

**Untersuchung der Neuroblastompathogenese
aus Neuralleistenvorläuferzellen *in vitro* und
*in vivo***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Sven Lindner

aus Leipzig

22. Oktober 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im hämatologisch-onkologischen Labor der Kinderklinik III am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Johannes H. Schulte

Gutachter: Prof. Dr. Bertram Opalka

Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Jens Boenigk

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.14

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht

Posterpreis:

LIN28B drives neuroblastoma oncogenesis through let7-MYCN signaling

S. Lindner, JJ. Molenaar, P. Mestdagh, T. Thor, A. Sprüssel, HN. Caron, R. Versteeg, A. Schramm, A. Eggert, JH. Schulte

- 11. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen 2012

Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival.

Oehme I, Linke JP, Böck BC, Milde T, Lodrini M, Hartenstein B, Wiegand I, Eckert C, Roth W, Kool M, Kaden S, Gröne HJ, Schulte JH, **Lindner S**, Hamacher-Brady A, Brady NR, Deubzer HE, Witt O.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jun 25

LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression.

Molenaar JJ, Domingo-Fernández R, Ebus ME, **Lindner S**, Koster J, Drabek K, Mestdagh P, van Sluis P, Valentijn LJ, van Nes J, Broekmans M, Haneveld F, Volckmann R, Bray I, Heukamp L, Sprüssel A, Thor T, Kieckbusch K, Klein-Hitpass L, Fischer M, Vandesompele J, Schramm A, van Noesel MM, Varesio L, Speleman F, Eggert A, Stallings RL, Caron HN, Versteeg R, Schulte JH.

Nat Genet. 2012 Oct 7. doi: 10.1038/ng.2436

Targeted Expression of Mutated ALK Induces Neuroblastoma in Transgenic Mice.

Heukamp LC, Thor T, Schramm A, De Preter K, Kumps C, De Wilde B, Odersky A, Peifer M, Lindner S, Spruessel A, Pattyn F, Mestdagh P, Menten B, Kuhfittig-Kulle S, Künkele A, König K, Meder L, Chatterjee S, Ullrich RT, Schulte S, Vandesompele J, Speleman F, Büttner R, Eggert A, Schulte JH.

Sci Transl Med. 2012 Jul 4;4(141):141ra91.

MYCN and ALK[F1174L] are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells.

Schulte JH, **Lindner S**, Bohrer A, Maurer J, De Preter K, Lefever S, Heukamp L, Schulte S, Molenaar JJ, Versteeg R, Thor T, Künkele A, Vandesompele V, Speleman F, Schorle H, Eggert A and Schramm A

Oncogene 9 April 2012; doi: 10.1038/onc.2012.106

Oncogenic activation of FOXR1 by 11q23 intrachromosomal deletion-fusions in neuroblastoma.

Santo EE, Ebus ME, Koster J, Schulte JH, Lakeman A, van Sluis P, Vermeulen J, Gisselsson D, Ora I, **Lindner S**, Buckley PG, Stallings RL, Vandesompele J, Eggert A, Caron HN, Versteeg R, Molenaar JJ.

Oncogene. 2012 Mar 22;31(12):1571-81. doi: 10.1038/onc.2011.344. Epub 2011 Aug 22.

1 Inhaltsverzeichnis

2	Abkürzungsverzeichnis	1
3	Einleitung.....	5
3.1	Das Neuroblastom	5
3.2	Symptome und Diagnostik.....	6
3.3	Früherkennung und Präventivscreening.....	7
3.4	Pathogenese des Neuroblastoms.....	7
3.5	Neuralleiste und Neuralleistenvorläuferzellen	9
3.5.1	Neuralleistenstammzellen	11
3.6	Konditional immortalisierte JoMa1 Neuralleistenvorläuferzellen	12
3.7	Therapien der NB-Risikogruppen	14
3.8	Genetik des Neuroblastoms	14
3.8.1	Chromosomale Aberrationen.....	14
3.8.2	Amplifikationen von <i>MYCN</i> und therapeutische Ansätze	15
3.8.3	Mutationen der Anaplastischen Lymphomkinase und therapeutische Ansätze	16
3.8.4	Chromosomale Aberrationen des <i>FOXR1</i> Gens	17
3.8.5	Überexpression und genomische Amplifikation von <i>LIN28b</i>	18
3.8.6	Die Rolle des prognostisch günstigen Markes TrkA (<i>NTRK1</i>).....	20
3.8.7	Expression des miRNA Clusters miR-17-92.....	21
3.9	Klinische Marker des Neuroblastoms	21
3.10	Mausmodelle, die zur Untersuchung der Neuroblastompathogenese genutzt werden	22
3.10.1	Das TH- <i>MYCN</i> Modell.....	22
3.10.2	Das TH- <i>ALK</i> ^[F1174L] Modell	22
3.11	Mausmodelle, die auf dem Cre/ <i>loxP</i> -System basieren.....	22
3.11.1	Das <i>Dbh-iCre</i> ;LSL- <i>ALK</i> ^[F1174L] Modell	23
3.11.2	Das <i>Dbh-iCre</i> ;LSL- <i>Lin28b</i> Modell.....	23
3.12	Zielsetzung der Arbeit.....	25

3.12.1	Grundgedanke.....	25
3.12.2	Weiterführende Arbeiten.....	27
4	Material und Methoden.....	28
4.1	Verwendete Geräte.....	28
4.2	Verbrauchsmaterialien.....	29
4.3	Chemikalien.....	29
4.4	Enzyme.....	31
4.5	Kits.....	32
4.6	Antikörper.....	32
4.7	Lösungen, Puffer und Medien.....	33
4.7.1	Zellkultur.....	33
4.7.2	Bakterienmedien.....	33
4.7.3	Lösung zur Isolierung, Amplifizierung und Analyse von DNA.....	34
4.7.4	Western-Blot.....	35
4.7.5	Sonstige Puffer und Lösungen.....	37
4.8	Kultur-Routine von JoMa1 Neuralleistenzellen (NLZ).....	37
4.9	Medium für Neuralleistenzellen.....	37
4.10	Hühner-Embryonen Extrakt.....	38
4.11	Transfektion von JoMa1 Zellen.....	38
4.12	Messung der Viabilität von Zellen (MTT-Test).....	39
4.13	Bestimmung der Zellproliferation mittels Thyminanalogon (BrdU-Assay).....	39
4.14	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	39
4.15	Klonierungen und Arbeiten mit Bakterien.....	40
4.15.1	Gateway-System für Klonierungen.....	40
4.15.2	Verwendeter Bakterienstamm.....	40
4.15.3	Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i>	41
4.16	Isolierung und Analyse von DNA.....	41
4.16.1	Genutzte Plasmide.....	41

4.16.2	pCR8/GW/TOPO	41
4.16.3	DNA-Isolierung aus Zellkulturzellen	42
4.16.4	Plasmid-DNA-Isolation aus <i>E. coli</i>	43
4.16.5	Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration.....	43
4.16.6	DNA- und cDNA Amplifikation zur Genotypisierung transgener Mäuse	43
4.16.7	Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA	45
4.16.8	Ligation von DNA.....	45
4.16.9	Agarose Gelelektrophorese.....	46
4.16.10	Elution von DNA aus Agarose	46
4.16.11	Array-Komparative genomische Hybridisierung	47
4.17	Isolierung und Analyse von RNA	47
4.17.1	Isolierung von RNA.....	47
4.17.2	Synthese von cDNA aus isolierter RNA	48
4.17.3	Isolierung von miRNA und Synthese der cDNA aus miRNA.....	49
4.17.4	Analyse der Transkription mittels quantitativer Real-time PCR (qRT- PCR)	49
4.17.5	Expressions-Analyse von mRNA.....	50
4.18	Gewinnung von Proteinlysaten und Proteinanalyse	51
4.18.1	Gewinnung von Proteinlysaten aus Zellkulturzellen.....	51
4.18.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten	51
4.18.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	52
4.18.4	Western-Blot.....	52
4.19	Arbeiten mit Mäusen und murinem Tumormaterial.....	53
4.19.1	<i>In vivo</i> Biolumineszenz Bildgebung	53
4.19.2	Aufarbeitung von Tumoren für Xenografts	53
4.19.3	Immunhistochemische Analysen von Tumormaterial	54
4.20	Statistische Analysen.....	55

5	Ergebnisse	56
5.1	<i>MYCN</i> transfizierte JoMa1 Zellen sind <i>in vivo</i> tumorigen und weisen Homologien zum humanen Neuroblastom auf	56
5.1.1	JoMa1-MYCN Tumoren exprimieren Marker des humanen Neuroblastoms	60
5.2	ALK[F1174L] transfizierte JoMa1 Zellen sind <i>in vivo</i> tumorigen	62
5.3	<i>FOXR1</i> transfizierte JoMa1 Zellen zeigen eine Tendenz zur Transformation	63
5.4	Validierung von <i>LIN28b</i> als Onkogen im Neuroblastom	64
5.4.1	Generierung einer konditional transgenen <i>Lin28b</i> Maus	64
5.4.2	Neuralleistenspezifische Expression von <i>Lin28b</i>	66
5.4.3	Genotypisierungs- und flox-out-PCR der LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> Mäuse	67
5.4.4	Neuralleistenspezifische <i>Lin28b</i> Überexpression führt zu Tumoren	67
5.4.5	Hohe <i>Lin28b</i> Expression führt zu geringer <i>let-7</i> miRNA Expression und hoher <i>Mycn</i> Expression	70
5.4.6	Nachweis der <i>LIN28b-let-7-Mycn</i> regulatorischen Achse <i>in vitro</i> in JoMa1 Zellen	71
5.4.7	Knockdown von <i>Lin28b</i> hat keinen Effekt auf die Expression von <i>MYCN</i> mit fehlender 3'-UTR	73
5.4.8	Weitere Charakterisierung der LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> Tumoren zeigte Ähnlichkeiten mit humanem Neuroblastom	75
5.4.9	Chromosomale Aberrationen der LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> Tumoren entsprechen teilweise humanen NB-typischen Aberrationen	76
5.4.10	<i>Lin28b</i> getriebene Tumoren sind invasiv	79
5.4.11	Behandlung von LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> Tumoren mit dem Bromodomänen-Inhibitor JQ1	80
5.4.12	Der Bromodomänen-Inhibitor JQ1 reduziert die Zellviabilität von humanen Neuroblastomzelllinien	82

5.4.13	Der Bromodomänen-Inhibitor JQ1 reduziert die Zellviabilität in Xenografts von humanen Neuroblastomzelllinien.....	85
5.5	Nutzen des LSL- <i>Lin28b</i> Mausmodells für die Untersuchung anderer Tumorentitäten.....	87
6	Diskussion.....	89
6.1	Nutzung von JoMa1 zur Validierung potentieller Onkogene des Neuroblastoms.....	89
6.2	Chromosomale Aberrationen der aus JoMa1-MYCN entstandenen Tumoren weisen Homologien zum humanen Neuroblastom auf.....	92
6.3	Homologien der murinen Neuroblastome des LSL- <i>Lin28b;Dbh-iCre</i> Mausmodells zum humanen Neuroblastom	93
6.4	Reguliert LIN28b MYCN oder reguliert MYCN LIN28b?.....	94
6.5	Wie kommt es zu Überexpression von LIN28b im Neuroblastom?	95
6.6	Vergleich des LSL- <i>Lin28b;Dbh-iCre</i> Mausmodells mit anderen Neuroblastom Mausmodellen	96
7	Zusammenfassung.....	97
8	Abstract	98
9	Ausblick.....	100
10	Veröffentlichungen.....	102
11	Eigene Poster und Kongressbeiträge.....	104
11.1	Eigene Kongressbeiträge	104
11.2	Eigene Poster	104
12	Literaturverzeichnis.....	106
13	Tabellenverzeichnis	121
14	Lebenslauf	122
15	Eidesstattliche Erklärungen	123

2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
4-OHT oder Tamoxifen	4-Hydroxytamoxifen
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AS	Aminosäure
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
ca.	circa
PGK	Phosphoglyceratkinase
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
c-Myc	cellular Myc
c-MycER ^T	Tamoxifen-induzierbares c-Myc
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
pMSCV	Plasmid vom murinen Stammzellvirus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DPBS	Dulbeccos' s phosphate buffered saline
Dbh	Dopamin-β-Hydroxylase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
engl.	englisch
Eppi	Eppendorfgefäß

ER	Östrogenrezeptor
et al.	und Kollegen
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum
ggf.	gegebenenfalls
GOI	Gene Of Interest
HCl	Salzsäure
HEE	Hühnerembryonenextrakt
HRP	Horseradish Peroxidase
IAA	Isoamylalkohol
i.e.	id est (das heißt)
i.v.	intra vena (intravenös)
i.p.	intra peritoneal
Kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
konz.	konzentriert
LB-Medium	Lysogeny broth
LDS	Lithium dodecyl sulfate
LIN28b	Humanes LIN28b Protein
Lin28b	Murines Lin28b Protein
<i>LIN28b</i>	Humanes <i>LIN28b</i> Gen
<i>Lin28b</i>	Murines <i>Lin28b</i> Gen
LM	Lichtmikroskop
M	Molar (mol/Liter)
mA	Milli Ampere
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mM	Millimol
mRNA	messenger ribonucleic acid
miRNA	micro ribonucleic acid
MYCN	Humanes MYCN Protein
<i>MYCN</i>	Humanes <i>MYCN</i> Gen
Mycn	Murines Mycn Protein

<i>Mycn</i>	Murines <i>Mycn</i> Gen
N-	Amino-
NB	Neuroblastom
ng	Nanogramm
NGF	Nerve Growth Factor
NLVZ	Neuralleistenvorläuferzelle(n)
NLZ	Neuralleistenzellen
o.g.	oben genannte/n
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentium hydrogenium
qRT-PCR	quantitative Realtime PCR
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RTK	Rezeptortyrosin Kinase
s.c.	sub cutan
s.o.	siehe oben
s.u.	sieh unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
Stk.	Stück
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
Trk	Tropomyosin related kinase (z.B. TrkA)
u	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v-Myc	virales Myc
W	Watt

z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm

Die gängigen SI-Einheiten sind in diesem Abkürzungsverzeichnis nicht aufgeführt, da sie als bekannt vorausgesetzt wurden.

3 Einleitung

3.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom (NB) ist der häufigste solide extrakranielle Tumor im Kindesalter¹. Es tritt mit einer Prävalenz von 1:7000 Lebendgeburten auf und die Inzidenz beträgt 1,4 Fälle auf 100.000 Kinder < 15 Jahren. Etwa 90 % der Tumoren werden bis zu einem Alter von < 1 Jahr diagnostiziert² und das mediane Alter der Diagnostizierung liegt bei 17,4 Monaten. Es kann eine klinische Heterogenität beobachtet werden, bei der es zur spontanen Regression kommt (Stadien 1, 2 und 4S), oder das NB einen aggressiv metastasierenden Verlauf aufweist (Stadium 4)^{1,3}. Die Einteilung der Stadien erfolgt nach dem *International Neuroblastoma Staging System* (INSS)^{4,5} (Tabelle 1). NB entwickeln sich aus Neuralleistenvorläuferzellen, die während der Embryogenese entlang des sympathischen Grenzstranges migrieren und teilweise im Nebennierenmark lokalisiert sind³. Das NB wird vor allem in den Nebennieren, entlang der Wirbelsäule, im Kopf-, Hals- und Nackenbereich sowie im Brust-, Bauch- und Beckenraum entlang des zervikalen, thorakalen und abdominalen Grenzstranges, sowie in den Paraganglien diagnostiziert. Histologisch wird das NB zu den kleinen blau-rundzelligen Tumoren gezählt. Zu diesen zählen auch das Rhabdomyosarkom, das Non-Hodgkin Lymphom und das Ewing Sarkom⁴. Außerdem zeichnen sich NB durch das Vorhandensein von Homer-Wright Rosetten aus. Im Urin lässt sich in 90% aller NB auch ein Anstieg der Katecholamine nachweisen⁶.

Tabelle 1: Übersicht über die Stadien des Neuroblastoms (*International Neuroblastoma Staging System – INSS*)

Stadium	Befund	5-Jahres-Überleben
1	lokalisierter Tumor, kein Befall der Lymphknoten vollständige Resektion	> 90%
2a	lokalisierter Tumor, kein Befall der Lymphknoten unvollständige Resektion	> 90%
2b	lokalisierter Tumor, Befall der ipsilateralen Lymphknoten vollständige oder unvollständige Resektion	> 90%
3	Tumorinfiltration über die Mittellinie oder Befall der kontralateralen Lymphknoten inoperabel	~ 75%
4	Tumor mit Metastasen an entfernten Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder anderen Organen	< 20%
4S	lokalisierter Primärtumor mit Metastasen begrenzt auf Haut, Leber und/oder Knochenmark beschränkt auf Kinder < 1 Jahr	~ 75%

3.2 Symptome und Diagnostik

70% aller NB werden im Abdomen und 15-25% entlang des zervikalen sowie thorakalen Grenzstranges diagnostiziert⁷. Patienten mit einem NB klagen bei Diagnose meist über Schmerzen (33%), Fieber (26%) und Gewichtsverlust (12%). Haben Metastasen bereits das Knochenmark infiltriert, so kommt es auch zu Knochenschmerzen⁷. Die Metastasierung des Knochenmarks kann auch zu einer Anämie oder Thrombozytopenie führen⁷. Des Weiteren kommt es auch zur Metastasierung in der Leber⁸. Bei Tumoren, die entlang des Grenzstranges entstehen und die nahe der Neuroforamina liegen, kommt es oft auch zu Querschnittssymptomen. Bedingt durch die spezielle Lage wachsen diese NB oft durch die Neuroforamina in den Spinalkanal ein. Metastasen in der Haut zeigen sich als bläulich-violette Verfärbungen. Bei etwa 20% der diagnostizierten NB handelt es sich um eine Zufallsdiagnose durch einen Tastbefund oder eine Untersuchung mittels Sonographie oder MRT. Als weitere Diagnostik wird die Sekretion von

Katecholaminen, welche in $\geq 90\%$ aller NB-Patienten im Urin nachweisbar sind, genutzt. Durch die Sekretion von Katecholaminen kommt es zu einer Hypertonie. Als sehr spezifisches bildgebendes Verfahren wird die ^{131}I -MIBG-Szintigraphie eingesetzt. Dabei wird Metaiodobenzylguanidin (MIBG) mit ^{131}I markiert. MIBG reichert sich neben der Schilddrüse, Leber und Blase, vor allem in neurosekretorischen Granula an (z.B. Nebennierenmark)². Als bildgebendes Verfahren zur Visualisierung und Differenzierung zwischen Knochenmarks- und Knochenmetastasen kann auch $^{99\text{m}}\text{Tc}$ genutzt werden⁹. Die eindeutige Diagnose kann nach der Entnahme einer Biopsie gestellt werden.

3.3 Früherkennung und Präventivscreening

Da $>90\%$ aller NB Katecholamine sezernieren und diese im Urin der Patienten nachweisbar sind, wurden mittels Teststreifen im Urin die Abbauprodukte Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure nachgewiesen. Durch diesen Test erhöhte sich die Inzidenz der diagnostizierten NB um ein vielfaches (7:100.000). Jedoch konnte durch das Screening die Letalität der erkrankten Patienten nicht verringert werden. Wahrscheinlich wären es bei den zusätzlich detektierten NB im Laufe der Entwicklung zu einer spontanen Regression gekommen. Aus diesen Gründen wurde das präventive Screening eingestellt¹⁰.

3.4 Pathogenese des Neuroblastoms

Die initiale Pathogenese des NB konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Es gibt jedoch Anzeichen dafür, dass das NB aus Neuralleistenvorläuferzellen (NLVZ) entsteht. Dafür sprechen folgende Erkenntnisse:

Erstens: Die Lokalisation der auftretenden Tumoren (z.B. Nebennierenmark) entspricht u.a. den Zielen, zu denen die Neuralleistenzellen während der Embryogenese wandern¹¹ (Abbildung 3). Zweitens: Im Nebennierenmark finden sich mit einer Häufigkeit von 1:200 sogenannte NB *in situ*¹². Diese NB *in situ* sind Sympathogonien, Ursprungszellen des sympathischen Nervensystems, die in einem undifferenziertem Stadium verblieben sind. Solche Sympathogonien wurden in Säuglingen gefunden, die an nicht tumorassoziierten Erkrankungen gestorben waren. In den meisten Fällen werden diese NB *in situ* nicht diagnostiziert, da sie

später spontan ausdifferenzieren. Es wird vermutet, dass diese Zellen Ziel von Mutationen sind, wodurch sie zu malignen Tumorzellen transformieren. Drittens: In einem transgenen Mausmodell, bei welchem das Proto-Onkogen *MYCN* unter Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors exprimiert wird, entstehen mit hoher Penetranz Tumoren, die die Charakteristika von NB erfüllen¹³ (siehe auch 3.8.5). Viertens: Es konnte gezeigt werden, dass Neuroblasten hinsichtlich ihres globalen Expressionsmusters starke Ähnlichkeiten zu Neuroblastomen aufzeigen¹⁴. Gegenwärtig wird ein Modell von Brodeur und Maris für die Pathogenese des NB favorisiert^{1,3,15}. Das Modell (Abbildung 1) geht von der Annahme aus, dass undifferenzierte Neuroblasten Mutationen erfahren, die zur Tumorentstehung führen. Diese Mutationen fördern entweder die Bildung von Zellpopulationen mit hoher TrkA-Expression und triploidem Chromosomensatz, oder mit hoher TrkB-Expression und diploidem Chromosomensatz. Der nächste Schritt der Tumorentstehung wird durch die Expression von TrkA oder TrkB bestimmt. Eine Zellpopulation mit hoher TrkA-Expression wird sich, je nachdem ob NGF vorhanden ist oder nicht, differenzieren oder die Apoptose einleiten. Diese Gruppe entspricht dem prognostisch günstigen Risikotyp I. Bei Zellen mit TrkB-Expression kommt es zur genetischen Instabilität und zu tetraploiden oder nahezu diploiden Chromosomensätzen. Hierbei treten vor allem Translokationen an 17q auf¹⁶, sowie Deletionen an 14 und 11q¹⁷. Diese Gruppe entspricht dem Risikotyp II. Zum Risikotyp III gehören solche mit Deletion an 1p, Zugewinn an 17q und zusätzlicher *MYCN*-Amplifikation. Die dritte Gruppe entspricht der aggressivsten Form des NB.

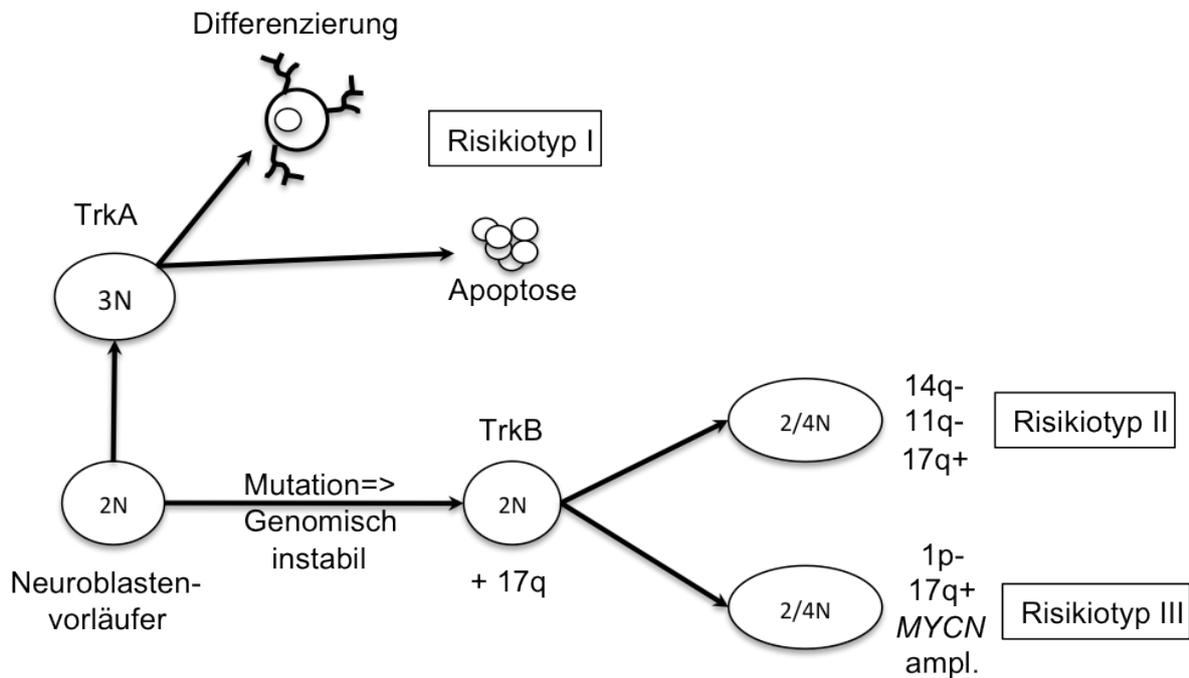


Abbildung 1: Modell der Neuroblastompathogenese.

Aus Neuroblasten mit diploidem Chromosomensatz (2N) entwickeln sich Neuroblasten mit triploidem Chromosomensatz (3N) und TrkA Expression. In Anwesenheit des TrkA Liganden NGF differenzieren die Neuroblasten. Ohne NGF kommt es zur Apoptose. Diese Gruppe entspricht dem Risikotyp 1. Teilweise können sich auch Neuroblasten mit diploidem Chromosomensatz (2N) und mit einer Deletion des 17q Arms bilden, die dann TrkB exprimieren. Diese Neuroblasten können weitere chromosomale Aberrationen akquirieren. Kommt es zu einem di- oder tetraploiden Chromosomensatz ohne MYCN Amplifikation, werden diese NBs dem Risikotyp II zugeordnet. Bei einer zusätzlich akquirierten MYCN Amplifikation sind diese NBs dem Riskiotyp III zuzuordnen (Modifiziert nach Maris et al. 1999 und Brodeur 2003)^{1,15}.

3.5 Neuralleiste und Neuralleistenvorläuferzellen

Die Neuralleiste ist eine Zellpopulation der Embryonalentwicklung der Chordaten, die aus dem Ektoderm hervorgeht. Sie wird während der Neurulation gebildet, indem sich die Neuralplatte faltet und dadurch das Neuralrohr bildet. Im apikalen Bereich des Neuralrohrs bildet sich dann durch Interaktion mit dem Ektoderm die Neuralleiste bzw. die Neuralleistenzellen (NLZ) (Abbildung 2)¹⁸. Die NLZ werden in diesem Stadium durch die Transkriptionsfaktoren Slug und Foxd3 ausgezeichnet¹⁹. Durch Signale aus dem Ektoderm wird die Migration der NLZ eingeleitet.

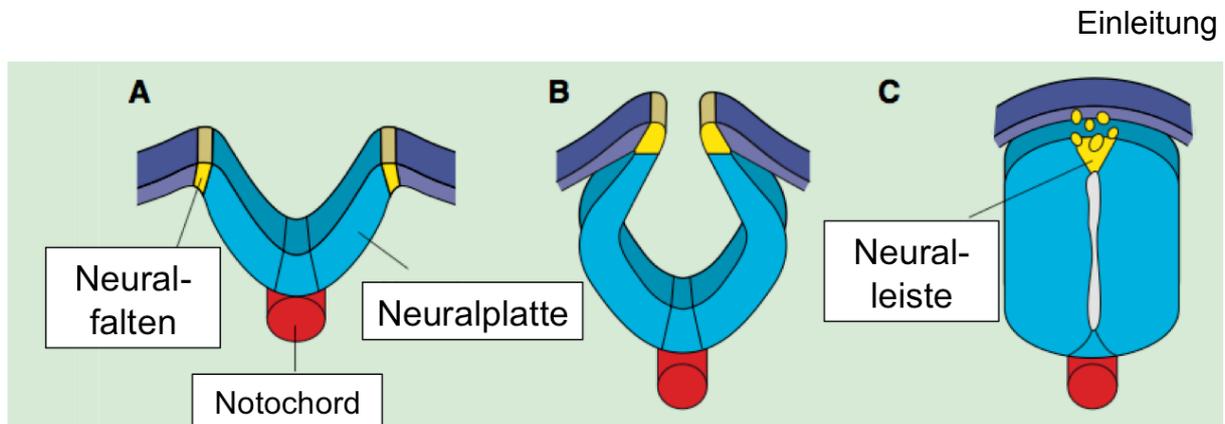


Abbildung 2: Entwicklung der Neuralleiste während der Neurulation.

Während der Neurulation faltet sich die Neuralplatte (A) und formt dadurch das Neuralrohr (B). Im apikalen Bereich bilden sich dann durch Interaktion mit dem Ektoderm die Neuralleistenzellen (C) und beginnen zu migrieren (Modifiziert nach Graham 2003)¹⁸.

Die NLZ wandern dabei durch den gesamten Embryo und generieren am Ende viele verschiedene Zelltypen: Neuronen, Gliazellen des sensorischen, sympathischen und parasymphatischen Nervensystems, die Pigmentzellen der Epidermis, die Melanozyten und Teile der Knorpel-, Knochen- und Bindegewebsstrukturen des Gesichts entsprechen den durch NLZ gebildeten Zelltypen (Abbildung 3)¹⁸.

