen Zellen einen Proliferationsarrest. Bei der einen Ausnahme war durch die siRNA das Tumorsuppressorgen PTEN herunterreguliert und die Zellen konnten trotz Trastuzumab weiter wachsen [Berns et al., 2007]. Hierbei handelt es sich also um einen denkbaren Mechanismus, durch den Brustkrebszellen eine Resistenz gegen Trastuzumab ausbilden könnten. Tatsächlich konnten Nagata et al. zeigen, dass der Verlust von PTEN eine Resistenz im Patienten bewirkt [Nagata et al., 2004].

Die Ergebnisse solcher Screening-Untersuchungen zeigen möglicherweise relevante Gene auf. Doch ist das Ergebnis aufgrund verschiedener Einflüsse und Fehlerquellen im Anschluss zu überprüfen. Es ist prinzipiell möglich, dass die gegen ein einzelnes Zielgen konzipierte siRNA neben der anvisierten mRNA weitere Gene reprimiert (off target effect). In solchen Fällen ist es schwer die ursächlichen Gene den beobachteten Effekten zuzuordnen.

Aufgrund der großen Anzahl der eingesetzten siRNAs ist es nicht möglich zu prüfen, wie effektiv die einzelnen siRNAs die Gene ausschalten. Geht man davon aus, dass nur die Hälfte der siRNAs erfolgreich funktionieren, werden nur 50% der untersuchten Gene mit dem Screen abgedeckt.

Vergleicht ein Screen zwei Zelllinien oder Tumore bedingt der Versuchsaufbau zunächst nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Es muss geprüft werden, ob es sich bei den Ergebnissen lediglich um zelllinienspezifische Unterschiede handelt oder ob sie allgemeine Relevanz (generelles Phänomen) haben und auf andere Tumorzellen übertragbar sind. Diese Unsicherheiten, die ein Screen mit sich bringt, machen es notwendig eine Validierung der Daten durchzuführen.

1.3.2 RNAi-Screen in MYCN-amplifizierten Neuroblastomen

Um Gene zu finden, die das aggressive Wachstum der Neuroblastome mit MYCN-Amplifikation erklären könnten, wurde ein Screen mit 194 Genen durchgeführt (Bernd Berwanger und Tobias Otto, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung Marburg 2005).

Ziel des Screens war es Gene zu identifizieren, die selektiv für das Wachstum von N-Myc-amplifizierten Neuroblastomen relevant sind und somit ein potentielles Ziel für eine pharmakologische Therapie darstellen. Hierzu wurden eine N-Myc-amplifizierte und eine N-Myc-Wildtyp Zelllinie ausgesucht in denen die 194 Gene mittels RNA-Interferenz (RNAi) einzeln ausgeschaltet wurden.

Spielt ein Gen für das Wachstum der untersuchten Zelle keine Rolle, sollten beide Zelllinien gleich gut wachsen. Wird hingegen ein kritisches Gen ausgeschaltet, das für das Wachstum beider Zelllinien notwendig ist, wachsen sie gleichsam schlecht. Schaltet man nun in beiden Zelllinien N-Myc aus, so bleibt die N-Myc-amplifizierte Zelllinie im Wachstum zurück, wobei die Zelllinie, die nicht auf N-Myc angewiesen ist, normal weiter wächst.

Sollte nun ein anderes Gen einen solchen Wachstumsarrest in der amplifizierten, nicht aber in der Zelllinie mit N-Myc-Wildtyp, zeigen, handelt es sich wahrscheinlich um ein kritisches N-Myc-Zielgen.

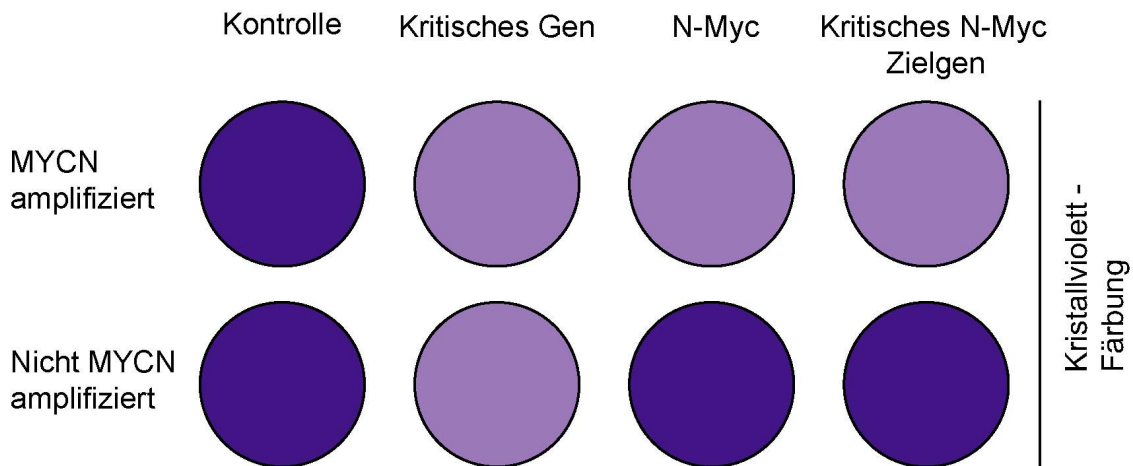


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des RNAi-Screens

Durch den Screen wurden 17 potentielle Zielgene entdeckt, die bei der Inhibition in beiden Zelllinien einen deutlich einseitigen Wachstumsarrest zeigten. Darunter befand sich Aurora-A, eine Serin/Threonin-Protein-Kinase.

Die Kinasen der Aurora-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Verteilung des replizierten genetischen Materials während der Mitose. Gemeinsam mit anderen Kinasen regulieren sie die Zentromerreifung, Chromosomenkondensation, Zentrosomenauftrennung, Spindelreifung, Chromosomenaufteilung und schließlich die Zellteilung. Abkömmlinge der Kinasen wurden in vielen verschiedenen Organismen (Hefen, Würmern, Fruchtfliegen, Vertebraten) nachgewiesen [Marumoto et al., 2005].

Im menschlichen Genom findet man drei Aurora-Kinasen: Aurora-A, Aurora-B, Aurora-C. Während Aurora-A und -B in den meisten Körperzellen exprimiert werden, ist Aurora-C hauptsächlich in Spermatozyten während der Meiose zu finden [Hu et al., 2000]. Auf der N-terminalen Seite zeigen die Aurora-Kinasen große Unterschiede, auf der C-terminalen Seite der Proteine befindet sich hingegen die hoch konservierte, katalytische Domäne.

Das Gen der Aurora-A-Kinase (Synonyme: Serin/Threonin-Kinase 15, Aurora-2, BTAK) ist auf Chromosom 20q13 lokalisiert und verschlüsselt ein Protein von 45,8kD. Aurora-A ist regelmäßig in verschiedenen epithelialen malignen Tumoren, einschließlich Mamma-, Kolon-, Blasen-, Ovarial- sowie Pankreaskarzinom amplifiziert und die mRNA- und Proteinspiegel sind erhöht [Tanaka et al., 1999] [Takahashi et al., 2000] [Gritsko et al., 2003] [Li et al., 2003b]. Beim hepatozellulären Karzinom zeigen nur 3% der Tumore eine Amplifikation im AURKA-Gen, aber in 60% der Tumore ist eine Überexpression nachweisbar [Jeng et al., 2004]. Ähnliche Ergebnisse wurden beim

Mamma-, Magen- und Ovarialkarzinom beschrieben [Zhou et al., 1998] [Sakakura et al., 2001] [Gritsko et al., 2003]. Die Aurora-A-Deregulation wird folglich hauptsächlich durch Mechanismen der Transkriptionsaktivierung und Hemmung des Proteinabbaus verursacht.

Aurora-A korreliert mit aggressiverem Phänotyp, schlechterer Prognose und schlechterem Ansprechen auf die Therapie [Jeng et al., 2004] [Miyoshi et al., 2001]. Es gibt allerdings auch Studien, in denen über das Auftreten von Aurora-A in bereits frühen Tumorstadien berichtet wird [Gritsko et al., 2003].

Aurora-A begünstigt durch verschiedene Mechanismen die Transformation einer Krebszelle. Normale Zellen haben Zellzyklus-Kontrollpunkte, die die genomische Integrität der Zelle überwachen und bei vorhandenen DNA-Schäden das Fortschreiten des Zellzyklus verhindern. Aurora-A-Überexpression hebt einen durch DNA-Schaden induzierten G2-Checkpoint-Arrest auf [Marumoto et al., 2002]. Auch ein durch Nocodazol, eine mikrotubuli-depolymerisierende Agens, induzierter Zellzyklusarrest kann durchbrochen werden [Jiang et al., 2003].

Weiterhin sorgt die Überexpression von Aurora-A für genomische Instabilität, indem es die Entstehung von tetraploiden Chromosomensätzen begünstigt. Tetraploidy ist eine Vorstufe der Aneuploidy und diese steht eng mit der Krebsentstehung in Zusammenhang [Shackney et al., 1989]. Die tetraploiden Zellen bei Aurora-A-Deregulation entstehen aufgrund einer gescheiterten Zellteilung (Zytokinese) oder durch fehlerhafte Spindelbildung, die zum Zellzyklusarrest, verlassen der Mitose und ausbleiben der Zellteilung führt [Lanni and Jacks, 1998] [Rieder and Maiato, 2004].

Aurora-A wurde auch im Zusammenhang mit p53 beschrieben. Auf der einen Seite soll p53 die onkogene Aktivität von Aurora-A unterdrücken können [Chen et al., 2002], auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass Aurora-A mit seiner Kinaseaktivität p53 direkt an Serin315 phosphorylieren kann und so einen MDM2-vermittelten p53-Abbau in Krebszellen induziert [Katayama et al., 2004]. Eine weitere Studie konnte eine direkte Phosphorylierung an Serin215 nachweisen, wodurch die Transkriptionsaktivität von p53 inaktiviert wird [Liu et al., 2004].

Mit Aurora-A transfizierte Fibroblasten wachsen zu Kolonien in der Zellkultur und werden zu Tumoren in Mäusen [Zhou et al., 1998] [Bischoff et al., 1998].

1.4 Fragestellung

Das Neuroblastom ist in seinem klinischen Erscheinungsbild ein äußerst heterogener Tumor. Besonders die MYCN-amplifizierte Neuroblastome haben trotz intensiver Therapie eine schlechte Prognose.

Allgemein werden durch Myc-induzierte Tumore häufig von diesem Onkogen abhängig und benötigen nach ihrer Entstehung weiterhin seine Expression [Weinstein, 2002]. Auch im Neuroblastom wurde gezeigt, dass MYCN-amplifizierte neuroblastische Zellen von hohen N-Myc-Konzentrationen im Wachstum begünstigt werden [Galderisi et al., 1999]. Strategien, die versuchen Myc in seiner Funktion zu beeinflussen könnten einen hohen Stellenwert für zukünftige Therapien haben [Arvanitis and Felsher, 2006]. N-Myc ist jedoch in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor als direktes Ziel im Rahmen einer Therapie nicht geeignet. Daher müssen relevante angreifbare Zielgene gesucht werden, über die die N-Myc-Konzentration in der Zelle gesenkt werden kann.

Durch die in 1.3.2 beschriebene Untersuchung von zwei Neuroblastomzelllinien durch RNAi wurden durch Beobachtung des Phänotyps 17 Gene gefunden, die MYCN-amplifizierte Tumorzellen zum Wachstum benötigen und gleichzeitig für Zellen mit normalem MYCN-Status verzichtbar sind.

Unter den 17 gefundenen Genen ist AURKA. Das Gen AURKA kodiert die Proteinkinase Aurora-A. Weitere Untersuchungen der Kinase Aurora-A könnten daher nicht nur helfen die Aggressivität der MYCN-amplifizierte Tumore besser zu verstehen, sondern böten prinzipiell die Möglichkeit eines neuen therapeutischen Ansatzes.

Daher soll in dieser Arbeit zunächst auf der Basis von PCR-Untersuchungen quantitativ geprüft werden mit welcher Effektivität die Expression der einzelnen Gene im beschriebenen Screen durch RNAi reprimiert werden können.

Die Aurora-A-Depletion führt in der MYCN-amplifizierte Zelllinie IMR-32 zu einem Wachstumsarrest. Um zu belegen, dass es sich bei der durch Aurora-A-Depletion ausgelösten Wachstumshemmung um ein generelles Phänomen und nicht nur um einen zelllinienspezifischen Unterschied handelt, sollen Versuche mit weiteren Neuroblastomzelllinien durchgeführt werden.

Die Aurora-A-Depletion führt in der Zelllinie IMR-32 zu erhöhten p53- und erniedrigten N-Myc-Konzentrationen. Auch diese Beobachtungen sollen in weiteren Neuroblastomzelllinien geprüft werden, um auf mögliche Mechanismen des Wachstumsarrests schließen zu können.

Die Erkennung eines allgemein gültigen Mechanismus zur Suppression des Tumorwachstums in der Subgruppe der MYCN-amplifizierten Neuroblastome könnte möglicherweise neue spezifische Therapiemöglichkeiten für diese aggressiven Tumore entstehen lassen.

2 Material

2.1 Stämme und Zelllinien

2.1.1 Säugerzellen

2.1.1.1 Neuroblastomzelllinien

Name	Beschreibung	Genomstatus	p53 Status	MYCN Status
IMR-32	im April 1967 aus einem 13 Monate alten Jungen isoliert und etabliert	49,XY,del(1),+2mar(Gruppe B), +2 Chromosomen Gruppe C, -16	Wt [Gold-schneider et al., 2006]	amplifizierte
IMR-5	ist ein Subklon von IMR-32 [Fischer and Berthold, 2003]	-	Wt	amplifizierte
SMS-KCN	1986 ohne vorausgegangene Therapie aus dem Primärtumor isoliert und etabliert [Reynolds et al., 1986]	46,del 1p [Reynolds et al., 1986]	Wt	amplifizierte
SK-N-BE(2)C	im November 1972 nach mehreren Chemotherapien und Bestrahlungen von einem 2-jährigen Jungen aus dem Knochenmark gewonnen	44,XY,1 oder mehrere amplifizierte Regionen (homogeneously staining regions)	mut [Gold-schneider et al., 2006]	amplifizierte
SH-EP	ist ein Subklon der Zelllinie SK-N-SH, die 1970 aus einer Knochenmarkmetastase eines 4-jährigen Mädchens stammt	47,XX,der(1)inv dup(1)(q11q24) inv(1)(q25q44), +7,add(9)(q34),der(22)t(17;22)(q21;q13) / del(ARF)	Wt	nicht amplifizierte
SH-SY5Y	ist eine dreimal geklonte Sub-Zelllinie aus SK-N-SH, die 1970 aus einer Knochenmarkmetastase eines 4-jährigen Mädchens stammt	47,XX,ins(1)(q1)	Wt [Gold-schneider et al., 2006]	nicht amplifizierte
SK-N-AS	Metastase aus dem Knochenmark / 1981 aus einem 6-jährigen Mädchen mit schwach differenziertem Neuroblastom isoliert	Del(1p), add(1q)	mut [Gold-schneider et al., 2006]	nicht amplifizierte
NB-69	wurde durch Yang et al. etabliert [Yang et al., 2001]	-	wt	nicht amplifizierte

Soweit nicht anders bezeichnet, stammen die Information aus der Datenbank der „American Type Culture Collection“ (ATCC).

2.1.1.2 Virusproduzierende Säugerzellen

PHOENIX^{ECO} Humane *Packaging* Zelllinie für rekombinante, ecotrophe Retroviren [Grignani et al., 1998]; produziert „Moloney Murine Leukemia Virus“ (MoMuLV)

2.1.2 Bakterienstämme

DH5 α E.coli F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYAegF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r_Kⁱ,m_K⁺)phoAsupE44 λ -thi-1 gyr A96 relA1

2.2 Medien

2.2.1 Medien für die Zellkultur

Medien für die Zellkultur wurden von der Firma BioWhittaker (Verviers, Belgien) geliefert. Fetales Rinderserum (FBS) wurde von der Firma Sigma bezogen.

Vollmedium für humane Neuroblastomzellen:

500ml RPMI mit Phenolrot
56ml (10%) FBS wärmeinaktiviert (30min bei 56°C)
5,6ml (1%) Penicillin (10.000U/ml) / Streptomycin (10mg/ml)
optional bei Zellen mit ecotrophen Rezeptor je nach Resistenz-Kassette 560 μ l G418 (Neomycin) oder 138 μ l Hygromycin

Vollmedium für Phoenixzellen:

500ml DMEM (*Dulbeccos modified Eagles Medium*), mit Phenolrot
56ml (10%) FBS wärmeinaktiviert (30min bei 56°C)
5,6ml (1%) Penicillin (10.000U/ml)/Streptomycin (10mg/ml)

Einfriermedium	RPMI-Vollmedium 20% FBS 10% DMSO
----------------	--

2.2.2 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium	10g Trypton (1%) 5g Hefeextrakt (0.5%) 10g NaCl (1%) 100 µg/ml Ampicillin ad 1000ml H ₂ O
LB-Agar	6g Bacto-Agar (1,2%) 100 µg/ml Ampicillin ad 500ml LB Medium

2.3 Lösungen

2.3.1 Lösungen für die Zellkultur

Trypsin	PAA 10x Trypsin Lösung; verdünnt und autoklaviert
DMSO	Merck, Dimethylsulfoxid (100%)
Hygromycin B	100 µg/ml (138 µl einer 406 mg/ml Stocklösung auf 562ml Vollmedium) für Neuroblastomzellen
G418 (Neo ^R)	200 µg/ml (1:1000 einer 200 mg/ml Stocklösung) bis 500 µg/ml für Neuroblastomzellen
Puromycin	1 µg/ml (1:10.000 einer 10 mg/ml Stocklösung) für Neuroblastomzellen

2.3.2 Allgemeine Lösungen

Acrylamidlösung	30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid in H ₂ O												
Blocklösung (Western-Blot)	5% Magermilchpulver (Merck) in TBS-T												
Bradford Reagenz	0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma) 4,75% Ethanol 8,5% Phosphorsäure in H ₂ O; filtrieren, lichtgeschützt lagern												
DEPC-H ₂ O	0,1% Diethylpyrocarbonat in H ₂ O 12h 37°C, dann autoklavieren												
Desoxynukleosid- Triphosphat (dNTP)	Sigma (100mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)												
Polybrene	Sigma (Stammlösung 4 mg/ml)												
Proteaseinhibitoren Sigma	Protease Inhibitor Cocktail (for mammalian tissues), <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>AEBSF</td> <td>104mM</td> </tr> <tr> <td>Aprotinin</td> <td>0,08mM</td> </tr> <tr> <td>Leupeptin</td> <td>2mM</td> </tr> <tr> <td>Bestatin</td> <td>4mM</td> </tr> <tr> <td>Pepstatin A</td> <td>1,5mM</td> </tr> <tr> <td>E-64</td> <td>1,4mM</td> </tr> </table> Arbeitskonzentration aller Proteaseinhibitoren 1:1000	AEBSF	104mM	Aprotinin	0,08mM	Leupeptin	2mM	Bestatin	4mM	Pepstatin A	1,5mM	E-64	1,4mM
AEBSF	104mM												
Aprotinin	0,08mM												
Leupeptin	2mM												
Bestatin	4mM												
Pepstatin A	1,5mM												
E-64	1,4mM												
RNase-Inhibitor	RNAsin Plus (Promega)												

2.4 Puffer

Blotpuffer (Western-Blot)	10-20% Methanol 150mM Glycin 20mM Tris-Base 0.1% SDS
2x HBS	280mM NaCl 1,5mM Na ₂ HPO ₄ 50mM Hepes-KOH pH 7,05 mit 1M NaOH bei 24°C
Laufpuffer (SDS-Gelelektrophorese)	25mM Tris/HCl pH 8,3 0,2M Glycin 0,1% SDS
NP40-Lysepuffer	150mM NaCl 50mM Tris pH8,0 1% NP-40 10mM Na ₄ P ₂ O ₇ 100mM NaF 2mM Na ₃ VO ₄
PBS-Puffer pH 7,4	137mM NaCl 2,7mM KCl 10,1mM Na ₂ HPO ₄ 1,76mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit HCl einstellen
SDS-Laufpuffer	25mM Tris-Base 250mM Glycin 0,1% SDS

SDS Probenpuffer 3x	187,5mM Tris pH 6,8 30% Glycerin 6% SDS 0,03% Bromphenolblau 2M β -Mercaptoethanol
Stripping-Puffer β -ME	62,5mM Tris pH 6,8 2% SDS 100nM (0,7%) β -Mercaptoethanol
20x TBS	1M Tris/HCl pH 7,4 3M NaCl
TBS-T	1x TBS / 0,2% Tween-20

2.5 Chemikalien

Soweit nicht besonders aufgeführt, wurden Chemikalien in Analysenqualität oder in Qualität für die Molekularbiologie von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) und Applichem (Heidelberg) bezogen. Feinchemikalien mit höchstem Reinheitsgrad wurden entweder von Sigma (Deisenhofen) oder Gibco-Life Technologies (Karlsruhe) verwendet.