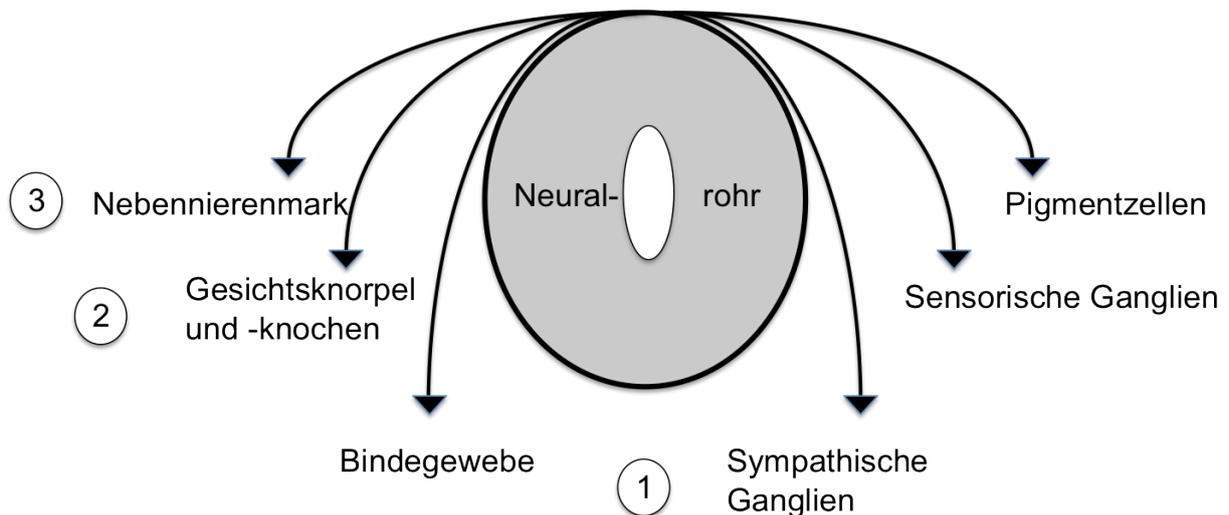


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Migration von Neuralleistenzellen (NLZ).

NLZ wandern ventral, verlassen das Neuralrohr und differenzieren sich dabei in die oben beschriebenen Zell- und Gewebstypen. Zellen, die auf dem Weg (1) wandern, bilden das Bindegewebe und die sympathischen Ganglien. Auf dem Weg (2) wandernde Zellen bilden Knorpel und Knochen des Gesichts und sensorische Ganglien. Pigmentzellen und Nebennierenmark werden durch Zellen gebildet, die auf dem Weg (3) wandern (Modifiziert nach Bronner-Fraser 1993)¹¹.

3.5.1 Neuralleistenstammzellen

Stammzellen sind pluripotente Vorläuferzellen mit Selbsterneuerungskapazität²⁰. Auch in der Neuralleiste finden sich multipotente Vorläuferzellen. Der Nachweis konnte sowohl *in vivo*²¹, als auch *in vitro* geführt werden, indem gezeigt wurde, dass unterschiedlich differenzierte Zellen von einer Vorläuferzelle abstammten. Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass diese Vorläuferzellen Selbsterneuerungskapazität besaßen^{20,22} und diese auch nach Wanderung teilweise nicht verloren^{23,24}. Diese Vorläuferzellen werden als Neuralleistenstammzellen (NLSZ) bezeichnet. NLSZ werden, wenn sie aus dem Neuralrohr auswandern, durch die Expression des niedrigaffinen Neurotrophin-Rezeptors p75 (engl. *low affinity nerve growth factor receptor*) und des Transkriptionsfaktors Sox10 (engl. *sex determining region Y-box 10*) von anderen Zellen unterschieden^{25,26}. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass diese Zellen sich in Muskelzellen, Neuronen und Gliazellen, sowie Melanozyten, Knorpel und Knochen differenzieren^{25,27,28}. *In vitro* konnte dieses Differenzierungspotential ebenfalls nachgewiesen werden, indem die Zellen durch Behandlung mit definierten Stimuli zur zelltypspezifischen Differenzierung angeregt wurden. In Zellkulturen konnte durch Zugabe von TGF- β (engl. *transforming growth factor beta*) gezeigt werden, dass NLSZ in Muskelzellen differenzieren und durch BMP-2 (engl. *bone morphogenetic protein 2*) Neurogenese induziert wurde²⁹. Shah und Kollegen konnten auch zeigen, dass GGF (engl. *glial growth factor*) NLSZ zum Differenzieren in Gliazellen anregen kann. Zur Differenzierung von NLSZ in Melanocyten ist FGF (engl. *fibroblast growth factor*) ausreichend^{30,31} und die Differenzierung in Melanocyten ist durch Endothelin 3 möglich³². Chondrogene Differenzierung, i.e. die Bildung von frühen Vorläuferzellen des Skeletts, konnte für NLSZ zumindest *in vitro* durch Zugabe von FGF2 (engl. *fibroblast growth factor 2*) nachgewiesen werden³³. Die oben genannten Studien zeigen, dass in der Neuralleiste multipotente Vorläuferzellen existieren, die durch extrinsische Faktoren in bestimmte Derivate differenzieren.

Untersuchung von NLSZ können nur in der kurzen Zeit (2-3 Tage) durchgeführt werden, in der sie als Stammzellen charakterisiert werden können (s.o.). Nachdem die NLSZ aus dem Neuralrohr ausgewandert sind und ihre Ziele erreicht haben, beginnen sie sich zu differenzieren. Nach der endgültigen Differenzierung geht die Multipotenz und Selbsterneuerungskapazität verloren³⁴. Für die molekulare Analyse von NLSZ kommt zu diesem zeitlich engen Fenster hinzu, dass die NLSZ nur einen

geringen Teil aller NLZ ausmachen. Sollen NLSZ *in vitro* untersucht werden, müssen diese Engpässe bewältigt werden.

3.6 Konditional immortalisierte JoMa1 Neuralleistenvorläuferzellen

Die Langzeitkultivierung von NLSZ ist nicht möglich ohne, dass NLSZ die Proliferation einstellen oder beginnen zu differenzieren^{35,36}. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine etablierte Neuralleisten-Vorläuferzelllinie (NLVZ) genutzt³⁷. Als wahre Stammzellen können nur Spermien, Eizellen oder die Morula angesehen werden, da nur diese Totipotent sind und uneingeschränkte Selbsterneuerungskapazität besitzen. Die von Maurer et al. beschriebene Zelllinie muss hingegen als multipotente NLVZ mit eingeschränkter Selbsterneuerungskapazität angesehen werden. Im Folgenden werden die Eigenschaften der genutzten Zelllinie näher erläutert.

Um NLVZ zu studieren, muss deren Selbsterneuerungskapazität gegeben sein, das heißt, sie müssen sich über mehrere Passagen stabil kultivieren lassen. Diese NLVZ müssen auch nach mehreren Passagen noch Differenzierungspotential besitzen und die NLVZ-typischen molekularen Marker p75 und Sox10 exprimieren. Die von Maurer und Kollegen 2007 etablierte murine NLVZ-Linie JoMa1 vereint diese Eigenschaften³⁷. JoMa1 wird durch ein c-MycER^T-Fusionskonstrukt³⁸ immortalisiert und erhält dadurch dauerhafte Selbsterneuerungskapazität. Das Konstrukt kodiert für das c-MycER^T-Protein, welches aus zwei Teilen besteht (Abbildung 4). Der Erste besteht aus der Hormon-Binde-Domäne (Aminosäuren 281-599) des murinen Östrogenrezeptors mit einem Aminosäureaustausch an Position 525. Durch diese Punktmutation kommt es zu einem Austausch von Glycin zu Arginin. Der zweite Teil des Fusionsproteins wird durch den humanen Transkriptionsfaktor c-Myc (Aminosäuren 1-435) ausgemacht, der an das C-terminale Ende des Östrogenrezeptors fusioniert ist. Durch die Fusion werden die letzten vier C-terminalen Aminosäuren von c-Myc, die an das bHLHZ-Motiv (engl. *basic helix-loop-helix leucin zipper*) angrenzen, ersetzt. Durch die Mutation kann die Hormon-Binde-Domäne des Östrogenrezeptors nicht mehr mit endogenem Östrogen interagieren. Stattdessen reagiert der Rezeptor mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT), das endogen nicht vorkommt. 4-OHT ist vor allem durch die Therapie von Hormonrezeptor-positiven Brustkrebstypen bekannt³⁹. 4-OHT bindet an den Östrogenrezeptor und blockiert folglich die Bindestelle für Östrogen. Dadurch werden proliferative Signale

durch Östrogen nicht an die Zellen weitergeleitet³⁹. Bindet 4-OHT an das c-MycER^T-Fusionsprotein, wird es aktiviert und ist im Zellkern lokalisiert. In diesem Zustand leitet es die Transkription proliferationsstreibender Gene ein. Ohne 4-OHT wird es inaktiviert und ist nicht mehr im Zellkern lokalisiert³⁷. Das c-MycER^T-Fusionsgen steht unter der Kontrolle des ROSA26-Promotors, der während der gesamten Embryogenese und auch in adulten Säugern ubiquitär aktiv ist⁴⁰, demnach auch in der Neuralleiste und den Neuralleistenvorläuferzellen.

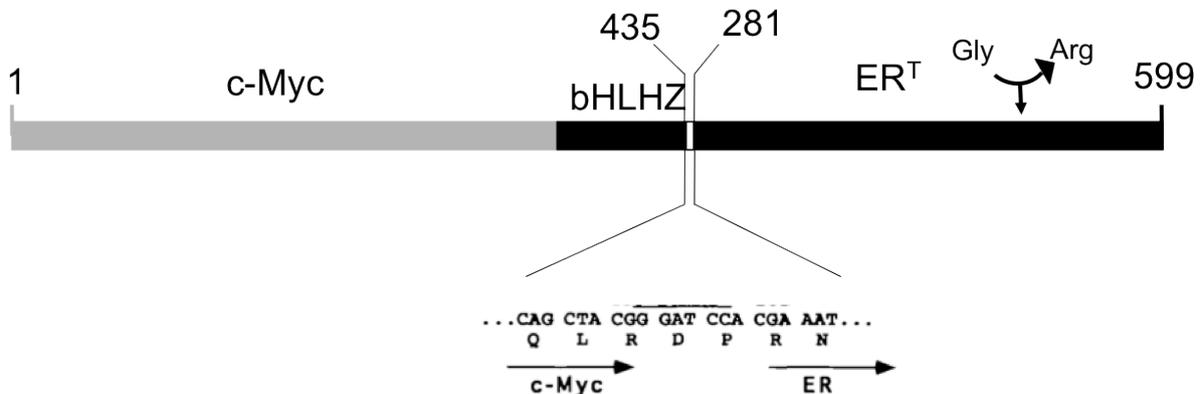


Abbildung 4: Aufbau des c-MycER^T-Fusionsgens.

Das Konstrukt besteht aus dem human Transkriptionsfaktor c-Myc und der Östrogenbindedomäne (ER^T) des murinen Östrogenrezeptors, der durch die Mutation an Aminosäure 281 und 525 kein Östrogen mehr binden kann (Modifiziert nach Littlewood 1995)³⁸.

Zur Etablierung von stabilen NLVZ-Kulturen wurden Embryos der Mauslinie ROSA Δ neo, die das homozygote c-MycER^T-Konstrukt trugen, entnommen und aus deren Neuralleisten eine Neuralleistenkultur angelegt. Die Kultivierung erfolgte in speziellem Neuralleistenvorläuferzell-Medium (siehe 4.9) in Gegenwart von 4-OHT, wodurch das c-MycER^T-Fusionsprotein aktiviert wurde³⁷. Durch die kontinuierliche c-Myc Aktivierung wurden die Zellen in einem de-differenzierten Stadium gehalten. Somit konnte eine als JoMa1 bezeichnete NLVZ-Linie etabliert werden, die in Gegenwart von 4-OHT durch ständige Aktivierung des Proto-Onkogens c-Myc immortalisiert werden kann. Bei 4-OHT-Entzug stoppt die Proliferation von JoMa1 Zellen, die dann in verschiedene Derivate differenzieren können³⁷. Schließlich weist JoMa1 auch die typischen NLVZ-Marker Sox10 und p75 auf³⁷. In dieser Arbeit wurde die JoMa1 Zelllinie genutzt, um die initialen Ereignisse der NB Pathogenese zu studieren.

3.7 Therapien der NB-Risikogruppen

Die Gesellschaft für pädiatrische Hämatologie und Onkologie hat in einer Studie von 2004 die Risikogruppen und deren Therapien festgelegt (GPOH; NB2004). Die Einordnung in die Risikogruppen beruht auf dem INSS Staging System (Tabelle 1). Gruppe eins umfasst alle Patienten ohne *MYCN* Amplifikation und ohne 1p Deletion. Patienten dieser Gruppe werden nur beobachtet und im Falle eines Rezidivs wird eine milde Chemotherapie verabreicht. Die Gruppe von NB Patienten mit intermediärem Risiko umfasst alle diejenigen Patienten die eine Aberration am Chromosomen 1p ohne *MYCN* Amplifikation haben. Patienten dieser Gruppe bekommen nach Tumorresektion eine intensive Chemotherapie, gefolgt von Bestrahlung. Im Anschluss folgt eine Retinsäurebehandlung zur Induktion der Differenzierung in verbleibenden Tumorzellen. Die Hoch-Risiko-Gruppe umfasst alle NB Patienten mit einer *MYCN* Amplifikation (Tabelle 1). In dieser Gruppe werden Patienten nach einem Standardprotokoll behandelt. Dieses Standardprotokoll beinhaltet intensive Chemotherapie, autologe Stammzelltransplantation und eine Retinsäurebehandlung. Bei Patienten mit einem Rezidiv, wird das Standardprotokoll in abgewandelter Form angewendet. Bei dieser Abwandlung werden im Wesentlichen verschiedene Zytostatika, als experimenteller Ansatz genutzt.

3.8 Genetik des Neuroblastoms

3.8.1 Chromosomale Aberrationen

Die häufigsten chromosomalen Aberrationen beim NB sind Deletionen in den Banden der Chromosomen 1p36, 11q23 und Zugewinne im Bereich 17q^{16,41,42}, die auch für die klinische Diagnostik relevant sind. Daher wird vermutet, dass in diesen Bereichen Tumorsuppressorgene liegen, die bis jetzt noch nicht eindeutig identifiziert wurden⁴³. Des Weiteren lassen sich NB anhand spezifischer chromosomaler Aberrationen in Gruppen einteilen, die mit der klinischen Prognose korrelieren. Die erste Gruppe umfasst NB mit Zugewinnen oder Deletionen ganzer Chromosomen, welche eine gute klinische Prognose haben¹⁷. *MYCN* Amplifikation und Deletion von Chromosom 1p und Zugewinn von 17q machen die zweite Gruppe aus. Diese Gruppe korreliert mit hohem Risiko. Die dritte Gruppe umfasst NB mit schlechter klinischer Prognose¹⁷. In dieser Gruppe sind häufig Deletionen der Chromosomen

3p, 4p und 11q, sowie Zugewinne der Chromosomen 1q, 2p, 12q und 17q zu beobachten. Außerdem zeichnet sich die Gruppe durch das Fehlen einer *MYCN* Amplifikation aus. Die vierte Gruppe umfasst Tumoren ohne nennenswerte Aberrationen, die jedoch eine klinisch schlechte Prognose haben¹⁷.

3.8.2 Amplifikationen von *MYCN* und therapeutische Ansätze

Der Transkriptionsfaktor *MYCN* wird normalerweise in der frühen Neurogenese exprimiert und reguliert zusammen mit *MXD1* (*Max dimerization protein 1*) und *MAX* (*Myc associated factor x*) die Gene der Apoptose, des Zellzyklus und der Differenzierung⁴⁴. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *MYCN* für die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen genutzt werden kann⁴⁵. Schon 1983 konnten Schwab et al. eine Amplifikation des *MYCN* (*v-myc myelocytomatosis viral related oncogene*) Genlokus feststellen, die sowohl in Primärtumoren, als auch in NB Zelllinien auftritt⁴⁶. Kurze Zeit später konnte gezeigt werden, dass diese Amplifikation häufig in aggressiven NBs vorkommt und die *MYCN* Amplifikation auch mit einer schlechten Prognose für den Patienten korreliert^{47,48}. Seit 1997 gibt es ein Mausmodell für das NB. In diesem Mausmodell wird *MYCN* in der Neuralleiste und deren Derivaten überexprimiert¹³. Mit diesem Modell konnte zum ersten Mal bewiesen werden, dass *MYCN* (murine) NB hervorrufen kann und dass diese NB wahrscheinlich aus Neuralleistenvorläuferzellen entstanden sind.

Da *MYCN* eine so entscheidende Rolle im NB spielt, wird schon lange versucht Moleküle zur Inhibierung von *MYCN* zu entwickeln. *MYCN* hat jedoch keine Liganden Bindestelle oder eine ATP Bindestelle was es schwieriger macht, *MYCN* zu inhibieren als z.B. Kinasen wie B-Raf⁴⁹. Aus diesen Gründen wird im NB versucht, die *MYCN* Überexpression oder *MYCN* Amplifikation indirekt zu kompensieren. Diese Strategien werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Durch *MYCN* Überexpression kommt es z. B. zu einem Anstieg von Mouse double minute 2 homolog (MDM2). Dies hat zur Folge, dass p53 abgebaut wird und in Tumorzellen nicht die Apoptose eingeleitet wird⁵⁰. Das Molekül Nutlin-3 verhindert den durch MDM2 eingeleiteten Abbau von p53 und hilft dadurch die Zellviabilität von NB Zellen deutlich zu senken⁵¹. Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) reguliert die Angiogenese und die *MYCN* Expression. Durch Inhibition von PI3K mittels NVP-BEZ235 konnte die Angiogenese von Tumoren im TH-*MYCN* Mausmodell verringert

werden (3.10.1)⁵². Dies funktionierte jedoch nur in MYCN hoch exprimierenden Tumoren, nicht in Tumoren mit MYCN Amplifikation⁵². MYCN kann an Aurora A Kinase binden und Aurora A Kinase ist häufig im NB überexprimiert. Die Inhibierung von Aurora A Kinase mittels MLN8237 oder CCT137690 zeigte eine deutliche Verminderung der Viabilität von Tumorzellen^{53,54}.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von Bromodomänen und extraterminalen Domänen Inhibitoren (BET Inhibitoren) sowohl die Transkription von MYCN selbst, als auch Transkription von MYCN Zielgenen signifikant verringert werden kann⁵⁵. BET Inhibitoren blockieren die Interaktion von Bromodomänen-Proteinen wie z.B. BRD4 mit Chromatin. Dabei blockieren BET Inhibitoren die Bindetasche, mit der Bromodomänen-Proteine an die Lysin-Reste des Chromatins binden⁵⁵. Durch die Blockierung können die Lysin-Reste nicht mehr acetyliert werden und die Transkription in den betroffenen Bereichen wird verringert⁵⁶. Der bekannteste und in dieser Arbeit genutzte BET Inhibitor ist JQ1⁵⁷.

3.8.3 Mutationen der Anaplastischen Lymphomkinase und therapeutische Ansätze

Das Gen Anaplastische Lymphomkinase (ALK) wurde zum ersten Mal als Fusionsgen Nucleophosmin-ALK (NPM-ALK) im anaplastischen-großzelligen Lymphom beschrieben⁵⁸. Normalerweise wird ALK im Hirn von Embryos, in Ganglien, Neuronen und im geringen Umfang auch im adulten Hirn exprimiert⁵⁹. Es handelt sich bei ALK um eine Rezeptortyrosin Kinase, deren Ligand nicht bekannt ist⁵⁹.

2008 konnten vier Arbeitsgruppen unabhängig voneinander nachweisen, dass es in 12% aller NB Mutationen des ALK Gens gibt⁶⁰⁻⁶³. Die häufigste und mit dem schlechtesten Überleben korrelierende Mutation ist die Mutation [F1174L] (49% aller ALK Mutationen)⁶⁴. Durch diese Mutation kommt es zu einem Aminosäure Austausch (Phenylalanin>Leucin), der eine dauerhafte Phosphorylierung von ALK und somit die dauerhafte Aktivierung der Zielproteine von ALK bewirkt^{65,66}. Die F1174L Mutation wird als embryonal letal vermutet, da sie beim hereditärem NB nicht vorkommt. Außerdem kann eine Korrelation der ALK[F1174L] Mutation und MYCN Amplifikation beobachtet werden⁶⁴. Die zweithäufigste ALK-Mutation ist die Mutation R1275Q (34,7% aller ALK Mutationen)⁶⁴. Diese Mutation tritt sowohl beim sporadischen, als

auch beim hereditären NB auf⁶³. Bei dieser Mutation kommt es zu einem Aminosäure-Austausch von Arginin zu Glutamin, die ebenfalls zur dauerhaften Phosphorylierung führt. De Brouwer et al. zeigte mittels BaF3 Transformationsassays, dass ALK[F1174L] die stärkste Transformierungskapazität besitzt und ALKR127Q, die zweit häufigste ALK Mutation, eine mittel-starke Transformierungskapazität⁶⁴. Überexpression von nicht mutiertem ALK schien die BaF3 Zellen hingegen nicht zu transformieren. Schulte et al. zeigten wiederum, dass auch hohe Expression der nicht mutierten ALK Form mit schlechtem Überleben korreliert⁶⁷. Zugewinne des Chromosoms 2p beinhalten außerdem zu ca. 90% das *ALK* Gen, was mit höherer ALK Expression und schlechter Prognose für den Patienten korreliert⁶⁴. Die stromabwärts liegenden Zielproteine von ALK sind z. B., AKT und ERK^{65,66}. Kommt es zu einer aktivierenden Mutation von ALK, so sind diese stromabwärts liegenden Signalwege konstant aktiv^{65,66}.

Da einige Lungenkarzinomtypen durch ALK-Fusionsgene getrieben werden und es im Vergleich zum NB viel mehr Lungenkarzinompatienten gibt, können Neuroblastompatienten von den entwickelten ALK-Inhibitoren profitieren⁶⁸. Ein Beispiel ist Crizotinib, das bereits in einer klinischen Phase I Studie genutzt wird. Crizotinib blockiert die ATP-Bindetasche von ALK und verhindert somit die Aktivierung der stromabwärts liegenden Zielproteine⁶⁹. Problematisch ist, dass ca. 25% der Patienten eine Resistenz im ALK Gen gegen Crizotinib entwickeln⁷⁰. Bei der Resistenz handelt es sich um die Mutation [F1174L], die in ca. 12% aller NBs auftritt^{63,65}. Der Inhibitor NVP-TAE-684 wirkt jedoch auch in NB Zelllinien mit [F1174L] Mutation^{65,71}. Ein neuer Inhibitor LDK378 wird im Moment ebenfalls in einer klinischen Phase I Studie für das Lungenkarzinom getestet (www.clinicaltrials.org). LDK378 hat eine höhere Affinität an die ALK ATP Bindetasche und wirkt sowohl bei der [F1174L] Mutante, als auch beim nicht mutiertem ALK⁷².

3.8.4 Chromosomale Aberrationen des *FOXR1* Gens

Das *FOXR1*-Gen, auch als *FOXN5* bezeichnet, befindet sich auf dem Chromosomen 11q in Bande 23, die in ca. 50% aller NBs deletiert ist^{15,73,74}. Es konnte gezeigt werden, dass *FOXR1* in NB oft stark überexprimiert ist, wenn es am Bruchpunkt von 11q liegt⁷⁵. FOX-Gene (engl. *forkhead-box*) sind Transkriptionsfaktoren, die ein WH-Motiv besitzen (engl. *winged helix*). Diese Motive setzen sich zu einer FOX-Domäne

zusammen, welche die Bindung an DNA ermöglicht. FOX-Transkriptionsfaktoren regulieren Gene der Embryogenese. Außerdem können sie durch Genamplifikation, retrovirale Integration und chromosomale Translokation auch an der Entstehung von Tumoren und Leukämien beteiligt sein^{73,76-78}. Durch die Lage des *FOXR1* Gens am 11q Bruchpunkt kann es außerdem zur Fusion mit anderen Genen kommen. Molenaar et al. zeigten z.B. die Fusion mit dem *MLL* Gen (auch als *Histone-lysine N-methyltransferase*, *HRX*, bezeichnet), zu dem Fusionsgen *MLL-FOXR1*. *MLL* Fusionsgene treten häufig bei Leukämien auf⁷⁹. Weiterhin konnte eine Osteosarkomzelllinie identifiziert werden, bei der *FOXR1* stark überexprimiert ist⁷⁵. Die eindeutige Funktion von *FOXR1* ist bisher nicht geklärt und *FOXR1* wurde bisher nur *in silico* von Katoh und Katoh charakterisiert⁷³. Die oben genannten Erkenntnisse zeigen, dass *FOX*-Gene durch Translokation und Fusionierung malignes Potential erhalten können.

3.8.5 Überexpression und genomische Amplifikation von *LIN28b*

LIN28a und *LIN28b* (engl. *cell lineage abnormal 28*) sind homologe RNA bindende Proteine deren Funktion 1997 in *C. elegans* beschrieben wurden⁸⁰ und 1983 entdeckt wurden⁸¹. Beide Proteine werden vor allem in embryonalen Stammzellen exprimiert und werden zur Gewinnung von induzierten pluripotenten Stammzellen genutzt⁸². Eine Rolle von *LIN28* oder *LIN28b* wird für diverse Tumorentitäten diskutiert, z.B. für das Ovarialkarzinom⁸³ und das Kolonkarzinom⁸⁴. Viswanathan et al. zeigten 2009, dass *LIN28b* in ungefähr 15% aller Tumoren eine Rolle spielt⁸⁵. Die grundlegenden Funktionen der homologen *LIN28a* und *LIN28b* Formen sind sehr ähnlich und treffen auch auf die murinen Formen der Proteine zu⁸⁶. Daher wird im Folgenden stellvertretend nur von *LIN28b* gesprochen. *LIN28b* besitzt eine *cold-shock* Domäne (CSD), die eine daumenförmige Struktur bildet (Abbildung 5 A und B). Außerdem besitzt *LIN28b* ein Cys-Cys-His-Cys Zinkfinger Motiv, das doppelt vorliegt (CCHCx2). Mit der CSD kann *LIN28b* mit der Haarnadelstruktur von miRNAs interagieren (Abbildung 5 A und B)⁸⁶. Mit dem CCHCx2 Motiv interagiert *LIN28b* mit einer GGAG Sequenz der miRNA. *LIN28b* bindet vor allem Vorläufer-Formen von *let-7* miRNAs (engl. *lethal seven*)⁸⁷. Durch Bindung an *pri-let-7* miRNAs wird die Prozessierung durch Drosha^{87,88}, und durch Bindung an *pre-let-7* miRNAs wird die Prozessierung durch Dicer verhindert⁸⁹.

Let-7 miRNAs regulieren die Expression einer Reihe von Genen, u.a. von *c-Myc* und *MYCN*⁹⁰. Hohe *let-7* miRNA Expression führt dabei zur Reprimierung der Zielgene. Dadurch ergibt sich folgender Zusammenhang zwischen LIN28b, *let-7* miRNAs und *MYCN*: Kommt es zur hohen LIN28b Expression, führt dies zur Reprimierung von *let-7* miRNAs. Geringe Expression von *let-7* miRNAs führt im Umkehrschluss zur De-Reprimierung von *let-7* miRNA Zielgenen (z.B. *MYCN*) (siehe Schema in Abbildung 5 D und Abbildung 23)⁹¹.

2012 konnte die AG Schulte in Kooperation mit der Gruppe um Jan Molenaar in Amsterdam zeigen, dass LIN28b in humanen NB überexprimiert ist und in 2% aller untersuchten NB eine genomische Amplifikation des *LIN28b* Gens vorliegt. Des Weiteren konnten durch diverse *in vitro* Versuche gezeigt werden, dass LIN28b essentiell für das onkogene Potential von NB Zelllinien ist^{91,92}. So konnten Molenaar et al. zeigen, dass sowohl der Knockdown von LIN28b zu geringerer Zellviabilität und geringerer MYCN Expression führte. Damit konnte gezeigt werden, dass LIN28b im NB *let-7* miRNAs reguliert und dadurch indirekt auch die *MYCN* Expression beeinflusst. Diese Verknüpfung von LIN28b, *let-7* miRNAs und *MYCN* wird auch als LIN28b-*let-7*-*MYCN* regulatorische Achse bezeichnet.