Calbiochem	NP-40
Difco	Agar, Bactopeptone, Bactotrypton
Fluka	ATP
GibcoBRL	TEMED
Invitrogen	Agarose
Riedel de Haen	Ethanol, Iso-Propanol, Methanol, NaCl
Roth	Tris , Phenol, Phenol / Chloroform, Tween-20, Glycerin, Glycin

2.6 Standards und Enzyme

2.6.1 Standards

PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)

2.6.2 Polymerase und Reverse Transkriptase

Immolase™ DNA Polymerase (Bioline)

„Superscript II“ Molony Mouse Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT)
(Gibco Life Technologies)

2.7 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion International AG, Martinsried/Deutschland synthetisiert und auf eine wässrige Lösung von 100µM eingestellt.

2.7.1 Primer für die Q-PCR

Expressionsanalyse humaner Gene

Primer Name	Gen	Sequenz	Anlagerungs-temperatur	Größe der Produkte	Position
AKAP1 fwd	A kinase (PRKA) anchor protein 1	TTCTCTGCCGATG ACATCCT	60°C	67 bp	2313
AKAP1 rev	A kinase (PRKA) anchor protein 1	GTTGACCACAATG ACCTCCA	59°C	67 bp	2379
ARAF fwd	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1	CCGTGAAGGTGCT CAAGG	60°C	91 bp	1203
ARAF rev	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1	ACATGTGCGCTCT TCCTGA	60°C	91 bp	1293
BAX fwd	Bcl-2 associated protein X	ATGTTTTCTGACG GCAACTTC	59°C	104 bp	364
BAX rev	Bcl-2 associated protein X	ATCAGTTCCGGCA CCTTG	59°C	104 bp	467
HSPD1 fwd	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	TGCTATGGCTGGA GATTTTGT	59°C	89 bp	1629
HSPD1 rev	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	CAGCAGCATCCAA TAAAGCA	59°C	89 bp	1717

RPS16 fwd	Ribosomal Protein S16	CGCGCACGCTACA GTACA	60°C	76 bp	214
RPS16 rev	Ribosomal Protein S16	CGGATGTCTACAC CAGCAA	59°C	76 bp	289
NAP1L1 fwd	nucleosome assembly protein 1-like 1	CTTGAGGATAACC TGCACTGG	59°C	75 bp	1318
NAP1L1 rev	nucleosome assembly protein 1-like 1	AATAGGCTTGTCA AATGATGTAAATTC	60°C	75 bp	1392
PSMB1 fwd	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1	GGGTCTTACCAGA GAGACTCCTT	59°C	96 bp	513
PSMB1 rev	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1	CTGCATGTTCTTA AAACCAACCT	59°C	96 bp	608
PTEN fwd	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)	GGGGAAGTAAGG ACCAGAGAC	59°C	95 bp	1497
PTEN rev	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)	TCCAGATGATTCT TTAACAGGTAGC	60°C	95 bp	1591
SFRS7 fwd	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa	TAAAAGGATCGAG GTATTTCCAA	59°C	77 bp	654
SFRS7 rev	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa	GCTGCTTCTTGGT CGTGAA	60°C	77 bp	730
AURKA fwd	Aurora-kinase-A	GGAGAAAGCCGG AGTGGAGCATC	62°C	400bp	865
AURKA rev	Aurora-kinase-A	TTCAATCATTTTCAG GGGGCAGGTA	62°C	400bp	1264
TOP1 fwd	topoisomerase (DNA) I	CCCTGTACTIONCAT CGACAAGC	59°C	75 bp	1679
TOP1 rev	topoisomerase (DNA) I	CCACAGTGTCCGC TGTTTC	60°C	75 bp	1753

2.7.2 Oligonukleotide für RNA-Interferenz (RNAi) Experimente

Die Oligonukleotide weisen eine Länge von 64 bp auf. Sie wurden im Design so erstellt, dass sie am 3'- und 5'-Ende die entsprechenden Sequenzen zur Integration in einen durch Restriktionsenzyme vorbereiteten Vektor tragen. Des weiteren beinhalteten die Oligos eine 19 Nukleotide lange Zielsequenz gegen das auszuschaltende Gen, eine Hairpin-Sequenz sowie die komplementäre Zielsequenz.

Oligonukleotide für RNA-Interferenz (RNAi) Experimente:

Name	Entfernung zum Anfang	Zielsequenz (19mer)	vorwärts Oligo-Nukleotid	rückwärts Oligo-Nukleotid
si-GFP	73	TGAATTAGATGGCGATGTT	GATCCCCTGAATTAGATGGCGATGTTTTCAAGAGAAACATCGCCATCTAATTCATTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAATGAATTAGATGGCGATGTTCTCTTGAAAACATCGCCATCTAATTCAGGG
Scrambled	-	CATAAGCTGAGATACTTCA	GATCCCCCATAAGCTGAGATACTTCATTCAAGAGATGAAGTATCTCAGCTTATGTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAACA TAAGCTGAGATACTTCAATCTCTGAAATGAAGTATCTCAGCTTATGGGG
BAX-1	205	CTGGACAGTACATGGAGC	GATCCCCCTGGACAGT AACATGGAGCTTCAAGAGAGCTCCATGTTACTGTCCAGTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAACTGGACAGTAAACATGGAGCTCTCTTGAAGCTCCATGTTACTGTCCAGGGG
BAX-2	391	CTGATCAGAACATCATGG	GATCCCCCTGATCAGAACCATCATGGTTCAGAGACCATGATGGTTCTGATCAGTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAACTGATCAGAACCATCATGTCTCTTGAACCATGATGTTCTGATCAGGGG
HSPD1-1	499	ATTGCACAGGTGCTACGA	GATCCCCATTGCACAGGTTGCTACGATTCAAGAGATCGTAGCAACCTGTGCAATTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAATTGCACAGGTTGCTACGATCTCTTGAATCGTAGCAACCTGTGCAATGGG
HSPD1-2	848	GTACACTCGTCTTGAATAG	GATCCCCGTACACTCGTCTTGAATAGTTCAAGAGACTATTCAAGACGAGTGTACTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAGTACACTCGTCTTGAATAGTCTCTTGAACTATTCAAGACGAGTGTACGGG
HSPD1-3	1053	AGACGATGCCATGCTCTTA	GATCCCCAGACGATGCCATGCTCTTATTCAAGAGATAAGAGCATGGCATCGTCTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAAGACGATGCCATGCTCTTATTCTCTTGAATAAGAGCATGGCATCGTCTGGG
NAP1L1-1	182	CACCAACAGGATACATTGA	GATCCCCACCAACAGGATACATTGATTCAAGAGATCAATGTATCCTGTGGTGTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAACA CCAACAGGATACATTGATCTCTTGAATCAATGTATCCTGTTGGTGGGG
NAP1L1-2	223	AGACGAGTGAATGCTCTCA	GATCCCCAGACGAGTGAATGCTCTCATTCAAGAGATGAGAGCATTACATCGTCTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAAGACGAGTGAATGCTCTCATCTCTTGAATGAGAGCATTCACTCGTCTGGG
NAP1L1-3	308	GGAAGTATGCTGTTCTCTA	GATCCCCGGAAGTATGCTGTTCTCTATTCAAGAGATAGAGAACAGCATACTTCCTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAAGG AAGTATGCTGTTCTCTATCTCTTGAATAGAGAACAGCATACTTCCGGG
PSMB1-1	299	AGATGTATAAGCATTCAA	GATCCCCAGATGTATAAGCATTCCAATTCAAGAGATTGGAATGCTTATACATCTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAAGATGTATAAGCATTCCAATCTCTTGAATGGAATGCTTATACATCTGGG
PSMB1-2	317	ATAATAAGGCCATGACTAC	GATCCCCATAATAAGGCCATGACTACTTCAAGAGAGTAGTCATGGCCTTATTATTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAATAATAAGGCCATGACTACTCTCTTGAAGTAGTCATGGCCTTATTATGGG
PSMB1-3	318	TAATAAGGCCATGACTACG	GATCCCCTAATAAGGCCATGACTACGTTCAAGAGACGTAGTCATGGCCTTATTATTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAATAATAAGGCCATGACTACTCTCTTGAACGTAGTCATGGCCTTATTATGGG
PTEN-1	545	AGAATCATCTGGATTATAG	GATCCCCAGAATCATCTGGATTATAGTTCAAGAGACTATAATCCAGATGATTCTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAAGAGAATCATCTGGATTATAGTCTCTTGAACTATAATCCAGATGATTCTGGG

PTEN-2	546	GAATCATCTG GATTATAGA	GATCCCCGAATCATCT GGATTATAGATTCAAG AGATCTATAATCCAGA TGATTCTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAGA ATCATCTGGATTATAG ATCTCTTGAATCTATAA TCCAGATGATTTCGGG
PTEN-3	118	AGACTTGAAG GCGTATACA	GATCCCCAGACTTGAA GGCGTATACATTCAAG AGATGTATACGCCTTC AAGTCTTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAG ACTTGAAGGCGTATAC ATCTCTTGAATGTATAC GCCTTCAAGTCTGGG
SFRS7-1	157	TTCGAAGATC CTAGAGATG	GATCCCCTTCGAAGAT CCTAGAGATGTTCAAG AGACATCTCTAGGATC TTCGAATTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAATTC GAAGATCCTAGAGATG TCTCTTGAACATCTCTA GGATCTTCGAAGGG
SFRS7-2	163	GATCCTAGAG ATGCAGAAG	GATCCCCGATCCTAGA GATGCAGAAGTTCAAG AGACTTCTGCATCTCTA GGATCTTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAGA TCCTAGAGATGCAGAA GTCTCTTGAACTTCTGC ATCTCTAGGATCGGG
SFRS7-3	172	GATGCAGAAG ATGCAGTAC	GATCCCCGATGCAGAA GATGCAGTACTTCAAG AGAGTACTGCATCTTCT GCATCTTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAGA TGCAGAAGATGCAGTA CTCTCTTGAAGTACTGC ATCTTCTGCATCGGG
AURKA-2	66	AACGTGTTCT CGTGACTCA	GATCCCCAACGTGTTCT CGTGACTCATTCAAGA GATGAGTCACGAGAAC ACGTTTTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAAA CGTGTTCTCGTGACTCA TCTCTTGAATGAGTCAC GAGAACACGTTGGG
AURKA-3	213	GAATCAGAAG CAGAAGCAA	GATCCCCGAATCAGAA GCAGAAGCAATTCAAG AGATTGCTTCTGCTTCT GATTCTTTTTTGGAAA	AGCTTTTCCAAAAAGA ATCAGAAGCAGAAGCA ATCTCTTGAATTGCTTC TGCTTCTGATTTCGGG

2.8 Plasmide

2.8.1 Grundvektoren

- pBabe

Vektoren für die Herstellung rekombinanter Retroviren im BOSC / Phoenix System mit zusätzlichen Resistenzgenen gegen Puromycin, Hygromycin oder Bleomycin [Morgenstern and Land, 1990]

- pSuper.retro.puro

Vektor für die Herstellung eines RNAi-Systems, der mittels Polymerase-III H1-RNA Promotor „*small interfering RNAs*“ (siRNA) in Säugerzellen exprimiert. Das Plasmid besitzt zusätzlich ein Resistenzgen gegen Puromycin (OligoEngine)

- pWZL Neo

Vektor für die Expression Protein-codierender mRNA mit Neomycin-Resistenzgen

2.8.2 Expressionsplasmide für ecotrophe Rezeptoren

- pWZL-Neo-EcoR Expressionsplasmid mit einem Resistenzgen gegen Neomycin^R sowie einem murinen ecotrophen Rezeptor, der die Infektion mit „Moloney Murine Leukemia Virus“ (MoMuLV) auch bei nicht murinen Zellen ermöglicht
- pBabe-Hygro-EcoR Expressionsplasmid mit einem Resistenzgen gegen Hygromycin sowie einem murinen ecotrophen Rezeptor, der die Infektion mit „Moloney Murine Leukemia Virus“ (MoMuLV) auch bei nicht murinen Zellen ermöglicht

2.8.3 Plasmide für RNA-Interferenz (RNAi) Experimente

- | | |
|-----------------------------|---|
| pBabe H2B-GFP | Plasmid mit der codierenden Sequenz für GFP-gekoppeltes (grün fluoreszierendes Protein) Histon-2B |
| pSuper.retro.puro- siGFP | siRNA gegen GFP-mRNA, Zielsequenz 73-92 bp |
| pSuper.retro.puro-scrambled | siRNA ohne passende Zielsequenz |
| pSuper.retro.puro-BAX-1 | siRNA gegen die BAX mRNA, Zielsequenz 205-224 bp |
| pSuper.retro.puro-BAX-2 | siRNA gegen die BAX mRNA, Zielsequenz 391-410 bp |
| pSuper.retro.puro-HSPD1-1 | siRNA gegen die HSPD1 mRNA, Zielsequenz 499-518 bp |
| pSuper.retro.puro-HSPD1-2 | siRNA gegen die HSPD1 mRNA, Zielsequenz 848-867 bp |
| pSuper.retro.puro-HSPD1-3 | siRNA gegen die HSPD1 mRNA, Zielsequenz 1053-1072 bp |

pSuper.retro.puro-NAP1L1-1	siRNA gegen die NAP1L1 mRNA, Zielsequenz 182-201 bp
pSuper.retro.puro-NAP1L1-2	siRNA gegen die NAP1L1 mRNA, Zielsequenz 223-242 bp
pSuper.retro.puro-NAP1L1-3	siRNA gegen die NAP1L1 mRNA, Zielsequenz 308-327 bp
pSuper.retro.puro-PSMB1-1	siRNA gegen die PSMB1 mRNA, Zielsequenz 299-318 bp
pSuper.retro.puro-PSMB1-2	siRNA gegen die PSMB1 mRNA, Zielsequenz 317-336 bp
pSuper.retro.puro-PSMB1-3	siRNA gegen die PSMB1 mRNA, Zielsequenz 318-337 bp
pSuper.retro.puro-PTEN-1	siRNA gegen die PTEN mRNA, Zielsequenz 545-564 bp
pSuper.retro.puro-PTEN-2	siRNA gegen die PTEN mRNA, Zielsequenz 546-565 bp
pSuper.retro.puro-PTEN-3	siRNA gegen die PTEN mRNA, Zielsequenz 118-137 bp
pSuper.retro.puro-SFRS7-1	siRNA gegen die SFRS7 mRNA, Zielsequenz 157-176 bp
pSuper.retro.puro-SFRS7-2	siRNA gegen die SFRS7 mRNA, Zielsequenz 163-182 bp
pSuper.retro.puro-SFRS7-3	siRNA gegen die SFRS7 mRNA, Zielsequenz 172-191 bp
pSuper.retro.puro-AURKA-2	siRNA gegen die AURKA mRNA, Zielsequenz 66-85 bp
pSuper.retro.puro- AURKA -3	siRNA gegen die AURKA mRNA, Zielsequenz 213-232 bp

Für alle nachstehend aufgelisteten Gene wurden Plasmide aus der „NKI RNAi library“ (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) entnommen. Als Grundplasmid dient ebenfalls der „pSuper.retro.puro“, wobei auch hier drei unterschiedliche siRNAs und somit drei Plasmide pro Gen verwendet wurden.

AKAP1	A kinase (PRKA) anchor protein 1
ARAF1	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1
RPS16	Ribosomal Protein S16
TOP1	topoisomerase (DNA) I

2.9 Filme, Filter und Geräte

Filme	Fuji Medical X-Ray Film / Super RX, Fuji Film
-------	---

Blotting-Membran für Proteine	Immobilon-P, PVDF Transfer Membran (Millipore)
-------------------------------	---

Whatman Filterpapiere	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)
-----------------------	--

Begasungsbrutschränke, Heraeus BBD 6220, Heraeus

Biofuge, Heraeus Fresco

Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf

Megafuge 1.OR, Heraeus

Mikroskop Axiovent 25, Zeiss

Mikroskop Kamera AxioCam MRm, Zeiss

Mikroskop UV-Lampe HBO 50, Zeiss

Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System, Biorad

Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer

Netzteil Power Pack 200, Biorad

PCR-Maschine Master Cycler EpGradient S, Eppendorf

Q-PCR-Maschine Stratagene MX3000P™, Stratagene

Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments

Sterilarbeitsbank, Heraeus HeraSafe

Schüttelinkubatoren Model G25, New Brunswick Scientifik Co.INC

Transblot Semi-Dry Apparatur, Biorad
Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech
UV-Lampe Vilber Lourmat 312nm/254nm

2.10 Antikörper

2.10.1 Primäre Antikörper

anti-humanes p53	IgG2a monoklonaler Antikörper der Maus (SC Biosciences), Lagerung bei 4°C, AK-Sammlung Nr. 268
anti-humanes Aurora-A	polyklonaler Antikörper des Kaninchens (Cell Signaling), Lagerung bei -20°C, AK-Sammlung Nr. 252
anti-humanes Cdk2	polyklonaler Kaninchen Antikörper (SC Biosciences), Lagerung bei 4°C, AK-Sammlung Nr. 34
anti-humanes p21	polyklonaler Kaninchen Antikörper (SC Biosciences), Lagerung bei 4°C, AK-Sammlung Nr. 208
anti-humanes N-Myc	IgG2a monoklonaler Antikörper der Maus (BD Biosciences), Lagerung bei 4°C, AK-Sammlung Nr. 251

2.10.2 Sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen-HRP	Affinitätsgereinigter Antikörper (Amersham) Esel anti-Kaninchen Immunglobulin, das mit der Meerrettich-Peroxidase („ <i>horseradish peroxidase</i> “ =HRP) gekoppelt ist, Lagerung bei 4°C, AK-Sammlung Nr.9
anti-Maus-HRP	Affinitätsgereinigter Antikörper (Amersham) Schaf anti-Maus Immunglobulin, das mit der Meerrettich-Peroxidase („ <i>horseradish peroxidase</i> “ =HRP) gekoppelt ist, Lagerung bei 4°C, AK-Sammlung Nr.8

2.11 Kit-Systeme

Entwicklerlösungen	ECL-Lösung Immobilion™ Western (Millipore), ECL Western blotting Detektions-System Lösung A und B (Amersham)
Q-PCR-Kit	ImmoMix™ (Bioline) 50x SYBR Green Solution I (Eurogentec)
Plasmid Maxi Kit	Jetstar plasmid purification system (Genomed)
RNA-Isolationskit	peqGold Trifast™ (peqlab biotechnologie GmbH)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Arbeiten mit Säugerzellkulturen wurden im Wesentlichen nach Standardmethoden, wie sie z.B. bei Spector (Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1998) beschrieben sind, durchgeführt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in Adhäsionskultur auf Polystyrol-Zellkulturschalen mit den Durchmessern 6cm, 10cm oder 15cm (Nunc, Greiner) kultiviert. Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Zellen im Vollmedium (siehe Material) in Heraeus BBD 6220 Begasungsbrutschränken bei 37°C, 96% relativer Feuchte und 5% CO₂ kultiviert. Alle Arbeiten mit Zellen, die für eine fortgesetzte Kultur vorgesehen waren, wurden unter sterilen Bedingungen in einer Steril-Arbeitsbank (Heraeus HeraSafe) durchgeführt.

3.1.2 Passagieren von Zellen

In Abhängigkeit von ihrer Wachstumsrate und Dichte wurden die Zellen alle 2-4 Tage zwischen 1:3 und 1:20 verdünnt und neu ausplattiert (passagiert). Durch Behandlung mit Trypsin (Proteaseaktivität) wurden die adhärent wachsenden Zellen von der Kulturschale abgelöst. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit sterilem PBS gewaschen um Serumreste, die Proteaseinhibitoren enthalten, zu entfernen. Die Zellen wurden mit 1ml Trypsin-Lösung überschichtet und zwischen 30sec und 2min bei 37°C inkubiert, bis sie sich vollständig von der Kulturschale gelöst hatten. Die abgelösten Zellen wurden dann in frischem Medium resuspendiert und entsprechend der erwünschten Endverdünnung in vorbereiteten Zellkulturschalen mit frischem Medium verdünnt. Bei sehr empfindlichen Zellen, wie den IMR-32, wurden die Kulturschalen nach dem Ausplattieren zunächst bis zu 2 Tage ohne weitere Bewegungen und Erschütterungen, die das Anwachsen behindern, in den Inkubator gestellt, bevor sie zu zellbiologischen Versuchen genutzt werden konnten.

3.1.3 Einfrieren von Zellen

Die Langzeitlagerung der Säugerzellen erfolgt in flüssigem Stickstoff bei -196°C . Beim Prozess des Einfrierens kann es dabei zur Bildung von Eiskristallen kommen, welche die Zellen irreversibel schädigen. Um dies zu verhindern, wurden die Zellen in einem speziellen Einfriermedium langsam auf die Lagertemperatur abgekühlt. Zunächst wurden die Zellen trypsinisiert, mit frischem Medium versehen und bei 1200rpm in einer Heraeus-Megafuge für 5min bei 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes, wurde das Zellpellet in eiskaltem RPMI-Medium mit 20% FBS und 10% DMSO (1ml pro konfluenter 10cm Platte) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde sofort auf vorgekühlte 1,8ml Cryo-Röhrchen (Nunc) (je 1ml) verteilt und diese dann im Verlauf von 2 Tagen auf -80°C abgekühlt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

3.1.4 Auftauen von Zellen

Zur Vermeidung von Zellbeschädigungen während des Auftauens wurden die eingefrorenen Zellen (1ml in 1,8ml Cryo-Röhrchen) direkt von -196°C in ein auf 37°C erwärmtes Wasserbad überführt und soweit erwärmt, dass sich die Zellsuspension gerade wieder verflüssigt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 10ml vorgewärmtem Medium gemischt und in einem 15ml Falcon-Reaktionsgefäß für 5min bei 1200rpm in einer Heraeus-Megafuge abzentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 10ml Medium resuspendiert und auf 10cm Zellkulturschalen ausgesät.