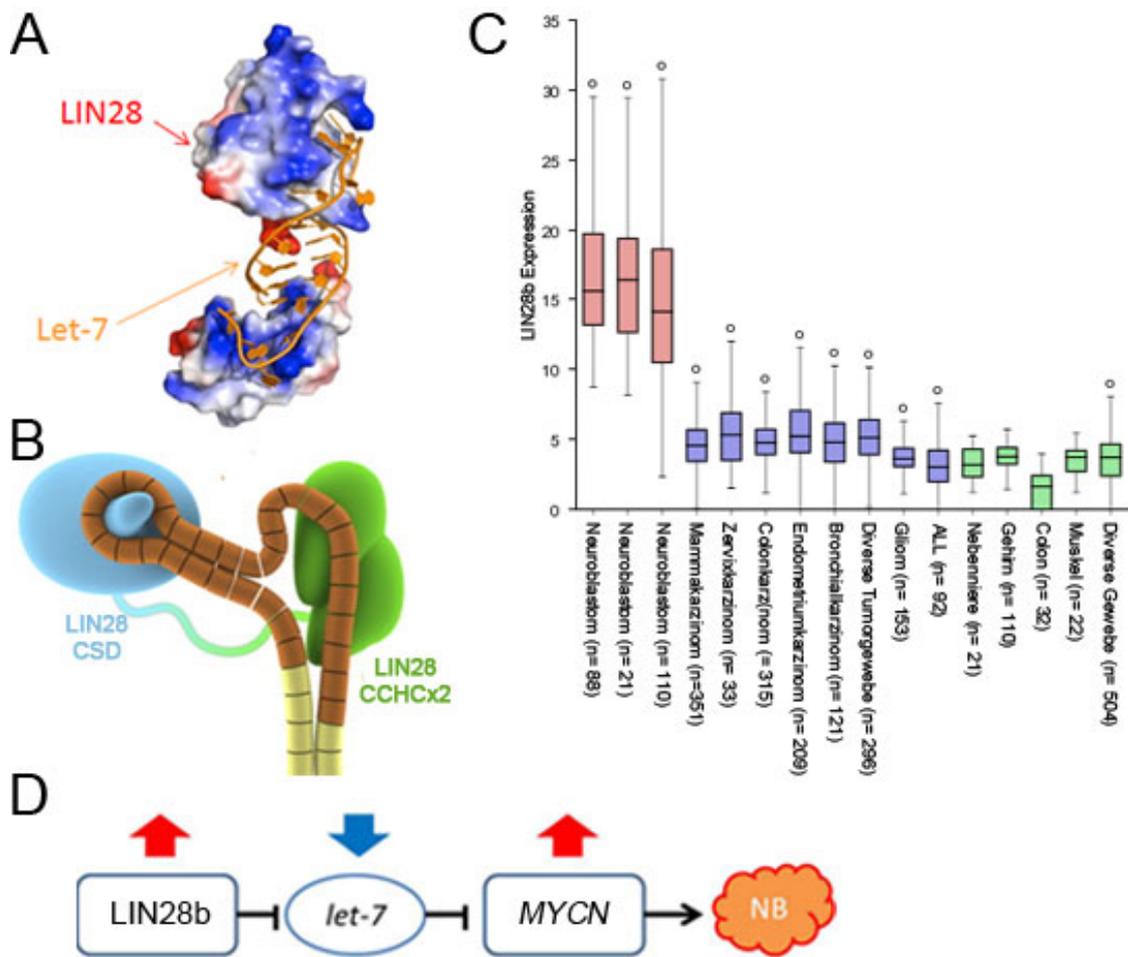


Abbildung 5: LIN28 Protein-Struktur und Expression in verschiedenen Geweben.

(A) Proteinstruktur von LIN28 in rot-blau-weiss (rot = hohes elektrostatisches Potential; blau = schwaches elektrostatisches Potential), mit einer gebundenen *let-7* miRNA (orange) (Modifiziert nach Nam et al.⁸⁶). (B) Vereinfachtes Modell von LIN28 mit einer gebundenen *let-7* miRNA. LIN28 bindet mit der daumenartigen *cold-shock* Domäne (LIN28b CSD) in der Haarnadelstruktur der miRNA (Modifiziert nach Nam et al.⁸⁶). Des Weiteren kann LIN28 mit Hilfe der doppelten Cys-Cys-His-Cys (CCHC) Zinkfinger Motive mit dem GGAG Motiv der miRNA interagieren (LIN28 CCHC2). (C) Übersicht über die LIN28b Expression in verschiedenen Tumorentitäten und Normalgeweben. In drei verschiedenen Kohorten von NB Tumoren (rot), zeigt sich eine ungefähr 10-fach höhere LIN28b Expression verglichen mit diversen anderen Tumoren (blau) und Normalgeweben (grün) (Erstellt mit R2 microarray analysis; <http://r2.amc.nl>). (D) Schema der regulatorischen Achse von LIN28b *let-7* miRNAs und *MYCN*. Hohe LIN28b Expression führt zur Reprimierung von *let-7* miRNAs und dadurch zur De-Reprimierung von *MYCN*. Hohe *MYCN* Expression kann dann zur Entstehung eines NB führen (siehe 5.4).

3.8.6 Die Rolle des prognostisch günstigen Markes TrkA (*NTRK1*)

Prognostisch günstige NB exprimieren hohe Level an TrkA (*NTRK1*), jedoch nicht den Liganden NGF (*nerve growth factor*). Durch NGF können TrkA exprimierende Neuroblasten zur Differenzierung angeregt werden. Ohne Anwesenheit von NGF leiten die Zellen die Apoptose ein. Seltener ist die Expression einer trunkierten Form

des TrkA-Neurotrophinrezeptors. Die trunkierte Form ist dauerhaft autophosphoryliert und vermittelt über den PI3K-Signalweg (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) das Überleben und erhöhte Angiogenese^{1,3}. Die eigentliche Funktion von Trk-Rezeptoren und Neurotrophinen besteht in der Regulation der Entwicklung und Differenzierung von Neuronen. Dabei werden die Neurotrophinrezeptoren an der Oberfläche von sich entwickelnden Axonen exprimiert. TrkA spielt vor allem eine Rolle bei der Entwicklung sympathischer Ganglien, beeinflusst jedoch auch die Bildung synaptischer Strukturen und Verbindungen⁹³.

3.8.7 Expression des miRNA Clusters miR-17-92

Die 7 miRNAs des *miR-17-92* Clusters sind in vielen Tumortypen überexprimiert⁹⁴. Dabei korreliert Überexpression oft mit höherer Aggressivität und schlechterer klinischer Prognose. 2010 konnte gezeigt werden, dass das *miR-17-92* Cluster im NB den TGF- β Signalweg reguliert⁹⁵. Dabei korrelierte auch hier hohe Expression des *miR-17-92* Clusters mit schlechter klinischer Prognose für den NB-Patienten⁹⁵. Interessanterweise wird die Expression des *miR-17-92* Cluster direkt von MYCN reguliert.

3.9 Klinische Marker des Neuroblastoms

Wie bei allen anderen Tumoren gibt es Markerproteine im Blut des Patienten oder im Tumor selbst, die die Identifizierung des Tumortyps ermöglichen. Im Folgenden sollen die Markerproteine des NB beschrieben werden. Die Präsenz des Oberflächenmarkers CD56 (NCAM; engl. *neural cell adhesion molecule*) wird z.B. genutzt, um das Knochenmark hinsichtlich Metastasen eines NB Patienten zu untersuchen⁹⁶. CD56 wird sowohl in primären NB, als auch in NB Zelllinien exprimiert⁹⁷. Ein weiterer Marker ist die Expression von NSE (Neuronenspezifischer Enolase). NSE wird sowohl im ZNS, als auch im peripheren Nervensystem und neuroendokrinen Geweben exprimiert. 1998 konnte gezeigt werden, dass hohe Serum-NSE Konzentrationen mit den Stadien des NBs korrelieren⁹⁸. Außerdem können zur Identifizierung von neuroendokrinen Tumoren die Marker DBH (Dopamin- β -Hydroxylase), TH (Tyrosinhydroxylase) und Phox2b (*Paired-like homeobox 2b*) genutzt werden^{99,100}. Beim NB werden diverse Marker in der Klinik zur Diagnostik eingesetzt. In dieser Arbeit wurden diese Marker zur Charakterisierung

der murinen NB. Es wurden die Tumoren die aus JoMa1-MYCN entstanden sind (5.1), so wie die Tumoren des *Dbh-iCre;LSL-Lin28b* Mausmodells hinsichtlich ihrer Marker analysiert.

3.10 Mausmodelle, die zur Untersuchung der Neuroblastompathogenese genutzt werden

3.10.1 Das TH-MYCN Modell

Das erste und lange Zeit auch einzige Mausmodell des NBs, TH-MYCN, wurde 1997 von Weiss et al. generiert¹³. Da MYCN Amplifikation und MYCN Überexpression der wichtigste prognostische Faktor im NB ist, der mit geringen Überlebensraten der Patienten korreliert, wurde im TH-MYCN Mausmodell MYCN überexprimiert¹³. Dadurch, dass sich humanes MYCN in diesem Modell stromabwärts des TyrosinhydroxylasePromotors der Ratte befindet, wird die MYCN Expression auf die Neuralleiste und die Derivate der Neuralleiste beschränkt¹⁰¹. Mit dem TH-MYCN Mausmodell konnte zum ersten Mal bewiesen werden, dass Überexpression von MYCN (murine) NBs hervorruft.

3.10.2 Das TH-ALK^[F1174L] Modell

Nachdem 2008 gezeigt werden konnte, dass in 12 % aller NBs das ALK Gen mutiert ist, wurde von Berry et al. ein weiteres NB Mausmodell publiziert⁶⁶. In diesem Modell wurde wie beim TH-MYCN Mausmodell der Tyrosin-Hydroxylase Promotor genutzt und stromabwärts wurde die mutierte ALK[F1174L] Variante kloniert. Interessanterweise entwickelten TH-ALK^[F1174L] Mäuse kein NB. Wurden die Mäuse jedoch mit Mäusen des TH-MYCN Modells verkreuzt, so entwickelten sich NB mit einer sehr hohen Inzidenz, die vergleichbar mit homozygoten TH-MYCN Mäusen war⁶⁶.

3.11 Mausmodelle, die auf dem Cre/loxP-System basieren

Um die Expression eines Gens in einem bestimmten Gewebstyp zu gewährleisten wird häufig das Cre/loxP-System genutzt¹⁰². Das Cre/loxP-System beruht auf der

homologen Rekombination. *Cre*-Rekombinasen (*Cre* = *Causes recombination*) erkennen bestimmte Erkennungssequenzen auf der DNA, die so genannten *loxP*-Stellen (*Locus of Crossover in phage P1*). Dabei schneiden sie das DNA-Stück zwischen zwei *loxP*-Stellen heraus und ligieren die freien Enden miteinander¹⁰². Dieses System wird normalerweise von Phagen genutzt, um ihre eigene DNA in das Genom von Bakterien zu integrieren. Mittels des *Cre/loxP*-Systems können sowohl Gene überexprimiert (*conditional knock in*), als auch deren Expression verhindert werden (*conditional knock out*). In dieser Doktorarbeit wurde das *Dbh-iCre* Mausmodell genutzt¹⁰³. Im *Dbh-iCre* Mausmodell wird die *improved Cre*-Rekombinase ausschließlich in noradrenergen Neuronen des peripheren und des zentralen Nervensystems exprimiert¹⁰³. Diese Restriktion auf bestimmte Gewebstypen wird dadurch erreicht, dass die *Cre*-Rekombinase sich stromabwärts des Dopamin- β -Hydroxylase (*Dbh*) Promotors befindet. Dieser Promotor ist ausschließlich in den o.g. Gewebstypen aktiv¹⁰¹.

3.11.1 Das *Dbh-iCre;LSL-ALK^[F1174L]* Modell

Fast zeitgleich mit Berry et al. konnten Heukamp et al. ebenfalls ein NB Mausmodell publizieren, das auf der Expression von mutierten *ALK[F1174L]* basiert^{65,66}. Jedoch entwickelten sich in diesem Modell auch murine NB in Tieren, die nur *Dbh-iCre;LSL-ALK^[F1174L]* doppelt-transgen waren. Es war also keine Verkreuzung mit einer TH-*MYCN* Maus nötig. In einer Maus zeigte sich auch eine lokale Amplifikation des *MYCN* Genlokus. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass mutiertes *ALK[F1174L]* hinreichend für die Entstehung ein (murines) NB sein kann. Außerdem konnten Heukamp et al. auch zeigen, dass es bei Verkreuzung von *Dbh-iCre;LSL-ALK^[F1174L]* Mäusen mit TH-*MYCN* Mäusen zu einer höheren Inzidenz von NB kommt und die Tumoren von dreifach transgenen Tieren sehr wenige chromosomale Aberrationen aufweisen⁶⁵. Dies deutet darauf hin, dass *MYCN* Überexpression zusammen mit der Expression von mutierten *ALK* völlig ausreicht, um die Pathogenese eines NBs zu treiben und keine weiteren Aberrationen nötig sind⁶⁵.

3.11.2 Das *Dbh-iCre;LSL-Lin28b* Modell

2012 zeigten Molenaar et al, dass ein Großteil aller NBs *LIN28B* überexprimieren und dass es in einem geringen Teil (ca. 2%) zur Amplifikation des *LIN28b* Genlokus

kommt⁹¹. Außerdem konnten Diskin et al. mittels einer genomweiten Assoziationsstudie zeigen, dass einzelne Nukleotid- Polymorphismen im *LIN28b* Gen mit dem NB assoziiert sind¹⁰⁴. Aufgrund dieser Fakten und weiteren *in vitro* Vorarbeiten wurde als Teil dieser Dissertation eine transgene Mauslinie mit konditioneller Überexpression von murinem Lin28b generiert (Siehe Kapitel 5.4)⁹¹.

3.12 Zielsetzung der Arbeit

3.12.1 Grundgedanke

Die Hypothese dieser Arbeit war, dass NB aus Neurralleistenvorläuferzellen (NLVZ) entstehen. Dabei sollte zur Untersuchung dieser Hypothese die NLVZ-linie JoMa1 genutzt werden, die alle Charakteristika von NLVZ erfüllt. Konkret sollten JoMa1-Zellen einerseits mit bekannten Onkogenen wie *MYCN* und mutiertem *ALK* transfiziert werden, um deren transformierende Wirkung an JoMa1 Zellen zu bestätigen. Weiterhin sollten im gleichen Modell die oben beschriebenen Kandidatengene (Tabelle 2), *FOXR1*, *LIN28b*, *ALK-WT*, *ALK[R1275Q]* und das *miR-17-92* Cluster auf transformierende Eigenschaften getestet werden.

Tabelle 2: Liste der Gene mit denen JoMa1 Zellen transfiziert wurden und deren Rolle im NB

Gen	Rolle im NB	Quelle
<i>MYCN</i>	Genomische Amplifikation, korreliert mit schlechter klinischer Prognose für NB Patienten	47,48
<i>NTRK1(TrkA)</i>	Hohe Expressionslevel korrelieren mit guter klinischer Prognose für NB Patienten	105
<i>ALK</i>	Hohe Expression und genomische Amplifikation korreliert mit schlechter klinischer Prognose für NB Patienten	67
<i>ALK[F1174L]</i>	Mutation korreliert mit schlechter klinischer Prognose, bei Patienten mit sporadischem NB	60-63
<i>ALK[R1275Q]</i>	Mutation korreliert mit schlechter klinischer Prognose, bei Patienten mit hereditärem NB	60-63
<i>FOXR1</i>	Deletionen im Bereich 11q23 führen zu hoher FOXR1 Expression. <i>In vitro</i> führt FOXR1 Expression zur Transformierung	75,106
<i>MLL-FOXR1</i>	Deletionen im Bereich 11q23 führen zum Fusionsgen <i>MLL-FOXR1</i>	75,106
<i>LIN28b</i>	Hohe LIN28b Expression korreliert mit schlechter klinischer Prognose für NB Patienten	91,92
<i>miR-17-92</i>	MYCN reguliert diese miRNA Familie. Hohe Expression korreliert mit einer schlechten klinischen Prognose für NB Patienten	95,107
<i>GFP</i>	Wurde als Kontrolle für die Transformierungs-Versuche genutzt	

Die transformierende Wirkung wurde dabei mittels Messung der Zellviabilität *in vitro* analysiert. Im Anschluss wurden JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK[F1174L] Zellen *in vivo* in Xenografts hinsichtlich ihrer Transformierungs-Kapazität analysiert. Die in diesen Xenografts entstandenen Tumoren wurden auf Markergene des NB untersucht. Außerdem wurden chromosomalen Aberrationen mit denen des humanen NB verglichen.

3.12.2 Weiterführende Arbeiten

Auf Grund der hohen klinischen Signifikanz von *LIN28b* Expression und Amplifikation sollte in dieser Arbeit auch die Wirkung von Lin28b Überexpression in der Neuralleiste und deren Derivaten *in vivo* untersucht werden. Dazu sollte ein Mausmodell etabliert und charakterisiert werden. Sich entwickelnde Tumoren sollten anhand der Charakteristika humaner NB untersucht werden. Nach der Charakterisierung sollte geprüft werden, ob dieses Mausmodell für präklinische Tests von Medikamenten, die neue Optionen für die Behandlung von NB Patienten darstellen könnten, genutzt werden kann.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Geräte

Tabelle 3: Genutzte Geräte

Geräte	Hersteller
Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Biodoc Analyzer Geldokumentation	Biometra (Göttingen)
CO ₂ Inkubator Steri-Cult 200	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Consort Power Supply E831	Consort (Belgien)
EL-800 Microplate Reader	Bio-Tek Instruments (Bad Friedrichshall)
Laborwaage EW420-3NM	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
Microporator MP-100	Digital Bio (Korea)
Mini-PROTEAN 2 Westernblotgerät	Bio-Rad (München)
Motic AE 31 Inversmikroskop	Motic (Wetzlar)
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab (Erlangen)
PerfectBlue Gelsystem Mini	Peqlab (Erlangen)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Schüttelwasserbad	GFL (Burgwedel)
StepOne Plus Real-time-PCR	Applied Biosystems (USA)
Sterilbank HERA-Safe HS12	Heraeus (Hanau)
Thermal Cycler C1000	Bio-Rad (München)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge Optima L-60	Beckman Coulter (Krefeld)
UVIchemi Westernblot	Biometra (Göttingen)
XCell <i>SureLock</i> Elektrophorese System	Invitrogen (Karlsruhe)
Z1 Coulter Partikel Counter	Beckman Coulter (Krefeld)
Zentrifuge Allegra X-22R	Beckman Coulter (Krefeld)
Zentrifuge Heraeus Biofuge Fresco	DJB labcare (Buckinghamshire)

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller

Material	Hersteller
Combitips 2,5; 5 ml	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorfgefäße 0,2; 1,5 und 2 ml	Eppendorf (Hamburg)
Injekt-F 1 ml Einmalspritzen	Braun (Melsungen)
Kanülen 0,4 mm Durchmesser	Braun (Melsungen)
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen (Karlsruhe)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg)
PMMA-Einmalküvetten	Roth (Karlsruhe)
PP-Röhrchen: 15 ml; 50 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Protran Nitrozellulose	GE Healthcare (Freiburg)
Serologische Einwegpipetten: 2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Sterilfilter: 0,22 und 0,45 µm Porengröße	Millipore (USA)
Zellkulturflaschen 75 cm ²	
Zellkulturschalen mit Wells: 6; 12; 24; 48; 96 Wells	Corning (Kaiserslautern)
Zellkulturschalen: 10 cm Durchmesser 14,5 cm Durchmesser	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellschaber 28 cm	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellulose Blot Papier 3 mm stark	GE Healthcare (Freiburg)
Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter (Krefeld)

4.3 Chemikalien

Tabelle 5: Genutzte Chemikalien und Bezugsquellen

Chemikalie	Hersteller
1 Kb DNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
100 bp DNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
11 Tage bebrütete Hühnereier	Sörries-Trockels (Möhnesee)
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich (USA)
5x First Strand Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
5x GoTaq Green Flexi Puffer	Promega (Mannheim)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
B27 Supplement	Invitrogen (Karlsruhe)
BSA	New England Biolabs (Frankfurt)
Chloroform	J. T. Baker Chemicals (Niederlande)
cOmplete, Mini Protease/Phosphatase Inhibitoren	Roche (Mannheim)
Cryo-SFM	PromoCell (Heidelberg)
D-MEM/F12	Invitrogen (Karlsruhe)
DMSO	Roth (Karlsruhe)
DPBS	Biochrom (Berlin)
EDTA	Merck (Darmstadt)
EGF	PromoKine (Heidelberg)
EtBr	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Sigma-Aldrich (USA)
EtOH	Sigma-Aldrich (USA)
Fibronectin	BD Bioscience (Heidelberg)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glykogen	Roche (Mannheim)
IAA	Sigma-Aldrich (USA)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (USA)
LDS	Sigma-Aldrich (USA)
MES	Roth (Karlsruhe)
MgCl ₂	Progamma (Mannheim)
N2 Supplement	Invitrogen (Karlsruhe)
NaCl	Roth (Karlsruhe)

Nukleotid-Mix (dNTP)	Bio-Budget
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Phenolrot	Sigma-Aldrich (USA)
PhosSTOP Phosphatase Inhibitoren	Roche (Mannheim)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (USA)
Puromycin dihydrochlorid	Sigma-Aldrich (USA)
Random Primer	Invitrogen
Roti-Quant	Roth (Karlsruhe)
SDS	GERBU Biochemicals (Gaiberg)
Thiazolylblau	Roth (Karlsruhe)
TRIzol	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin inhibitor	Sigma
Trypsin/EDTA	Gibco
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (USA)

4.4 Enzyme

Tabelle 6: Diverse genutzte Enzyme und ihre Hersteller

Bezeichnung (Hersteller)	Spezifikation
GoTaq Hot Start Polymerase	5 units/ μ l (Promega)
Proteinase K	20 mg/ml, 30 units/mg (New England Biolabs)
Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs):	
<i>BsrGI</i>	10.000 units/ml
<i>EcoRI</i>	20.000 units/ml
<i>HindIII</i>	20.000 units/ml
<i>NotI</i>	10.000 units/ml
Reverse Transkriptase, SuperScript II	200 units/ μ l (Invitrogen)
Ribonuklease H, RNaseH	60 units/ μ l (TaKaRa)
Ribonukleaseinhibitor, RNaseOUT	40 units/ μ l (Invitrogen)
T4 DNA Ligase	5 units/ μ l (Fermentas)

4.5 Kits

Tabelle 7: Kits und ihre Bezugsquellen

Bezeichnung	Hersteller
BrdU Cell Proliferation ELISA	Roche (Mannheim)
ECL Plus Western Blotting Detection	GE Healthcare (Freiburg)
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
miRNeasy Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
miScript Reverse Transcriptase Kit	QIAGEN (Hilden)
Neon Transfection System 10 µl Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (Hilden)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN (Hilden)

4.6 Antikörper

Tabelle 8: Erst- und Zweit-Antikörper und ihre Bezugsquellen

Bezeichnung (Produktnr.)	Hersteller
Erst-Antikörper	
anti-Mycn (sc-53993)	Santa Cruz Biotechnology inc. (USA)
anti-c-Myc (#9402)	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
anti-p75 (AB 1554)	Millipore (Schwalbach)
anti-LIN28B (#4196)	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
anti-Lin28b (#5422)	
anti-Gapdh (MAB374)	Millipore (USA)
anti-β-Aktin (A5441)	Sigma-Aldrich (USA)
Zweit-Antikörper	
anti-Maus-HRP (P0260)	Dako Cytomation (Hamburg)
anti-Kaninchen-HRP (NA9340)	GE Healthcare (Freiburg)
anti-Kaninchen-Cy3 (ab50503)	Abcam (UK)

4.7 Lösungen, Puffer und Medien

4.7.1 Zellkultur

Tabelle 9: Lösungen der Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich (USA)
B27 Supplement	Invitrogen (Karlsruhe)
Cryo-SFM	PromoCell (Heidelberg)
D-MEM/F12	Invitrogen (Karlsruhe)
Fibronectin	BD Biosciences (Heidelberg)
HEE	Siehe Abschnitt 4.9
N2 Supplement	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin inhibitor	Sigma-Aldrich (USA)

4.7.2 Bakterienmedien

LB-Medium

Trypton	1 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 g
aqua deion.	ad 950 ml
mit 10 N NaOH auf pH 7 eingestellt	
aqua deion.	ad 1000 ml

S.O.C. Medium

Trypton	2%
Hefeextrakt	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glukose	20 mM
aqua deion	ad 6 ml

LB-Agar

LB-Medium	1 L
Agar	10 g

4.7.3 Lösung zur Isolierung, Amplifizierung und Analyse von DNADNA-Isolierungspuffer

NaCl	75 mM
Na ₂ EDTA	24 mM pH 8,0
SDS	0,1%
aqua deion.	ad 100 ml

50x TAE-Puffer

TRIS Base	2 M
EDTA	127 mM
Mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt	
aqua deion.	ad 1000 ml

PCR-Ansatz

5x Green GoTaq Flexi Buffer	4 µl
MgCl ₂	2,5 mM
Nukleotid Mix	0,57 mM
GoTaq Hot Start Polymerase	0,2 u
Templat	100 ng
aqua deion.	ad 20 µl

4.7.4 Western-Blot

RIPA-Puffer

Hepes	50 mM pH 7,4	
NaCl	150 mM	
Triton X-100	1%	
NP 40	1%	
SDS	0,1%	
PhosSTOP Phosphatase Inhibitoren		1 Tablette
cOmplete, Mini Protease Inhibitoren		1 Tablette

20x MES-SDS Laufpuffer

MES	50 mM
TRIS Base	50 mM
SDS	0,1%
EDTA	1 mM
aqua deion.	ad 1000 ml

4x NuPAGE LDS Ladepuffer

TRIS-HCl	106 mM
TRIS Base	141 mM
LDS	2%
EDTA	0,51 mM
Glycerin	10%
Coomassie 1%ig	0,22 mM
Phenolrot 1%ig	0,175 mM
aqua deion.	ad 10 ml

1x NuPAGE LDS Ladepuffer

4x NuPage LDS Puffer	5 µl
β-Mercaptoethanol	1 µl
Proteinlysate	40 µg
aqua deion.	ad 20 µl

10x Transferpuffer

TRIS Base	250 mM
Glycin	1,9 M
aqua deion.	ad 1000 ml

Ponceau S Färbelösung

Ponceau S	0,13 mM
Essigsäure	5%

Blotto-Puffer (Blockierungslösung)

Trockenmilchpulver	25 g (5%)
TRIS-HCl	50 mM
NaCl	80 mM
CaCl ₂	2 mM
NP-40	1 ml (0,2%)
aqua deion.	ad 500 ml

Größenstandard

PageRuler Unstained Protein Ladder 6 µl pro Gel

4.7.5 Sonstige Puffer und Lösungen

<u>MTT-Reagenz</u>		<u>MTT-Lysereagenz</u>	
Thiazolylblau	0,1 mM	SDS	10 g
PBS	10 ml	DMSO	100 ml
		Essigsäure 100 %	0,6 ml

<u>DAPI-Lösung</u>	
DAPI	10 mg
PBS	1 ml

4.8 Kultur-Routine von JoMa1 Neuralleistenzellen (NLZ)

Neuralleistenzellen wurden auf mit Fibronectin (50 µg/ml) beschichteten Gewebekulturschalen kultiviert. Das NLZ-Medium wurde täglich erneuert und 4-OHT wurde täglich frisch zugegeben. Die Zellen wurden durchschnittlich alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:10 auf neue Schalen verteilt, da sie zu diesem Zeitpunkt etwa 70% Zelldichte erreicht hatten, was ca. 4×10^6 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale entspricht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann durch Zugabe von 0,5% Trypsin/EDTA und Inkubation für 1-2 Min. bei RT von der Platte gelöst. Um die Aktivität des Trypsins zu vermindern, wurde ein gleich großes Volumen an Trypsininhibitor zugegeben und die Suspension bei 125 x g für 5 Min. zentrifugiert. Die Zentrifuge (Allegra X-22R) wurde auf Stufe 2 beschleunigt und abgestoppt, um zu große, auf die Zellen einwirkende, g-Kräfte zu vermeiden. Die Zellen wurden in NLZ-Medium aufgenommen und auf neuen Fibronectin-beschichteten (50 µg/ml) Zellkulturschalen ausgesät.

4.9 Medium für Neuralleistenzellen

In allen Experimenten wurde ein modifiziertes Standardmedium benutzt, erstmalig beschrieben von Stemple und Anderson (Stemple und Anderson 1992). Zu einer Mischung aus DMEM (4500 mg/ml Glukose, L-Glutamin, Pyruvat) und Hab's F12 im Verhältnis 1:1 wurde folgendes zugegeben: 1% N2-Supplement, 2% B27-Supplement, 10 ng/ml EGF, 1 ng/ml FGF, 100 units/ml Penicillin-Streptomycin und 10% HEE (4.10). Um konstitutive Aktivierung von c-MycERT in JoMa1 zu erreichen,

wurde dieses Standardmedium mit 200 nM 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) versetzt. Für JoMa1-Zellen, die nach Transfektion den pMSCVpuro-GOI-Vektor trugen, wurde zusätzlich noch 1,5 µg Puromycin/ml NLZ-Medium gegeben. Die Selektion wurde 7 Tage fortgeführt.