3.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer modifizierten Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde auf das Zählgitter der Kammer ein Deckglas so aufgebracht, dass sogenannte Newtonsche Ringe erkennbar waren. Die Zellen wurden trypsinisiert, in einem definierten Volumen in Medium aufgenommen und auf die Zählkammer unter das Deckglas pipettiert. Anschließend wurde die Zellzahl in vier Großquadraten, die aus jeweils 25 Feldern bestehen, ausgezählt und hieraus der Mittelwert berechnet. Durch Multiplikation des Mittelwertes mit 1×10^4 erhielt man die Zellzahl pro ml.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Transfektion von Säugerzellen durch Kalziumphosphat-präzipitation

1-2 Tage vor der Transfektion wurden je nach Wachstumsverhalten $5\text{-}30 \times 10^5$ Zellen auf 10cm Platten plattiert. 4h vor der Transfektion wurde das RPMI-Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10ml frischem DNEM-Medium versetzt. Die zu transfizierenden DNA-Plasmide ($40\mu\text{g}$) wurden mit H_2O auf ein Volumen von $900\mu\text{l}$ aufgefüllt, und dann mit $100\mu\text{l}$ einer $2,5\text{M}$ CaCl_2 -Lösung vermischt. In 15ml Reaktionsgefäßen wurden pro Ansatz 1ml eines $2\times\text{HBS}$ -Puffers (280mM NaCl , $1,5\text{mM}$ Na_2HPO_4 , 50mM Hepes-KOH, $\text{pH}7,05$) vorgelegt und auf einen Vortex gestellt, um stetige Durchmischung und eine Anreicherung mit Luft zu garantieren. Dazu wurde tropfenweise die DNA- CaCl_2 -Lösung gegeben. Das gebildete Präzipitat wurde nach 5 Minuten resuspendiert und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht mit dem Präzipitat inkubiert und nach 12-15h einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

Zur Selektion und stabilen Integration der transfizierten DNA wurden die Zellen 48h nach Transfektion in das entsprechende Selektionsmedium überführt (siehe Tabelle) und bei Bedarf weiter passagiert.

Somit entstand ein Zellpool, der den murinen ecotrophen Rezeptor, dessen codierende Sequenz sich im transfizierten Plasmid befand, stabil exprimiert.

Neuroblastom-zelllinien	Plasmid mit murinem ecotrophen Rezeptor und Resistenz	Selektionsmedium	Erwartete Selektionsdauer
SH-EP IMR-32 SMS-KCN SK-N-BE(2)C	pBabe-Hygro-EcoR	10ml RPMI-Vollmedium + $2,5\mu\text{l}$ Hygromycin B pro 10cm Zellkulturschale	ca. 10 Tage
SH-SY5Y NB-69 SK-N-AS IMR-5	pWZL-Neo-EcoR	10ml RPMI-Vollmedium + $30\mu\text{l}$ G418 (Neo^{R}) pro 10cm Zellkulturschale	ca. 5 Tage

Als Positiv-Kontrolle wurde je eine Platte mit einem H2B-GFP-Plasmid transfiziert, um zwei Tage nach der Transfektion die Effizienz anhand der Anzahl der GFP-positiven Zellen unter dem Mikroskop mit UV-Lampe feststellen zu können.

Eine untransfizierte Schale ohne Resistenz-Gen jeder Zelllinie diene als Negativ-Kontrolle, um die Wirksamkeit des Antibiotikums im Selektionsmedium zu prüfen.

3.2.2 Retrovirale Infektion zur Integration von Plasmid-DNA

3.2.2.1 Herstellung rekombinanter Retroviren

Die Technik des retroviralen Gentransfers [Pear et al., 1993] ermöglicht die stabile Integration von Plasmid-DNA in das Genom von Säugerzellen. Als Vektoren dienten die Plasmide pSuper.retro.puro und pBABE, in die die entsprechenden cDNA Sequenzen kloniert wurden. Die Plasmide wurden in Bakterien amplifiziert und in präparativem Maßstab isoliert.

Zur Transfektion der Phoenix-*Packaging*-Zelllinie wurden auf einer 10cm Kulturschale $4\text{-}5 \times 10^6$ Zellen ausplattiert und am folgenden Tag (24h später) $40\mu\text{g}$ DNA mit Hilfe der oben beschriebenen Kalziumphosphat-Methode transfiziert. 12-15h nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 7ml neuem Medium gefüttert. Nach weiteren 24h wurde der die Viren enthaltene Überstand abgenommen (1.Ernte). In dem Fall, dass die Ernte unmittelbar zur Infektion genutzt werden sollte, musste der Überstand zunächst durch einen Sterilfilter mit $0,45\mu\text{m}$ Porengröße filtriert werden, um eventuell enthaltene Phoenix-Zellen zu eliminieren. Andernfalls konnte der virushaltige Überstand in zwei 3,5ml Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Infektion bei -80°C gelagert werden. Die Phoenix-Zellen wurden erneut mit 7ml Medium versorgt und der Überstand nach weiteren 24h geerntet (2.Ernte) und eingefroren.

3.2.2.2 Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren

Am Vortag der Infektion wurden je nach Wachstumseigenschaften der Zelllinien $0,4\text{-}3 \times 10^6$ Zellen auf eine 10cm Kulturschale plattiert, so dass die Schale etwa nach 4 Tagen konfluent bewachsen war. Zur Infektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3ml viralem Überstand versetzt. Zusätzlich wurden noch 2ml frisches Medium und zur Erhöhung der Infektionseffizienz $4\mu\text{g/ml}$ Polybrene (Hexadimethrinbromid, Sigma) zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit dem virushaltigen Medium bei 37°C im Brutschrank für 12-16h inkubiert. Dann wurden

weitere 5ml Medium zugegeben. 48h nach Infektionsbeginn wurde mit der Selektion der infizierten Zellen begonnen.

Als Positiv-Kontrolle diente hier je eine Schale pro Zelllinie, die ebenfalls mittels rekombinater Retroviren mit dem H2B-GFP-Vektor infiziert wurde. Eine nicht infizierte Schale jeder Zelllinie, der folglich das Resistenz-Gen fehlte, wurde als Negativ-Kontrolle verwendet, um die passende Endkonzentration des Antibiotikums zu finden und die Vollständigkeit der Selektion zu garantieren.

Endkonzentrationen des verwendeten Selektions-Antibiotikums

Zelllinie	Puromycin-Konzentration
SH-EP SH-SY5Y IMR-32 KCN IMR-5	1,0 µg/ml (1,0 µl pro 10cm Schale)
SK-N-AS NB-69	1,5 µg/ml (1,5 µl pro 10cm Schale)
SK-N-BE(2)C	2,0 µg/ml (2,0 µl pro 10cm Schale)

Es überleben nur die Zellen, die infiziert wurden, den Vektor ins Genom integriert haben und die Resistenzkassette gegen Puromycin exprimieren. Durch diesen Selektionsvorgang wird ein Zellpool generiert, der die integrierte DNA dauerhaft exprimiert. Dieser beinhaltet auch die codierenden Sequenzen der siRNA.

3.2.3 Prozessierung der siRNA

Nachdem der Vektor in das Genom integriert und der H1-Promotor aktiviert wurde, kann die siRNA exprimiert werden. Dazu lagert sich die DNA-abhängige-RNA-Polymerase in der Promotorregion an die DNA an, liest diese in 3'-5'-Richtung ab und synthetisiert dabei einen RNA-Strang.

Das entstandene Transkript wird zunächst als „sh-RNA“ (small-hairpin-RNA) bezeichnet und besteht aus einer 19 Basen langen Zielsequenz (sense) gegen das auszuschaltende Gen, einer 9 Basen langen „Haarnadel-Sequenz“ (hairpin) sowie der komplementären Zielsequenz (antisense).

Die sh-RNA wird von der RNase namens Dicer zugeschnitten. Im Verlauf der Prozessierung lagern sich Zielsequenz und komplementäre Zielsequenz aneinander an. Die „Haarnadel-Sequenz“, die die beiden Sequenzen verbunden hat wird daraufhin abgeschnitten. Die entstandene siRNA vereinigt sich mit dem „RNA-inducing-silencing-complex“ (RISC) und kann sich nun an ihre Zielsequenz in der messengerRNA des entsprechenden Gens anlagern und ihren Abbau einleiten.

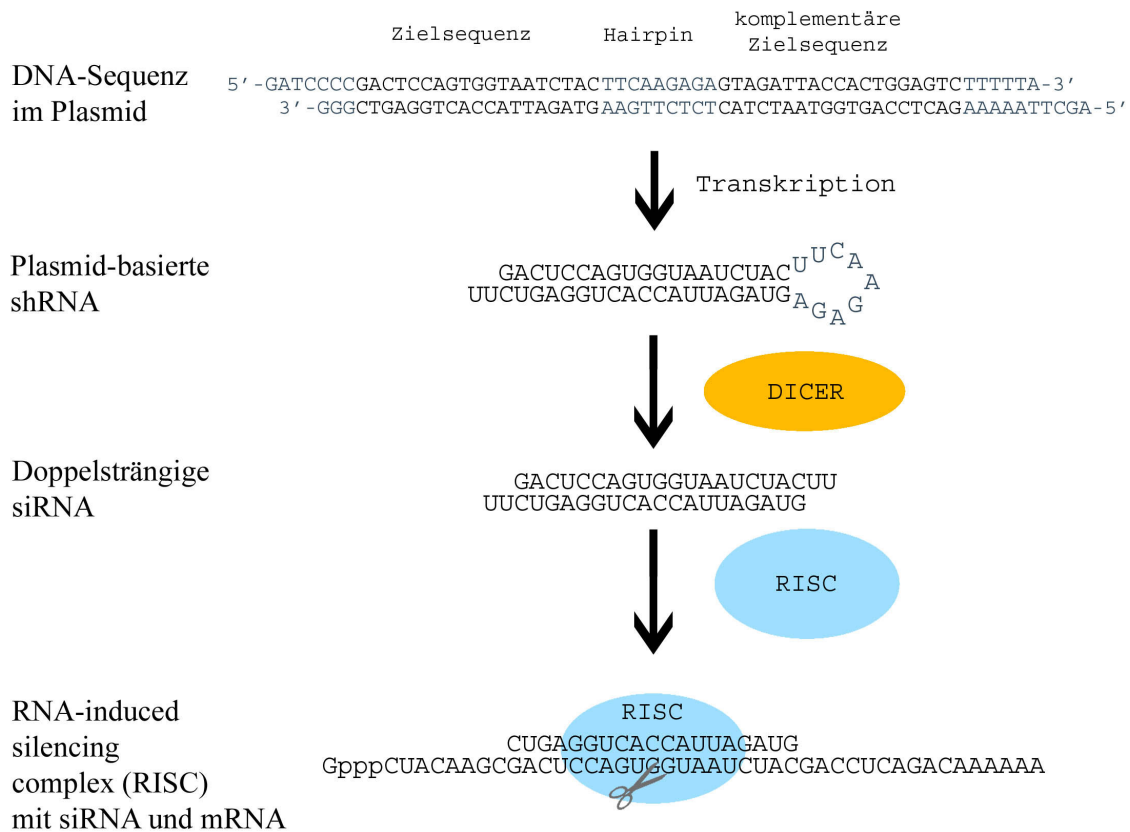


Abbildung 3: Prozessierung der siRNA

3.2.4 DNA-Schädigung durch UV-Licht Bestrahlung

Für einige zellbiologische Experimente wurden die Zellen mit UV-Licht bestrahlt. Die UV-Strahlen haben dabei eine schädigende Wirkung an der DNA der Zellen. Zwischen den Basen der DNA bilden sich kovalente Bindungen aus. 71% der entstehenden Photoprodukte sind durch einen Cyclobutanring verbundene Pyrimidindimere. Weitere 24% haben eine Einfachbindung zwischen dem C4-Atom der einen Base und dem C6-Atom der benachbarten Basen. Diese Strukturveränderungen sind recht stabil und müssen daher durch aktive Reparaturmechanismen der Zelle ersetzt werden [Weinberg, 2007].

Für die UV-Bestrahlung der Zellen wurde unter sterilen Bedingungen ihr Medium von den Kulturschalen abgesaugt. Dabei lagen stets subkonfluente Bedingungen vor. Anschließend wurden die Schalen ohne Deckel unter eine UV-Lampe gestellt und die Zellen für 30 Sekunden mit UV-B (312nm) bestrahlt. Um den Zellen eine Reaktion auf die Schädigung zu ermöglichen, bekamen sie neues vorgewärmtes Medium, wurden wieder bei 37°C im Brutschrank inkubiert und zu einem späteren Zeitpunkt geerntet.

3.2.5 Zellfärbung mit Kristallviolett

Um die Zelldichte in den Kulturschalen sichtbar und so das Wachstum der Zellen vergleichbar zu machen, wurden sie nach der von Serrano (1997) beschriebenen Methode mit Kristallviolett gefärbt.

Dazu wird zunächst das Medium von der Zellkulturschale abgesaugt und mit PBS gewaschen. Abhängig von der Adhärenz der Zellen, sollte man sie gut antrocknen lassen. Durch die Zugabe von 4ml Ethanol werden die Zellen für 10 Minuten fixiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und die Zellen erneut für 15 Minuten getrocknet. Zum Färben werden nun 4ml Kristallviolettlösung pro Schale für 30 Minuten dazugegeben. Nach Abwaschen der Färbelösung im Wasserbad werden die Zellkulturschalen über Nacht getrocknet.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für die meisten Experimente (Western-Blot, Immunpräzipitation) wurde zum Aufschluss der Zellen die Methode des wiederholten schnellen Einfrierens und Auftauens (*freeze-thaw*) angewandt. Der Aufschluss erfolgte in Lysepuffer bei Anwesenheit eines milden Detergens. Der gesamte Vorgang erfolgte im Eisbad. Zunächst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit einem Gummischaber vom Boden der Kulturschale gelöst und in Suspension gebracht. Durch Zentrifugation in einer Eppendorf Zentrifuge bei 400g (1500rpm) für 5min bei 4°C wurden die Zellen pelletiert. Das Zellpellet wurde entweder für die spätere Verwendung in Stickstoffschockgefroren und bei -80°C gelagert, oder sofort weiterverarbeitet. Für die Weiterverarbeitung wurde das Pellet in 25µl Lysepuffer (NP40-Puffer mit Proteaseinhibitoren) resuspendiert und 10min im Eisbad inkubiert. Die Zellsuspension

wurde anschließend dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut, wobei eine Erwärmung der Suspension auf über 10°C vermieden wurde. Nach einer weiteren Inkubation von 5min im Eisbad waren die Zellen weitestgehend aufgeschlossen. Die entstandene Zellfragment- und Proteinsuspension wurde in der Eppendorf Zentrifuge für 5min bei 4°C und 14.000rpm abzentrifugiert. Der den Großteil der Zellproteine enthaltende Überstand wurde abgenommen und weiterverwendet. Sofern die Proteinlysate nicht sofort Verwendung fanden, wurden sie bei -80°C eingefroren.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde die von Bradford beschriebene Methode [Harlow and Lane, 1988] verwendet. Mit Hilfe einer BSA-Referenzkurve wurde der Proteingehalt der Zelllysate bestimmt. Dazu wurden 1µl, 2µl, 4µl, 6µl und 8µl einer BSA-Lösung (1mg/ml) mit 150mM NaCl-Lösung auf 100µl aufgefüllt und mit je 900µl Bradford-Lösung versetzt. In der gleichen Weise wurden 1µl und 2µl des Zelllysats eingesetzt. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD₅₉₅ der Proben gegen einen Leerwert ohne Protein bestimmt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde dann an der erstellten BSA-Referenzkurve abgelesen.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese [Laemmli et al., 1970] unter denaturierenden Bedingungen. Dabei hängt die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld neben der Durchlässigkeit der Matrix nur von deren Molekulargewicht ab.

Als Matrix dienen vertikale Gele aus mit Bisacrylamid vernetztem Acrylamid, die aus einem niedrigprozentigen Sammelgel und einem, je nach erwünschten Auftrennungsgrad, 7-15% Trenngel bestehen. Vor dem Beladen der Gele wurde die aufzutrennende Proteinlösung mit 3x SDS Probenpuffer versetzt und für 5min bei 95°C inkubiert. Die Laufzeit ist abhängig von dem gewünschten Auftrennungsgrad, der anhand eines mitlaufenden Größenstandards (Fermentas PageRuler) nachvollzogen werden kann. Die aufgetrennten Proteinbanden wurden mittels Western-Blot fixiert und sichtbar gemacht.

3.3.4 Western Blot

Mit dieser Methode erfolgte der Nachweis der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Im ersten Schritt wurden die Proteine im „*semi-dry*“ Verfahren aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert. Dazu wurde zunächst die Nitrozellulose-Membran unter Vermeidung von Verunreinigungen für 30sec in 100% Methanol, für 5min in H₂O und für 10min in Blot-Puffer inkubiert. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte in einer Transblot SD Apparatur (Biorad) bei konstant 220mA für 35min. Dem Blot-Puffer (25mM TrisBase, 150mM Glycin) wurde 10% Methanol für Proteine >50kDa und 20% Methanol für Proteine <50kDa zugesetzt.

Die auf der Oberfläche der Nitrozellulose immobilisierten Proteine waren nun in weiteren Schritten immunologischen Reaktionen zugänglich. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper an die Membran wurde diese nach dem Transfer sofort in Blocklösung überführt und für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Blocklösung durch frische ersetzt und dieser der primäre Antikörper in einer angemessenen Verdünnung (standardmäßig in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:4000) zugesetzt. In dieser Lösung wurde die Membran 3h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal für 15min mit TBS-T gewaschen und für 1h in Blocklösung mit dem sekundären Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper (standardmäßig in einer Verdünnung von 1:4000) inkubiert. Nach viermaligem 15-minütigen Waschen mit TBS-T wurden die spezifischen Proteinbanden durch ein ECL „*Western Blotting Detection System*“ (Amersham) oder ECL-Lösung Immobilion™ Western (Millipore) auf medizinischen Röntgenfilmen (Fuji) detektiert. Die Schwärzung des Films ist in gewissen Grenzen der Menge an gebundenem Antikörper und damit der Menge an nachzuweisendem Protein proportional.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Plasmidpräparationen in analytischem Maßstab, photometrische Bestimmung der Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen, Transformation von kompetenten Bakterien, Ligationen sowie Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden nach den in

Standardwerken veröffentlichten Protokollen durchgeführt. Sequenzbestimmungen von doppelsträngiger DNA wurden von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt.

3.4.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Standardmäßig wurde der Sicherheitsstamm DH5 α eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium mit oder ohne 100 μ g/ml Ampicillin bei 37°C in Schüttelinkubatoren. Zur dauerhaften Lagerung wurden 0,5ml einer Übernachtskultur mit 0,5ml Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

3.4.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

100 μ l auf Eis aufgetauter transformationskompetenter Bakterien wurden mit dem zur Transformation vorgesehenen Plasmid (0,1 μ g-1 μ g DNA) oder dem Ligationsansatz gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 90s bei 42°C wurden die Bakterien für 2min auf Eis gelagert, anschließend mit 800 μ l LB-Medium ohne Ampicillin gemischt und für 45min bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde anschließend auf LB^{Amp}-Agarplatten in geeigneter Verdünnung ausgestrichen oder zur Animpfung einer Übernachtskultur (12-16h bei 37°C) verwendet.

3.4.4 Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

1ml einer Übernachtskultur von transformierten Bakterien wurde für 1min bei 7000rpm in einer Heraeus Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 110 μ l STET-Puffer mit Lysozym (0,5mg/ml) aufgenommen. Diese Suspension wurde zunächst für 5min bei Raumtemperatur und dann für 1min bei 95°C inkubiert und schließlich für 15min bei 13.000rpm in einer Heraeus-Minifuge bei 4°C abzentrifugiert. Nach Entfernung des Pellets wurde dem Überstand 110 μ l Isopropanol zugegeben. In einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13.000rpm für 15min bei 4°C wurde die DNA pelletiert. Das Pellet wurde dann einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 μ l H₂O resuspendiert.

3.4.5 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmidpräparationen in präparativem Umfang wurden mit einem System der Firma Genomed nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt. Dieses System beruht auf einem säulenchromatographischen Trennverfahren und erlaubt die Aufreinigung von bis zu 500 μ g Plasmid-DNA pro Ansatz.

3.4.6 Photometrische Bestimmung von DNA

Um die DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung zu bestimmen, wurde jeweils 1 μ l einer Probe auf das Nanodrop Photometer pipettiert und deren Absorption bei 260nm bestimmt. Die Reinheit der DNA lässt sich durch Messung der Absorption bei 280nm und der Bestimmung des Quotienten A_{260}/A_{280} abschätzen. Ein idealer Quotient von 1,8 +/-0,2 zeichnet eine reine DNA-Präparation aus.

Die präparierte Plasmid-DNA wurde auf diese Weise mit H₂O auf eine Konzentration von 1 μ g/ μ l eingestellt.

3.4.7 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde das „peqGold TriFast-Kit“ der Firma Peqlab Biotechnologie verwendet. Dazu wurden 1ml der „peqGold-Lösung“ direkt auf die Zellkulturschale oder auf schon vorher eingefrorene Zellen gegeben und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 200 μ l Chloroform wurden die Tubes für 15sec intensiv auf dem Vortex geschüttelt um eine ausreichende Durchmischung zu erhalten und anschließend für 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 12.000rpm erhielt man drei Phasen: die obere farblose Phase, in der sich die Gesamt-RNA befindet, eine mittlere Interphase, die Proteine enthält und eine untere Phenol/Chloroform-Phase. Die obere Phase wurde abgenommen und die RNA mit 0,5 ml Isopropanol gefällt. Bei sehr kleinen RNA-Mengen wurde 1 μ l Glykogen zur besseren Fällung hinzugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 12.000rpm wurde die RNA mit 75% Ethanol/DEPC-H₂O gewaschen, 10min getrocknet und in RNase freiem H₂O gelöst.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260nm und 280nm Wellenlänge im Nanodrop Spectrophotometer bestimmt um anschließend unmittelbar mit der cDNA-Synthese beginnen zu können. Die Lagerung der RNA erfolgte in gefällter Form in 2,5vol Ethanol und 0,1vol Natriumacetat (3M pH4.9) bei -80°C.

3.4.8 Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde mit der rekombinanten „*Superscript II*“ *Molony Mouse Leukemia Virus Reversen Transkriptase* (Gibco Life Technologies) nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden 2 μ g RNA mit DEPC-H₂O

auf 10µl aufgefüllt und für 1min bei 65°C inkubiert. Bevor die Lösung mit dem Master-Mix versetzt wird, sollte sie kurzzeitig auf Eis gestellt werden.

Der Master-Mix beinhaltet 10µl Superscript Puffer (Gibco), 5µl 100mM DTT (Gibco), 5µl dNTP-Mix (je 2,5mM, Sigma), 2µl Oligo-(dT)₁₅ Primer (1µg/µl) (Boehringer Mannheim), 0,2µl RNAsin (Promega) und 1,5µl Superscript Reverse Transkriptase (200U/µl, Gibco) mit 16,8µl DEPC-H₂O auf ein Volumen von 40µl aufgefüllt. Das resultierende Endvolumen von 50µl pro Ansatz wurde in PCR-Tubes pipettiert und im Master Cycler der Firma Eppendorf dem nachfolgenden Reaktionsschema unterzogen. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese für 50min auf 37°C gebracht und anschließend die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (15min, 70°C) gestoppt. Die Lagerung der cDNA (gesamter Reaktionsansatz) erfolgte bei -20°C.

3.4.9 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion („*Real-time*“ PCR) erlaubt die Vervielfältigung von cDNA und Analyse der Expression spezifischer zellulärer Gene.

Durchgeführt wurde die Q-PCR mit der MX3000PTM von Stratagene. Dazu wird zum PCR-Ansatz ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR Green Solution) gegeben, der nur dann fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA bindet. Diese Fluoreszenz kann mit Hilfe einer Kamera gemessen werden. Je mehr doppelsträngiges PCR-Produkt gebildet wird, umso mehr Fluoreszenz wird emittiert. Es entstehen Amplifikationskurven, die Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA zulassen. Die cDNA-Menge ist wiederum proportional zur Ausgangsmenge der komplementären mRNA und somit dem Expressionsgrad eines Gens. Dabei gibt der CT-Wert die Zyklenzahl an, bei der die Signale des spezifischen Amplifikationsprodukts sich von dem Signalthintergrund abheben. Je kleiner der CT-Wert, desto mehr spezifische cDNA lag in der eingesetzten Probe vor.

Ein Reaktionsansatz für ein spezifisches Gen besteht aus 10µl 2x ImmoMix (Bioline), 0,5µl PrimerMix (jeweils 10pmol/µl fwd und rev primer), 0,4µl SYBR Green Solution und 1µl cDNA-Probe mit 8,1µl H₂O auf ein Endvolumen von 20µl aufgefüllt.

Jede Probe wurde in Triplikaten amplifiziert und analysiert.

Die Realtime-PCR lief nach folgendem Schema ab:

	15min 95°C	(DNA-Denaturierung)
38 Zyklen	15sec 95°C	(DNA-Denaturierung)
	20sec X°C	(Primer-Anlagerung)
	15sec 72°C	(Amplifikation)
	1min 95°C	
	30sec 60°C	
	30sec 95°C	

Die Anlagerungstemperatur X ist aus der Primerliste (2.7.1) ersichtlich.

4 Ergebnisse

4.1 RNAi-Screen: Effektivität der shRNAs und Umfang der untersuchten Gene

Aus publizierten Fremdergebnissen und eigenen Untersuchungen wurden insgesamt 194 Gene selektiert deren Expression in verschiedenen Neuroblastomgruppen differentiell exprimiert waren. Jedes der 194 Gene wurde in unserem Screen in zwei Zelllinien durch jeweils drei verschiedene shRNAs einzeln herunterreguliert und das Wachstumsverhalten anhand der Zelldichte in den Kulturschalen beurteilt.

Jetzt sollte zusätzlich geprüft werden mit welcher Effektivität die von uns eingesetzten shRNAs die Gene herunterregulieren. Zum Vergleich wurden zwei Kontroll-RNAs eingesetzt, deren Basensequenz im Genom nicht vorkommt. Ein großer Teil der shRNAs wurde selbst in Vektoren kloniert, die übrigen der Bibliothek des „Niederlands Kanker Instituut“ (NKI) entnommen. Da es zu umständlich und kostenintensiv wäre bei allen ursprünglich im Screen untersuchten Genen die Effizienz zu prüfen, wurde eine Stichprobe von zehn Genen gezogen. Diese zehn zufällig ausgewählten Gene (10 aus 194) sind nachfolgend aufgelistet.

Gen-Abkürzung	Offizielle Gen-Bezeichnung
AKAP1	A kinase (PRKA) anchor protein 1
ARAF	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1
BAX	Bcl-2 associated protein X
HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
NAP1L1	nucleosome assembly protein 1-like 1
PSMB1	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RPS16	Ribosomal Protein S16
SFRS7	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa
TOP1	topoisomerase (DNA) I

Um die Effektivität der siRNAs gegen diese 10 Gene zu überprüfen, wurden die beiden im Screen verwendeten Zelllinien (IMR-32 und SH-EP) mit den shRNAs infiziert, nach

zwei Tagen selektioniert und schließlich geerntet. Um auch die Wirkung der AURKA-shRNAs zu testen, wurden diese zusätzlich in beiden Zelllinien eingesetzt. Die gesamte RNA der Zellen wurde aus den Zelllysaten aufgereinigt und in cDNA kopiert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Gene mittels Q-RT-PCR amplifiziert und quantifiziert. Die gemessenen Mengen wurde auf die S14-Expression („Ribosomales Protein S14“ zeigt eine Zellzyklus und Zellstatus unabhängige Expression) genormt und die Expression unter der Kontroll-sh-1 auf 100% gesetzt. In dunkel- und hellblau sind der erste und zweite Kontrollvektor dargestellt, der rote Balken zeigt die relative Expression des jeweils untersuchten Gens. Alle Versuche wurden in Triplikaten durch die Q-RT-PCR ausgewertet. Die schwarzen Balken geben die Standardabweichung an.

Depletion der Zielgene in IMR-32 Zellen

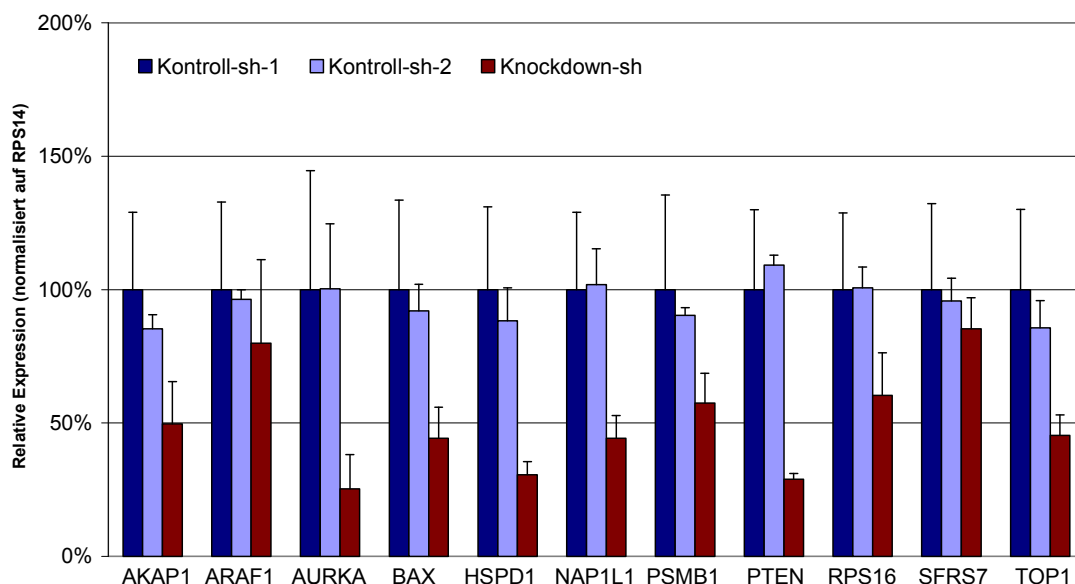


Abbildung 4: Depletion der Zielgene in IMR-32 Zellen

Eine Expression von $\leq 50\%$ wird als erfolgreiche Depletion gewertet. Dieser Grenzwert wurde arbiträr gewählt. In der MYCN-amplifizierten Zelllinie IMR-32 (Abbildung 4) ist dies bei 7 aus 11 Genen der Fall (63,6%).

Depletion der Zielgene in SH-EP Zellen

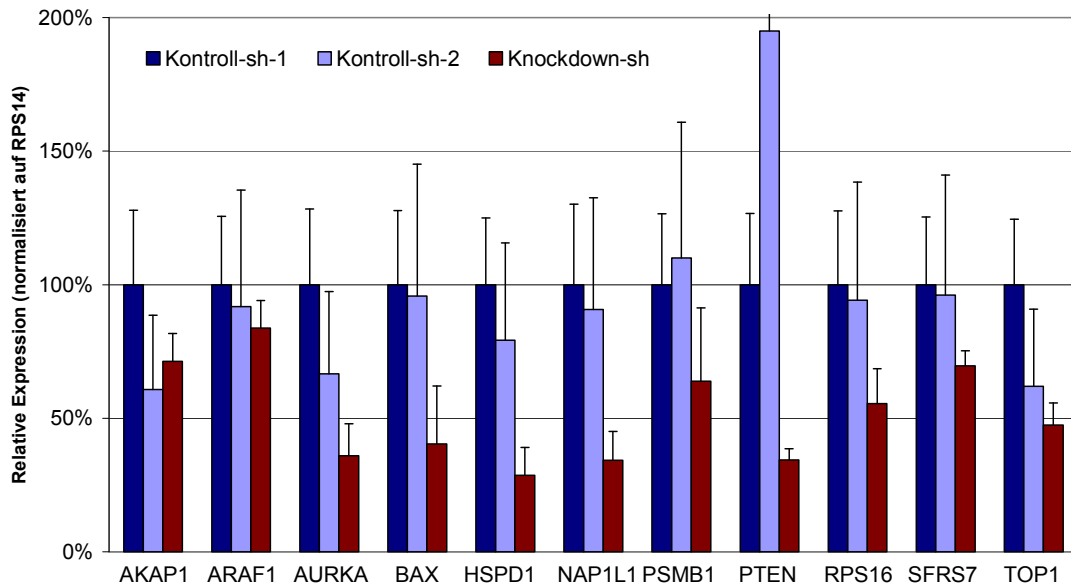


Abbildung 5: Depletion der Zielgene in SH-EP Zellen

In der SH-EP Zelllinie (Abbildung 5) zeigt sich eine effiziente Depletion (Expression von $\leq 50\%$) bei 6 von 11 Genen (54,5%). Bei der Kontroll-sh2 der PTEN-Messung scheint ein Fehler unterlaufen zu sein.

Depletion der Zielgene im Vergleich

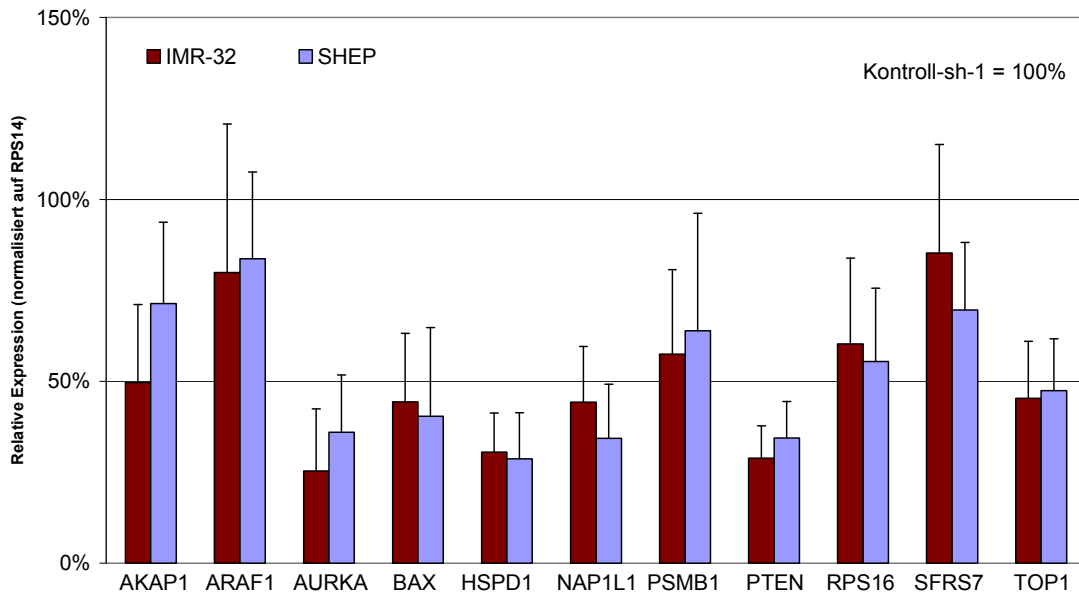


Abbildung 6: Depletion der Zielgene im Vergleich

In Abbildung 6 sind beide Zelllinien gemeinsam dargestellt. Die Kontrollvektoren sind ausgeblendet, die Gen-Expression auf „S14“ genormt und die Kontroll-sh 1 auf 100%

gesetzt. Bei den sechs effizient herunterregulierten Genen handelt es sich in beiden Zelllinien um die gleichen Gene (AURKA, BAX, HSPD1, NAP1L1, PTEN, TOP1). Die shRNAs scheinen in beiden Zellsystemen gleich gut zu funktionieren. Zusätzlich schaffen die shRNAs gegen AKAP1 in IMR-32 eine effektive Depletion. In SH-EP Zellen gelingt dies bei AKAP1 nicht.

Man kann also davon ausgehen, dass in beiden Zelllinien der größere Anteil der Depletionen erfolgreich funktioniert hat. Daraus ergibt sich für den Screen, dass ein Grossteil der insgesamt 194 getesteten Gene tatsächlich geprüft wurden. Die verbleibenden ineffizient herunterregulierten Gene könnten möglicherweise durch den Screen nicht erfasst werden, da zu geringe Expressionsunterschiede zwischen Kontrolle und Knockdown die zuverlässige Erkennung des Phänotyps (Wachstumsarrest durch Depletion des Gens) behindern.

Welche der 194 Gene durch den Screen erfasst wurden, kann ohne die Prüfung der Effektivität aller shRNAs nicht gesagt werden.

4.2 Wachstumsarrest durch Aurora-A-Depletion in MYCN-amplifizierten Zellen gegenüber nicht amplifizierten Zellen – ein generelles Phänomen?

Die Aurora-A-Depletion zeigte im Screen einen deutlichen Wachstumsarrest bei der MYCN-amplifizierten Zelllinie IMR-32, während die nicht-amplifizierte Zelllinie SH-EP unbeeinträchtigt weiter wuchs. Die Validierung sollte zeigen, ob es sich bei dem einseitigen Wachstumsarrest um ein generelles Phänomen in MYCN-amplifizierten gegenüber nicht amplifizierten Zelllinien handelt, oder ob dies lediglich eine Beobachtung zwischen IMR-32 und SH-EP ist, die vielleicht später keine generelle Relevanz zeigt und nicht auf andere Zelllinien oder gar Neuroblastome übertragbar ist. Zusätzlich zu den beiden im Screen verwandten Zelllinien wurden jeweils drei weitere aus Neuroblastomen gewonnene Zelllinien (detaillierte Informationen über die Zelllinien unter 2.1.1.1) ausgesucht und auf diese Fragestellung geprüft. Es wurden jeweils acht Zellkulturschalen aller Zelllinien mit einer der beiden Kontroll-shRNAs oder einer der beiden Aurora-A-shRNAs infiziert und später selektioniert. Jeweils vier Platten einer Zelllinie wurden zu einem späteren Zeitpunkt gefärbt. Die übrigen Zellkulturschalen wurden abgeerntet, die Zellen lysiert und die Proteine aufgereinigt.

Wachstumseigenschaften MYCN-amplifizierter Zellen

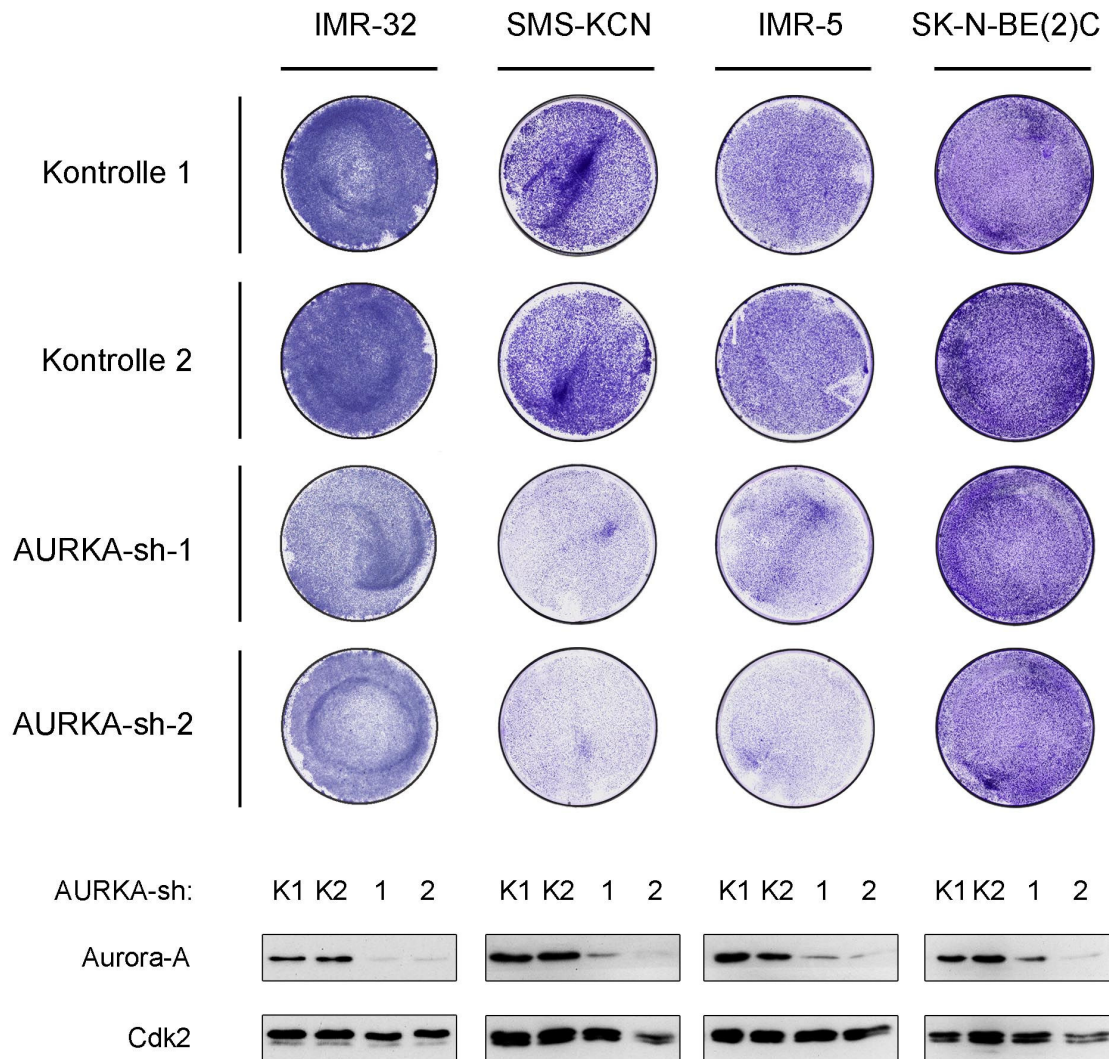


Abbildung 7: Zellfärbung mit Kristallviolett und Western Blot in MYCN-amplifizierten Zellen bei Aurora-A-Depletion

Im unteren Teil der Abbildung sind die Proteinspiegel von Aurora-A und Cdk2 mittels Western Blot dargestellt. Cdk2 wird kaum reguliert und dient daher als Ladekontrolle, um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen in das Gel geladen wurden. Die Aurora-A-Depletion hat in allen vier Zelllinien gut funktioniert.