4.10 Hühner-Embryonen Extrakt

Hühnereier wurden für 11 Tage in einem 37°C warmen, luftbefeuchteten Inkubator bebrütet (Sörries Trockels Vermehrungszucht, Möhnesee). Die Herstellung des Hühner-Embryonen Extrakts wurde nach dem Protokoll von Pajtler et al. durchgeführt¹⁰⁸. Diese Protokoll ist eine veränderte Version des Protokolls von Stemple und Anderson²². Die Embryonen wurden sauber vom Dottersack getrennt und in 4°C kaltem PBS gesammelt. Immer zehn Embryonen wurden gleichzeitig durch eine 60 ml Spritze gedrückt und so mazeriert. Das daraus resultierende Lysat (etwa 25 ml Lösung) wurde in einem 50 ml fassenden PP-Röhrchen aufgenommen. Ein gleiches Volumen DMEM wurde zugegeben und die Lösung wurde bei 4°C für 45 Min. geschüttelt. Sterile Hyaluronidase (1 mg/ml Ausgangslösung) wurde zugegeben (1 mg auf 25 g Embryo), anschließend wurde der Ansatz für 7 h bei 38000 x g zentrifugiert. Es wurde ein Ti-60 Rotor in einer Optima L-60 Zentrifuge genutzt. Der Überstand wurde nacheinander durch einen Filter (Porengröße: 45 und darauffolgend 22 µm) steril filtriert und in 10 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

4.11 Transfektion von JoMa1 Zellen

Für die Transfektion von JoMa1-Zellen mit verschiedenen Genen von Interesse (GOI) wurde der Microporator MP 100 und das dazugehörige Protokoll für Elektroporationen genutzt. Bei der Elektroporation werden die Zellmembranen durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert (Alberts et al. 2002). Die Elektroporation wurde dabei in einer 10 µl Kapillare durchgeführt. Die Kapillare hat den Vorteil, dass die Oberflächengröße der Elektroden geringer ist und zugleich deren Abstand größer, im Vergleich zu einer herkömmlichen Küvette. Durch diese Unterschiede wird die Bildung von Hitze und Metalloxiden, die den pH-Wert beeinflussen, reduziert. Die Effizienz der Elektroporation wurde durch eine parallele Elektroporation mit pMSCVpuro-GFP kontrolliert. Die Effizienz ergab sich aus dem Verhältnis zwischen JoMa1-Zellen, die durch die Expression von GFP fluoreszieren und den nicht-

fluoreszierenden Zellen im Sichtfeld. Für die Elektroporation wurden folgende Parameter genutzt:

Spannung :	1100 V
Impulslänge:	30 ms
Impulsanzahl:	1
Plasmid:	1 µg pMSCVpuro-GOI / 10 µl Elektroporationsansatz
Zellen:	10 ⁵ Zellen / 10 µl Elektroporationsansatz

4.12 Messung der Viabilität von Zellen (MTT-Test)

Der Test misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen, unabhängig davon, ob diese momentan DNA synthetisieren oder nicht. Dabei wird der Tetrazoliumring des gelben Thiazolyl (MTT; 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid) durch die Dehydrogenasen der Mitochondrien aufgebrochen. Dadurch entsteht das in Alkohol lösliche dunkelblaue Formazan (Lindl 2002). Mit Hilfe von MTT-Lysereagenz (4.7.5) wurden die Zellen nach einer zweistündigen Inkubationszeit in MTT-Reagenz (4.7.5) denaturiert. Die Intensität des Formazans wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt und korreliert mit der Anzahl lebensfähiger Zellen.

4.13 Bestimmung der Zellproliferation mittels Thyminanalogon (BrdU-Assay)

Um die Menge an proliferierenden Zellen zu bestimmen, wurde der Zell-Proliferations ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) von Roche nach Herstellerangaben genutzt. Im Gegensatz zum MTT-Test kann mit diesem Test zwischen „nur“ lebenden und proliferierenden Zellen unterschieden werden. Die Messung der Proliferation korreliert mit der Menge an dem eingebauten Thyminanalogon BrdU (5-brom-2'-desoxyuridin), das per fluoreszenzgekoppeltem Antikörper detektiert wird. Zur Messung der Proliferation wurden Zellen auf einer 96-Well-Platte für 2 h mit BrdU inkubiert und dann weiter nach Handbuch verarbeitet. Die photometrische Endpunktmessung erfolgte bei 450 nm.

4.14 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) wird meist im Sinne von „Durchflusszytometrie“ benutzt und die Begriffe werden häufig synonym verwendet.

Die FACS- Methode wird zur Analyse und Aufbereitung von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften eingesetzt. Technische Voraussetzung zur Messung mit einem Durchflusszytometer ist das Vorliegen der Probe als Einzelzellsuspension, da nur Partikel mit einem Durchmesser von $> 1 \mu\text{m}$ unterscheidbar sind. Zu den Anwendungen der Durchflusszytometrie gehört der Nachweis von Blutzellen, Knochenmark, Tumorzellen, Pflanzenzellen, Zellkernen und einzelligen Organismen. Im FACS können sowohl Streulicht als auch Fluoreszenz gemessen werden. Beim Streulicht gibt es zwei Parameter, die unmittelbar der Analyse zugänglich sind: das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter), welches mit der Zellgröße korreliert und das Seitenstreulicht (SSC, Side Scatter), welches die Zellgranularität und -komplexität widerspiegelt.

4.15 Klonierungen und Arbeiten mit Bakterien

4.15.1 Gateway-System für Klonierungen

Die Gateway-Klonierungsmethode beruht auf dem Rekombinasesystem des Phagen λ und den Rekombinationssequenzen (engl. *attachment sites*) dieses Systems. Im Gegensatz zur herkömmlichen Klonierung findet hier die Selektion mittels Antibiotikaresistenz und einem Gen, das für einen Gyrasehemmer kodiert, statt. Dies führt dazu, dass die Klonierung sehr effizient ist. Die Gateway-Klonierung wurde genutzt, um GOI aus verschiedenen Donorvektoren in den, für alle Transfektionen mit JoMa1, genutzten Zielvektor pMSCVpuro-attR zu klonieren. Dabei wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

4.15.2 Verwendeter Bakterienstamm

Escherichia coli TOP10 Genotyp: F- *mcrA* $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$
 $\Delta lacX74$ *recA1* *araD139* $\Delta(ara\text{-}leu)$ 7697 *galU* *galK* *rpsL*
(Str^R) *endA1* *nupG* λ -

E. coli TOP10 ist ein chemisch kompetenter Stamm, der von der Firma Invitrogen vertrieben wird. Er ist besonders für die Replikation von High-Copy-Plasmiden geeignet. Der Stamm wurde genutzt, um die verwendeten Plasmide zu replizieren und dadurch größere Menge Plasmid-DNA zu gewinnen.

4.15.3 Hitzeschocktransformation von *E.coli*

Um Plasmid-DNA in den TOP10 *E. coli* Stamm einzuschleusen, wurde die Hitzeschocktransformation nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Durch den Hitzeschock wird die Bakterien-Membran destabilisiert und einzuschleusende Plasmid-DNA kann in das Bakterium eindringen. Zur Selektion wurden Plasmide genutzt, die u.a. für Antibiotikaresistenzen kodieren.

4.16 Isolierung und Analyse von DNA

4.16.1 Genutzte Plasmide

Für die Transfektion von JoMa1 Zellen mit *MYCN*, *LIN28b*, *FOXR1*, *ALK-WT*, *ALK[F1174L]* und *ALK[R1275Q]* wurde der pMSCVpuro Vektor genutzt, dessen Name sich vom murinen embryonalen Stammzellvirus ableitet. Der Vektor diente als Shuttle-Vektor zwischen *E. coli* und JoMa1-Zellen. In die MCS (engl. *multiple cloning site*) einklonierte attR-Stellen verleihen diesem Vektor Kompatibilität mit dem Gateway-System (4.15). Ein an den attR-Stellen inseriertes Gen steht unter Kontrolle der speziell gestalteten 5'-LTR-Region (engl. *long terminal repeats*), die eine hohe Transkription des inserierten Gens garantieren. Das Amp^r-Gen kodiert für das Ampicillin-Resistenzgen β -Lactamase und dient zur Selektion in *E. coli*. Das unter der Kontrolle des murinen *pgk*-Promotors stehende, Puro^r-Gen kodiert für eine Resistenz gegenüber dem Translations-hemmenden Antibiotika Puromycin und dient der Selektion in eukaryotischen Zellen. Die für die eigenständige Replikation des pMSCVpuro-Vektors notwendigen viralen Gene sind nicht kodiert.

4.16.2 pCR8/GW/TOPO

Der pCR8/GW/TOPO-Vektor ist ein Vektor, der sowohl die Rekombinationssequenzen des Gateway-Systems (4.15), als auch des TopoTA-Cloning-Systems kodiert. Das TopoTA-Cloning-System nutzt die Fähigkeit der DNA-Topoisomerase-I, freie DNA-Fragmente mit überhängenden TA-Enden (Thymin-Adenin) zu verbinden. Der pCR8/GW/TOPO-Vektor liegt linearisiert vor. An den Enden sind jeweils kovalent DNA-Topoisomerase-I-Enzyme gebunden. PCR-Produkte, die mittels Taq-Polymerase erzeugt wurden, besitzen freie TA-Enden.

Durch Inkubation dieser PCR-Produkte mit dem Vektor wird das PCR-Produkt durch die DNA-Topoisomerase-I ligiert und der Vektor zyklisiert. Weiterhin kodiert der Vektor für eine Spectinomycinresistenz, die zur Selektion in *E. coli* dient.

4.16.3 DNA-Isolierung aus Zellkulturzellen

Die genutzte Methode der DNA-Isolierung beruht auf der Lyse der Zellen durch SDS und EDTA, wobei SDS die Zellkerne und Proteine denaturiert. EDTA bildet mit zweiwertigen Kationen Komplexe und inaktiviert dadurch u.a. DNasen. Proteine werden durch Proteinase K abgebaut. Die Trennung von DNA und Proteinresten erfolgte durch Phenol-Chloroform-Iso-Amyl-Alkohol Extraktion, bei der die Proteinreste an der Grenzschicht der Interphase zur Phenolphase ausfallen und sich die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase ansammeln. Chloroform entfernt Phenolreste, die die nachfolgende Analyse der DNA stören würden und stabilisiert die Phasengrenze zwischen wässriger und organischer Phase. IAA verhindert Schäumen beim Durchmischen des Ansatzes. Die Fällung der DNA beruht auf dem Entzug der Hydrathülle der DNA durch EtOH und Na-Acetat, wodurch sich die Löslichkeit der DNA verringert und diese ausfällt. Um das mit der DNA ausgefallene Na-Acetat wieder auszuwaschen, wurde anschließend mit 70%igem EtOH gewaschen.

Um DNA aus Zellkulturzellen zu isolieren, wurden Zellen in einer Zellkulturschale ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Die Zellen wurden 2-3 Min. mit Trypsin/EDTA inkubiert und durch leichtes Schütteln gelöst. Im folgenden Schritt wurden die Zellen für 5 Min. bei 125 x g zentrifugiert und dann 2-mal mit DPBS gewaschen. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml DNA-Isolierungspuffer (4.7.3) resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 5 µl Proteinase K gegeben und der Ansatz ÜN bei 50°C und 300 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl Chloroform-IAA (24:1) und 250 µl Phenol wurde für 5 Min. bei 16.000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und der vorherige Schritt wiederholt und dann erneut zentrifugiert. Nach erneuter Überführung der wässrigen Phase wurde 500 µl Chloroform-IAA (24:1) dazugegeben und für 5 Min. bei 16.000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und der vorherige Schritt wiederholt und dann erneut zentrifugiert. Die Fällung der DNA wurde durch Zugabe von 1 ml 100%iges EtOH und 100 µl Na-Acetat 3 M erreicht. Nach einer

Inkubation von 10 Min. bei RT wurde für 15 Min. bei 4°C und 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml EtOH 70%igem aufgenommen und für 10 Min. bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Zum Schluss wurde das DNA-Pellet in 100 µl H₂O aufgenommen und die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt (siehe 4.16.5).

4.16.4 Plasmid-DNA-Isolation aus *E. coli*

Um Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurde der Plasmid Maxi Kit der Firma QIAGEN genutzt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren und die Puffer des Kits genutzt. Die Isolation der Plasmid-DNA beruht auf der Methode der alkalischen Lyse. Dabei wurde die Bakterienmembran durch EDTA (Entzug der Kationen) und Lysozym (Abbau des Peptidoglykans) denaturiert. Durch Zugabe von SDS wurden die Zellen lysiert und Proteine denaturiert. Die Zugabe von NaOH denaturierte die genomische DNA, Plasmid-DNA wurde teilweise denaturiert und konnte nach Erhöhung des pH-Werts wieder renaturieren. Genomische DNA aggregierte mit Proteinen und wurde durch die mitgelieferten Filter-Säulen von der Plasmid-DNA durch mehrere Waschschriffe getrennt. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt (siehe 4.16.5).

4.16.5 Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm, da in diesem Wellenlängenbereich die aromatischen Ringe der Basen der DNA absorbieren. Eine OD₂₆₀ von eins entspricht einer DNA-Konzentration von ~33 µg/ml. Um die Reinheit der DNA zu bestimmen wurde gleichzeitig eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration bei 280 nm durchgeführt. In diesem Bereich absorbieren die aromatischen Aminosäuren der Proteine. Reine DNA besitzt einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert von 1,8. Eine mit Proteinen verunreinigte DNA-Lösung hat einen geringeren Wert.

4.16.6 DNA- und cDNA Amplifikation zur Genotypisierung transgener Mäuse

Zur Amplifikation von definierten DNA Abschnitten wurden die in Tabelle 10 beschriebenen Oligonukleotide in einer Konzentration von 20 nmol eingesetzt. Das Prinzip der Amplifikation beruht auf der von Kary B. Mullis 1983 entwickelten PCR

(engl. *polymerase chain reaction*). Eine PCR besteht aus der wiederholten Denaturierung der DNA und der Anlagerung (engl. *annealing*) der Startsequenzen, den spezifisch gestalteten Oligonukleotiden, für die DNA-Polymerase. Nach Anlagerung der DNA-Polymerase startet diese mit der Amplifizierung des DNA-Abschnitts, der zu beiden Seiten von den Oligonukleotiden eingegrenzt wird. Nach der ersten Amplifizierung wiederholt sich dieser Zyklus mehrere Male. Da in jedem Zyklus der PCR doppelt so viele neu synthetisierte Matrizen zur Verfügung stehen, ergibt sich eine exponentielle Amplifizierung des ursprünglichen DNA-Abschnitts.

Für jede PCR wurde der folgende Temperaturzyklus gewählt, wobei X den in Tabelle 10 aufgeführten Hybridisierungstemperaturen entsprach:

Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	} 30 Zyklen
Hybridisierung	X°C	30 sec	
Amplifizierung	72°C	30 -120 sec	
Finale Amplifizierung	72°C	10 min	

Tabelle 10: Liste der für die PCR genutzten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Amplikon	Annealing-temperatur	Elongationszeit
<i>Dbh-iCre</i>	fwd: ctgccagggacatggccagg rev: gcacagtcgaggctgatcagc	300 bp	59°C	45 sek
Flox-out	fwd: gcccgcggtgatgcctttgagg rev: ggctcgtcctctgccagcccg	298 bzw. 1836 bp		120 sek
LSL- <i>Lin28b</i>	fwd: atgcagctctgcggcac rev: tccgctgcctgcaaagggtc	460 bp		45 sek
<i>ROSA26</i>	fwd: ctcttccctcgtgatctgcaactcc rev: catgtctttaatctacctcgatgg	299 bp	62°C	45 sek

4.16.7 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Restriktionsenzyme spalten hydrolytisch die Phosphodiesterbindungen an doppelsträngiger DNA. Die in dieser Arbeit für den Restriktionsverdau verwendeten Restriktionsendonukleasen vom Typ II, weisen eine vier bis acht Basen lange palindromische Schnitt- bzw. Erkennungssequenz auf und spalten den DNA-Doppelstrang innerhalb dieser Sequenz. Die Restriktionsendonukleasen (**Tabelle 6**) wurden zur Überprüfung der Integration von Genen in diverse Vektoren eingesetzt. Durch hydrolytische Spaltung eines Vektors mit und ohne integrierten DNA-Abschnitt ergeben sich spezifische Fragmentlängen. Die elektrophoretische Auftrennung dieser unterschiedlich langen Fragmente zeigt ein charakteristisches Bandenmuster. Für den Restriktionsverdau wurden die Enzyme und Puffer der Firma New England Biolabs nach Herstellerangaben verwendet.

4.16.8 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurde mit der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Diese Ligase katalysiert u.a. die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyende der DNA. Die Produkte der

Ligation wurden für Restriktionsanalysen (4.16.7) und die Hitzeschocktransformation (4.15.3) mit *E. coli* verwendet. Für die Ligation wurde die T4 DNA-Ligase und der mitgelieferte Puffer der Firma Fermentas nach Herstellerangaben genutzt. Es wurde jeweils folgender Ansatz pipettiert

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. Linearisierter Vektor | 20 ng |
| 2. Zu inserierende DNA | 100 ng (5facher Überschuss) |
| 3. 10x T4 DNA-Ligase Puffer | 2 μ l |
| 4. T4 DNA-Ligase | 10 u |
| 5. aqua deion. | ad 20 μ l |

4.16.9 Agarose Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren nach Größe aufgetrennt. Die durch das Phosphatgruppen-Rückgrat negativ geladenen Nukleinsäuren wandern dabei in der Agarose-Gelmatrix in Richtung Anode. Größere Fragmente wandern langsamer, kürzere wandern schneller, da sie weniger von den Poren der Agarose-Gelmatrix „gebremst“ werden. Die Porengröße nimmt mit der steigender Agarose-Konzentration ab. Zusätzlich hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der vorliegenden Form der Nukleinsäuren ab. Superhelikale DNA wandert schneller als lineare DNA derselben Länge. Je nach aufzutrennender Fragmentgröße wurden 1-2%ige Agarosegele genutzt, zu denen 0,05 mg EtBr pro 100 ml Agarose-TAE 1x Puffer gegeben wurde. Zusätzlich zu den aufzutrennenden Proben wurde ein Größenstandard aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit 150 mA, 150 W und 130 V für 45 oder 60 Min. in Abhängigkeit der DNA-Fragmentgröße durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die Auswertung der Agarosegele erfolgte an einem Biodoc Analyzer Geldokumentationsgerät der Firma Biometra.

4.16.10 Elution von DNA aus Agarose

Zur Elution von DNA aus Agarose wurde der Nucleo Spin Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel nach den Herstellerangaben genutzt. Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass DNA in Gegenwart von chaotrophen Salzen an eine Silikamembran bindet. In einem Waschschrift wurden Verunreinigungen mit EtOH entfernt. In einem weiteren Schritt wurde die DNA mit einem alkalischen Puffer eluiert. Zuletzt wurde die Konzentration der eluierten DNA photometrisch bestimmt (4.16.5).

4.16.11 Array-Komparative genomische Hybridisierung

Die Technik der Array-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (aCGH) findet in der modernen medizinischen Forschung Anwendung, um Verluste und Zugewinne genomischer DNA in einem Gewebe relativ zur Kontrolle zu detektieren. Dabei wird die DNA der Referenzprobe und der zu analysierenden Probe mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt und gegen ein Raster von DNA-Fragmenten hybridisiert. Das Verhältnis der Fluoreszenzsignale gibt Aufschluss über chromosomale Aberrationen. Für die Detektion chromosomaler Aberrationen, die in *LSL-Lin28b;Dbh-iCre* Tumoren vorkamen, wurden die Tumoren und die entsprechenden Kontrollen (Gewebe aus dem Schwanz der gleichen Maus) analysiert. Genomische DNA wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Proben wurden auf einem 180K (AMADID 027411) Array (Agilent Technologies), der das komplette Mausgenom enthielt, analysiert. Je 400 ng DNA aus Tumorgewebe wurde mittels *Random priming* (Invitrogen) Cy3 (Perkin Elmer) gekoppelt, während die gleiche Menge DNA aus Schwanzgewebe mit Cy5 (Perkin Elmer) gekoppelt wurde. Die Hybridisierung und Waschung der Proben erfolgte nach Herstellerangaben. Die Messung der Fluoreszenz-Intensitäten wurde mittels des Agilent Scanners G2505C (Agilent Technologies) durchgeführt. Das Software Programm *Feature Extraction v10.1.1.1* (Agilent Technologies) wurde zur Extrahierung der Daten genutzt. Die Daten wurden mit Hilfe von aCGHbase (<http://medgen.ugent.be/arraycghbase>) weiter bearbeitet. Verluste und Zugewinne von Genen wurden anhand des *circular binary segmentation* Algorithmus berechnet^{109,110}.

4.17 Isolierung und Analyse von RNA

4.17.1 Isolierung von RNA

Die Isolation von RNA aus Zellkulturzellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen, der eine Erweiterung der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi darstellt¹¹¹. Es wurde nach den Herstellerangaben gearbeitet.

Zu Beginn wurden Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Das Medium wurde abgesaugt und die

Zellen in 1 ml TRIzol aufgenommen, indem mit einem Zellschaber alle Zellen vom Boden der Schale gelöst wurden. TRIzol denaturiert die Zellen, inhibiert u.a. RNasen (Guanidinisothiocyanat denaturiert Proteine) und stabilisiert somit die RNA. Die erhaltene Suspension wurde in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Chloroform und Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g wurde eine Phasentrennung erreicht, in der sich die RNA in der wässrigen Phase befand. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die RNA mit dem 0,7 fachen Volumen Isopropanol gefällt. Die gefällte RNA wurde in Resuspensionslösung (100 µl RNase freies Wasser, 250 µl EtOH 100%ig, 350 µl Puffer RLT aus dem Kit) aufgenommen. Die RNA wurde durch Zentrifugation an ein Silikagel gebunden, das als Anionen-Austauscher fungiert. Es folgten mehrere Waschschrte mit EtOH. Die Elution der RNA erfolgte mittels 50 µl RNase freiem Wasser. Im letzten Schritt wurde die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt (4.16.5).

4.17.2 Synthese von cDNA aus isolierter RNA

Zur Analyse der Transkription wurde RNA in cDNA revers transkribiert, da DNA stabiler ist als RNA. Zur reversen Transkription wurden zufällig gestaltete Oligonukleotide (Hexamere) verwendet, die im Gegensatz zu Oligo-Deoxy-Thymin-Nukleotiden auch an RNA binden, die keine Poly-Adenin-Sequenz trägt. Die hier verwendete Reverse Transkriptase stammt aus dem Maus-Leukämie-Virus und trägt eine Mutation, welche die RNaseH-Aktivität inaktiviert (Kotewicz et al 1985 und 1988). So wird verhindert, dass RNA abgebaut wird, bevor sie komplett transkribiert wurde. Nach der Synthese der cDNA wurde die RNA durch Zugabe von RNase H abgebaut. Es wurden jeweils maximal 3 µg isolierte RNA für die Synthese von cDNA eingesetzt. Dabei wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

1. RNA (maximal 3 µg in 6 µl)	6 µl
2. dNTPs (20 mM, 5 µM je Nukleotid)	1 µl
3. Random Primer (3 µg/µl)	3 µl
• 5 min 65°C	
4. 5x First Strand Puffer	5 µl
5. MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
6. RNaseOUT (40 units/µl)	1,25 µl
7. SuperScriptII Reverse Transkriptase (200 units/µl)	1,25 µl
• 10 Min. 25°C	
• 50 Min. 42°C	
• 15 Min. 70°C	
8. RNase H (60 units/µl)	1 µl

4.17.3 Isolierung von miRNA und Synthese der cDNA aus miRNA

Zur Isolierung von miRNA wurde das RNeasy Mini Kit genutzt und nach den Herstellerangaben verfahren. Die Isolierung beruht auf denselben Prinzipien wie unter 4.17.1 beschrieben. Der Unterschied zur RNA-Isolierung besteht darin, dass die miRNA mit einem niedrig konzentrierten Salzpuffer eluiert wird.

Zur Synthese der cDNA aus der isolierten miRNA wurde der miScript Reverse Transcriptase Kit nach Herstellerangaben verwendet. Da miRNAs nicht polyadenyliert sind, enthält der mitgelieferte Puffer für die cDNA-Synthese neben den üblichen Komponenten (MgCl₂, dNTPs, random Primer, oligo dT-Primer, reverse Transkriptase) auch eine Poly-A-Polymerase. Die Poly-A-Polymerase katalysiert die Polyadenylierung der miRNAs, an die oligo dT-Primer binden und die durch die reverse Transkriptase in cDNA transkribiert werden können.

4.17.4 Analyse der Transkription mittels quantitativer Real-time PCR (qRT-PCR)

Bei der quantitativen Realtime PCR kann das entstehende PCR-Produkt während der PCR-Reaktion gemessen werden, z.B. indem der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green genutzt wird. SYBR-Green bindet nur an doppelsträngige DNA und kann mittels Fluoreszenz-Emission detektiert werden. Nach jedem PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen, die mit dem gebildeten PCR-Produkt korreliert. Innerhalb der exponentiellen Phase der PCR ist die Fluoreszenz proportional zur eingesetzten

Menge an Matrize. Zur Auswertung wurde der so genannte C_T -Wert (engl. *threshold cycle*) bestimmt. Der C_T -Wert gibt an, ab welchem Punkt die Fluoreszenz einen Schwellenwert übersteigt. Je geringer der C_T -Wert, desto mehr Matrize war zu Beginn der PCR zur Verfügung und umgekehrt. Da cDNA als Matrize genutzt wurde, konnte so auf die Menge an Transkript und die Regulation eines Gens geschlossen werden.

Tabelle 11: Liste der genutzten qRT-PCR Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'-3' oder Bestellnummer	qPCR Kit
Mm_Dbh	fwd: tcatgcacatacaacacaga rev: tgcacatagttgacacacat	Fast SYBR® Green Master Mix
Hs_GAPDH	fwd: catcaagaaggtggtgaagc rev: gagcttgacaaagtggctgt	Fast SYBR® Green Master Mix
Mm_Gapdh	QT01658692 (Qiagen)	Fast SYBR® Green Master Mix
Mm_Phox2b	fwd: ggcagaggaattgaggtaag rev: cgtctccacatccatcttt	Fast SYBR® Green Master Mix
Hs_RNU6B	MS00007497 (Qiagen)	miScript SYBR Green PCR Kit
Mm_Th	fwd: agtggtgacacttatccaa rev: agtgccagagaggacaag	Fast SYBR® Green Master Mix

4.17.5 Expressions-Analyse von mRNA

Anhand von Mikroarrays kann die mRNA-Menge bestimmter Gene einer Probe bestimmt werden. Dazu wird die isolierte mRNA zunächst in cDNA oder cRNA transkribiert und dann mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der spezifische Mikroarray-Chip, der eine Auswahl von DNA-Spots enthält, hybridisiert die cDNA oder cRNA der zu analysierenden Probe. Nach Abwaschen der nicht gebundenen Nucleinsäuren, gibt die zu normalisierende Fluoreszenzintensität der Spots die mRNA Expression des spezifischen Gens in der Probe wieder.

Die Bestimmung der Konzentration und Qualität isolierter Gesamt-RNA aus 4 *Dbh-iCre;LSL-Lin28b* Tumoren und 3 Nebennieren erfolgte anhand des *RNA6000 Nano Assays* auf dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies). Die Transkription in cDNA und die Fragmentierung dieser erfolgte mit Hilfe des *GeneChip® 3' IVT*

Express Kit (Affymetrix). Die Hybridisierung der cDNA auf den Mausgenom-Genchips 430 2.0 (Affymetrix), die das komplette Genom der Maus enthielten, und das Auslesen erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. CEL Dateien wurden normalisiert und die Expression mittels der RMA Methode mit Power Tools v1.15.0 (Affymetrix) berechnet.

4.18 Gewinnung von Proteinlysaten und Proteinanalyse

4.18.1 Gewinnung von Proteinlysaten aus Zellkulturzellen

Um Proteinlysat aus Zellkulturzellen zu erhalten, wurden Zellen auf einer 15 cm Zellkulturschale ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Die Zellen wurden trypsinisiert und für 5 Min. bei 125 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 5 ml DPBS suspendiert und erneut zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100 µl RIPA-Puffer suspendiert. Das nun erhaltene Lysat wurde 30 Min. auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat durch eine Injektionsnadel mit einem Durchmesser von 0,4 mm fünf Mal auf und ab pipettiert, um das Aufbrechen der Zellwände zu gewährleisten. Im folgenden Schritt wurden die Lysate für 10 Min. bei 4°C und 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet verworfen, und anschließend die Konzentration der Proteinlysate mit Hilfe eines Bradford-Assays bestimmt.

4.18.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Um die Konzentration der Proteinlysate zu bestimmen wurde die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) durchgeführt, die auf hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 mit Proteinen beruht. Bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 zu 595 nm, was zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt werden kann. Zur Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate wurde zuerst eine Eichgerade mit definierten Mengen BSA (engl. *bovine serum albumin*) und Coomassie Brilliant Blue G-250 erstellt, anhand der Gerade wurde die Konzentration der Proteinlysate bestimmt.

4.18.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach Größe wurde die SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) genutzt. Durch Zugabe des anionischen Detergens SDS (engl. *Sodium Dodecylsulfate*), das an Proteine bindet und deren Eigenladung überdeckt, wird eine Auftrennung der Proteine nach Masse erreicht. 1 g Protein bindet dabei etwa 1,4 g SDS, so dass das Molekulargewicht direkt mit der Ladung des Proteins korreliert. Außerdem bewirken die negativen Ladungen des SDS ein Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstruktur, so dass die Proteine in linearisierter Form vorliegen. Um Disulfidbrücken zu reduzieren, wurde jeder Probe 1 µl β-Mercaptoethanol 5%ig (v/v) hinzugefügt. Vor Beladung des Gels wurden die Proben für 5 Min. bei 95°C inkubiert, um Wasserstoffbrückenbindungen zu denaturieren und die vollständige Linearisierung der Proteine zu gewährleisten. Die denaturierten Proben wurden auf NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gele aufgetragen. Zusätzlich wurde als Größenstandard PageRuler Unstained Protein Ladder aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode.

4.18.4 Western-Blot

Für die Übertragung der Proteine von dem NuPAGE Gel auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Methode des Nass- bzw. Tank-Blots verwendet. Dabei wandern die Proteine in einem elektrischen Feld zur Anode und bleiben dabei auf Grund hydrophober Wechselwirkung an der Nitrozellulosemembran haften. Die Blot-Kammer ist dabei komplett mit Transferpuffer gefüllt, was eine effiziente Übertragung der Proteine vom NuPAGE Gel auf die Nitrozellulosemembran bewirkt. Um die Effizienz des Transfers zu kontrollieren, wurden die auf die Membran transferierten Proteine mit Ponceau-Färbelösung angefärbt. Um die zu untersuchenden Proteine zu detektieren, wurde die Membran mit einem Blotto-Puffer-Antikörpergemisch inkubiert. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte ÜN bei 4°C. Der Zweitantikörper wurde 1 h bei RT inkubiert. Die Visualisierung des gebundenen Zweitantikörpers auf der Membran erfolgte mittels des ECL-Westernblot-Detektion-Kits nach Herstellerangaben.

4.19 Arbeiten mit Mäusen und murinem Tumormaterial

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden im zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen gehalten. Die Tiere lebten in einem hell-dunkel-Rhythmus von je 12 Std. und bei einer konstanten Raumtemperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Wasser und pelletiertes Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH) erhielten die Tiere *ad libitum*.

4.19.1 *In vivo* Biolumineszenz Bildung

Mittels des IVIS Lumina II Gerätes kann man Biolumineszenz detektieren. In dieser Arbeit wurde mit dem Gerät gearbeitet, um *in vivo* die Co-Expression einer Glühwürmchen Luciferase (*Fluc*; Abbildung 11) und dem *Lin28b* Transgen zu detektieren. Die Luciferase sollte dabei nur in den Geweben exprimiert werden, in denen der *Dbh* Promotor aktiv ist. Als Substrat benötigt die Luciferase Luciferin, das mit molekularem Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert, wobei ein nicht-stabiler, angeregter Übergangszustand erzeugt wird, der unter Abgabe von Photonen in einen stabilen Zustand übergeht. Diese Photonen können mit dem IVIS Lumina II detektiert werden. Mit diesem Verfahren lässt sich indirekt der Tumor lokalisieren, in dem die beiden Transgene exprimiert werden. Damit Luciferin im Zielgewebe zur Verfügung steht, wurde einer Maus jeweils 100 μl fertige Luciferin Lösung i.v. in die Schwanzvene injiziert und danach die Maus narkotisiert.

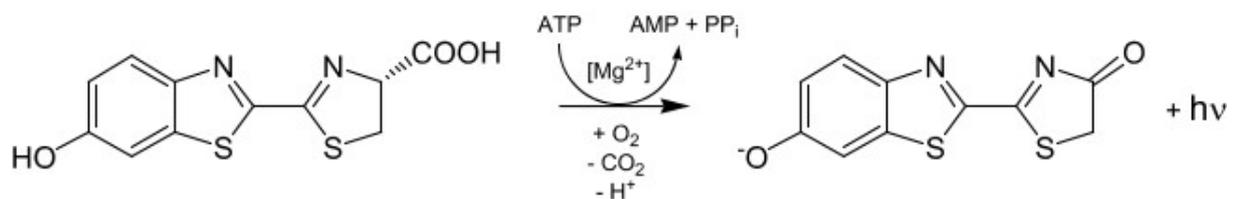


Abbildung 6: Schema der Luciferase-Reaktion.

Luciferin wird unter Sauerstoff Verbrauch oxidiert, dabei entsteht Oxyluciferin, und es wird Energie in Form von Photonen (hν) frei.

4.19.2 Aufarbeitung von Tumoren für Xenografts

Je ein entnommener Tumor wurde mit einer Schere in einer Petrischale zerkleinert. Diese Gewebestücke wurden mit Collagenase Lösung (2mg/ml, Collagenase NB4, Serva, 17454.01) versetzt und für 30 Min. bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln

gelagert. Dabei baut die Collagenase das Bindegewebe ab und erleichtert somit die Vereinzelung der Tumorzellen. Danach wurden die Zellen durch ein 40 mesh-Sieb gegeben (Tissue Grinder Kit, Sigma Aldrich, CD1-1KT) und das Sieb einmal mit 10 ml Medium gespült. An diesem Punkt wurden die Zellen zentrifugiert und in Matrigel (s.c. Xenografts) oder in PBS aufgenommen (i.p. Xenografts) und in Nacktmäuse injiziert.

4.19.3 Immunhistochemische Analysen von Tumormaterial

Die Immunhistochemie beruht auf der Bindung eines antigenspezifischen Erstantikörpers an das gesuchte Zielprotein. An den Erstantikörper bindet ein Zweitantikörper, der entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Farbstoff umsetzenden Protein gekoppelt ist. Die Bindung der Antikörper kann dann durch Licht einer bestimmten Wellenlänge sichtbar gemacht werden und dadurch die Lokalisation und Intensität des Zielantigens bestimmt werden. Nach Entnahme des Tumors wurde ein Teil in einem Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Der andere Teil wurde UN in 4 % Paraformaldehyd bei RT fixiert. Der fixierte Tumor wurde in Paraffin eingebettet und es wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf einem Deckglas fixiert wurden. Die Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Demaskierung der Antigene erfolgte mittels der *Target Retrieval Solution* (Dako) bei pH 6 für 20 Min. bei 100°C. Die Schnitte wurden 20 Min. gekühlt und für 5 Min. in 3% H₂O₂ inkubiert. Im *Dako Autostainer* (Dakocytomation) wurden die verschiedenen Antikörper (Tabelle 12), nach Herstellerangaben inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mittels des EnVision™ Kit (Dako).

Tabelle 12: Liste der genutzten Antikörper für die immunhistochemischen Analysen der Tumorschnitte und Tumorzellen

Antigen	Artikelnr. (Firma)	Genutzte Verdünnung
Caspase 3	9661 (Cell Signaling)	1:200
Ki67	275R-16 (Cell Marque)	1:50
Tyrosinhydroxylase	AB76442 (Abcam)	1:200
NCAM (CD56)	556324 (BD Pharmingen)	1:200

4.20 Statistische Analysen

Alle Tests zur Viabilität und Proliferation wurden im 96-Well-Maßstab durchgeführt. Die Tests zur Viabilität wurden drei- bis fünfmal wiederholt, jeweils mit Dreifachbestimmung. Die Tests zur Proliferation wurden zweimal wiederholt, jeweils mit Dreifachbestimmung. Die Daten wurden paarweise mit dem „Students t-test“ auf eine signifikante Abweichung überprüft. Die Signifikanzen wurden folgendermaßen dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Für die Auswertung der Viabilität und Proliferation wurde der Mittelwert und die Standardabweichung genutzt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Analysen (5.4.13) wurden mit Hilfe von ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>) gemacht. Dazu wurde der Schwellenwert eines $650.628 \mu\text{m}^2$ ($\cong 650 \text{ mm}^2$) großen Bildausschnitts auf 75 gesetzt. Im nächsten Schritt wurde das Bild in einen Binärmodus konvertiert und durch Anwendung eines „Watershed Filters“ invertiert. Als Parameter für die nun positiv gefärbten Zellen wurden folgende gewählt: Pixelsize (\wedge^2): 5-150; Circularity 0-1. Für die Auswertung wurden jeweils immer die positiven Zellen von mindestens drei Tumoren gezählt.

5 Ergebnisse

In der hier vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob JoMa1 Neuralleistenvorläuferzellen durch potentielle Onkogene des NB transformiert werden können. Dazu wurde die JoMa1 Zelllinie mit einem pMSCVpuro Vektor transfiziert, der entweder kein Gen trug, oder ein Gen das für *GFP*, *TrkA*, *MYCN*, *FOXR1*, *MLL-FOXR1*, *ALK[F1174L]*, *ALK[Q1275Q]* das *miR-17-92* Cluster oder *LIN28b* kodierte (Tabelle 2). Durch Messung der Zellviabilität mittels MTT konnte gezeigt werden, dass nach Expression von *TrkA* oder *GFP* keine erhöhte Zellviabilität in JoMa1 detektierbar war. Die ektope Expression von *MYCN*, *FOXR1*, *ALK[F1174L]* oder *LIN28b* hingegen führten zu einer erhöhten Zellviabilität, was ein erhöhtes Transformierungspotential vermuten lässt. Für die Gene *MLL-FOXR1* und das *miR-17-92* Cluster zeigte sich kein eindeutiges Bild. Über die Versuche *in vitro* hinaus wurde in dieser Dissertation die Transformierungskapazität von *MYCN*, *ALK-WT*, *ALK[F1174L]*, *ALK[R1275Q]* und *LIN28b* auch *in vivo* untersucht. Dabei führte die *MYCN* Expression in JoMa1-Zellen nicht nur zur Transformation *in vitro*, sondern auch zur Formation von Tumoren *in vivo* in Xenografts. Die Überexpression der *ALK* Varianten zeigten, dass die *ALK[F1174L]* Variante die *ALK* Variante mit dem stärksten Transformierungspotential ist. Dies konnte kurze Zeit später auch nochmals von Heukamp et al. *in vivo* bewiesen werden⁶⁵. Überexpression von humanen *LIN28b* in JoMa1-Zellen führte zur Transformation *in vitro*. Da Expressionsdaten von humanen NB eine Überexpression von *LIN28b* in nahezu allen Tumoren zeigte und in einer genomweiten Assoziationsstudie gezeigt werden konnte, dass einzelne Nukleotid Polymorphismen von *LIN28b* mit dem NB assoziiert sind, wurde ein transgenes Mausmodell entwickelt (*LSL-Lin28b;Dbh-iCre*). In ca. 35% aller *LSL-Lin28b;Dbh-iCre* doppel-transgenen Tieren entwickelten sich murine NB.

5.1 ***MYCN* transfizierte JoMa1 Zellen sind *in vivo* tumorigen und weisen Homologien zum humanen Neuroblastom auf**

Um zu untersuchen, ob JoMa1 Neuralleistenvorläuferzellen zur Klärung der Pathogenese des NBs beitragen können, wurden JoMa1 Zellen mit *MYCN* transfiziert. *MYCN* Amplifikation oder Überexpression ist der wichtigste prognostische Faktor im NB, der mit schlechten Überlebensraten der Patienten

korreliert. Die Überexpression von MYCN zeigte im TH-MYCN Mausmodell, dass Zellen der Neuralleiste durch MYCN transformiert werden und dies zur Entstehung von murinen NB führt¹³. Zur Untersuchung wurde der pMSCVpuro Vektor genutzt, in den zuvor humane *MYCN* cDNA kloniert wurde (4.16.1). JoMa1 Zellen, die mit *MYCN* transfiziert wurden, wurden 2 Wochen lang mit 1 µg Puromycin pro 1 ml Zellkulturmedium selektioniert. In dieser Zeit wurden JoMa1-MYCN Zellen mit 4-OHT kultiviert. Nach der Selektion wurden 2×10^7 Zellen in 100 µl Matrigel in je sechs Nacktmäuse (Genotyp: nu/nu) s.c. injiziert. Fünf Tage nach der Injektion der JoMa1-MYCN Zellen wurde alle 2 Tage das Tumolvolumen (Höhe, Länge und Breite) mit einer Schieblehre vermessen und notiert. Beim Erreichen eines Tumolvolumens von $\geq 1000 \text{ mm}^3$ wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet und die Tumoren asserviert und kultiviert. Es zeigte sich, dass die Tumoren zwischen 43 und 123 Tagen brauchten, um ein Volumen von 1000 mm^3 zu erreichen (Abbildung 7 A; graue Linie). Dabei war auffällig, dass es eine Gruppe von Tumoren (Tumoren 3-6) gab die zwischen 43 und 64 Tagen ein Volumen von 1000 mm^3 erreichten und eine weitere Gruppe (Tumoren 1-2), die 106-123 Tage brauchten. Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Tumoren 3-6 eine deutlich höhere MYCN Expression hatten, als die Tumoren 1-2 (Abbildung 7 B). Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass schnell wachsende JoMa1-MYCN Tumoren eine hohe MYCN Expression haben, und langsam wachsende JoMa1-MYCN Tumoren eine niedrige MYCN Expression haben (Abbildung 7 A und B). Um zu zeigen, dass es sich bei den aus JoMa1-MYCN entstandenen Tumoren nicht um Hyperplasien handelte, wurden die JoMa1-MYCN Tumor Zellen kultiviert und von den Tumoren 3-6 jeweils 1×10^7 Zellen in je fünf Nacktmäuse retransplantiert (4.19.2). Die retransplantierten Tumoren wurden mit mT-MYCN (mT=Maustumor) bezeichnet. Es zeigte sich, dass diese 20 Tumoren bereits nach 11-20 Tagen ein Volumen von $\geq 1000 \text{ mm}^3$ erreichten (Abbildung 7 A; rote Linie). Mittels aCGH (4.16.11) konnte gezeigt werden, dass alle sechs JoMa1-MYCN Tumoren diverse chromosomale Aberrationen akquiriert hatten. Zu den Aberrationen gehörten Deletionen des ganzen oder eines Teils des Chromosoms 3, 12, 14, 16 und 18. Außerdem traten Zugewinne an den Chromosomen 3, 8, 10, 11q, 15, 15q, und X auf (Abbildung 7 C). Beim Vergleich der chromosomalen Aberrationen fiel auf, dass in schnell wachsenden Tumoren jeweils ein Zugewinn in einem kleinen Bereich des Chromosoms 8.86p und des Bereichs 15q zu beobachten war (Abbildung 7 C; roter und blauer Kasten). Der Zugewinn auf Chromosom 8 hat seine kürzeste Region, die in allen JoMa1-MYCN Tumoren 3-6

überlappt, im Bereich Chromosom 8.83. In diesem Bereich liegen etwa 50 Gene (Quelle: PubMed Genome Browser). Eine Aberration, die für die JoMa1-MYCN Tumoren 1-2 charakteristisch war, ist eine Deletion im Bereich des Chromosoms 12:74-78 (Abbildung 7, grüner Kasten). Dieser Bereich umfasste 95 Gene und die Deletion umfasste in beiden Fällen exakt denselben Bereich. Von der Deletion ist auch das Gen *Max* betroffen (Quelle: PubMed Genome Browser). *Max* ist der Homodimerisierungspartner von *Mycn/MYCN*, ohne den die Transkription der Zielgene von *Mycn/MYCN* nicht möglich ist¹¹².

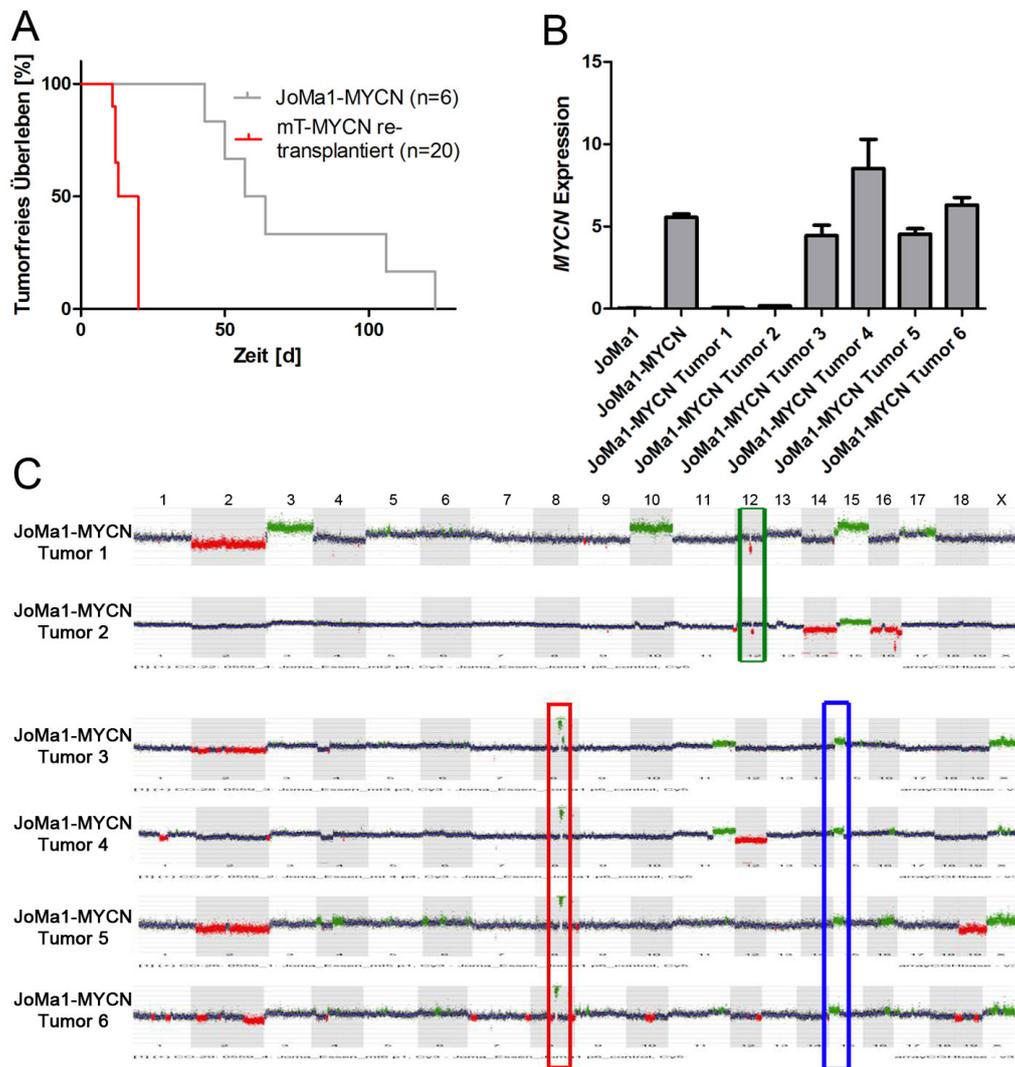


Abbildung 7: Hohe MYCN Expression fördert schnelles Wachstum transformierter JoMa1 Zellen und spezifische chromosomale Aberrationen.

(A) Darstellung der Kaplan-Meier Analyse des tumorfreien Überlebens der JoMa1-MYCN und mT-MYCN Xenografts. Als Abbruchkriterium wurde ein Überschreiten eines Tumolvolumens von $\geq 1000 \text{ mm}^3$ gewertet. JoMa1-MYCN Tumoren 3-6 erreichten das Abbruchkriterium nach 43-64 Tagen, während die Tumoren 1-2 nach 106-123 Tagen das Abbruchkriterium erreichten (graue Linie). Die retransplantierten JoMa1-MYCN Tumoren, als mT-MYCN bezeichnet, erreichten das Abbruchkriterium nach 11-20 Tagen (rote Linie). (B) qRT-PCR Analyse der humanen *MYCN* Expression in den JoMa1-MYCN Tumoren, JoMa1 und JoMa1-MYCN Zelllinie. Während JoMa1 und JoMa1-MYCN Tumoren 1-2 geringe bis keine *MYCN* Expression aufwiesen, zeigten JoMa1-MYCN und die JoMa1-MYCN Tumoren 3-6 hohe *MYCN* Expression. (C) Zur Detektion der chromosomalen Aberrationen wurde eine aCGH Analyse aller sechs JoMa1-MYCN Tumoren durchgeführt. Neben Deletionen von Teilen oder des ganzen Chromosoms 3, 12, 14, 16 und 18, oder Zugewinnen von Teilen oder des ganzen Chromosoms 3, 8, 10, 11q, 15, 15q, und X, konnten auch spezifische Aberrationen gefunden werden (roter, blauer und grüner Kasten). JoMa1-MYCN-Tumoren 3-6 mit hoher *MYCN* Expression, wiesen Zugewinne im Chromosomen 8.86p und 15q auf (roter und blauer Kasten), die in den JoMa1-MYCN Tumoren 1-2 nicht detektierbar waren. JoMa1-MYCN Tumoren 1-2 mit geringer *MYCN* Expression wiesen eine Deletion im Bereich des Chromosoms 12 auf, die in Tumoren mit hoher *MYCN* Expression nicht zu finden waren (A und B modifiziert nach ¹¹³).

5.1.1 JoMa1-MYCN Tumoren exprimieren Marker des humanen Neuroblastoms

Um zu klären, ob es sich bei den aus JoMa1-MYCN entstandenen Tumoren um NB handelt, wurde das Tumormaterial und die etablierten Zelllinien hinsichtlich der Expression von typischen humanen NB Markern untersucht. Zunächst wurde geprüft, ob in den Tumoren die Expression des Zelladhäsionsproteins NCAM (auch CD56; engl.: *Neural Cell Adhesion Molecule*) zu detektieren ist. CD56 ist in nahezu 100% aller NB exprimiert¹¹⁴. Bei der Analyse des Knochenmarks auf Metastasen wird ebenfalls nach CD56 exprimierenden Zellen gesucht⁹⁶. Zur Detektion von CD56 wurde eine FACS-Analyse durchgeführt (Tabelle 12 und Abschnitt 4.14). Es zeigte sich, dass CD56 in JoMa1, JoMa1-MYCN und JoMa1-GFP Zellen nicht exprimiert wurde (Abbildung 8 A). In allen sechs aus JoMa1-MYCN etablierten Tumorzelllinien war hingegen CD56 Expression detektierbar (Abbildung 8 A). Um zu überprüfen, ob es sich bei den Tumoren um einen neuroendokrinen Tumor handelt, wurde eine immunhistologische Färbung für Neuronenspezifische Enolase (NSE) durchgeführt. NSE wird in NB exprimiert und korreliert mit einer schlechten Prognose für den Patienten¹¹⁵. Die Färbung des Tumorgewebes war positiv für NSE (Abbildung 8 B). In Kooperation mit der AG Heukamp in der Pathologie der Uniklinik Köln wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen (EM-Aufnahmen) der Tumoren gemacht. Mit Hilfe der EM-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass in den Tumoren Strukturen zu finden waren, die synaptischen Membranen entsprechen (Abbildung 8 C, schwarze Pfeile). Außerdem zeigte sich die Präsenz von neurosekretoischen Vesikeln (Abbildung 8 C, weiße Pfeile). Das Vorhandensein beider Strukturen deutet darauf hin, dass es sich um Tumoren handelte, die neuroendokrinen Ursprunges waren und somit vereinbar mit der Diagnose NB sind^{2,116}. Als weitere typische neuroendokrine Marker wurden die Expression von Phox2b und Tyrosinhydroxylase in den Tumoren mittels qRT-PCR nachgewiesen. Es zeigte sich eine sehr hohe Expression der beiden Marker in der Nebenniere (Positivkontrolle) und den JoMa1-MYCN Tumoren 2-5. In den Kontrollgeweben und JoMa1-MYCN Tumor 1 war nur geringe Expression der Markergene nachzuweisen (Abbildung 8 D). Zusammengenommen zeigen die Expression der Markergene und die mikroskopischen Strukturen, dass es sich bei denen aus JoMa1-MYCN entstandenen Tumoren um murine NB-ähnliche Tumoren neuroendokrinen Ursprungs handelte.

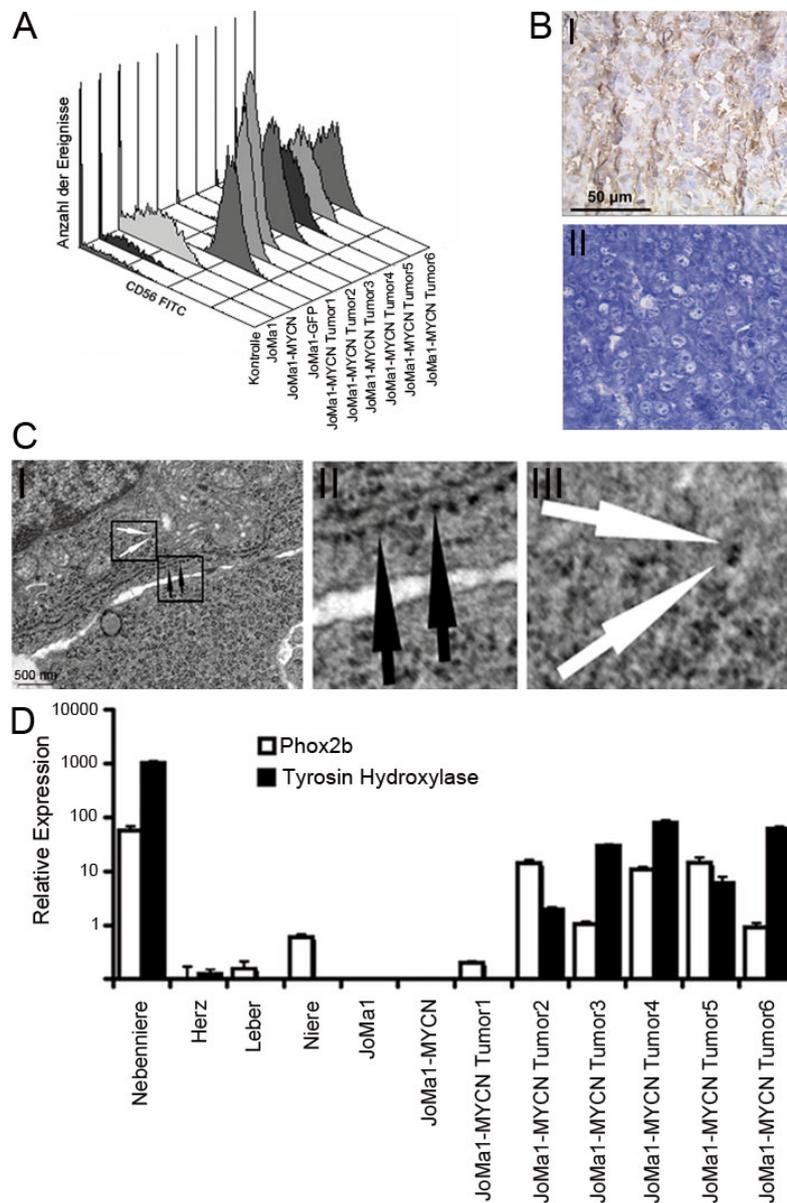


Abbildung 8: JoMa1-MYCN Tumoren exprimieren Markergene des humanen Neuroblastoms.

(A) Mittels FACS-Analyse konnte die Expression des Oberflächenmarkers CD56 auf allen JoMa1-MYCN Tumoren nachgewiesen werden, jedoch nicht auf JoMa1, JoMa1-MYCN, JoMa1-GFP und der Kontrolle (Kontrolle = Nur FITC markierter 2. Antikörper). **(B I)** Immunhistochemische Färbung, die die Expression des Neuroblastommarkergens Neuronenspezifische Enolase zeigte (NSE). **(B II)** Kontrolle zur NSE Färbung, bei der nur der 2. Antikörper genutzt wurde. **(C I)** Elektronenmikroskopische Aufnahme (EM-Aufnahme), die eine Übersicht eines JoMa1-MYCN Tumors zeigt. **(C II)** Detaillierter Bildausschnitt der EM-Aufnahme, der die Präsenz einer synaptischen Membran zeigt (Schwarze Pfeile). **(C III)** Detaillierter Bildausschnitt der EM-Aufnahme, der die Präsenz von neurosekretorischen Vesikeln zeigt (Weiße Pfeile). **(D)** qRT-PCR welche die Expression von Phox2b und Tyrosinhydroxylase in allen JoMa1-MYCN Tumoren bis auf den Tumor 1 zeigt. cDNA aus der Nebenniere diente als Positivkontrolle. JoMa1, JoMa1-MYCN, Herz, Niere und Leber dienten als Negativkontrolle (modifiziert nach ¹¹³).

5.2 ALK[F1174L] transfizierte JoMa1 Zellen sind *in vivo* tumorigen

Mutationen im *ALK* Gen kommen in ca. 15% aller NBs vor⁶³, darunter die Mutationen an Stelle 1174 oder 1275 der Nukleotid-Sequenz des *ALK* Gens. Um zu überprüfen, welche Auswirkung die Überexpression von ALK[F1174L], ALK[R1275Q] und nicht mutiertem ALK auf JoMa1 Zellen hat, wurden JoMa1 Zellen mit pMSCVpuro-ALK[F1174L], ALK[R1275Q] und nicht mutiertem ALK transfiziert und zwei Wochen mit Puromycin (1,5 µg/ml) selektioniert. Nach zwei Wochen wurden 1000 Zellen für einen MTT Test ausgesät und die Zellen ohne 4-OHT kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass JoMa1 Zellen, die mit ALK[F1174L] transfiziert wurden, eine im Vergleich zu JoMa1-ALK-WT (Abbildung 9 A und B) etwa zweifach höhere Zellviabilität und BrdU Inkorporation aufwiesen. Die Zellviabilität von JoMa1-ALK[R1275Q] lag zwischen JoMa1-ALK-WT und JoMa1-ALK[F1174L] (Abbildung 9 A und B). Um das Transformierungspotential von ALK[F1174L] in JoMa1 *in vivo* zu untersuchen, wurden jeweils 1×10^7 Zellen pro Nacktmaus (Genotyp: nu/nu) injiziert (n=6). Dabei bildeten 2 von 6 Nacktmäusen einen Tumor (Daten nicht gezeigt). Als Abbruchkriterium wurde auch hier ein Tumolvolumen von $\geq 1000 \text{ mm}^3$ gewählt. Die zwei Tumoren erreichten das Abbruchkriterium an 48 Tagen. Die anderen 4 Mäuse zeigten auch nach 120 Tagen Beobachtungszeit noch keine Tumoren.