Oben sind die Ergebnisse aus den Zellfärbungen mit Kristallviolett dargestellt. Die Zellen wurden mit den gleichen shRNAs wie in den Western Blot Versuchen infiziert, anschließend selektiert und nachdem die erste Platte einer Zelllinie dicht bewachsen war, wurden alle vier Platten dieser Zelllinie getrocknet und gefärbt. Je mehr Zellen auf der Platte gewachsen sind, umso stärker färbt sie sich an.

Die ersten drei Zelllinien (IMR-32/ SMS-KCN/ IMR-5) werden durch beide shRNAs gegen Aurora-A im Vergleich zur Kontrolle deutlich in ihrem Wachstum gebremst. Die vierte Zelllinie (SK-N-BE(2)C) zeigt diesen Effekt wenn überhaupt nur sehr schwach.

Wachstumseigenschaften nicht amplifizierter Zellen

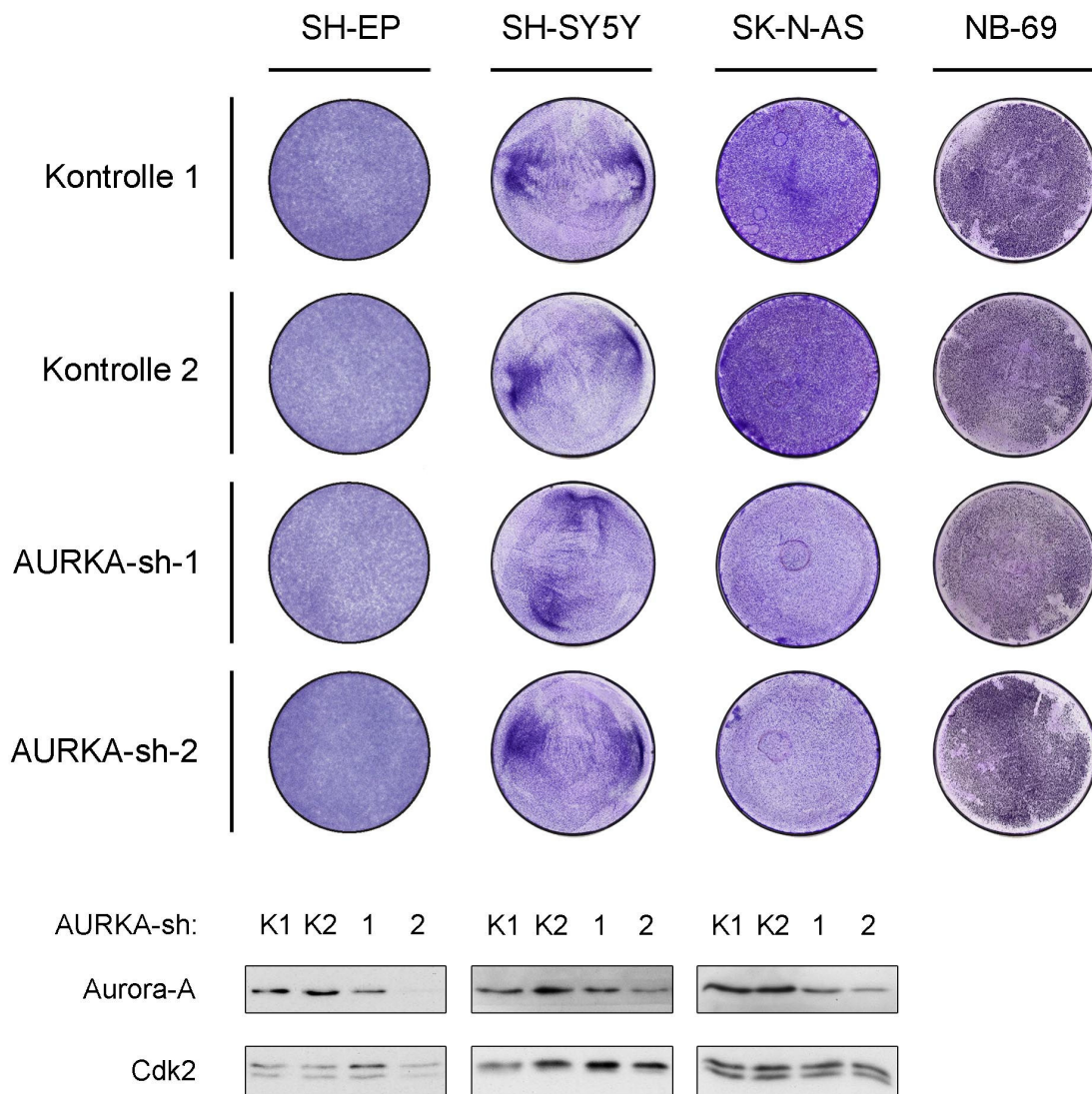


Abbildung 8: Zellfärbung mit Kristallviolett und Western Blot in nicht amplifizierten Zellen bei Aurora-A-Depletion

Die nicht amplifizierten Zelllinien wurden ebenfalls auf ihr Ansprechen auf Aurora-A-Depletion getestet. Der Western Blot in Abbildung 8 zeigt die erfolgreich herunterregulierten Aurora-A-Spiegel und die Ladekontrolle Cdk2. Der Depletions-effekt der AURKA-sh1 in SH-EP und SH-SY5Y ist noch stärker zu werten, wenn man

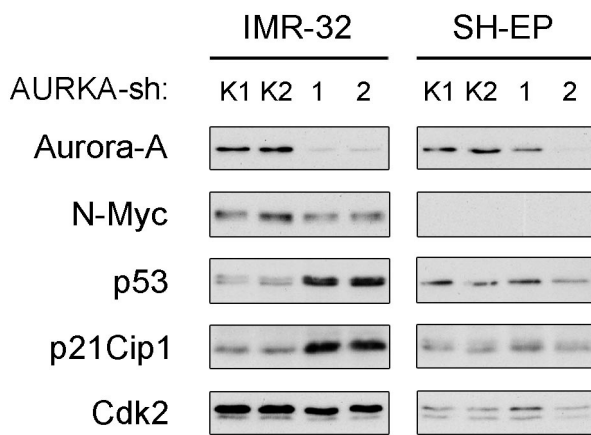
die Ladekontrolle berücksichtigt. Bei der Zelllinie NB-69 konnten wegen technischer Probleme keine auswertbaren Blots erstellt werden.

Die Zelllinien SH-EP, SH-SY5Y und NB-69 wachsen auf allen Schalen gleichmäßig stark. Die herunterregulierten Aurora-A-Spiegel begünstigen keinen Wachstumsarrest. Bei SK-N-AS ist ein leichter Unterschied in der Zelldichte auszumachen.

4.3 p53-Status im Neuroblastom - ist p53 verantwortlich für den durch Aurora-A-Depletion ausgelösten Wachstumsarrest?

4.3.1 Beobachtungen in IMR-32 und SH-EP Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Aurora-A-Depletion in MYCN-amplifizierten Zellen einen Wachstumsarrest auslöst, stellte sich die Frage wie dies auf zellulärer Ebene abläuft. Dazu wurden einige Beobachtungen auf Proteinebene



gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass aus der Aurora-A-Depletion Veränderungen der Proteinkonzentrationen in der amplifizierten Zelllinie IMR-32 resultieren. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, kommt es zu einer Abnahme der N-Myc-Konzentration und einer Zunahme der p53- und p21-Spiegel.

Abbildung 9: Western Blot einer Aurora-A-Depletion in IMR-32 und SH-EP Zellen

Während in den beiden Kontrollen (K1/K2) hohe Aurora-A-Konzentrationen zu sehen sind, wurde Aurora-A durch die beiden shRNAs (1/2) erfolgreich herunterreguliert. Gleichfalls scheint die N-Myc-Konzentration in IMR-32 als Reaktion auf die Aurora-A-Depletion gesunken zu sein. p53 verhält sich entgegengesetzt und steigt gemeinsam mit seinem Zielgen p21 an. Die Ladekontrolle Cdk2 zeigt, dass gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden.

Auch in der nicht amplifizierten Zelllinie SH-EP hat die Aurora-A-Depletion erfolgreich funktioniert. Der nur leichte Unterschied der schwächeren Bande unter AURKA-sh1 ist noch eindeutiger wenn man berücksichtigt, dass die Cdk2-Konzentration und somit die geladene Proteinmenge größer ist, als in den anderen

Spuren. Gleichförmig gerichtete Reaktionen in den anderen Proteinbanden sind hingegen nicht zu sehen.

Es sind nun zwei Erklärungsansätze für das verlangsamte Wachstum der MYCN-amplifizierten Zelllinie IMR-32 denkbar. Zum einen fehlt den Zellen durch die sinkenden N-Myc-Spiegel ein Wachstumssignal, zum anderen hemmen steigende p53-Spiegel das Wachstum. Durch eine Aktivierung kann p53 seine Funktion als Transkriptionsfaktor wahrnehmen und weitere Gene und Signalwege anschalten. Abhängig von den genauen Umständen, die zur p53-Aktivierung führen, kann es zu einem p21-abhängigen Zellzyklusarrest oder sogar zur Aktivierung der Apoptose kommen.

4.3.2 p53-Induktion in allen Zelllinien

Zunächst soll geprüft werden, ob p53 in den verschiedenen Zelllinien induzierbar ist. Dazu wurden die Zellen mit UV-B Licht bestrahlt. In normalen Zellen ist p53 relativ instabil. Es wird kontinuierlich nachgebildet, aber durch Aktivierung seines eigenen Inhibitors MDM2 gleichzeitig auch wieder abgebaut. Die UV-Bestrahlung verursacht DNA-Schäden. Diese werden an den Kontrollpunkten des Zellzyklus erkannt und veranlassen Proteinkinasen wie ATM, Chk1 oder Chk2 p53 an seiner N-terminalen Domäne zu phosphorylieren [Efeyan and Serrano, 2007]. Diese Modifikationen verhindern, dass MDM2 weiterhin binden kann. p53 wird stabilisiert und leitet einen Zellzyklusarrest ein um der Zelle die Reparatur an der DNA zu ermöglichen. Ist der Schaden zu groß wird der aktive Zelltod eingeleitet.

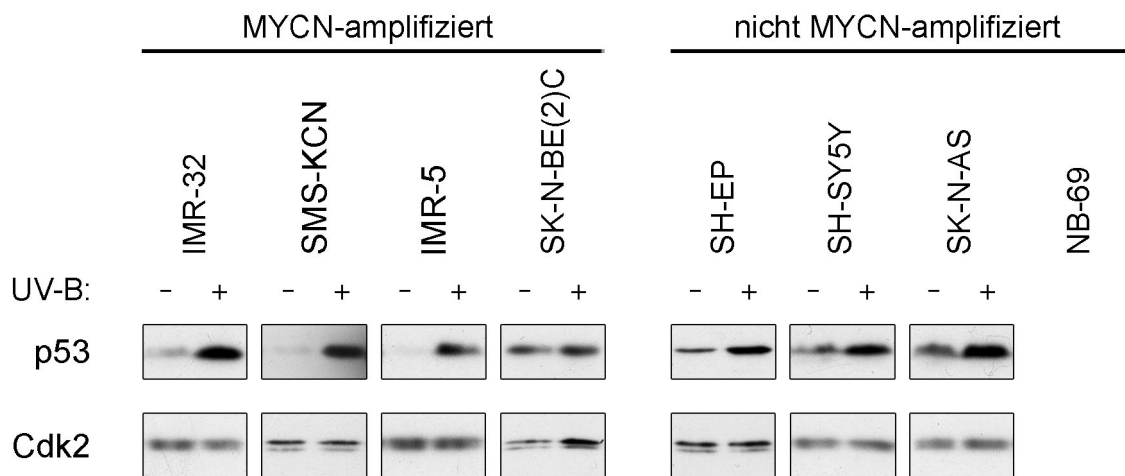


Abbildung 10: p53-Induktion mittels UV-B-Bestrahlung

In Abbildung 10 sind die verschiedenen Zelllinien jeweils mit und ohne UV-Bestrahlung auf p53 und Cdk2 geblottet worden.

Außer SK-N-BE(2)C zeigen alle Zelllinien eine p53-Stabilisierung und Anreicherung nach UV-B-Behandlung. Unter Berücksichtigung der Ladekontrolle wird p53 in SK-N-BE(2)C eindeutig nicht induziert. Dies könnte mit einer durch Goldschneider et al. beschriebenen Mutation des p53-Gens in SK-N-BE(2)C in Zusammenhang stehen [Goldschneider et al., 2006]. Auch bei SK-N-AS wurde eine p53-Mutation beschrieben. In dem hier durchgeführten Versuch gelingt die Induktion. Die Zelllinie NB-69 ließ sich wie bereits erwähnt wegen technischer Probleme nicht blotten.

4.3.3 Wie reagiert p53 in den verschiedenen Zelllinien auf die Aurora-A-Depletion?

Die Aurora-A-Depletion hat in allen Zelllinien gut funktioniert (Abbildung 11). In IMR-32 zeigte sich als Reaktion ein eindeutiger p53- und p21-Anstieg. In SMS-KCN wird durch Einsatz der AURKA-sh1 p53 minimal und p21 deutlich heraufreguliert. Unter Berücksichtigung der Ladekontrolle ist bei dieser Zelllinie für AURKA-sh2 keine eindeutige Aussage zu den p53/p21 Konzentrationen möglich. IMR-5 zeigt praktisch keine p53-Reaktion, wohl aber einen deutlichen p21-Anstieg der dritten Spur. Bei SK-N-BE(2)C kommt es unter Berücksichtigung der Ladekontrolle ebenfalls zu keiner Veränderung der p53- oder p21-Spiegel.

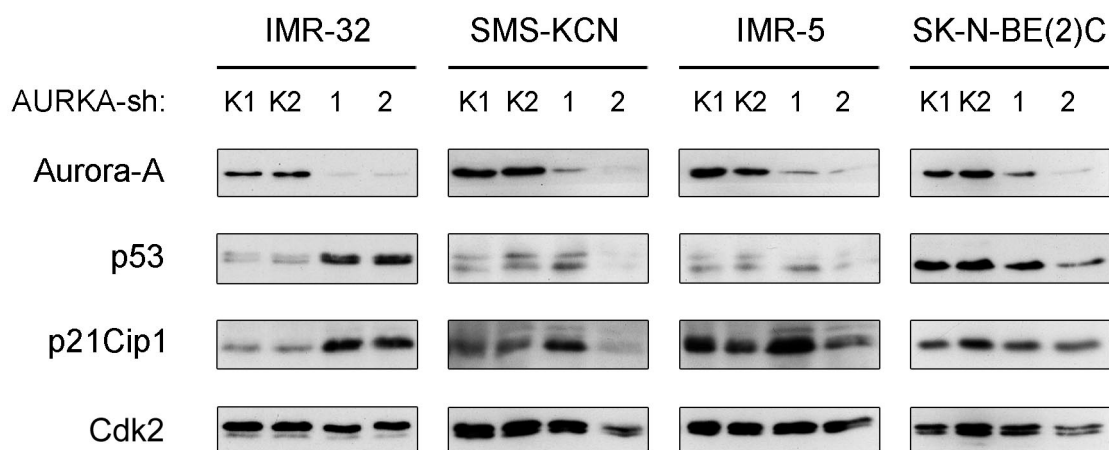


Abbildung 11: Western Blot auf p53/p21 in MYCN-amplifizierten Zelllinien unter Aurora-A-Depletion

Die Ergebnisse sind nicht hinreichend um die Beobachtungen des Wachstumsverhaltens bei Aurora-A-Depletion zu erklären, da in den ersten Versuchen (Zellfärbungen mit Kristallviolett) sowohl AURKA-sh1 und AURKA-sh2 zum Arrest der amplifizierten Zelllinien führten. Folglich müsste p53 in allen Zelllinien zunehmen, um eine Erklärung für den Wachstumsarrest zu liefern.

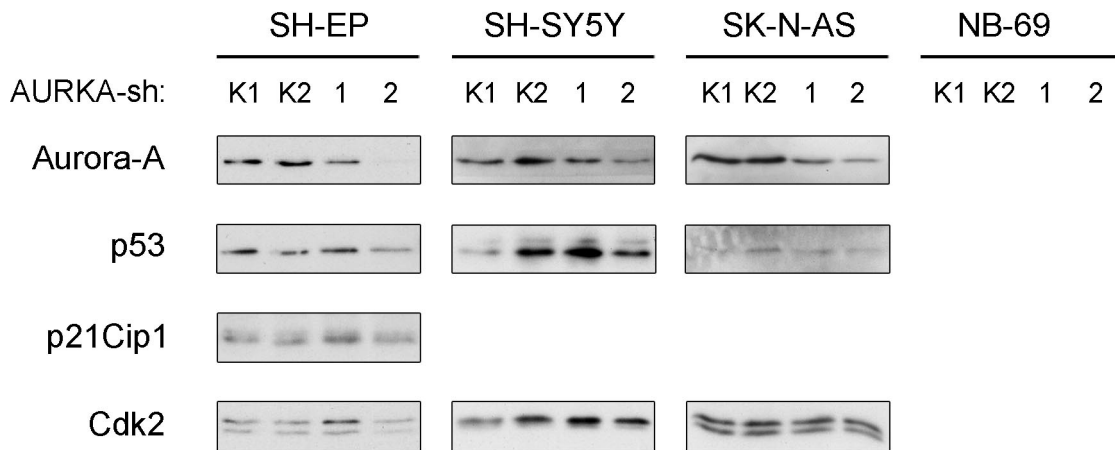


Abbildung 12: Western Blot auf p53/p21 in nicht amplifizierten Zelllinien unter Aurora-A Depletion

In Abbildung 12 sind die anderen vier Zelllinien und deren p53-Reaktion auf eine Aurora-A-Depletion gezeigt. Die shRNAs gegen Aurora-A haben in allen Zellen funktioniert. In SH-SY5Y ist der Effekt unter Berücksichtigung der Ladekontrolle noch besser. Die Schwankungen in der Darstellung der p53-Expression sind zum Teil ebenfalls auf die Ladekontrolle zurückzuführen. In diesen Zelllinien sind keine gleichgerichteten Veränderungen der p53-Spiegel zu beobachten.

4.4 Wird der Wachstumsarrest unter Aurora-A-Depletion durch MYCN ausgelöst?

Eine weitere Beobachtung in IMR-32 war, dass mit der Abnahme der Aurora-A-Spiegel auch die Konzentration von N-Myc herunterreguliert wurde. Dies konnte in den anderen MYCN-amplifizierten Zelllinien bestätigt werden (Abbildung 13). Noch deutlicher als in IMR-32 Zellen folgt der Aurora-A-Depletion in SMS-KCN, IMR-5 und SK-N-BE(2)C eine Abnahme der N-Myc-Spiegel.

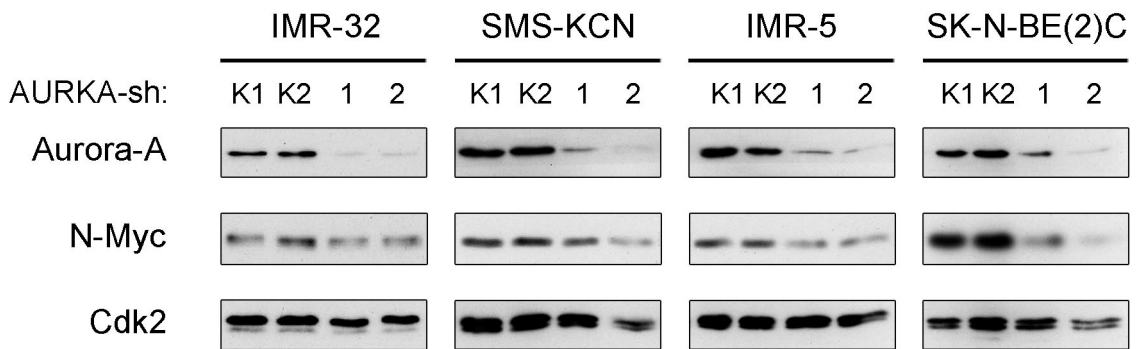


Abbildung 13: Western Blot auf N-Myc in MYCN-amplifizierten Zelllinien unter Aurora-A-Depletion

In den nicht amplifizierten Zelllinien kann ein solcher Effekt nicht beobachtet werden (Abbildung 14). Sie besitzen nur eine einfache Kopie des MYCN-Gens und haben deutlich niedrigere mRNA- und N-Myc-Proteinspiegel. Das N-Myc-Protein ist daher im Blot nicht detektierbar.