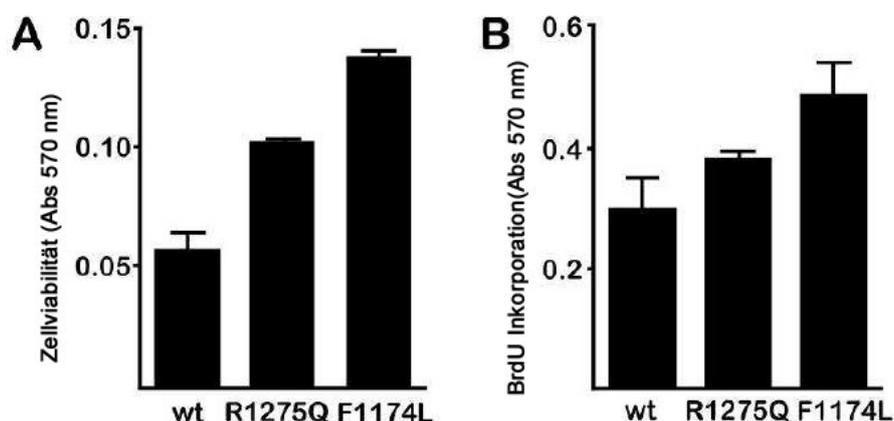


Abbildung 9: Wirkung von ALK Mutationen auf die Zellviabilität und BrdU Inkorporation.

(A) Die Viabilität von JoMa1-ALK[F1174L] war nach 72h im Vergleich zu JoMa1-ALK-WT um den Faktor 2 erhöht. Die Viabilität von JoMa1-ALK[R1275Q] lag zwischen JoMa1-ALK[F1174L] und JoMa1-ALK-WT. (B) Die BrdU Inkorporation von JoMa1-ALK[F1174L] war nach 72h im Vergleich zu JoMa1-ALK-WT um den Faktor 2 erhöht. Die BrdU Inkorporation von JoMa1-ALK[R1275Q] lag zwischen JoMa1-ALK[F1174L] und JoMa1-ALK-WT (modifiziert nach ⁶⁵).

5.3 *FOXR1* transfizierte JoMa1 Zellen zeigen eine Tendenz zur Transformation

Deletionen auf Chromosom 11 an Position 11q23 kommen im NB in ca. 44% der Patienten vor⁷⁴. Dies zeigt, dass in dieser Region sehr wahrscheinlich ein Tumorsuppressorgen liegt, das während der Pathogenese des NBs inaktiviert wird. Santo et al. konnten zeigen, dass Mikrodeletionen in diesem chromosomalen Bereich zu aktivierenden Fusionsgenen (z.B. *MLL-FOXR1*) oder Überexpression bestimmter Gene führt (z.B. *FOXR1*)⁷⁵.

In Kooperation mit Santo et al. wurden JoMa1 Zellen mit pMSCVpuro-*FOXR1* oder pMSCVpuro-*MLL-FOXR1* transfiziert und die Wirkung beider Gene auf die Proliferation der Zellen analysiert. Nach zwei Wochen Selektion mit Puromycin (1,5 µg/ml) wurden je 1000 Zellen für einen MTT-Test auf einer 96-Well Platte ausgesät und nach 72h wurde die Zellviabilität gemessen. Es zeigte sich, dass JoMa1-*FOXR1* ohne 4-OHT keine signifikant geringere Viabilität aufwies, verglichen mit JoMa1-*FOXR1*, die mit 4-OHT kultiviert wurden (Abbildung 10 A). JoMa1 und JoMa1-GFP zeigen hingegen eine signifikant höhere Viabilität, wenn sie mit 4-OHT kultiviert werden, im Gegensatz zu ohne 4-OHT kultivierten JoMa1 und JoMa1-GFP (Abbildung 10 A). Mittels mikroskopischen Aufnahmen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die Anzahl der Zellen nach 72h zwischen JoMa1-*FOXR1* die mit und ohne 4-OHT kultiviert wurden, kaum unterscheiden (Abbildung 10 B). JoMa1-*MLL-FOXR1* zeigte ohne 4-OHT ähnlich geringe Zellviabilität wie JoMa1 und JoMa1-GFP (Daten nicht gezeigt).

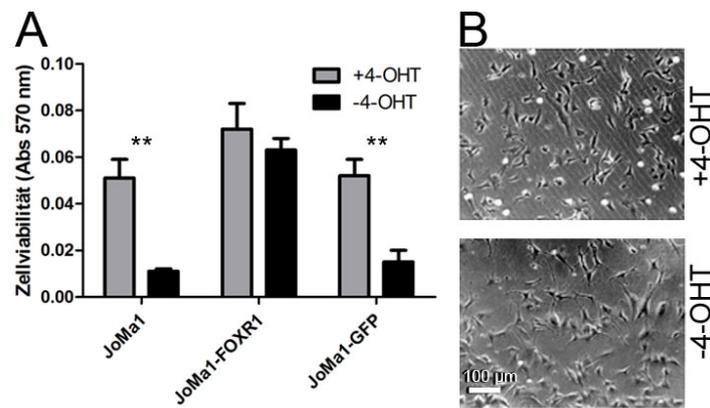


Abbildung 10: Auswirkung von FOXR1 auf die Zellviabilität von JoMa1 Zellen.

(A) Die Zellviabilität von JoMa1-FOXR1 ist ohne 4-OHT nicht signifikant niedriger als JoMa1-FOXR1 mit 4-OHT. Die parentale Zelllinie JoMa1 oder auch JoMa1-GFP zeigt hingegen signifikant geringere Zellviabilität, wenn sie ohne 4-OHT kultiviert werden. **(B)** Lichtmikroskopisch zeigen sich keine Unterschiede zwischen JoMa1-FOXR1 Zellen mit und ohne 4-OHT (modifiziert nach ⁷⁵).

5.4 Validierung von *LIN28b* als Onkogen im Neuroblastom

In der vorangegangenen Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass JoMa1 Zellen durch *LIN28b* transformiert werden (Abbildung 17 A). Molenaar et al. konnten zeigen, dass *LIN28b* in einem Großteil aller NB hoch exprimiert ist und in einem geringen Anteil auch genomisch amplifiziert ist⁹¹. Weiterhin konnten Molenaar et al. zeigen, dass hohe *LIN28b* Expression mit einer schlechten Prognose für NB-Patienten korreliert⁹¹. Im Folgenden zeigten Molenaar et al. in diversen weiteren *in vitro* Experimenten, dass *LIN28b* tatsächlich ein Onkogen des Neuroblastoms ist. Die AG Schulte hat mit diesem Wissen über die Rolle von *LIN28b* im NB bei der Firma TaconicArtemis (Köln) die 'Herstellung' einer Maus in Auftrag gegeben, die murines *Lin28b* exprimiert. Mehr Informationen zu dem Transgen-Aufbau dieser Maus befinden sich im Abschnitt 5.4.1. Diese transgene Maus wurde genutzt, um *in vivo* zu zeigen, dass *Lin28b* tatsächlich zur Pathogenese des NB beitragen kann.

5.4.1 Generierung einer konditional transgenen *Lin28b* Maus

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *LIN28b* ein potentielles Onkogen *in vitro* und *in vivo* ist, wurde eine transgene Maus generiert. Die *LSL-Lin28b* Maus wurde im Auftrag der Arbeitsgruppe Schulte bei der Firma TaconicArtemis GmbH in Köln generiert. In einen Vektor mit Rekombinase-Kassettenaustauschstelle (RCME)

wurde murine cDNA des *Lin28b* Gens (Gen-ID: ENSMUSG00000063804) hinter einen Hühner-Aktin-Promotor (CAG) und eine *loxP*-flankierte Polyadenylierung-Stop-Sequenz (LoxStopLox) und vor eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und ein Luciferase Gen (Fluc) kloniert (Abbildung 11). TaconicArtemis F1 RMCE 103 embryonale Mausstammzellen mit dem genetischen Hintergrund 129S6 (50%);C57BL/6 (50%), die im *ROSA26* Genlocus über RMCE Stellen verfügten, wurden mit dem CAG-LSL-*Lin28b*-IRES-*Fluc*-RMCE-Austauschvektor und einem Flpe-Rekombinase exprimierenden Vektor (pCAG Flpe pA) mittels Lipofektion transfiziert. Der Austausch der Kassetten erfolgt an den Positionen FRT und F3. Positive Klone wurden sieben Tage lang mit G418 selektiert, morphologisch verschiedene Kolonien wurden isoliert und die Integration der Vektoren mittels Southern Blot und PCR validiert. Tetraploiden Maus-Blastozysten wurden je 7-10 validierte ES-Zellen injiziert. Die Blastozysten wurden dann einem scheinträchtigen Weibchen in den Uterus implantiert. Chimäre Nachkommen wurden weitergezüchtet, keimbahnmutierte Tiere vermehrt und an die Arbeitsgruppe Schulte verschickt. Durch die Verpaarung mit Wildtyp 129x1/SvJ oder C57Bl/6N Mäusen wurden die Tiere in die jeweiligen genetischen Hintergründe gekreuzt. Zur Genotypisierung der Mäuse wurde den Nachkommen an Tag 5 bis 8 nach der Geburt eine Schwanzbiopsie entnommen. Die Vervielfältigung des LSL-*Lin28b*-Amplikons aus genomischer Schwanz-DNA erfolgte mittels PCR mit LSL-*Lin28b*-Primern (Abbildung 11; Primer B1 und B2; Tabelle 10) und die Detektion mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (4.16.9). Homozygote Mäuse wurden mit *ROSA26*-Wildtyp-Primern identifiziert (Tabelle 10).

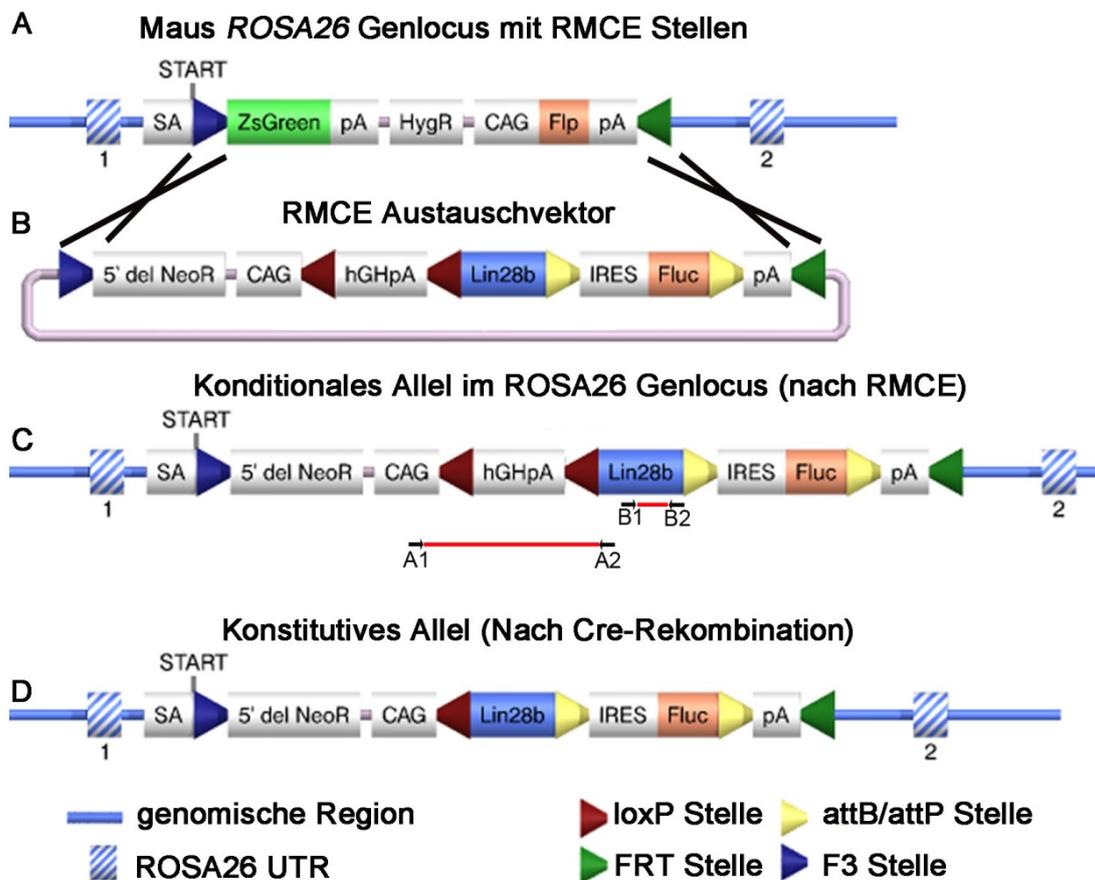


Abbildung 11: Klonierungsstrategie und genetisches Design der LSL-*Lin28b* Maus.

(A) Schema des ROSA26 Genlocus der F1 RMCE 103 embryonalen Mausstammzellen mit Rekombinase-Kassettenaustauschstellen (RCME). (B) Schema des CAG-LSL-*Lin28b*-IRES-*Fluc*-RMCE-Austauschvektors. (C) Der ROSA26 Genlocus nach der Insertion des konditionalen Allels und (D) dem Cre-Rekombinase-vermittelten Ausschneiden der Transkriptionsabbruchstelle. CAG = Hühner-Aktin-Promotor; hGHpA = Polyadenylierungs-Stopp-Sequenz, hergestellt aus humanem Wachstumshormon, mit Polyadenylationsstelle; *Lin28b* = offener Leseraster von murinem *Lin28b*; A1/A2 = Primer zur Validierung des Ausschneidens der Transkriptionsabbruchstelle; B1/B2 = Primer zur Amplifikation/Sequenzierung des *Lin28b*-Transgens (modifiziert nach ⁹¹).

5.4.2 Neuralleistenspezifische Expression von *Lin28b*

Um eine neuralleistenspezifische Expression von *Lin28b* zu gewährleisten, wurden die LSL-*Lin28b* Mäuse mit *Dbh-iCre* Mäusen verpaart. Die Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Dbh*-Promotors gewährleistet die Rekombinase Expression in der Neuralleiste und ihren Derivaten¹⁰³. LSL-*Lin28b*;*Dbh-iCre* doppelt-transgenen Mäusen fehlt somit die Polyadenylierungs-Stopp-Sequenz vor dem *Lin28b* Gen. Dadurch kommt es zur *Lin28b* Transkription in Neuralleistengewebe (Abbildung 12).

5.4.3 Genotypisierungs- und flox-out-PCR der LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* Mäuse

Für die Genotypisierung wurde genomische DNA aus einer Schwanzbiopsie isoliert. Zum Nachweis des *Dbh-iCre* Transgenes wurde eine Genotypisierungs-PCR mit *Dbh-iCre* Primern durchgeführt (Tabelle 10; Abbildung 12 A). Zum Nachweis des *Lin28b* Transgens in den LSL-*Lin28b* Mäusen wurde ein Genotypisierungs-PCR mit LSL-*Lin28b* Primern durchgeführt (Tabelle 10; Abbildung 12 B). *Dbh-iCre*;LSL-*Lin28b* doppelt-transgene Tiere wurden entsprechend mit beiden Primerpaaren identifiziert. Durch Verpaarung der LSL-*Lin28b* Maus mit einer *Dbh-iCre* Maus kommt es zum Ausschneiden der Polyadenylierung-Stop-Sequenz zwischen den loxP-Stellen. Diese verkürzte DNA Sequenz wurde mit Hilfe der flox-out-PCR nachgewiesen (Tabelle 10; Abbildung 12 C). Nach Verpaarung von LSL-*Lin28b* mit LSL-*Lin28b* Mäusen wurden die Mäuse hinsichtlich des Zygotiestatus des LSL-*Lin28b* Transgens mit *ROSA26* Primern überprüft (Tabelle 10; Abbildung 12 D). Durch ein homozygotes LSL-*Lin28b* Transgen kommt es zum Verlust des Amplikons, da die gewählte Elongationszeit für die Amplifikation des Transgens zu kurz ist.

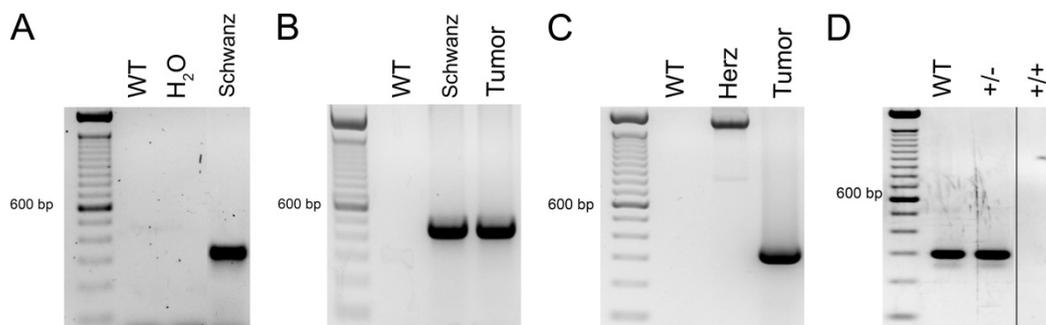


Abbildung 12: Genotypisierungs- und flox-out-PCR der LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* doppeltransgenen Mäuse.

(A) Genotypisierungs-PCR einer *Dbh-iCre* Maus (Amplikon 300 bp). (B) Amplifikation des *Lin28b* Transgens (Amplikon 460 bp). (C) Beispiel einer flox-out-PCR. In Geweben in denen die Cre-Rekombinase nicht aktiv ist zeigt sich ein 1836 bp langes Amplikon, in Cre-Rekombinase aktivem Gewebe zeigt sich hingegen ein kürzeres Amplikon mit 298 bp. (D) *ROSA26*-Wildtyp-Genlocus, amplifiziert aus genomischer DNA einer Wildtyp- und einer heterozygoten LSL-*Lin28b* Maus (Amplikon 300 bp) (modifiziert nach ⁹¹).

5.4.4 Neuralleistenspezifische *Lin28b* Überexpression führt zu Tumoren

LSL-*Lin28b* (n=17) einfach transgene und LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* (n=34) doppeltransgene Mäuse wurden bis zu 400 d beobachtet. In dieser Zeit entwickelten 12 (ca. 35%) der doppeltransgenen und keine der einfach transgenen Mäuse einen oder

mehrere Tumoren (Abbildung 13). Das mittlere Alter der Diagnose der Tumore betrug ≈ 63 d.

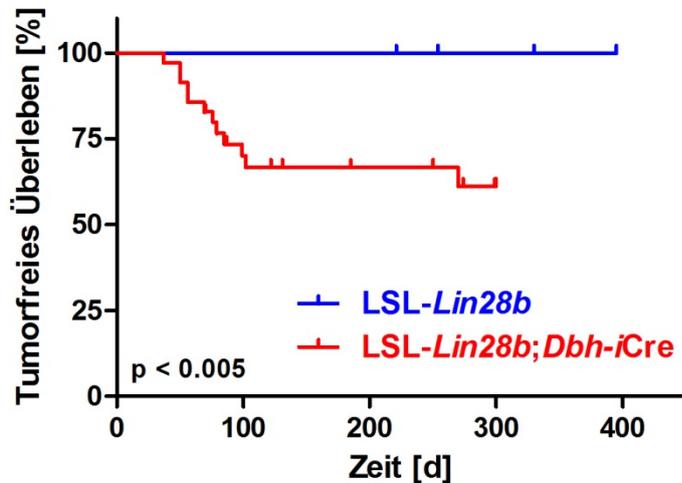


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Analyse der Tumorzinzenz von LSL-Lin28b Mäusen im Vergleich zu LSL-Lin28b;Dbh-iCre Mäusen.

12 von 34 doppel-transgenen Tieren entwickelten innerhalb von 36-110 Tagen einen oder mehrere Tumoren. In einfach transgenen Tieren wurde kein Tumor diagnostiziert. Eine doppel-transgene Maus verstarb nach 270 d, jedoch nicht an einem NB.

Die Tumoren wurden ertastet und dann mittels *in vivo* Biolumineszenz Bildgebung und Sektion validiert. Es zeigte sich, dass LSL-Lin28b;Dbh-iCre Mäuse Tumoren an den Nebennieren (ca. 70%), dem oberen Cervikalganglion (ca. 25%) und am Ganglion coeliacum (ca. 10%) entwickelten (Abbildung 15 A-C; Abbildung 14 A-C). Diese Lokalisationen spiegeln die des NB beim Menschen wider¹¹⁷. Außerdem zeigt die Sektion, dass die *in vivo* Biolumineszenz Bildgebung ein nützliches Werkzeug ist, um den Tastbefund zu validieren, denn die Lokalisation der Lumineszenz-Signale stimmen mit den Lokalisationen der Tumoren nach Sektion überein.

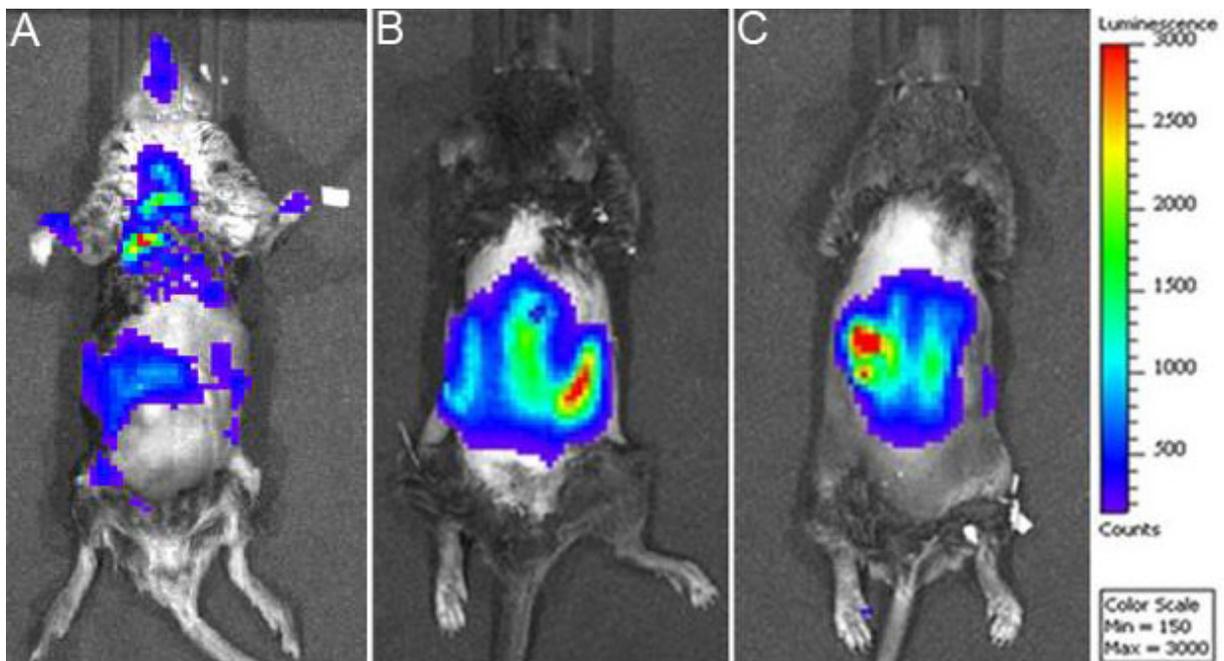


Abbildung 14: In vivo Biolumineszenz-Bildgebung.

(A) Beispiel für einen Tumor in der Nähe der Luftröhre, der aus dem oberen Zervikalganglion entstanden ist. (B und C) Tumoren der Nebenniere (modifiziert nach⁹¹).

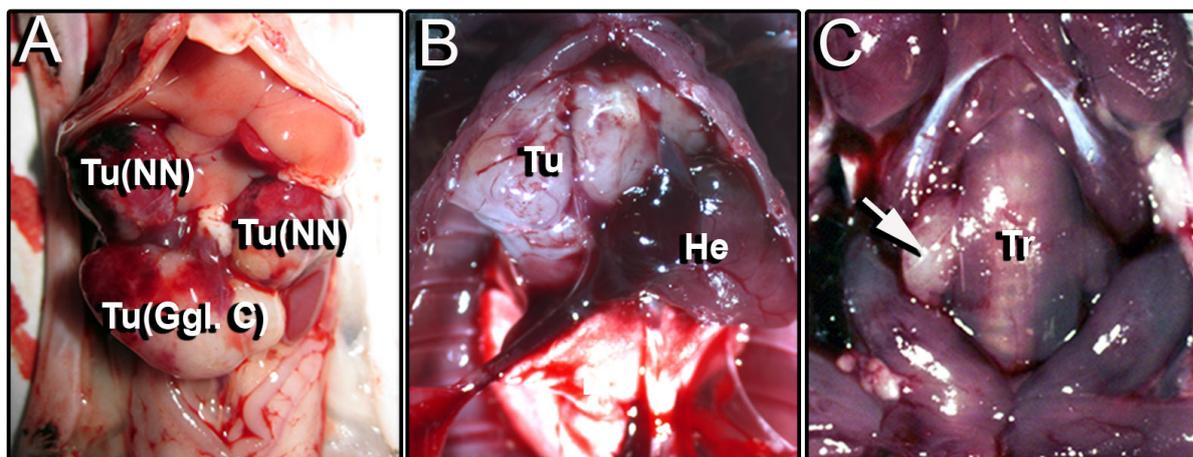


Abbildung 15: Makroskopische Bilder der Tumoren während der Sektion.

(A) Die Tumoren entstehen im Abdomen an den Nebennieren und am Ganglion coeliacum (Tu[NN] = Tumor der Nebenniere; Tu[Ggl. C] = Tumor des Ganglion coeliacum). (B) Beispiel für einen Tumor des Thorax Bereichs (Tu = Tumor; He = Herz). (C) Der Pfeil deutet auf einen Tumor, der an der Luftröhre (Tr) aus dem oberen Cervikalganglion entstanden ist (modifiziert nach⁹¹).

5.4.5 Hohe Lin28b Expression führt zu geringer *let-7* miRNA Expression und hoher Mycn Expression

2009 konnte gezeigt werden, dass LIN28b die *let-7* miRNA Expression reguliert und dass dies dann zu hoher MYC Expression führt¹¹⁸. Um zu überprüfen, ob die Lin28b Expression in den LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* Tumoren ebenfalls *let-7* miRNAs reguliert und gleichzeitig dadurch auch indirekt Mycn reguliert, wurde ein Westernblot für Lin28b und Mycn durchgeführt. Hohe MYCN Expression und/oder MYCN Amplifikation kommt in 25% aller NB vor^{47,119}. Es zeigte sich, dass das Lin28b Transgen und endogenes Mycn im Vergleich zu Kontrollgeweben hoch exprimiert werden (Abbildung 16 A). Die Expression diverser *let-7* miRNAs wurde mit Hilfe einer qRT-PCR analysiert¹²⁰. Es zeigte sich, dass *let-7* miRNAs in dem Tumorgewebe von LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* Mäusen geringer exprimiert werden als in Kontrollgeweben und Tumorgewebe des TH-MYCN Mausmodells. Um zu prüfen, ob auch die durch Mycn kontrollierten Gene von der Regulation betroffen sind wurde mittels qRT-PCR die Expression von drei wichtigen Zielgenen von Mycn gemessen¹²¹. Es konnte gezeigt werden, dass Ornithin Decarboxylase 1 (*Odc1*), Nucleolin (*Ncl*) und Protomyosin alpha (*Ptma*) in den Tumoren des LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* Mausmodells hoch reguliert sind. Dabei ist die Expression dieser drei Gene etwa gleich hoch wie im TH-MYCN Mausmodell und höher als in gesundem Nebennieren-Gewebe (Abbildung 16 C). Mittels mRNA Array-Expressions-Analyse wurden je vier Tumoren des *Dbh-iCre*; LSL-*Lin28b* und des TH-MYCN Mausmodells mit dem Expressionsmuster von drei Nebennieren verglichen (Abbildung 16 D). Bei der Analyse wurden die 1000 Gene mit der stärksten differentiellen Expression zwischen den drei genannten Gruppen verglichen. Zum einen zeigte sich, dass die Expressionsmuster von *Dbh-iCre*; LSL-*Lin28b* und TH-MYCN Tumoren zueinander ähnlicher ist, als zu denen der Nebennieren (Abbildung 16 D). Von ungefähr 7000 differentiell exprimierten Genen in den Tumoren sind ungefähr 3500 zwischen *Dbh-iCre*; LSL-*Lin28b* und TH-MYCN Tumoren gleich reguliert. Von den restlichen 3500 Genen sind ca. 1000 in *Dbh-iCre*; LSL-*Lin28b* Tumoren deutlich anders reguliert

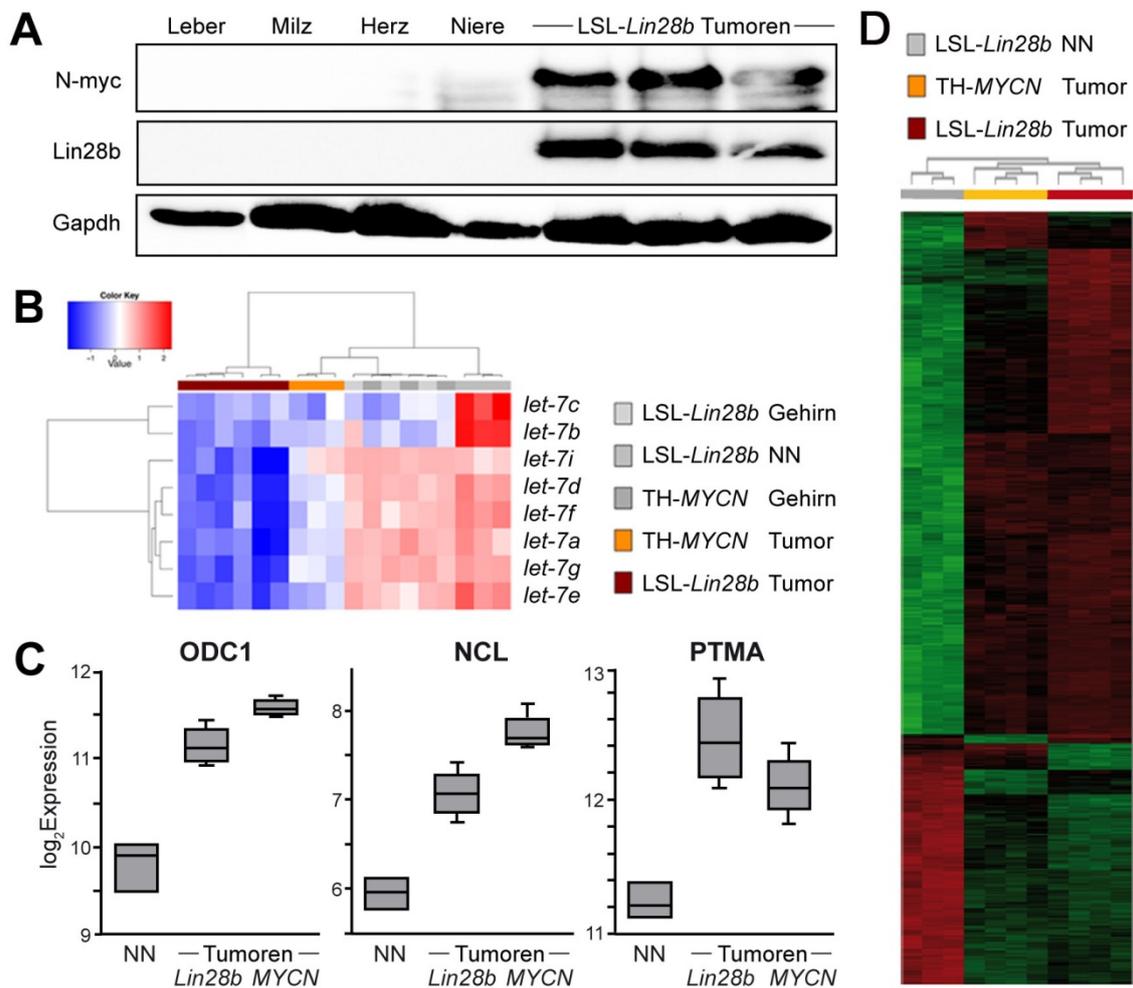


Abbildung 16: Nachweis der *Lin28b-let-7-Mycn* regulatorischen Achse in den Tumoren der *LSL-Lin28b;Dbh-iCre* Maus.

(A) Expression des *Lin28b* Transgens und *Mycn* in Tumoren. In den Kontrollorganen war weder die Expression von *Lin28b* noch von *Mycn* zu beobachten. (B) Mittels Heatmap Darstellung der relativen Expression von *let-7* miRNAs zeigte sich die niedrige Expression aller *let-7* miRNAs in den *Lin28b* getriebenen Tumoren. In den Kontrollgeweben war eine mittlere bis höhere Expression zu erkennen. Im Tumorgewebe des TH-MYCN Mausmodells war die *let-7* miRNA Expression ebenfalls höher als in den *Lin28b* getriebenen Tumoren (blau = niedrige Expression; rot = hohe Expression). (C) Die Expression der *Mycn* Zielgene *Odc1*, *Ncl* und *Ptma* war in *LSL-Lin28b;Dbh-iCre* Tumoren ähnlich hoch wie in TH-MYCN Tumoren und höher als in Nebennieren-Gewebe (NN). (D) Der Vergleich der Expressionsmuster von drei Nebennieren (*LSL-Lin28b* NN), vier *Dbh-iCre;LSL-Lin28b* Tumoren und vier TH-MYCN Tumoren, mittels mRNA Expressions-Arrays zeigte, dass sich die mRNA Expressionsmuster von *Dbh-iCre;LSL-Lin28b* Tumoren und TH-MYCN Tumoren ähnlicher waren, als das Expressionsmuster der Nebennieren (modifiziert nach ⁹¹).

5.4.6 Nachweis der *LIN28b-let-7-Mycn* regulatorischen Achse *in vitro* in JoMa1 Zellen

Nachdem in meiner Diplomarbeit gezeigt werden konnte, dass JoMa1 Zellen durch humanes *LIN28b* transformiert werden können (Abbildung 17 A), sollte in dieser

Arbeit untersucht werden, ob diese Transformation eventuell auch über die LIN28b-*let-7-Mycn* regulatorische Achse vermittelt wird. Dazu wurde mittels qRT-PCR die Expression verschiedener *let-7* miRNAs gemessen. Es wurden die *let-7* miRNA Expression von JoMa1, JoMa1-MYCN und JoMa1-LIN28b verglichen. Dabei zeigte sich, dass JoMa1-LIN28b die geringste *let-7* miRNA Expression aufweist und JoMa1 die durchschnittlich höchste Expression (Abbildung 17 B). In JoMa1-MYCN sind *let-7g*, *let-7a* und *let-7b* ähnlich gering exprimiert wie in JoMa1-LIN28b. Wie die Clusteranalyse zeigt, ist die *let-7* miRNA Expression von JoMa1-MYCN, der *let-7* miRNA Expression von JoMa1 ähnlicher als der von JoMa1-LIN28b (Abbildung 17 B). Sowohl in JoMa1-MYCN, als auch in JoMa1-LIN28b wird *Mycn* exprimiert (Abbildung 17 D). Dies zeigt zum einen, dass in JoMa1-MYCN ektope humanes MYCN hoch exprimiert wird, zum anderen das murine *Mycn* sehr wahrscheinlich durch LIN28b hoch reguliert wird (Abbildung 17 D). Außerdem wird hierdurch deutlich, dass ektope MYCN zumindest in diesem System keine Lin28b Expression induziert. Die Ergebnisse aus Abbildung 17 B und D lassen vermuten, dass die LIN28b-*let-7-Mycn* regulatorische Achse auch in JoMa1-LIN28b präsent ist. Westermann et al. zeigten 2008, dass ektope Expression von MYCN zur Repression von endogenem c-Myc führt¹²². In JoMa1-MYCN und in JoMa1-LIN28b sind die endogenen c-Myc Expressionslevel deutlich geringer als in JoMa1 (Abbildung 17 C). Dieser Befund zeigt, dass auch im JoMa1 Zellsystem ektope MYCN Expression zur Repression von c-Myc führt. Weiterhin wird deutlich, dass endogenes murines *Mycn*, dass durch LIN28b de-reprimiert wird, dazu führen kann, dass c-Myc reprimiert werden kann (Abbildung 17 C). Für diesen Versuch wurden JoMa1, JoMa1-LIN28b und JoMa1-MYCN mit 4-OHT kultiviert. Daher ist in allen Lysaten auch c-MycER^T detektierbar (Abbildung 17 C). Das c-MycER^T Konstrukt hat durch die Fusion mit dem mutiertem murinem Östrogenrezeptor ein höheres Molekulargewicht (≈ 100 kDa) als c-Myc. Da in JoMa1-LIN28b endogenes *Mycn* aktiviert wird und in JoMa1-MYCN ektope MYCN überexprimiert wird, sollten die Effekte auf die induzierten Zielgene identische sein. Um dies zu klären, wurden von JoMa1-LIN28b und JoMa1-MYCN nach Kultivierung ohne 4-OHT RNA isoliert und diese mit Hilfe von Affymetrix Arrays hinsichtlich der Änderung in Expression analysiert (4.17.5). Es zeigte sich, dass der Anteil an ähnlich exprimierten Genen mehr als doppelt so hoch ist wie der Anteil unterschiedlich exprimierter Gene (Abbildung 17 E). Daraus lässt sich schließen, dass in beiden Zelllinien MYCN (in JoMa1-MYCN) bzw. *Mycn* (in JoMa1-LIN28b) aktiv ist.

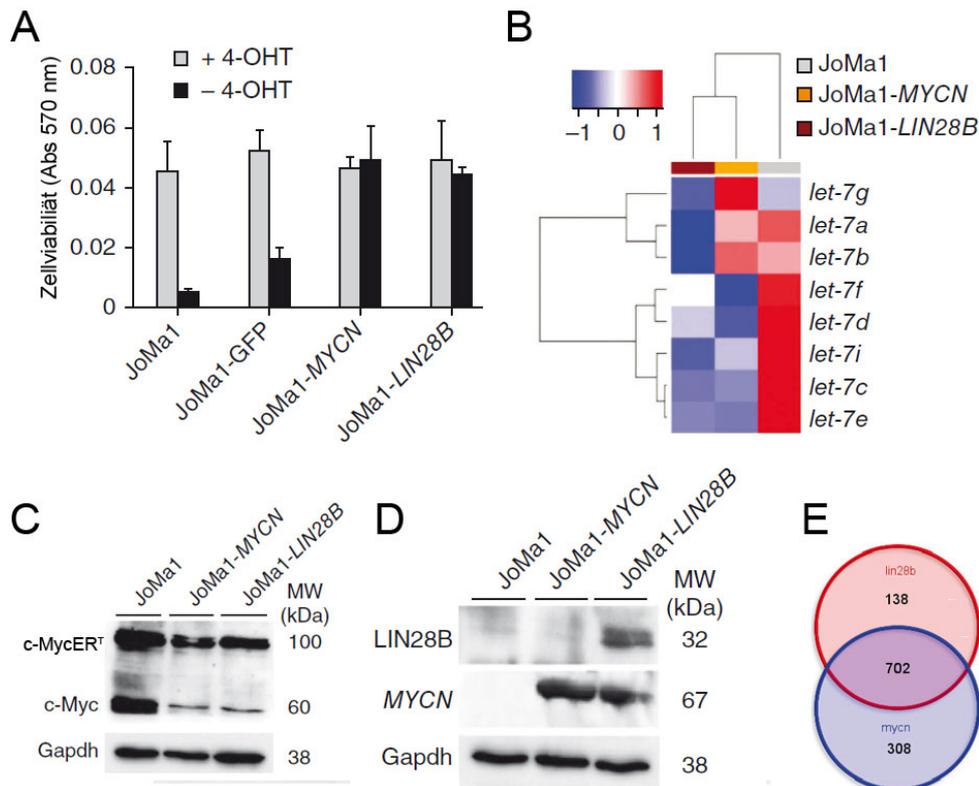


Abbildung 17: Charakterisierung der LIN28b-let-7-Mycn regulatorischen Achse *in vitro* in JoMa1 Zellen

(A) JoMa1 und JoMa1-GFP wiesen 72h nach 4-OHT Entzug eine geringe Zellviabilität auf. JoMa1-MYCN und JoMa1-LIN28b hingegen zeigten ohne 4-OHT eine ähnliche Zellviabilität wie JoMa1 und JoMa1-GFP Zellen. (B) Mit Hilfe einer qRT-PCR konnte die reprimierte *let-7* miRNA Expression (rot) nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich auch, dass die *let-7* miRNA Expressions Level von JoMa1 und JoMa1-MYCN ähnlicher sind als die von JoMa1-LIN28b. (C) Sowohl in JoMa1-MYCN als auch in JoMa1-LIN28b wird endogene c-Myc reprimiert. (D) Mycn Expression ist in JoMa1-LIN28b und JoMa1-MYCN gleichermaßen hochreguliert. Lin28b ist hingegen in JoMa1-MYCN nicht exprimiert. (E) Darstellung der unterschiedlich (138 bzw. 308) und gleich (702) regulierten Gene in JoMa1-LIN28b und JoMa1-MYCN als Venn-Diagramm (modifiziert nach ⁹¹).

5.4.7 Knockdown von *Lin28b* hat keinen Effekt auf die Expression von MYCN mit fehlender 3'-UTR

Um die Frage zu klären, ob Lin28b die MYCN Expression über *let-7* miRNAs reguliert wurde Lin28b in NHO2A Zellen mittels siRNA reprimiert. NHO2A Zellen sind murine Zellen, die aus dem Tumor einer TH-MYCN Maus etabliert wurden¹²³. Im Gegensatz zu anderen TH-MYCN abgeleiteten Zellen exprimieren NHO2A Zellen Lin28b. Im TH-MYCN Mausmodell und somit auch in NHO2A Zellen wird humane *MYCN* cDNA ohne den 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) exprimiert, so dass keine Regulation

von *MYCN* über miRNAs, die im 3'UTR binden, möglich sein sollte. Es zeigte sich, dass der knockdown von *Lin28b* die *Lin28b* Expression stark reduzierte. Die *MYCN* Expression blieb jedoch identisch im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 18 A). Außerdem war keine Veränderung der Zellviabilität feststellbar, was dafür spricht, dass die *MYCN* Expressionslevel gleich blieben, da die *let-7* miRNAs *MYCN* in diesem System nicht regulieren können (Abbildung 18 B). Wären die *MYCN* Expressionslevel gesunken, hätte dies zu einer signifikant geringeren Zellviabilität führen sollen, wie es Faisal et al. 2011 zeigen konnten⁵⁴. Zusätzlich zur Westernblot-Analyse und dem Zellviabilitätsassay wurde der Zustand der Zellen lichtmikroskopisch beurteilt (Abbildung 18 C). Auch hier zeigte sich keine Veränderung, was wiederum für gleich bleibende *MYCN* Expressionslevel spricht. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass *Lin28b* *MYCN* tatsächlich über *let-7* miRNAs reguliert und nicht einen anderen Mechanismus

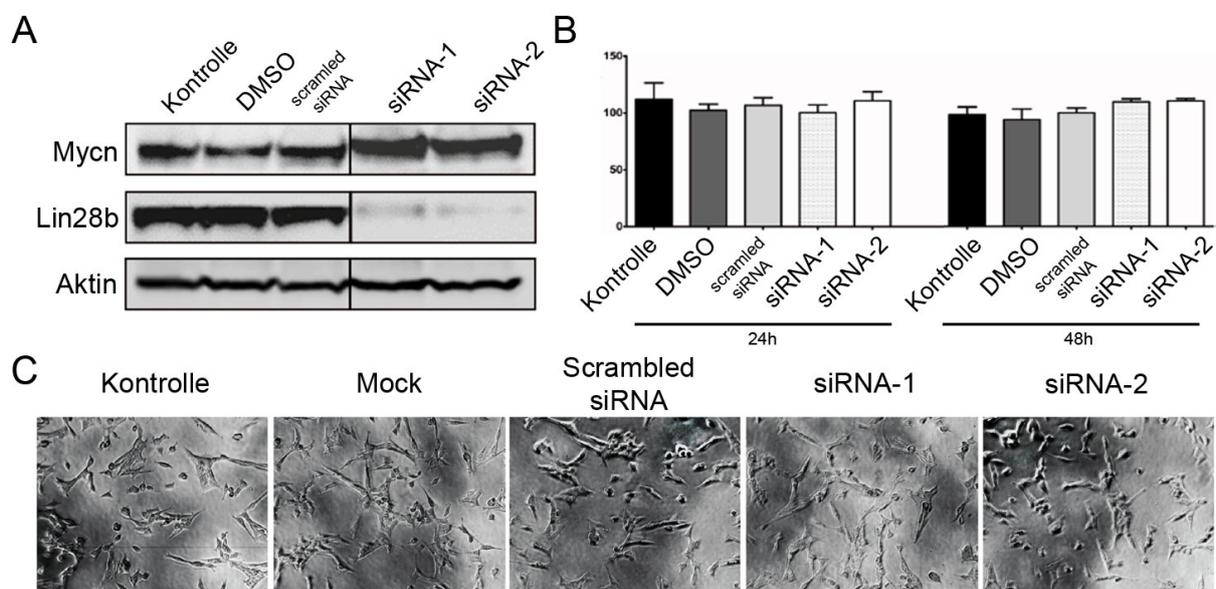


Abbildung 18: Knockdown von *Lin28b* hat keinen Effekt auf die Expression von *MYCN* mit fehlender 3' -UTR.

(A) Die Westernblot-Analyse zeigte, dass die Behandlung von NHO2A mit siRNA gegen *Lin28b* einen starken Rückgang der *Lin28b* Expression bewirkte. Die *MYCN* Expression blieb trotz *Lin28b* knockdown auf Grund der fehlenden 3'-UTR von *MYCN* unbeeinträchtigt. **(B)** Die Zellviabilität nach *Lin28b* knockdown ist in NHO2A Zellen unverändert. **(C)** NHO2A Zellen unterscheiden sich phänotypisch nach *Lin28b* knockdown nicht von Kontrollen. Außerdem war kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl festzustellen (modifiziert nach⁹¹).

5.4.8 Weitere Charakterisierung der LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Tumoren zeigte Ähnlichkeiten mit humanem Neuroblastom

In weiteren Experimenten wurden die Tumoren des LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Mausmodells hinsichtlich ihrer klinisch relevanten Markergenexpression untersucht. Dazu wurde aus dem Tumormaterial und entsprechenden Kontrollgeweben RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Tumoren die typischen NB Markergene Dopamin- β -Hydroxylase (*Dbh*), Tyrosinhydroxylase (*Th*) und paired-like homeobox 2b (*Phox2b*) exprimieren. Im Gegensatz dazu war in den Kontrollgeweben keine Expression dieser Gene zu beobachten (Abbildung 19 A). Durch Anfertigung einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass die Tumoren ein kleines blau-rundzelliges Erscheinungsbild haben (Abbildung 19 B I und II). Dieses Erscheinungsbild zeigt sich auch beim humanen NB. Außerdem wurde mit Paraffinschnitten auch eine 3,3'-Diaminobenzidin-Färbung für Tyrosinhydroxylase durchgeführt. Immunhistochemische Färbungen für Tyrosinhydroxylase werden auch zum Identifizieren humaner NB genutzt (Abbildung 19 B III und IV). Zusammengenommen weisen die Expression von *Dbh*, *Th*, *Phox2b* und die Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie die immunhistochemische Tyrosinhydroxylase Färbung darauf hin, dass es sich bei den Tumoren des LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Maus Modells um murine NB handelt.

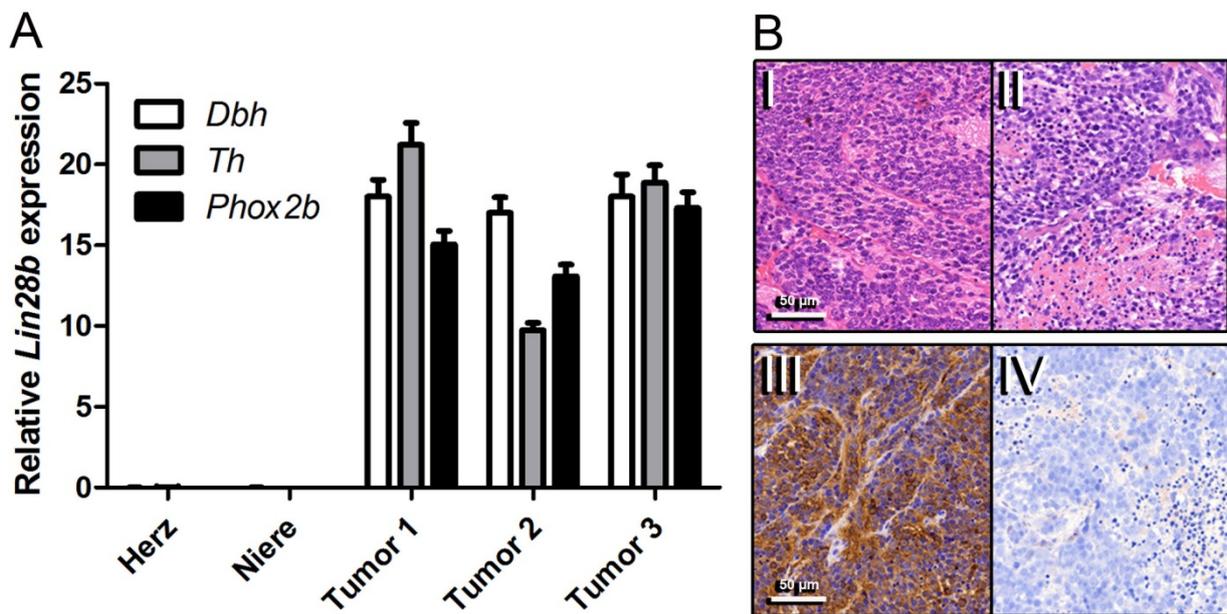


Abbildung 19: Ähnlichkeit der LSL-*Lin28b*;Dbh-*iCre* Tumoren zum humanen NB.

(A) qRT-PCR von drei Tumoren und Kontrollgewebe. In den Tumoren zeigte sich hohe Expression von *Dbh*, *Th* und *Phox2b*. (B) Hämatoxylin-Eosin-Färbung von zwei exemplarischen Tumoren. Die Tumoren wiesen ein kleines blau-rundzelliges Erscheinungsbild auf (I und II). Th positiv gefärbter Gewebeschnitt eines Tumors (III) und die dazugehörige Negativkontrolle, bei der nur der Zweitantikörper genutzt wurde (IV) (modifiziert nach ⁹¹).

5.4.9 Chromosomale Aberrationen der LSL-*Lin28b*;Dbh-*iCre* Tumoren entsprechen teilweise humanen NB-typischen Aberrationen

Die Chromosomen der Maus entsprechen nicht denen des Menschen, es gibt jedoch große syntene Abschnitte. So entspricht zum Beispiel ein Teil des murinen Chromosom 11q dem des humanen Chromosom 17q¹²⁴. Zur Untersuchung der chromosomalen Aberrationen wurde aus Tumoren des LSL-*Lin28b*;Dbh-*iCre* Mausmodells und aus deren Schwanzbiopsien genomische DNA isoliert. Diese DNA wurde zur array-CGH Analyse genutzt (4.16.11). Dabei wird die DNA der Schwanzbiopsie mit der des Tumors hinsichtlich chromosomaler Aberrationen verglichen. Es wurden insgesamt 15 Tumoren untersucht. Darunter waren neun Tumoren, die sich aus der Nebenniere entwickelten, vier Tumoren, die sich aus dem Ganglion Coeliacum entwickelten und zwei Tumoren, die sich aus dem oberen Cervicalganglion entwickelten. Zusätzlich wurde einer der retransplantierten Tumoren untersucht.

Es zeigte sich, dass 11 der 15 untersuchten Tumoren einen Zugewinn an Chromosom 3 aufwiesen. Dabei waren sowohl die Tumoren der Nebennieren, des Ganglion Coeliacum, als auch die des oberen Cervicalganglion betroffen (Abbildung 20 A und B; Tabelle 13). Sechs der Tumoren wiesen einen Verlust des Chromosoms 14q auf. Auch dieser Verlust betraf sowohl die Tumoren der Nebennieren, des Ganglion Coeliacum, als auch das obere Cervicalganglion (Abbildung 20 A und C; Tabelle 13). In drei Tumoren kam es zu einem Zugewinn des Chromosoms 11q. Zweimal trat dieser Zugewinn in je einem Tumor des Ganglion Coeliacum auf und einmal in einem Tumor der Nebenniere (Abbildung 20 A und D; Tabelle 13). Vereinzelt war auch ein Verlust des Chromosoms 4q (Tumor eines Ganglion Coeliacum), ein Zugewinn des Chromosoms 7 (Tumor eines Ganglion Coeliacum) und ein Zugewinn des Chromosoms 10 (Tumor einer Nebenniere) zu beobachten (Abbildung 20 A; Tabelle 13). Zwei Tumoren der Nebenniere von verschiedenen Mäusen zeigten keine chromosomale Aberrationen (Tabelle 13). Zusätzlich zu den Primär-Tumoren wurde auch ein retransplantierte Tumor untersucht (siehe Abschnitt 5.4.10; Tabelle 13). Dieser Tumor wies einen Zugewinn des Chromosoms 3, 11, 12 und Teile von 13 auf (Tabelle 13). Alle gefundenen chromosomalen Aberrationen sind in Abbildung 20 A grafisch dargestellt. Außerdem sind die Aberrationen in Tabelle 13 aufgelistet und die homologen Bereiche der humanen Chromosomen mit angegeben.

Drei Tumoren des LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* Mausmodells zeigte einen Zugewinn des Chromosoms 11q (Abbildung 20 D). Interessanterweise konnte dieser Zugewinn auch in 2 der 6 JoMa1-MYCN Tumore nachgewiesen werden (Abbildung 20 E). Dies lässt darauf schließen, dass dieser Zugewinn wichtig für die Tumorprogression ist.

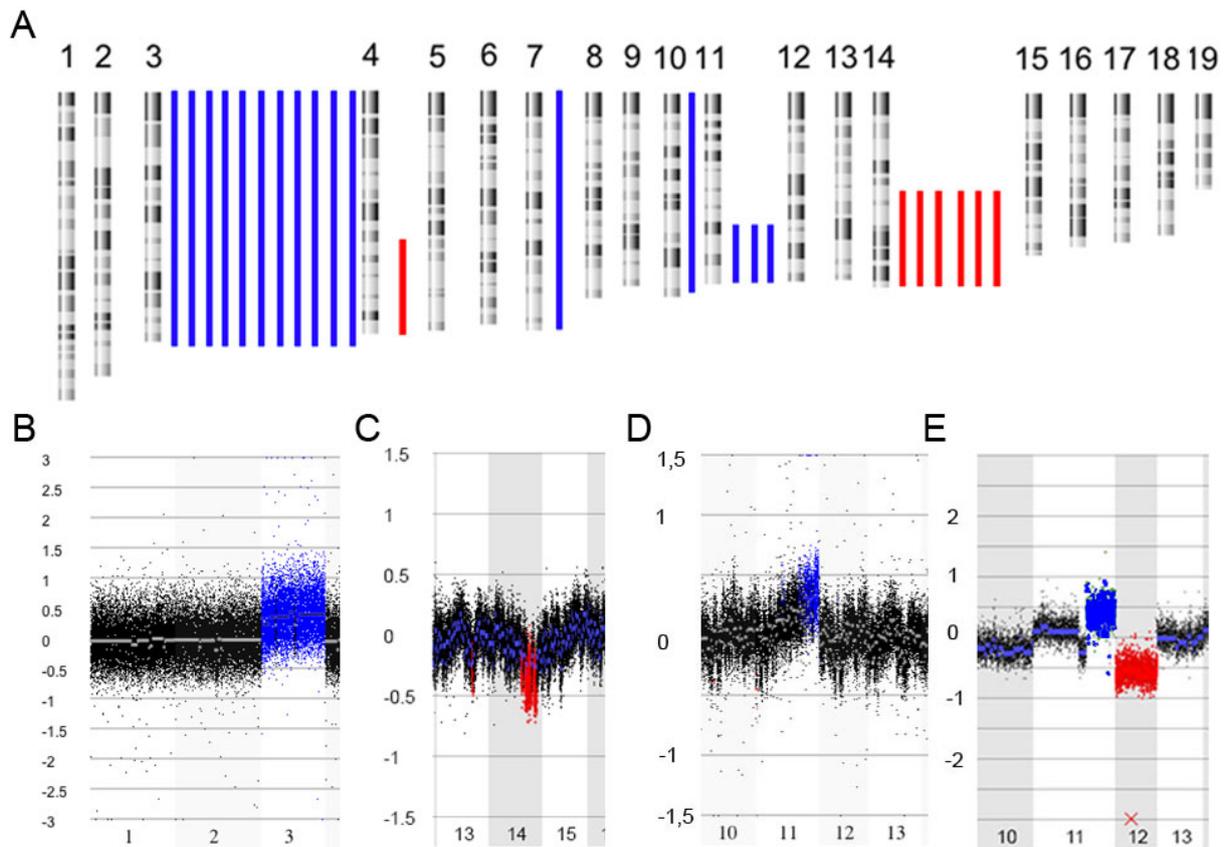


Abbildung 20: Übersicht der chromosomalen Aberrationen des LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Mausmodells und von JoMa1-MYCN Tumoren.

(A) Übersicht aller gefundenen chromosomalen Aberrationen von 15 LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Tumoren (Blau=Zugewinn von DNA; Rot=Verlust von DNA). (B) Repräsentatives Beispiel für den Zugewinn an Chromosom 3. (C) Beispiel für einen Verlust des Chromosoms 14q. (D) Beispiel für einen Zugewinn des Chromosoms 11q. (E) Beispiel für den Zugewinn des Chromosoms 11q in einem JoMa1-MYCN Tumor.