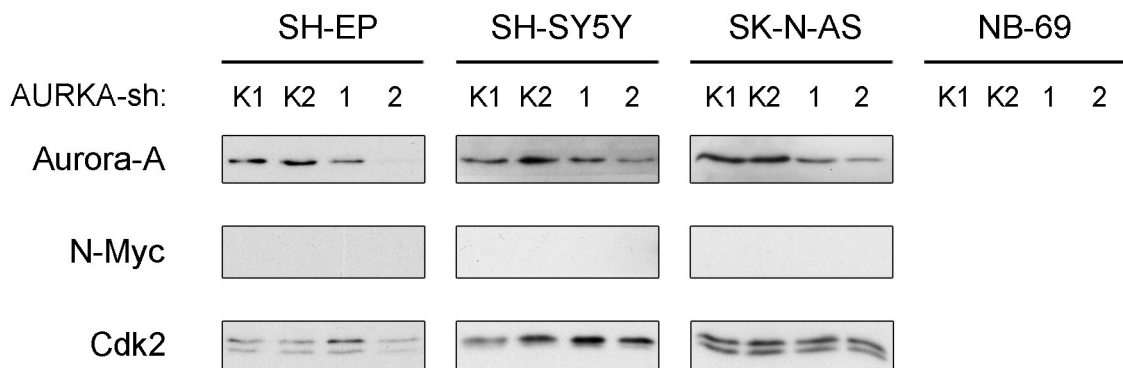


Abbildung 14: Western Blot auf N-Myc in nicht amplifizierten Zelllinien unter Aurora-A-Depletion

5 Diskussion

Ursprünglich konzipierten wir einen Screen mit zwei Zelllinien, von denen nur eine die MYCN-Amplifikation trägt, um Gene aufzudecken, welche für das Überleben der amplifizierten Zelllinie essentiell sind und gleichzeitig für die nicht amplifizierte Zelllinie nur geringe Relevanz zeigen. Wir suchten zunächst nach Genen, deren Expression eine positive Korrelation mit dem MYCN-Status in primären Neuroblastomen zeigte (67 Gene) [Berwanger et al., 2002] oder die als direkte Myc-Zielgene bekannt waren (127 Gene zum damaligen Zeitpunkt) und regulierten die Expression dieser insgesamt 194 Gene in beiden Zelllinien nacheinander herunter. Mittlerweile sind jedoch deutlich mehr Myc-Zielgene und differentiell regulierte Gene in klinischen Subgruppen der Neuroblastome bekannt. Durch ausgiebige Analyse der Neuroblastom Transkriptome mehrerer Studien konstruierten Oberthuer et al. einen Microarray-Chip für die Untersuchung von über 10.000 Genen [Oberthuer et al., 2006].

Durch den Screen wurden letztlich 17 Gene gefunden, die unseren geforderten Bedingungen entsprachen. Unter ihnen befand sich Aurora-A. Die Ergebnisse aus 4.1 spiegeln die Effizienz, mit der die Depletionen der einzelnen Gene in unserem Screen funktioniert haben, wieder. Bei einem arbiträr gewählten Grenzwert von 50% zeigt sich für die Zelllinie SH-EP eine Effizienz von 55% (6 aus 11 Genen) und für die Zelllinie IMR-32 von 63% (7 aus 11 Genen) erfolgreicher Knockdowns. Bedenkt man, dass bei einer gemittelten Effizienz von 59% erfolgreicher Knockdowns 41% der 194 Gene nicht erfasst wurden, so ist rein rechnerisch zu erwarten, dass dort weitere 12 Gene zu identifizieren sind. Überträgt man diese Quote (29 aus 194 Genen), ohne Einschränkungen zu machen und ohne die unterschiedlichen Auswahlkriterien zu berücksichtigen, auf den großen Microarray-Chip dürfte man mit über 1.400 Genen rechnen, die ein ähnliches Verhalten auf das Wachstum von IMR-32 und SH-EP zeigen. In den neuen Zielgenen steckt daher noch ein großes Potential weitere zu identifizieren, mit denen in MYCN-amplifizierten Tumoren eine synthetische Letalität induzierbar wäre [Kaelin, 2005].

Andere RNAi-Screens zeigen ebenfalls durch den Einsatz von dreifach shRNA-Kombinationen Ergebnisse in ähnlichen Größenordnungen. Der gleichzeitige Einsatz von drei shRNAs hat den Vorteil, dass immer noch eine ausreichende Depletion erreicht

werden kann, falls eine shRNA aus irgendeinem Grund nicht funktionieren sollte. Die shRNA-Bibliothek des „NKI“ aus der ein Teil unserer verwendeten Plasmide stammt, zeigt bei 70% der Gene eine Depletion von über 70% der ursprünglichen Expression. Werden die Vektoren einzeln verwendet, erreichen etwa 30% der shRNAs eine Depletion von 70% der ursprünglichen Expression [Bernards et al., 2006]. Bei diesen Vergleichen muss stets bedacht werden, dass die Effektivität auch von den verwendeten Zellsystemen abhängt.

Darüber hinaus war die Validierung des Screens notwendig um den Einfluss von Fehlern einschätzen zu können. Der eingangs erwähnte „Off Target Effekt“, bei dem die shRNA ein anderes Gen reprimiert, würde möglicherweise einen Effekt (Wachstumsarrest) auslösen, der nicht auf das anvisierte Gen selbst zurückzuführen ist. Solche unspezifischen „Off Target Effekte“ lassen sich nicht ausschließen. Ergibt die einzelne Verwendung vieler verschiedener shRNAs gegen dasselbe Gen immer den gleichen Phänotyp, ist das Risiko für einen „Off Target Effekt“ jedoch vermindert [Bernards et al., 2006]. Trotz dieser Einschränkung war der Screen gut geeignet, um Gene zu identifizieren, die für MYCN-amplifizierte Zellen eine wichtige Rolle spielen könnten.

Unter den 17 Genen befanden sich auch für uns weniger interessant erscheinende Ziele. Einige ribosomale Proteine, die ihre Funktion in der Proteinbiosynthese wahrnehmen, aber sonst keine weiteren Prozesse oder Signalwege in der Zelle regulieren, kamen für weitere Untersuchungen nicht in Frage. Aurora-A hingegen schien nicht zuletzt aufgrund seiner Kinase-Funktion ein attraktives Ziel zu sein, das genauer validiert werden sollte.

In 4.2 konnte gezeigt werden, dass eine Aurora-A-Depletion in MYCN-amplifizierten Zellen zu einem Wachstumsarrest führt, während die nicht amplifizierten Zellen unbeeinträchtigt weiter wachsen. Eine gute Erklärung für den Wachstumsarrest wäre eine p53 Induktion, die in IMR-32 Zellen (Abbildung 9) als Folge der Aurora-A-Depletion beobachtet wurde. Katayama et al. konnten zeigen, dass Aurora-A mit seiner Kinase-Domäne über eine Phosphorylierung p53 destabilisieren und inhibieren kann [Katayama et al., 2004]. Dies würde im Gegenzug bedeuten, dass der Aurora-A-Abbau zur Stabilisierung und Aktivierung von p53 beiträgt.

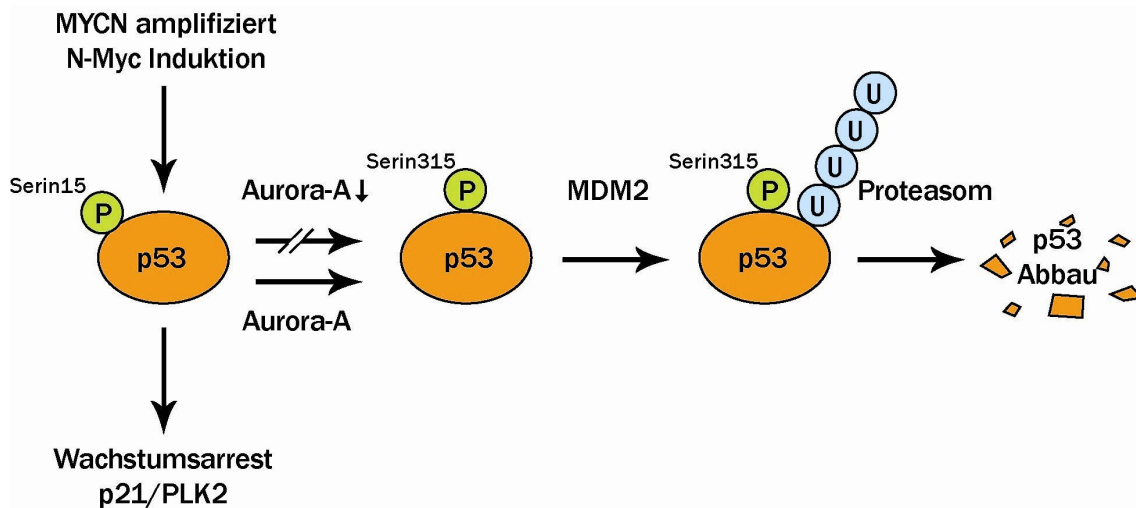


Abbildung 15: Modell für die p53/Aurora-A Interaktion: Die durch genomische MYCN-Amplifikation oder N-Myc-Induktion erhöhten N-Myc-Spiegel führen zu einer p53-Aktivierung. Aktives, an Serin15 phosphoryliertes, p53 löst einen Wachstumsarrest durch p21 und PLK2 Induktion aus und schützt die Zelle so vor dem onkogenen Potential der hohen N-Myc-Spiegel. Unter physiologisch niedrigen Aurora-A-Spiegeln wird p53 nicht beeinflusst. Ist die Aurora-A-Expression jedoch erhöht, könnte es über eine Phosphorylierung an Serin315 zur Einleitung des p53 Abbaus kommen. MDM2 bindet an Serin315 phosphoryliertes p53 und markiert es durch Polyubiquitinierung für den Abbau im Proteasom. (P=anorganisches Phosphat/ U=Ubiquitin)

In den Zellfärbungen mit Kristallviolett der MYCN-amplifizierten Zellen (Abbildung 7) fällt auf, dass die Zelllinie SK-N-BE(2)C durch die Aurora-A-Depletion kaum Änderungen in der Proliferation zeigt, während die anderen Zelllinien eindeutig in die Apoptose gehen. Goldschneider et al. haben gezeigt, dass SK-N-BE(2)C das Tumorsuppressorgen p53 in mutierter Form exprimiert [Goldschneider et al., 2006]. Wenn der durch Aurora-A-Depletion induzierte Wachstumsarrest auf dem p53-Signalweg beruhen würde, wäre die Mutation eine gute Erklärung für das schlechte Ansprechen der SK-N-BE(2)C Zellen.

Auf Bestrahlung mit UV-B reagieren alle Zelllinien bis auf SK-N-BE(2)C mit einer p53 Induktion (Abbildung 10). Die anderen Zelllinien sind also prinzipiell in der Lage auf kritische Situation mit einer Aktivierung des p53-Signalweges zu antworten und einen p21-abhängigen Wachstumsarrest oder über proapoptotische Proteine den aktiven Zelltod einzuleiten.

Nun wollten wir prüfen, ob p53 in allen Zelllinien eine Rolle bei der Reaktion auf die Aurora-A-Depletion spielt. Außer bei IMR-32 gab es aber keine schlüssigen Ergebnisse, die diese Hypothese bestätigen würden. Lediglich in SMS-KCN kam es bei einer AURKA-sh zu einem leichten p53 Anstieg (Abbildung 11). Die gleich bleibenden p53-Spiegel in SK-N-BE(2)C könnten allerdings durch die erwähnte Mutation

begründet werden und sprechen für den Einfluss von p53 auf den Arrest. Des Weiteren konnte ein p21-Anstieg bei jeweils nur einer AURKA-sh in SMS-KCN und IMR-5 beobachtet werden. p21 wird zwar über den p53-Signalweg aktiviert, es sind aber auch alternative Erklärungen für diesen Anstieg denkbar. Auch wenn der Wachstumsarrest über p53 kein genereller Mechanismus für alle Neuroblastomzelllinien zu sein scheint, kann er trotzdem einen Teil des Effektes in IMR-32 ausmachen.

Eine N-Myc-Depletion in MYCN-amplifizierten Zellen führt zu einem G1-Arrest und erhöhten p21-Spiegeln in der Zelle [Bell et al., 2006]. Dies funktioniert in p53-Wildtyp-Zellen ebenso wie in p53-mutierten Zellen [Bell et al., 2006] und spricht dafür, dass sinkende N-Myc-Spiegel auf einem p53-unabhängigen Weg p21 aktivieren und den Zellzyklusarrest auslösen können. Miz1, Myc-assoziiertes Zinkfinger-Protein, liegt gemeinsam mit Myc und Max in einem Komplex vor. Sinkt die Myc-Konzentration in der Zelle ist mehr freies Miz1 vorhanden. Miz1 bindet an ein Initiatorelement (INR) im p21-Promotor und aktiviert dort die Transkription durch die RNA-Polymerase II [Adhikary et al., 2005]. Somit steigt die p21-Konzentration allein durch sinkende N-Myc-Spiegel an und führt zu dem beschriebenen Wachstumsarrest.

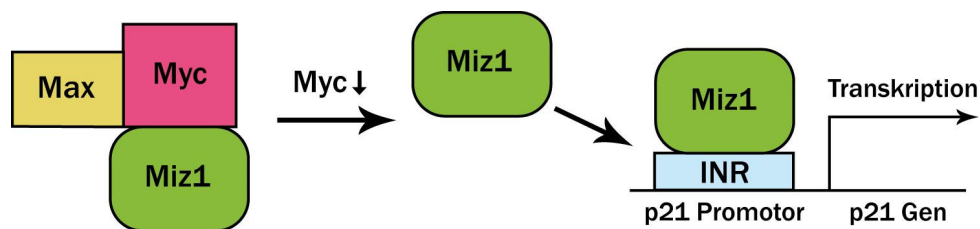


Abbildung 16: An Myc gebundenes Miz1 ist funktionell inaktiv. Sinkt hingegen die Myc-Konzentration in der Zelle, kann das freie Miz1 an das Initiatorelement (INR) binden und die p21-Transkription aktivieren.

In der Zelllinie IMR-32 wurden solche erniedrigten N-Myc-Spiegel beobachtet (Abbildung 9). Daraufhin wurden die anderen MYCN-amplifizierten Zelllinien untersucht und bei allen zeigte sich das gleiche Ergebnis: Die Aurora-A-Depletion führt zu einem erniedrigten N-Myc-Spiegel in MYCN-amplifizierten Zellen (Abbildung 13). Die Abnahme der N-Myc-Konzentration scheint daher der Mechanismus zu sein, über den die Aurora-A-Depletion zu einem Wachstumsarrest führt. Nicht amplifizierte Zelllinien exprimieren das MYCN-Gen nur in geringen Konzentrationen und sind deshalb nicht von dem Onkogen abhängig. Eine Aurora-A-Depletion in den nicht amplifizierten Zellen zeigt daher keine Wirkung auf das Zellwachstum (Abbildung 8).

In der Arbeitsgruppe wurden weitergehende Experimente durchgeführt um zu klären wie Aurora-A und N-Myc miteinander interagieren könnten. Wir konnten zeigen, dass eine Aurora-A-Depletion zu erniedrigten N-Myc-Proteinspiegeln führt, hohe Aurora-A-Spiegel hingegen N-Myc in der Zelle stabilisieren. Doch wie kommt es dazu, dass Aurora-A die N-Myc Stabilität reguliert?

AURKA-Depletion führte in IMR-32 Zellen zwar zu einer Reduktion der N-Myc-Proteine, aber zu einer mäßigen Zunahme der MYCN-mRNA-Spiegel. Dies spricht für eine posttranskriptionale Beeinflussung, während durch die Zunahme der MYCN-mRNA-Spiegel die Proteinneubildung im Sinne einer Gegenregulation gesteigert wird. In der Tat konnte durch Blockade der Neusynthese von Proteinen mittels Cycloheximid gezeigt werden, dass eine AURKA-Depletion den N-Myc Umsatz erhöht. Umgekehrt stabilisiert die Co-Expression von Aurora-A und N-Myc in SH-EP Zellen das N-Myc Protein und erhöht die Halbwertszeit in der Zelle auf das 2,5fache.

In neuronalen Vorläuferzellen ist der N-Myc-Abbau eng an die Mitose geknüpft. In der Prophase der Zellkernteilung wird N-Myc durch den Cyclin B/Cdk1-Komplex an Serin62 phosphoryliert und stabilisiert. Gsk3 bindet an das markierte Serin62 und markiert N-Myc durch eine weitere Phosphorylierung an Threonin58 [Sjostrom et al., 2005]. Die entsprechende Stelle bei c-Myc wird durch die Ubiquitin-Ligase Fbxw7 erkannt und mit Ubiquitin-Resten versehen. Durch Polyubiquitinierung eines Proteins wird es vom Proteasom erkannt und anschließend abgebaut. N-Myc könnte über den gleichen Komplex abgebaut werden [Welcker et al., 2004] [Yada et al., 2004].

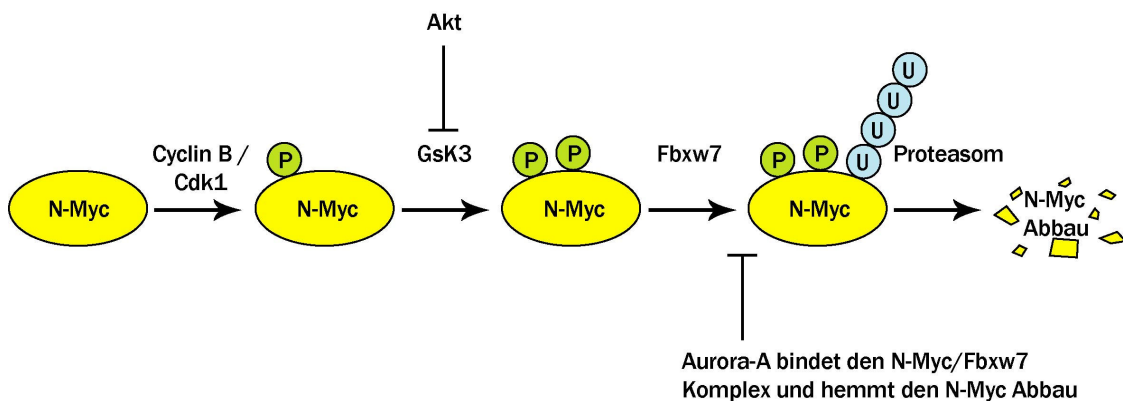


Abbildung 17: Regulation der N-Myc-Stabilität im Zellzyklus; Nachdem N-Myc in der Prophase durch den Cyclin B/ Cdk1-Komplex an Serin 62 phosphoryliert wurde, kann Gsk3 binden und seinerseits Threonin 58 phosphorylieren. Fbxw7 kann daraufhin mit N-Myc interagieren und es durch anhängen von Ubiquitin zum Abbau im Proteasom markieren. Hohe Aurora-A-Spiegel binden den N-Myc/Fbxw7-Komplex und stabilisieren so N-Myc. (P=anorganisches Phosphat/ U=Ubiquitin)

Tatsächlich führte die gleichzeitige Transfektion von Fbxw7 und N-Myc in SH-EP Zellen zu einer starken Abnahme der N-Myc-Proteinspiegel. Die zusätzliche Expression von Aurora-A hob diesen Effekt wieder auf, was dafür sprechen würde, dass Aurora-A den Fbxw7 vermittelten Abbau hemmt.

Bevor N-Myc durch Gsk3 an Threonin58 markiert werden kann, benötigt es zuerst die stabilisierende Phosphorylierung an Serin62. Daher wurde eine alterierte N-Myc-Form hergestellt, bei der die Positionen 58 und 62 durch Alanin ausgetauscht wurden (N-Myc-mut). Diese mutierte N-Myc Form reagierte weder auf den Fbxw7 induzierten Abbau, noch konnte Aurora-A die vorhandene Menge N-Myc-mut beeinflussen.

Es sollte zunächst überprüft werden, ob Aurora-A N-Myc über eine Inhibition des Fbxw7-vermittelten Abbaus stabilisiert. Da Aurora-A eine Serin/Threonin-Kinase ist, wäre es denkbar, dass es die Stabilisierung durch seine Kinase-Domäne über eine Phosphorylierung von N-Myc oder Fbxw7 erreicht. Daher wurden acht verschiedene AURKA-Mutanten hergestellt, die in der Literatur mit nicht funktioneller Kinase-Aktivität beschrieben worden sind. Trotz der nicht funktionellen Kinase-Domänen zeigten die Aurora-A-Mutanten weiterhin den stabilisierenden Effekt. Folglich vollzieht Aurora-A seine N-Myc stabilisierende Wirkung unabhängig von seiner Kinase-Funktion.

Als nächstes ergab sich der Verdacht, dass Aurora-A in vivo einen stabilen Komplex mit Fbxw7 oder N-Myc formen könnte und dadurch N-Myc vor dem Abbau schützt.

Tatsächlich konnte in der Arbeitsgruppe Aurora-A in Fbxw7-Immunopräzipitaten nachgewiesen werden, wenn beide Proteine in SH-EP Zellen exprimiert wurden. Umgekehrt gelang auch der Nachweis von Fbxw7 in Aurora-A-Immunopräzipitaten. Dies zeigt, dass die beiden Proteine in vivo ein stabilen Komplex bilden. Da Aurora-A selbst, wie viele andere Proteine auch, von Fbxw7 polyubiquitiniert wird, besteht die Möglichkeit das hohe Aurora-A-Spiegel mit N-Myc um die Interaktion mit Fbxw7 konkurrieren [Fujii et al., 2006] [Mao et al., 2004]. Daher wurde geprüft ob ansteigende Aurora-A Spiegel N-Myc aus der Bindung mit Fbxw7 verdrängen. Doch selbst hohe Aurora-A-Spiegel lösten den Komplex zwischen N-Myc und Fbxw7 nicht auf, wenn alle drei Proteine in SH-EP exprimiert wurden.

Eine dritte Möglichkeit wäre, dass Aurora-A vornehmlich mit N-Myc interagiert, das bereits an Fbxw7 gebunden ist und in diesem Komplex den Abbau verhindert. In Immunopräzipitationsversuchen konnte tatsächlich gezeigt werden, dass Aurora-A in N-Myc-Immunopräzipitaten zu finden ist und umgekehrt N-Myc in Aurora-A-Präzipitaten,

wenn die beiden Proteine in SH-EP Zellen exprimiert werden. Auch in IMR-32 Zellen bilden endogenes Aurora-A und N-Myc einen Komplex. Interessanterweise zeigte N-Myc, das an T58 und S62 mutiert ist (MYCN-mut) eine verminderte Interaktion mit Aurora-A, was wiederum die verminderte Interaktion mit Fbxw7 widerspiegelt und zeigt, dass Aurora-A hauptsächlich mit N-Myc interagiert, das an Fbxw7 gebunden vorliegt. Dadurch gelingt es Aurora-A den SCF^{Fbxw7}-vermittelten Abbau von N-Myc zu hemmen.

Wie oben beschrieben bindet Gsk3 an das an Serin62 phosphorylierte N-Myc und markiert es durch eine weitere Phosphorylierung an Threonin58 für den Fbxw7 vermittelten Abbau [Sjostrom et al., 2005]. Gsk3 kann durch eine Akt-abhängige Phosphorylierung inhibiert werden [Cross et al., 1995]. Akt (Proteinkinase B) selbst wird durch Wachstumsstimuli (Wachstumsfaktoren/ Insulin), die von außen auf die Zelle einwirken, über eine intrazelluläre Signalkaskade (PI3-Kinase-Signalweg) aktiviert. Folglich führen Wachstumssignale von außen über Akt-Aktivierung zu einer Stabilisierung von N-Myc und verhindern dessen Abbau im Proteasom (siehe Abbildung 17) [Kenney et al., 2004]. Aktives an Serin473 oder Threonin308 phosphoryliertes Akt stellt einen unabhängigen Prognosefaktor für ein verkürztes Überleben beim Neuroblastom dar und korreliert mit MYCN-Amplifikation, 1p-Aberrationen, fortgeschrittenem Krankheitsstadium, erhöhtem Alter zum Zeitpunkt der Diagnose und bösartigem histologischen Befund [Opel et al., 2007]. Fehlen die stabilisierenden Signale, kann N-Myc in der Mitose abgebaut werden und die Zelle besitzt die Möglichkeit den Zellzyklus zu verlassen und auszureifen [Sjostrom et al., 2005]. Dies wird dadurch bestätigt, dass N-Myc-Mutanten, die nicht durch Gsk3 phosphoryliert werden können, Wachstum induzieren und die Ausreifung von neuronalen Vorläuferzellen unterdrücken [Kenney et al., 2004]. Im Gegensatz dazu führt in MYCN-amplifizierten Neuroblastomzellen die Inhibition des PI3-Kinase Signalweges (Akt-Aktivierung) zu leicht erniedrigten N-Myc-Spiegeln ohne die MYCN-mRNA-Spiegel zu verändern und verursacht verlangsamtes Wachstum sowie vermehrte Apoptose [Chesler et al., 2006]. Chesler et al. konnten auch in vivo mittels RNA-Interferenz gegen MYCN-mRNA die Entstehung von Neuroblastomen in Mäusen verhindern und durch breit wirksame PI3-Kinase-Inhibitoren das Wachstum der Neuroblastome in Mäusen hemmen. Solche breit wirksamen PI3-Kinase-Inhibitoren sind wenig selektiv, hemmen alle in Säugern vorkommenden PI3-Kinasen sowie

weitere Proteine und zeigen eine relevante Toxizität. Deutlich spezifischere, neu entwickelte Inhibitoren werden aktuell getestet [Knight et al., 2004]. Chesler et al. vermuten hier einen vielversprechenden Ansatz für die Neuroblastomtherapie [Chesler et al., 2006].

Doch ist dabei zu bedenken, dass die PI3-Kinase-Inhibitoren zwar zu einer Gsk3 vermittelten N-Myc-Phosphorylierung an Threonin58 führen, der weitere N-Myc-Abbau jedoch durch hohe Aurora-A-Spiegel gehemmt wird (Abbildung 17). Die gemeinsame Expression von Aurora-A und N-Myc in SH-EP Zellen führte zu einer Ansammlung von N-Myc, welches an T58 und S62 phosphoryliert war. Neuroblastome, die hohe Aurora-A-Spiegel haben, könnten daher möglicherweise nicht auf eine Therapie mit PI3-Kinase-Inhibitoren ansprechen [Chesler et al., 2006].

Neu entwickelte Aurora-A-Kinase-Inhibitoren zeigten breite, unerwartet gute Wirksamkeit in Neuroblastomzelllinien und Mausmodellen [Houghton et al., 2008] und sollen aktuell in einer Phase I Studie in Kindern mit therapieresistenten Neuroblastomen getestet werden [Mosse, 2008].

Allgemein lässt sich sagen, dass die Ergebnisse ein Beispiel dafür sind, wie die Abhängigkeit der Zellen von einem Onkogen (MYCN-Amplifikation) dazu verwendet werden kann, weitere Gene zu identifizieren, die selbst nicht mutiert sein müssen, aber trotzdem essentiell für das Überleben der Tumorzellen und gleichzeitig entbehrlich für normale Zellen sind. Es erscheint wichtig und aussichtsreich nach solchen Genen als alternativen Angriffspunkten für eine spezifische Therapie zu suchen, wenn die onkogene Mutation selbst durch eine Pharmakotherapie nicht angreifbar ist [Kaelin, 2005]. Die Ergebnisse zeigen, dass der N-Myc-Abbau in der Mitose eine Möglichkeit darstellt, selektiv MYCN-amplifizierte Neuroblastome anzugreifen. Da die N-Myc-stabilisierende Wirkung jedoch keine Funktion der Aurora-A-Kinase-Domäne ist, werden Kinase-Inhibitoren über diesen Mechanismus nicht wirksam sein.

Durch den Screen, die sich anschließende Validierung und genauere Untersuchung des Mechanismus ist es gelungen die Aurora-A-Kinase als einen wichtigen Stabilisator des Transkriptionsfaktors N-Myc und relevanten Faktor der Onkogenese MYCN-amplifizierter Neuroblastome zu beschreiben.

6 Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist ein Tumor des Säuglings- und Kindesalters. Es entsteht aus Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems, den Neuroblasten. Das klinische Erscheinungsbild reicht von sehr langsam verdrängend wachsenden Tumoren, die das Potential einer vollständigen Rückbildung ohne Therapie besitzen, bis zu aggressiven invasiv wachsenden Tumoren, deren 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Ausnutzung aller zur Verfügung stehenden Therapieoptionen lediglich 30% beträgt.

Die großen Unterschiede im biologischen Verhalten der Tumore basieren auf molekulargenetischen Risikofaktoren. Einer dieser Risikofaktoren ist die Amplifikation des Protoonkogens MYCN. Das exprimierte Protein N-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der andere Gene aktiviert und das Wachstum der Zelle beeinflussen kann. Es sind viele Zielgene des N-Myc-Proteins bekannt. Diese Kenntnisse reichen jedoch nicht aus um die N-Myc-induzierte Tumorentstehung sowie das besonders aggressive Wachstum und die schlechte Prognose der MYCN-amplifizierten Tumore zu erklären.

Um weitere Gene zu identifizieren, die für das Wachstum der MYCN-amplifizierten Tumore essentiell sind, wurde ein Screen durchgeführt. Dabei wurden jeweils 194 Gene in einer MYCN-amplifizierten Neuroblastomzelllinie und einer Zelllinie ohne MYCN-Amplifikation ausgeschaltet. Alle Gene, die in der MYCN-amplifizierten Zelllinie einen Wachstumsarrest auslösten, für die nicht amplifizierte Zelllinie hingegen verzichtbar waren, wurden gelistet. Die Bedingungen wurden von 17 Genen erfüllt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden mit welcher Effektivität die Expression der einzelnen Gene im Screen herunterreguliert wurde. Dies ist notwendig um die Anzahl der tatsächlich untersuchten Gene abschätzen zu können.

Unter den 17 entdeckten Genen befindet sich die Aurora-Kinase A. Wird Aurora-A inhibiert bleiben die MYCN-amplifizierten Zellen im Wachstum zurück. Um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt nicht nur zelllinienspezifisch ist, sondern generelle Gültigkeit besitzt und auf andere Zelllinien und Neuroblastome übertragbar ist, wurden verschiedene Zelllinien auf dieses Verhalten bei Aurora-A-Depletion überprüft. In vier MYCN-amplifizierten und vier nicht amplifizierten Zelllinien bestätigten sich die Beobachtungen. Darüber hinaus konnte in den acht

Neuroblastomzelllinien durch Untersuchung der Proteinveränderungen in der Zelle bei Aurora-A-Depletion auf den möglichen Mechanismus, auf dem die Beobachtungen des Wachstumsarrests beruhen, geschlossen werden. Aurora-A stabilisiert N-Myc und ist somit maßgeblich am Wachstum der Zelle beteiligt. Im Gegenzug dazu führt die Aurora-A-Depletion zu erniedrigten N-Myc-Spiegeln in der Zelle und begünstigt somit den Wachstumsarrest. Aurora-A-Kinase konnte als wichtiger Regulator der N-Myc-Stabilität identifiziert und seine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung der MYCN-amplifizierten Neuroblastome geklärt werden.

Summary

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor in infancy. It descends from primitive cells of the sympathetic nervous system. The course of the disease varies strongly, ranging from slowly growing tumors, with the potential of spontaneous remission, to progressive disease with metastasis and a five-year survival rate of only 30%.

The different biological features are caused by several genetic risk factors. One of these risk factors is the amplification of the MYCN proto-oncogene. The encoded protein N-Myc is a transcription factor that is able to activate other genes and thereby influence cell growth and cell cycle. Although there are several N-Myc target genes known, it has yet not been clarified what the reason for this aggressive growth and the poor outcome in MYCN-amplified Neuroblastoma is.

To identify further genes, that are relevant for the growth of MYCN-amplified tumors, a screen was performed. Therefore, 194 genes were depleted separately in a MYCN-amplified and a MYCN-nonamplified cell line. In the screen it was checked, which genes showed an inhibition of cell proliferation in the MYCN-amplified cell line while having no effect on the nonamplified cell line. Seventeen genes were thereby detected.

In this dissertation the “knock-down” efficiency of the screen has been proved. This is necessary in order to estimate the number of genes that have been checked in the screen. One of the identified genes is Aurora-A. Depletion of Aurora-A inhibits cell proliferation in the MYCN-amplified cell line. To check whether this observation is a general phenomenon, other Neuroblastoma cell lines were tested. The observation was

verified in four MYCN-amplified and four MYCN-nonamplified cell lines. To identify the mechanism of proliferation arrest in Aurora-A depleted cells the eight cell lines were checked for collective protein alterations. The results show, that Aurora-A stabilizes N-Myc and therefore influences cell growth and proliferation. Aurora-A depletion leads to decreased N-Myc levels and promotes proliferation arrest. N-Myc stabilization could be identified as a critical function of Aurora-A in MYCN-amplified Neuroblastoma.

7 Literaturverzeichnis

Abe, N., Watanabe, T., Sugiyama, M. et al. Determination of high mobility group I(Y) expression level in colorectal neoplasias: a potential diagnostic marker. *Cancer Res.* 1999; 59:1169-74.

Acheson, A., Conover, J. C., Fandl, J. P. et al. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature.* 1995; 374:450-3.

Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A. et al. The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell.* 2005; 123:409-21.

Ambros, I. M., Attarbaschi, A., Rumpler, S. et al. Neuroblastoma cells provoke Schwann cell proliferation in vitro. *Med Pediatr Oncol.* 2001; 36:163-8.

Ambros, I. M., Zellner, A., Roald, B. et al. Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1996; 334:1505-11.

Arnold, I., Watt, F. M. c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr Biol.* 2001; 11:558-68.

Arvanitis, C., Felsher, D. W. Conditional transgenic models define how MYC initiates and maintains tumorigenesis. *Semin Cancer Biol.* 2006; 16:313-7.

Ayer, D. E., Eisenman, R. N. A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev.* 1993; 7:2110-9.

Bader, P., Schilling, F., Schlaud, M. et al. Expression analysis of multidrug resistance associated genes in neuroblastomas. *Oncol Rep.* 1999; 6:1143-6.

Bagchi, A., Papazoglu, C., Wu, Y. et al. CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell.* 2007; 128:459-75.

Baudino, T. A., McKay, C., Pendeville-Samain, H. et al. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev.* 2002; 16:2530-43.

Bauer, A., Savelyeva, L., Claas, A., Praml, C., Berthold, F., Schwab, M. Smallest region of overlapping deletion in 1p36 in human neuroblastoma: a 1 Mbp cosmid and PAC contig. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001; 31:228-39.

Bell, E., Premkumar, R., Carr, J. et al. The role of MYCN in the failure of MYCN amplified neuroblastoma cell lines to G1 arrest after DNA damage. *Cell Cycle.* 2006; 5:2639-47.

Bernards, R., Brummelkamp, T. R., Beijersbergen, R. L. shRNA libraries and their use in cancer genetics. *Nat Methods.* 2006; 3:701-6.

- Berns, K., Hijmans, E. M., Mullenders, J. et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*. 2004; 428:431-7.
- Berns, K., Horlings, H. M., Hennessy, B. T. et al. *A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer.* ; 2007.
- Berthold, F., Hero, B. Neuroblastoma: current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs*. 2000; 59:1261-77.
- Berthold, F., Sahin, K., Hero, B. et al. The current contribution of molecular factors to risk estimation in neuroblastoma patients. *Eur J Cancer*. 1997; 33:2092-7.
- Berwanger, B., Hartmann, O., Bergmann, E. et al. Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2002; 2:377-86.
- Birren, S. J., Lo, L., Anderson, D. J. Sympathetic neuroblasts undergo a developmental switch in trophic dependence. *Development*. 1993; 119:597-610.
- Bischoff, J. R., Anderson, L., Zhu, Y. et al. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J*. 1998; 17:3052-65.
- Blackwell, T. K., Huang, J., Ma, A. et al. *Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences.* ; 1993.
- Blackwood, E. M., Eisenman, R. N. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*. 1991; 251:1211-7.
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. *Pathologie.* : Urban / Fischer; 2004.
- Bordow, S. B., Haber, M., Madafiglio, J., Cheung, B., Marshall, G. M., Norris, M. D. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma. *Cancer Res*. 1994; 54:5036-40.
- Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M. et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1999; 340:1954-61.
- Brodeur, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:203-16.
- Brodeur, G. M., Maris, J. M. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 2002:.
- Brodeur, G. M., Maris, J. M., Yamashiro, D. J., Hogarty, M. D., White, P. S. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1997; 19:93-101.
- Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F. et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993; 11:1466-77.

- Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop, J. M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984; 224:1121-4.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002a; 296:550-3.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., Agami, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*. 2002b; 2:243-7.
- Caron, H. Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 1995; 24:215-21.
- Chang, T., Yu, D., Lee, Y. et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*. 2008; 40:43-50.
- Chen, S., Chang, P., Cheng, Y., Tang, F., Lin, Y. Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *EMBO J*. 2002; 21:4491-9.
- Chesler, L., Schlieve, C., Goldenberg, D. D. et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase destabilizes Mycn protein and blocks malignant progression in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2006; 66:8139-46.
- Chiappetta, G., Tallini, G., De Biasio, M. C. et al. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res*. 1998; 58:4193-8.
- Corvi, R., Amler, L. C., Savelyeva, L., Gehring, M., Schwab, M. MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:5523-7.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995; 378:785-9.
- Disney, J. E., Johnson, K. R., Magnuson, N. S., Sylvester, S. R., Reeves, R. High-mobility group protein HMG-I localizes to G/Q- and C-bands of human and mouse chromosomes. *J Cell Biol*. 1989; 109:1975-82.
- Efeyan, A., Serrano, M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*. 2007; 6:1006-10.
- Egle, A., Harris, A. W., Bouillet, P., Cory, S. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:6164-9.
- Eilers, M., Schirm, S., Bishop, J. M. The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J*. 1991; 10:133-41.

- Eischen, C. M., Woo, D., Roussel, M. F., Cleveland, J. L. Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol Cell Biol.* 2001; 21:5063-70.
- Ejeskar, K., Sjoberg, R. M., Abel, F., Kogner, P., Ambros, P. F., Martinsson, T. Fine mapping of a tumour suppressor candidate gene region in 1p36.2-3, commonly deleted in neuroblastomas and germ cell tumours. *Med Pediatr Oncol.* 2001; 36:61-6.
- Eklof, O., Sandstedt, B., Thonell, S., Ahstrom, L. Spontaneous regression of stage IV neuroblastoma. *Acta Paediatr Scand.* 1983; 72:473-6.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001; 411:494-8.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S. et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell.* 1992; 69:119-28.
- Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L. et al. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* 2003; 17:1115-29.
- Fiorillo, A., Migliorati, R., Tamburrini, O. et al. Prolonged survival of a patient with disseminated neuroblastoma. *J Pediatr.* 1982; 101:564-6.
- Fire, A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 1999; 15:358-63.
- Fischer, M., Berthold, F. Characterization of the gene expression profile of neuroblastoma cell line IMR-5 using serial analysis of gene expression. *Cancer Lett.* 2003; 190:79-87.
- Freeman, A., Morris, L. S., Mills, A. D. et al. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:2121-32.
- Freytag, S. O., Geddes, T. J. Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science.* 1992; 256:379-82.
- Frye, M., Gardner, C., Li, E. R., Arnold, I., Watt, F. M. Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development.* 2003; 130:2793-808.
- Fujii, Y., Yada, M., Nishiyama, M. et al. Fbxw7 contributes to tumor suppression by targeting multiple proteins for ubiquitin-dependent degradation. *Cancer Sci.* 2006; 97:729-36.
- Galderisi, U., Di Bernardo, G., Cipollaro, M. et al. Differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells: role of N-myc gene product. *J Cell Biochem.* 1999; 73:97-105.
- Gehring, M., Berthold, F., Edler, L., Schwab, M., Amler, L. C. The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma. *Cancer Res.* 1995; 55:5366-9.

- Giannini, G., Cerignoli, F., Mellone, M. et al. Molecular mechanism of HMGA1 deregulation in human neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2005; 228:97-104.
- Goldschneider, D., Horvilleur, E., Plassa, L. et al. Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34:5603-12.
- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A. et al. High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.* 1998; 58:14-9.
- Gritsko, T. M., Coppola, D., Paciga, J. E. et al. Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:1420-6.
- Guo, C., White, P. S., Weiss, M. J. et al. *Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas.* ; 1999.
- Haber, M., Smith, J., Bordow, S. B. et al. Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2006; 24:1546-53.
- Hann, H. W., Evans, A. E., Siegel, S. E. et al. Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. *Cancer Res.* 1985; 45:2843-8.
- Harlow, E., Lane, D. *Antibodies A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. 1988.
- Hempstead, B. L. The many faces of p75^{NTR}. *Curr Opin Neurobiol.* 2002; 12:260-7.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V. et al. Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell.* 2002; 10:509-21.
- Ho, R., Eggert, A., Hishiki, T. et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res.* 2002; 62:6462-6.
- Hoefnagel, C. A., De Kraker, J., Valdes Olmos, R. A., Voute, P. A. 131I-MIBG as a first-line treatment in high-risk neuroblastoma patients. *Nucl Med Commun.* 1994; 15:712-7.
- Hogarty, M. D., Liu, X., Guo, C. et al. Identification of a 1-megabase consensus region of deletion at 1p36.3 in primary neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol.* 2000; 35:512-5.
- Houghton, P., Morton, C., Maris, J., Courtright, J. Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP) evaluation of the Aurora A Kinase Inhibitor MLN8237. <http://pptp.stjude.org/doc/meetingPresentations/MLN8237%20AACR%202008.pdf>. 2008.
- Hu, H. M., Chuang, C. K., Lee, M. J., Tseng, T. C., Tang, T. K. Genomic organization, expression, and chromosome localization of a third aurora-related kinase gene, Aie1. *DNA Cell Biol.* 2000; 19:679-88.

- Ikeda, H., Iehara, T., Tsuchida, Y. et al. Experience with International Neuroblastoma Staging System and Pathology Classification. *Br J Cancer*. 2002; 86:1110-6.
- Iritani, B. M., Eisenman, R. N. c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:13180-5.
- Jeng, Y., Peng, S., Lin, C., Hsu, H. Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:2065-71.
- Jiang, Y., Zhang, Y., Lees, E., Seghezzi, W. AuroraA overexpression overrides the mitotic spindle checkpoint triggered by nocodazole, a microtubule destabilizer. *Oncogene*. 2003; 22:8293-301.
- Kaatsch, P., Kaletsch, U., Spix, C. *Annual report 1998 - German Childhood Cancer Registry*. Mainz; 1999.
- Kaelin, W. G. J. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5:689-98.
- Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H. et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet*. 2004; 36:55-62.
- Kenney, A. M., Widlund, H. R., Rowitch, D. H. Hedgehog and PI-3 kinase signaling converge on Nmyc1 to promote cell cycle progression in cerebellar neuronal precursors. *Development*. 2004; 131:217-28.
- Klein, R. Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J*. 1994; 8:738-44.
- Knight, Z. A., Chiang, G. G., Alaimo, P. J. et al. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors from an arylmorpholine scaffold. *Bioorg Med Chem*. 2004; 12:4749-59.
- Kogner, P., Barbany, G., Dominici, C., Castello, M. A., Raschella, G., Persson, H. Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res*. 1993; 53:2044-50.
- Laemmli, U. K., Beguin, F., Gujer-Kellenberger, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol*. 1970; 47:69-85.
- Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992; 358:15-6.
- Lanni, J. S., Jacks, T. Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol*. 1998; 18:1055-64.
- Li, D., Zhu, J., Firozi, P. F. et al. Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2003b; 9:991-7.
- Li, F., Wang, Y., Zeller, K. I. et al. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol*. 2005; 25:6225-34.

- Li, Z., Van Calcar, S., Qu, C., Cavenee, W. K., Zhang, M. Q., Ren, B. A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003a; 100:8164-9.
- Liu, Q., Kaneko, S., Yang, L. et al. Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *J Biol Chem*. 2004; 279:52175-82.
- Maiorano, D., Lemaitre, J. M., Mechali, M. Stepwise regulated chromatin assembly of MCM2-7 proteins. *J Biol Chem*. 2000; 275:8426-31.
- Manohar, C. F., Bray, J. A., Salwen, H. R. et al. MYCN-mediated regulation of the MRP1 promoter in human neuroblastoma. *Oncogene*. 2004; 23:753-62.
- Mao, D. Y. L., Watson, J. D., Yan, P. S. et al. Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr Biol*. 2003; 13:882-6.
- Mao, J., Perez-Losada, J., Wu, D. et al. Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature*. 2004; 432:775-9.
- Maris, J. M., Guo, C., Blake, D. et al. Comprehensive analysis of chromosome 1p deletions in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2001; 36:32-6.
- Maris, J. M., Matthay, K. K. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1999; 17:2264-79.
- Maris, J. M., Weiss, M. J., Guo, C. et al. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol*. 2000; 18:1888-99.
- Martins, C. P., Brown-Swigart, L., Evan, G. I. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell*. 2006; 127:1323-34.
- Martinsson, T., Sjoberg, R. M., Hedborg, F., Kogner, P. Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. *Cancer Res*. 1995; 55:5681-6.
- Marumoto, T., Hirota, T., Morisaki, T. et al. Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells*. 2002; 7:1173-82.
- Marumoto, T., Zhang, D., Saya, H. Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5:42-50.
- Matthay, K. K., Tan, J. C., Villablanca, J. G. et al. Phase I dose escalation of iodine-131-metaiodobenzylguanidine with myeloablative chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in refractory neuroblastoma: a new approaches to Neuroblastoma Therapy Consortium Study. *J Clin Oncol*. 2006; 24:500-6.

Matthay, K. K., Villablanca, J. G., Seeger, R. C. et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med.* 1999; 341:1165-73.

McArdle, L., McDermott, M., Purcell, R. et al. Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q. *Carcinogenesis.* 2004; 25:1599-609.

Miyoshi, Y., Iwao, K., Egawa, C., Noguchi, S. Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int J Cancer.* 2001; 92:370-3.

Morgenstern, J. P., Land, H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18:3587-96.

Morrish, F., Neretti, N., Sedivy, J. M., Hockenbery, D. M. The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry. *Cell Cycle.* 2008; 7:1054-66.

Mosse, Y. A Phase I Study of MLN8237, an Oral Selective Small Molecule Inhibitor of Aurora A Kinase, in Pediatric Patients With Relapsed/Refractory Solid Tumors and Leukemia. [http://clinicaltrials.gov/ Number: NCT00739427](http://clinicaltrials.gov/Number:NCT00739427). 2008.

Nagata, Y., Lan, K., Zhou, X. et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 2004; 6:117-27.

Nakagawara, A., Azar, C. G., Scavarda, N. J., Brodeur, G. M. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol.* 1994; 14:759-67.

Nakagawara, A., Brodeur, G. M. Role of neurotrophins and their receptors in human neuroblastomas: a primary culture study. *Eur J Cancer.* 1997; 33:2050-3.

Nesbit, C. E., Tersak, J. M., Prochownik, E. V. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene.* 1999; 18:3004-16.

Oberthuer, A., Berthold, F., Warnat, P. et al. Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification. *J Clin Oncol.* 2006; 24:5070-8.

Ohtani, K., Iwanaga, R., Nakamura, M. et al. Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene.* 1999; 18:2299-309.

Opel, D., Poremba, C., Simon, T., Debatin, K., Fulda, S. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2007; 67:735-45.

Park, B. H., Davidson, N. E. PI3 kinase activation and response to Trastuzumab Therapy: what's new with herceptin resistance? *Cancer Cell.* 2007; 12:297-9.

Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., Baltimore, D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:8392-6.

Pelengaris, S., Khan, M. The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 416:129-36.

Pelengaris, S., Khan, M., Evan, G. I. Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell.* 2002; 109:321-34.

Plantaz, D., Vandesompele, J., Van Roy, N. et al. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer.* 2001; 91:680-6.

Powell, J. E., Esteve, J., Mann, J. R. et al. Neuroblastoma in Europe: differences in the pattern of disease in the UK. SENSE. Study group for the Evaluation of Neuroblastoma Screening in Europe. *Lancet.* 1998; 352:682-7.

Pritchard, J., Hickman, J. A. Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously? *Lancet.* 1994; 344:869-70.

Prof. Dr. Frank Berthold (Principal investigator). *NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma Principal investigator: Prof. Dr. Frank Berthold; Dept. Pediatric Oncology and Hematology; Children's Hospital, University of Cologne; Kerpener Str. 62; D-50924 Köln, GE. ; 2004.*

Ramsay, G., Stanton, L., Schwab, M., Bishop, J. M. Human proto-oncogene N-myc encodes nuclear proteins that bind DNA. *Mol Cell Biol.* 1986; 6:4450-7.

Reeves, R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene.* 2001; 277:63-81.

Reinhardt; Dietrich. *Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2007.

Remmele, W. *Pathologie Band 4 - Tumoren des Kindesalters.* Berlin: Springer; 1997.

Reynolds, C. P., Biedler, J. L., Spengler, B. A. et al. Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1986; 76:375-87.

Rieder, C. L., Maiato, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev Cell.* 2004; 7:637-51.

Ryden, M., Sehgal, R., Dominici, C., Schilling, F. H., Ibanez, C. F., Kogner, P. Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastomas with favourable tumour stage and good prognosis. *Br J Cancer.* 1996; 74:773-9.

Sakakura, C., Hagiwara, A., Yasuoka, R. et al. Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. *Br J Cancer.* 2001; 84:824-31.

- Schilling, F. H., Spix, C., Berthold, F. et al. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med.* 2002; 346:1047-53.
- Schlagbauer-Wadl, H., Griffioen, M., van Elsas, A. et al. Influence of increased c-Myc expression on the growth characteristics of human melanoma. *J Invest Dermatol.* 1999; 112:332-6.
- Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop, J. M. et al. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature.* 1984; 308:288-91.
- Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop, J. M. Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature.* 1985; 316:160-2.
- Schwab, M., Westermann, F., Hero, B., Berthold, F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol.* 2003; 4:472-80.
- Shackney, S. E., Smith, C. A., Miller, B. W. et al. Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res.* 1989; 49:3344-54.
- Shimada, H., Ambros, I. M., Dehner, L. P. et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer.* 1999b; 86:364-72.
- Shimada, H., Ambros, I. M., Dehner, L. P., Hata, J., Joshi, V. V., Roald, B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer.* 1999a; 86:349-63.
- Shohet, J. M., Hicks, M. J., Plon, S. E. et al. Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2002; 62:1123-8.
- Shuster, J. J., McWilliams, N. B., Castleberry, R. et al. Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive partitioning study. *Am J Clin Oncol.* 1992; 15:295-303.
- Simon, T., Spitz, R., Hero, B., Berthold, F., Faldum, A. Risk estimation in localized unresectable single copy MYCN neuroblastoma by the status of chromosomes 1p and 11q. *Cancer Lett.* 2006; 237:215-22.
- Sjostrom, S. K., Finn, G., Hahn, W. C., Rowitch, D. H., Kenney, A. M. The Cdk1 complex plays a prime role in regulating N-myc phosphorylation and turnover in neural precursors. *Dev Cell.* 2005; 9:327-38.
- Snider, W. D. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell.* 1994; 77:627-38.
- Spitz, R., Hero, B., Ernestus, K., Berthold, F. Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:52-8.

- Spitz, R., Hero, B., Simon, T., Berthold, F. Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:3368-73.
- Spitz, R., Hero, B., Westermann, F., Ernestus, K., Schwab, M., Berthold, F. Fluorescence in situ hybridization analyses of chromosome band 1p36 in neuroblastoma detect two classes of alterations. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002; 34:299-305.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A. et al. *Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1.* ; 2001.
- Suzuki, S., Adachi, A., Hiraiwa, A., Ohashi, M., Ishibashi, M., Kiyono, T. Cloning and characterization of human MCM7 promoter. *Gene.* 1998; 216:85-91.
- Takaha, N., Hawkins, A. L., Griffin, C. A., Isaacs, W. B., Coffey, D. S. High mobility group protein I(Y): a candidate architectural protein for chromosomal rearrangements in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002; 62:647-51.
- Takahashi, T., Futamura, M., Yoshimi, N. et al. Centrosomal kinases, HsAIRK1 and HsAIRK3, are overexpressed in primary colorectal cancers. *Jpn J Cancer Res.* 2000; 91:1007-14.
- Tanaka, T., Kimura, M., Matsunaga, K., Fukada, D., Mori, H., Okano, Y. Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res.* 1999; 59:2041-4.
- Tang, X. X., Zhao, H., Kung, B. et al. The MYCN enigma: significance of MYCN expression in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2006; 66:2826-33.
- Todorov, I. T., Werness, B. A., Wang, H. Q. et al. HsMCM2/BM28: a novel proliferation marker for human tumors and normal tissues. *Lab Invest.* 1998; 78:73-8.
- Vafa, O., Wade, M., Kern, S. et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell.* 2002; 9:1031-44.
- van de Wetering, M., Oving, I., Muncan, V. et al. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* 2003; 4:609-15.
- Van Roy, N., Laureys, G., Van Gele, M. et al. Analysis of 1;17 translocation breakpoints in neuroblastoma: implications for mapping of neuroblastoma genes. *Eur J Cancer.* 1997; 33:1974-8.
- Weinberg, R. A. *The biology of cancer.* : Garland Science; 2007.
- Weinstein, I. B. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. *Science.* 2002; 297:63-4.

- Welcker, M., Orian, A., Jin, J. et al. The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:9085-90.
- Westermann, F., Schwab, M. Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett*. 2002; 184:127-47.
- Woods, W. G., Tuchman, M., Robison, L. L. et al. A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. *Lancet*. 1996; 348:1682-7.
- Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T. et al. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J*. 2004; 23:2116-25.
- Yang, H. W., Chen, Y. Z., Piao, H. Y., Takita, J., Soeda, E., Hayashi, Y. DNA fragmentation factor 45 (DFF45) gene at 1p36.2 is homozygously deleted and encodes variant transcripts in neuroblastoma cell line. *Neoplasia*. 2001; 3:165-9.
- Zeller, K. I., Zhao, X., Lee, C. W. H. et al. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:17834-9.
- Zeltzer, P. M., Marangos, P. J., Evans, A. E., Schneider, S. L. Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. Relationship to stage and disease course. *Cancer*. 1986; 57:1230-4.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L. et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet*. 1998; 20:189-93.
- Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H. et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*. 1998; 12:2424-33.

8 Anhang

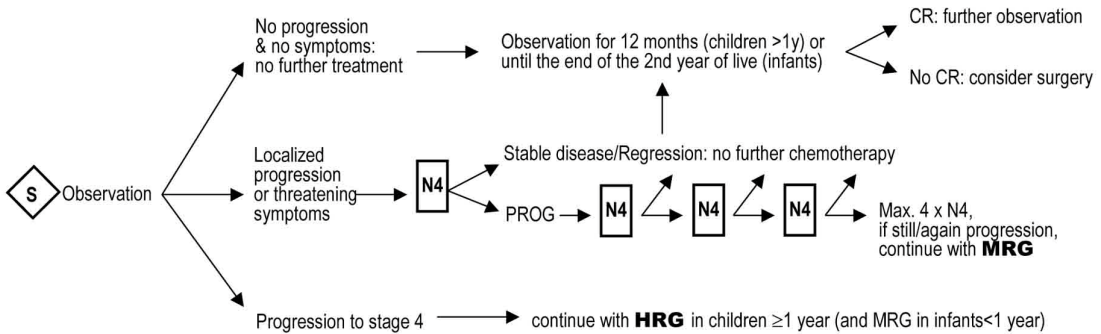
8.1 Neuroblastomstudie 2004

Die Abbildung zeigt die Gesamtübersicht der Neuroblastomstudie 2004. Je nach Gruppenzuteilung der am Neuroblastom erkrankten Kinder erfolgt eine Risiko adaptierte Therapie [Prof. Dr. Frank Berthold (Principal investigator), 2004].

NB2004 GENERAL OVERVIEW

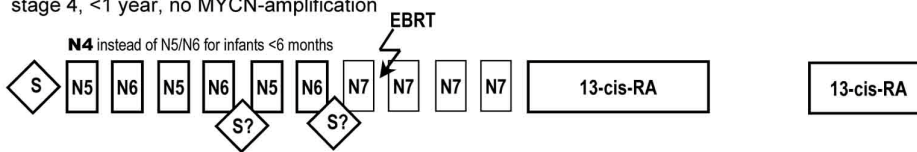
OBSERVATION GROUP (OG)

stage 1, 0-21 years, no MYCN-amplification
 stage 2, 0-21 years, no 1p aberration, no MYCN-amplification
 stage 3, 0-2 years, no 1p aberration, no MYCN-amplification
 stage 4S, 0-1 year, no MYCN-amplification



MEDIUM RISK GROUP (MRG)

stage 3, ≥2 years; no MYCN-amplification
 stage 3, 0-21 years, 1p aberration, no MYCN-amplification
 stage 2, 0-21 years, 1p aberration, no MYCN-amplification
 stage 4, <1 year, no MYCN-amplification



HIGH RISK GROUP (HRG)

stage 4, ≥1-21 years,
 Any stage, age 0-21 years, presence of MYCN amplification

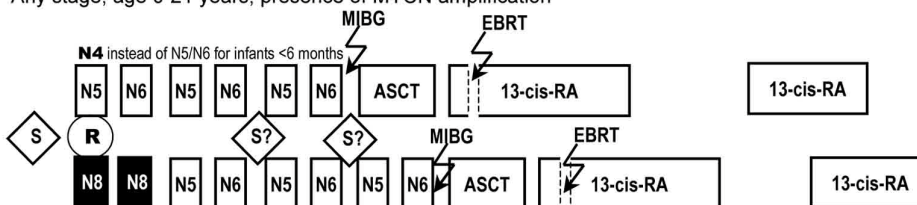


Figure 1: Overview over NB2004 treatment (S=surgery, R=randomization, N4/5/6/7/8=chemotherapy cycles, MIBG=MIBG treatment, EBRT=external beam radiation therapy, 13-cis-RA=13-cis-retinoic acid)

8.2 Abkürzungen-Glossar

Sofern nicht hier aufgeführt, wurden Abkürzungen entsprechend den Maßangaben der IUPAC (International union of pure and applied chemistry) und denen des SI-Systems (System Internationale de l'Unité) verwendet. Spezielle Abkürzungen für Fachtermini, die nicht in dieser Liste enthalten sind, werden jeweils im Text erläutert.

A	Ampère/ Absorption
AK	Antikörper
Akt	Akt = PKB
AURKA	Aurora-Kinase-A Gen
Aurora-A	exprimiertes Protein des AURKA Gens
BCL-X _L	basal cell lymphoma-extra large
BCL2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaare
BIM	Bcl-2–interacting mediator of cell death
°C	Grad Celsius
CD44	cluster of differentiation 44
Cdk	cyclin dependent kinase
cDNA	copy DNA
Chd5	chromodomain helicase DNA-binding protein 5
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	cycle treshold
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
DMs	doubel-minute chromatin bodies
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
Fbxw7	F-Box and WD40 domain protein 7
fwd	forward
g	Gramm, Erdbeschleunigung
Gsk3	glycogen synthase kinase 3
h	Stunde

H1	Histon 1
HDM2	human homologue of murine mdm2
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HMGA1	high mobility group at-hook 1
HLH/LZ	Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Domäne
HSRs	homogeneously staining regions
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB-Medium	lysogeny broth medium
LOH	loss of heterozygosity
m	milli
M	molar
MCM7	minichromosome maintenance 7
MDM2	mouse double minute chromosome 2
mIBG	¹³¹ I-Metajodbenzylguanidin
min.	Minute
Miz-1	Myc interacting zinc finger protein
mRNA	messenger RNA
MRP1	multidrug resistance protein-1
mut	mutiert
μ	mikro
n	nano
MYCN	Onkogen MYCN, Neuroblastoma-derived
N-Myc	exprimiertes Protein des MYCN Gens
OCR	origin recognition complex
p	petite; der kurze Arm eines Chromosoms
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pH	pondus hydrogenii
PKB	protein kinase B
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q	der lange Arm eines Chromosoms
Q	quantitativ

rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
Rpm	revolutions per minute
RT	reverse Transkription
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
S	Svedberg (Maßeinheit für den Sedimentationskoeffizienten)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SYBR	Synergy Brands, Inc. (Farbstoff zum Nachweis doppelsträngiger DNA)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TrkA/B/C	tyrosin kinase receptor A/B/C (=NTRK1/2/3)
UV	Ultraviolett
vol	Volumen
Wt	Wildtyp

8.3 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Risikogruppen-Definition der Neuroblastomstudie 2004	10
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des RNAi-Screens	24
Abbildung 3: Prozessierung der siRNA	48
Abbildung 4: Depletion der Zielgene in IMR-32 Zellen.....	57
Abbildung 5: Depletion der Zielgene in SH-EP Zellen.....	58
Abbildung 6: Depletion der Zielgene im Vergleich	58
Abbildung 7: Zellfärbung mit Kristallviolett und Western Blot in MYCN-amplifizierten Zellen bei Aurora-A-Depletion.....	60
Abbildung 8: Zellfärbung mit Kristallviolett und Western Blot in nicht amplifizierten Zellen bei Aurora-A-Depletion.....	61
Abbildung 9: Western Blot einer Aurora-A-Depletion in IMR-32 und SH-EP Zellen	62
Abbildung 10: p53-Induktion mittels UV-B-Bestrahlung.....	63
Abbildung 11: Western Blot auf p53/p21 in MYCN-amplifizierten Zelllinien unter Aurora-A-Depletion	64
Abbildung 12: Western Blot auf p53/p21 in nicht amplifizierten Zelllinien unter Aurora-A-Depletion	65
Abbildung 13: Western Blot auf N-Myc in MYCN-amplifizierten Zelllinien unter Aurora-A-Depletion	66
Abbildung 14: Western Blot auf N-Myc in nicht amplifizierten Zelllinien unter Aurora-A-Depletion	66
Abbildung 15: Modell für die p53/Aurora-A Interaktion.....	69
Abbildung 16: p21 Aktivierung über Miz1	70
Abbildung 17: Regulation der N-Myc-Stabilität im Zellzyklus.....	71

8.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt:

Aumüller, Basler, Cetin, Daut, del Rey, Eilers, Feuser, Gemsa, Geus, Grundmann, Hasilik, Kern, Koolman, Lang, Lemansky, Lill, Liss, Löffler, Mandrek, Mueller, Neumüller, Rausch, Röhm, Röper, Seifert, Seitz, Suske, Steininger, Sundermeyer, Weihe, Westermann

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Al-Fakhri, Alter, Arnold, Bals, Barth, Baum, Bauer, Baumann, Berger, Bien, Boekhoff, Büch, Burchert, Christiansen, Czubayko, Dominguez, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Cabillic, Fuchs-Winkelmann, Funck, Geks, Görg, Gress, Grimm, Gudermann, Happle, Hellwig, Hertl, Herzum, Höffken, Hofman, Hörle, Hoyer, Junclas, Kann, Kill, Klenk, Klose, Köhler, Köhler, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Loff, Lohoff, Maier, Maisch, Mennel, Mittag, Mederos, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Nockher, Oeffner, Oertel, Pagenstecher, Plant, Printz, Renz, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schäfer, Schmitt, Schofer, Sesterhenn, Sommer, Stief, Strauch, Vogelmeier, Wagner, Werner, Wulf, Yu, Zemlin

8.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Eilers, der mir die Bearbeitung eines sehr interessanten Themas ermöglicht hat. Herrn Dr. med. Bernd Berwanger danke ich für die exzellente Betreuung. Durch zahlreiche Ratschläge und schnelle Hilfestellungen, sowie durch seine große Geduld hat er maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. Tobias Otto, der mir Tag für Tag bei Fragen zur Seite stand und mir das notwendige Handwerk mit Ausdauer und großer Präzision beigebracht hat.

Ich danke meinen Eltern, Jutta und Henning Schüttrumpf, für die moralische, menschliche und finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums der Humanmedizin, ohne die diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

- Danke -