Tabelle 13: Übersicht über die chromosomalen Aberrationen des LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Mausmodells und den homologen Bereichen der humanen Chromosomen.

Maus	Tumor	Aberration		Otholog zum Humanen Chromosom	
		Zugewinn	Verlust	Zugewinn	Verlust
89260 2xL/1xR	Nebenniere links	Chr 3	-	Chr 1q/q, 3q, 4q/p	
	Nebenniere rechts	Chr 3	-	Chr 1q/q, 3q, 4q/p	
	Ganglion Coeliacum	Chr 3, Chr 11q distal,	-	Chr 1q/q, 3q, 4q/p, 17q	
89261 1xL	Nebenniere links	Chr 3	Chr 14q	Chr 1q/q, 3q, 4q/p	Chr 8, 10, 13, 14
	Nebenniere rechts	Chr 3	Chr 14q	Chr 1q/q, 3q, 4q/p	Chr 8, 10, 13, 14
	Ganglion Coeliacum	Chr 3	Chr 14q	Chr 1q/q, 3q, 4q/p	Chr 8, 10, 13, 14
90788 2xL	Nebenniere rechts	Chr 3, Chr 11q distal,	Chr 14q	Chr 1q/q, 3q, 4q/p, 17q	Chr 8, 10, 13, 14
	Nebenniere links	Chr 10	Chr 14q	Chr 2, 10, 19, 21, 22	Chr 8, 10, 13, 14
	Oberes Cervicalganglion	Chr 3	Chr 14q	Chr 1q/q, 3q, 4q/p	Chr 8, 10, 13, 14
89261 Lu	Nebenniere links	-	-		
	Nebenniere rechts	Chr 3	-	Chr 1q/q, 3q, 4q/p	
	Ganglion Coeliacum	Chr 3, Chr 11q distal,	-	Chr 1q/q, 3q, 4q/p, 17q	
96653 Lo	Ganglion Coeliacum	Chr 7	Chr 4q	Chr 11, 15, 16	Chr 1
91809 Ru	Nebenniere rechts	-	-		
89261 1xL Retransplantiert	Retransplantiert/ Abdomen	Chr 3, 11, 12, Teile von 13	Kein		

5.4.10 Lin28b getriebene Tumoren sind invasiv

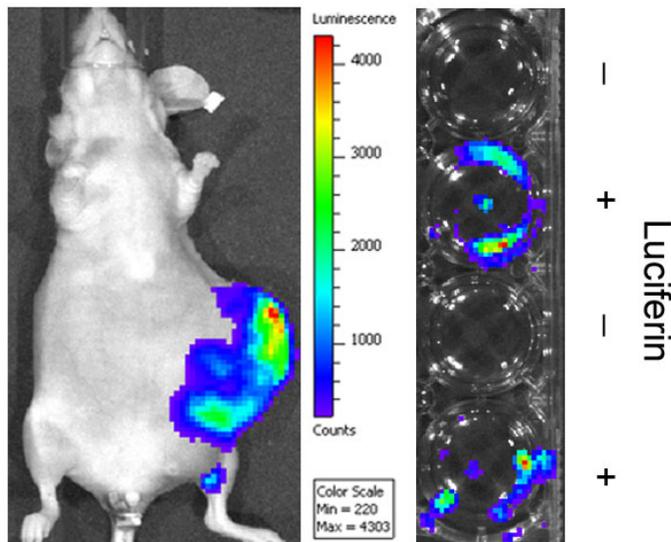


Abbildung 21: Transgenexpression in LSL-Lin28b;Dbh-iCre Xenografts.

Nach Aufarbeitung der Tumorzellen aus einem LSL-Lin28b;Dbh-iCre transgenen Tier wurden mittels *in vivo* Biolumineszenz Bildgebung die in eine Nacktmaus s.c. injizierten Zellen hinsichtlich ihrer Transgenexpression sowohl *in vivo* (links) als auch *in vitro* (rechts) nachgewiesen. Das linke Bild zeigt die Transgenexpression nach 21 Tagen. Das rechte Bild zeigt die Transgenexpression nach 3 Tagen Kultivierung.

Während der Embryonalentwicklung sind Hyperplasien an der Nebenniere häufig zu beobachten¹²⁵. Diese Hyperplasien gehen jedoch meist im Laufe der weiteren Entwicklung zurück. Um auszuschließen, dass es sich bei den Lin28b getriebenen Tumoren nicht um eine Hyperplasie der Nebenniere handelt, wurden die Tumoren aufgearbeitet (siehe 4.19.2) und die Tumorzellen i.p. oder s.c. in eine Nacktmaus injiziert. Mittels *in vivo* Biolumineszenz-Bildgebung wurde die Transgenexpression der aufgearbeiteten Zellen überprüft (4.19.1). Es zeigte sich, dass sowohl die verarbeiteten Zellen *in vitro*, als auch die Zellen des Xenografts *in vivo* Luciferaseaktivität aufwiesen (Abbildung 21). In den Nacktmäusen entwickelten sich teilweise mehrere Tumoren im Abdomen und makroskopisch sichtbare Metastasen in der Leber (Abbildung 22 A). Lebermetastasen kommen auch beim humanen NB häufig vor und konnten schon in anderen Mausmodellen des NB diagnostiziert werden⁶⁵. Aus dem Tumor und der Leber wurde jeweils genomische DNA isoliert und die Präsenz des Transgenkonstrukts sowie der flox-out der Polyadenylierung-Stop-Sequenz mittels PCR nachgewiesen (Abbildung 22 C und D). Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Tumore zeigten ein klein, blau-rundzelliges Erscheinungsbild (Abbildung 22⁵⁶ B I), welches auch in den Metastasen der Leber beobachtet wurden (Abbildung 22 B II und III). Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen, dass es sich bei den LSL-Lin28b;Dbh-iCre Tumoren nicht um Hyperplasien handelt, sondern um aggressive und invasive NB.

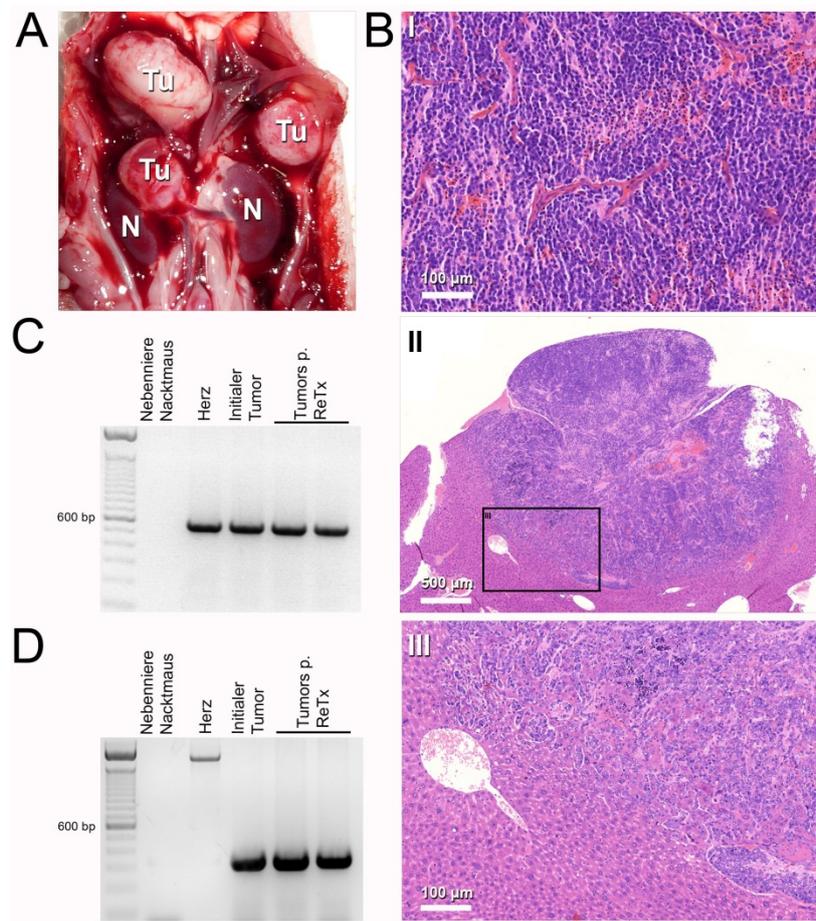


Abbildung 22: Aggressives und invasives Wachstum der LSL-Lin28b;Dbh-iCre Xenografts.

(A) Makroskopische Aufnahmen der nach i.p. Injektion der Tumorzellen entstandenen abdominalen Tumoren. (B I) Die abdominalen Tumore zeigen ein klein blau-rundzelliges Erscheinungsbild. (B II und III). Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Leber der Nacktmaus, die das invasive Wachstum einer Metastase des Primärtumors zeigt. B III zeigt eine Nahaufnahme des Ausschnitts in B II (modifiziert nach ⁹¹).

5.4.11 Behandlung von LSL-Lin28b;Dbh-iCre Tumoren mit dem Bromodomänen-Inhibitor JQ1

Im Gegensatz zu anderen NB Mausmodellen^{13,65,66} wird im LSL-Lin28b;Dbh-iCre Mausmodell endogenes Mycn überexprimiert. Das hat den Vorteil, dass stromaufwärts von Mycn kein artifiziell eingebrachter, sondern der endogene Promotor liegt. Delomere et al. konnten zeigen, dass Proteine mit Bromodomänen (z.B BRD4), die acetylierte Lysine binden können und dadurch die Struktur des Chromatins beeinflussen, u.a. an den Promotor von c-Myc binden⁵⁶. Puissant et al.⁵⁵ haben belegt, dass man mit dem Bromodomänen-Inhibitor JQ1 die Expression von

MYCN herunter regulieren kann. Dies führt in Xenografts mit humanen NB Zelllinien zu signifikant geringerem Tumorwachstum⁵⁵.

Um die Wirkung von JQ1 auf die Tumoren des LSL-*Lin28b*;*Dbh-iCre* Mausmodells zu untersuchen, wurden LSL-*Lin28b*;*Dbh-iCre* Tumoren entnommen, aufgearbeitet (4.19.2) und s.c. in vier Nacktmäuse injiziert. Zwei der Mäuse wurden nach dem Erreichen von 200 mm³ Tumolvolumen für drei Tage mit dem Lösungsmittel behandelt und die anderen zwei mit JQ1 (50 mg JQ1 pro kg Körpergewicht gelöst in einer Mischung aus DMSO [12,5%] und 5%-iger Glucose [87,5%], Abbildung 23 A). Nach drei Tagen wurden die Nacktmäuse getötet und die Tumoren asserviert. Zum einen wurden von den Tumoren jeweils eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefertigt (Abbildung 23 B). Zum anderen wurden immunhistochemische Färbungen von Ki67, welches nur bei proliferierenden Zellen zu finden ist, und gespaltene Caspase 3, welche nur in apoptotischen Zellen in dieser Form auftritt, angefertigt. Es wurde deutlich, dass die Behandlung mit JQ1 den Anteil an proliferierenden Zellen stark verringert (Abbildung 23 B) und den Anteil apoptotischer Zellen stark erhöht (Abbildung 23 B). In Proteinlysaten konnte gezeigt werden, dass *Lin28b* gleichmäßig in allen Tumoren exprimiert wird; *Mycn* ist hingegen stark herunter reguliert (Abbildung 23 C). Diese Resultate weisen darauf hin, dass JQ1 die Transkription von *Mycn* effektiv herunter reguliert, was sich in einer geringeren Proteinmenge von *Lin28b* zeigte (Abbildung 23 D). Der hohe Anteil an apoptotischen Zellen (gespaltene Caspase positiv) und der geringe Anteil an proliferierenden Zellen (Ki67 positiv) machen außerdem deutlich, dass die Zellen stark abhängig von der *Mycn* Expression sind. Ohne ausreichende *Mycn* Expression leiten die Zellen die Apoptose ein und stellen die Proliferation ein.

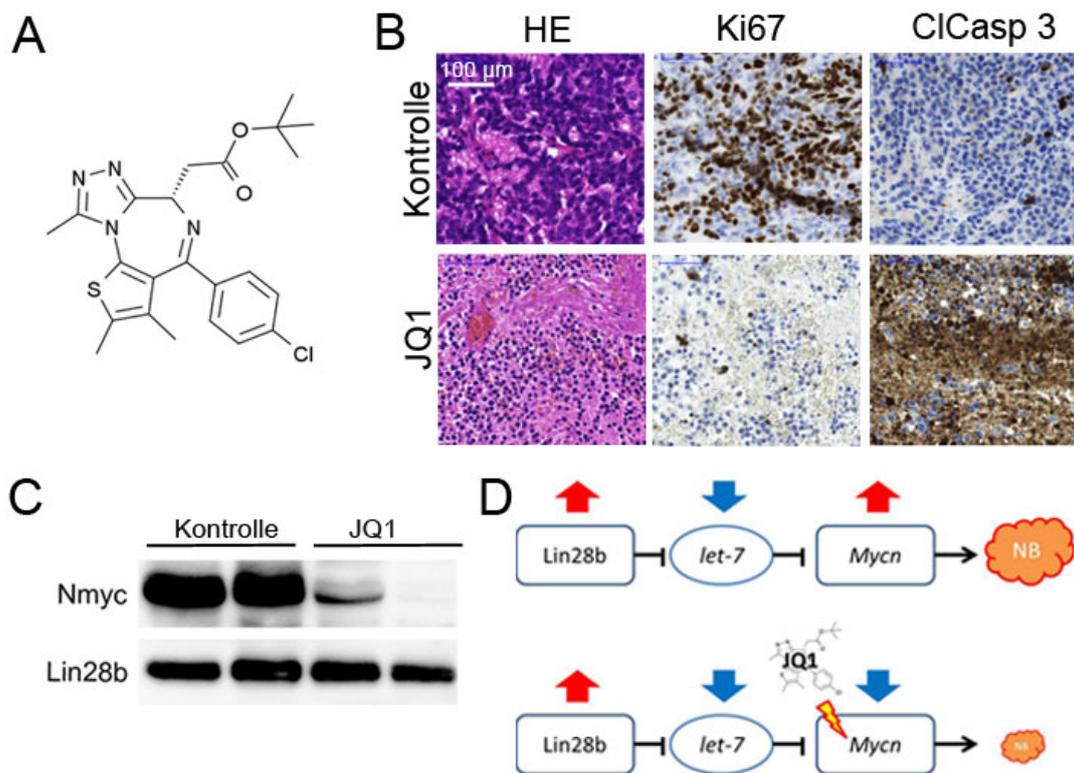


Abbildung 23: Inhibierung der Lin28b-let-7-Mycn Achse in LSL-Lin28b;Dbh-iCre Xenografts mit JQ1.

(A) Chemische Struktur von JQ1 (Quelle: http://en.wikipedia.org/wiki/File:JQ1_structure.png). (B) Hämatoxylin-Eosin-Färbung, die das klein blau-rundzellige Erscheinungsbild in den Kontrollen zeigt. In den JQ1 behandelten Tumoren sind die Zellkerne klein (blau/violett) und das Zytoplasma (rötlich) größer als in der Kontrolle. Der Anteil proliferierender Zellen wurde mittels Ki67-Färbung bestimmt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mittels gespaltener Caspase 3 Färbung bestimmt. In JQ1 behandelten Tumoren ist der Anteil proliferierender Zellen deutlich sichtbar verringert. Des Weiteren ist der Anteil an apoptotischen Zellen in den JQ1 behandelten Tumoren deutlich sichtbar erhöht. (C) JQ1 Behandlung verringert die Mycn Expression im Vergleich zu den Kontrollen. Die Lin28b Expression ist hingegen in beiden Gruppen identisch. (D) Schema der Lin28b-let-7-Mycn regulatorischen Achse im NB. (Oben) Durch Lin28b Überexpression kommt es zur geringeren let-7 miRNA Expression, wonach die Mycn Expression ansteigt. Behandelt man die Tumoren mit JQ1 (unten) kommt es trotz geringer let-7 miRNA Expression nicht zu einem Anstieg der Mycn Expression (modifiziert nach⁹¹).

5.4.12 Der Bromodomänen-Inhibitor JQ1 reduziert die Zellviabilität von humanen Neuroblastomzelllinien

Um zu untersuchen, ob JQ1 auch in humanen NB Zellen die Zellviabilität senkt wurden 4 NB Zelllinien für 72h mit JQ1 behandelt und die mittlere inhibitorische Konzentration berechnet (IC_{50}). Es wurden zwei humane NB Zelllinien mit MYCN Amplifikation (Kelly und SK-N-BE) und zwei ohne MYCN Amplifikation (SH-EP und SH-SY5Y) gewählt. Mittels MTT Zellviabilitätsmessung konnte gezeigt werden, dass die IC_{50} aller Zelllinien im nanomolaren Bereich lagen (Abbildung 24 A). Die mittlere

IC₅₀ der beiden Zelllinien mit *MYCN* Amplifikation lag bei 172 nM und die mittlere IC₅₀ der Zelllinien ohne *MYCN* Amplifikation lag bei 147 nM (Abbildung 24 A). Die Zelllinie SH-SY5Y exprimiert kein *MYCN* (aber c-Myc)¹²⁶ und hatte die höchste IC₅₀ mit 294 nM. Die Zelllinie SH-EP zeigte nur minimale *MYCN* Expression und dafür jedoch c-Myc Expression¹⁰⁷. In SH-SY5Y und SH-EP lässt sich die Sensibilität gegenüber JQ1, also durch die Herunterregulation von c-Myc erklären. Mittels mikroskopischer Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass JQ1 behandelten Zellen deutlich geringere Zellzahlen aufwiesen und sich Zellreste toter Zellen in Suspension befanden (Abbildung 24 B). Diese Daten zeigen, dass JQ1 auch in humanen NB Zelllinien die Zellviabilität stark verringert. Die Wirkung von JQ1 auf *MYCN* und c-Myc Expression wurde mittels Westernblot untersucht. Es zeigte sich, dass *MYCN* in Kelly und SK-N-BE nach JQ1 Behandlung geringer exprimiert wurde (Abbildung 24 C). In SH-EP Zellen war bei basal geringen *MYCN*-Spiegeln keine Änderung der *MYCN* Expression feststellbar (Abbildung 24 C). Statt Änderungen in der *MYCN* Expression konnte in SH-EP und SH-SY5Y Zellen ein Rückgang der c-Myc Expression nach JQ1 Behandlung beobachtet werden (Abbildung 24 C). In SH-SY5Y war mittels Westernblot-Analyse kein *MYCN* detektierbar (Daten nicht gezeigt).

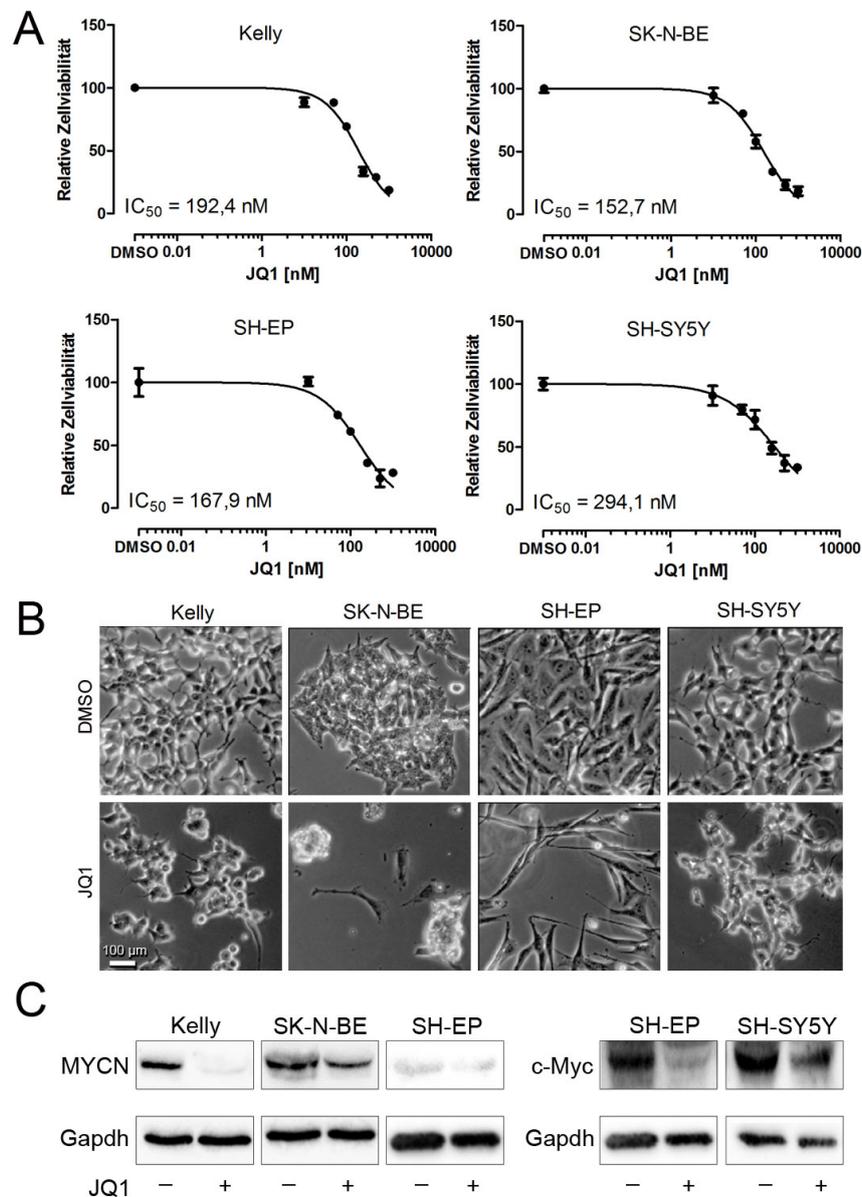


Abbildung 24: JQ1 reduziert die c-Myc- und MYCN Expression sowie die Zellviabilität von humanen NB Zelllinien.

(A) MTT Tests nach 72h JQ1 Behandlung zeigten, dass die IC_{50} aller gewählten Zelllinien im nanomolaren Bereich lagen (Kelly $IC_{50} = 192$ nM; SK-N-BE $IC_{50} = 152$ nM; SH-EP $IC_{50} = 167$ nM; SH-SY5Y $IC_{50} = 294$ nM). **(B)** Mikroskopische Aufnahmen zeigten, dass nach 72h JQ1 Behandlung deutlich weniger viable Zellen vorhanden waren. Außerdem befanden sich in den mit JQ1 behandelten Zellen viele Reste toter Zellen in Suspension. **(C)** Westernblot-Analysen zeigten, dass MYCN in Kelly und SK-N-BE nach JQ1 Behandlung geringer exprimiert wurde. In SH-EP Zellen war sehr geringe MYCN Expression zu beobachten, wobei sich kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zeigte. C-Myc wurde vor allem in SH-SY5Y exprimiert. Durch JQ1 Behandlung wurde c-Myc in SH-EP und SH-SY5Y geringer exprimiert.

5.4.13 Der Bromodomänen-Inhibitor JQ1 reduziert die Zellviabilität in Xenografts von humanen Neuroblastomzelllinien

Um die Wirkung von JQ1 auf humane NB Zelllinien *in vivo* zu untersuchen, wurde die humane NB Zelllinie IMR5/75 genutzt. Die IMR5/75 Zelllinie trägt ungefähr 75 Kopien des *MYCN* Gens¹²². Zunächst wurde die Sensitivität der IMR5/75 Zellen gegenüber JQ1 *in vitro* validiert, wobei sich eine IC₅₀ bei 75 nM zeigte (Abbildung 25 A). Als Kontrolle dienten humane Fibroblasten, die mit der gleichen Konzentrationsreihe wie IMR5/75 behandelt wurden. Die Fibroblasten zeigten eine theoretische IC₅₀ von 28 µM, was etwa dem Faktor 1000 gegenüber IMR5/75 entspricht (Abbildung 25 A). Für die Untersuchung der Wirkung von JQ1 *in vivo* wurden 1x10⁷ IMR5/75 Zellen jeweils s.c. in eine Nacktmaus injiziert (n=6). Nach dem Tag der Injektion wurden die Tumoren aller zwei Tage mit einer Schieblehre vermessen. Ab einer Tumorgroße von 200 mm³ wurden drei der Mäuse zwei Mal täglich für drei Tage mit JQ1 behandelt und 4 Stunden nach der letzten Behandlung getötet und die Tumoren asserviert (50 mg JQ1 pro kg Körpergewicht gelöst in DMSO [12,5%] und Glucose 5%-iger [87,5%]). Die anderen drei Mäuse wurden nur mit DMSO (12,5%) und Glucose 5%-iger (87,5%) behandelt. Die Tumoren wurden immunhistologisch analysiert und die Expression von *MYCN* mittels Westernblot untersucht. Durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigte sich, dass der Anteil an klein blau-rundzelligen Zellen nach JQ1 Behandlung zurückging und die JQ1 behandelten Tumoren wiesen größere Stroma-Anteile auf als die Kontrollen (Abbildung 25 B). Durch eine Anfärbung des Zellteilungsmarkers Ki67 konnte gezeigt werden, dass sich der Anteil an proliferierenden Zellen nach JQ1 Behandlung signifikant verringert (Abbildung 25 A und B). Außerdem wurde der Anteil von apoptotischen Zellen anhand gespaltener Caspase 3 gemessen. Es wurde deutlich, dass in den JQ1 behandelten Tumoren der Anteil an apoptotischen Zellen signifikant erhöht war. Dazu wurden die Bilder der immunohistochemischen Analysen quantitativ mit dem Programm „ImageJ“ ausgewertet (Abbildung 25 B und C, vgl. Abschnitt 4.20). Western Blot Analysen zeigten, dass die *MYCN* Expression in den JQ1 behandelten Tumoren geringer war als in den Tumoren, die mit dem JQ1 Lösungsmittel behandelt wurden (Abbildung 25 D). Zusammengefasst ergibt sich, dass sich durch JQ1-Behandlung von IMR5/75 Xenografts der Anteil an mitotischen Zellen reduziert, der Anteil an apoptotischen Zellen erhöht und die *MYCN* Expression reprimiert wird.

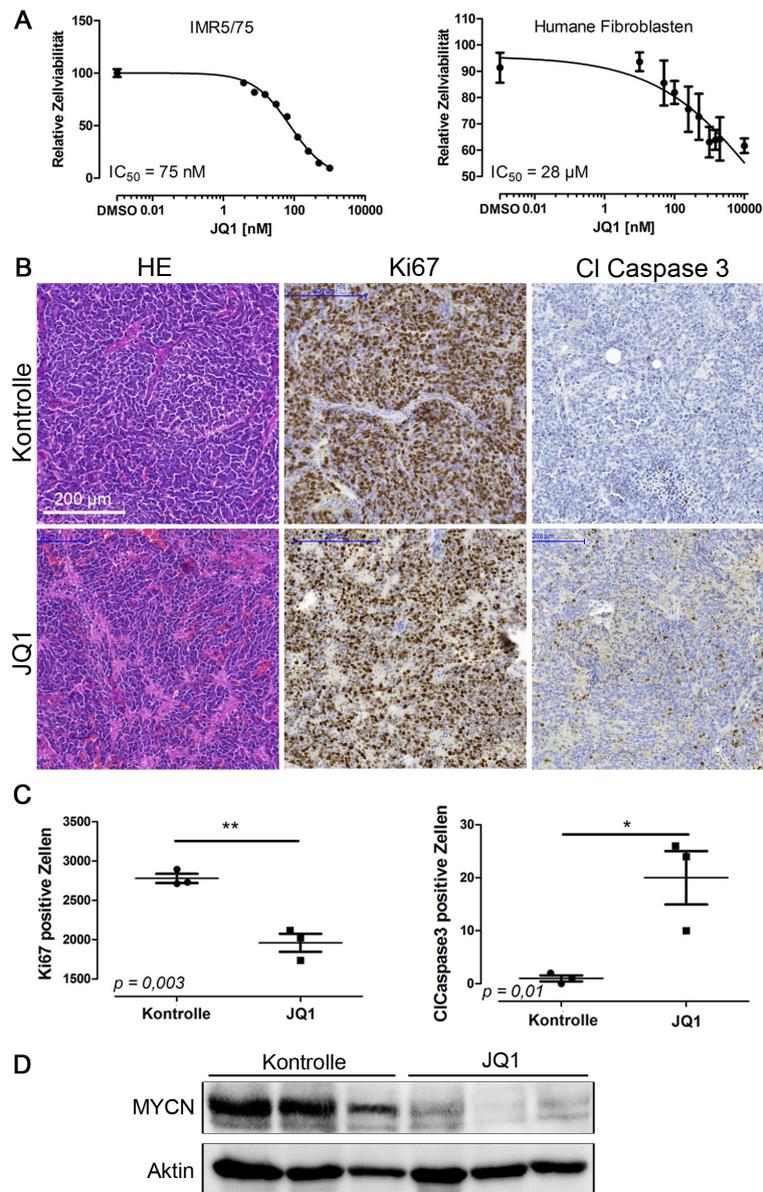


Abbildung 25: Reduktion der Zellviabilität von Xenografts der humanen Neuroblastom Zelllinie IMR5/75 durch JQ1

(A) Die Zellviabilität von IMR5/75 Zellen wird durch nanomolare Konzentrationen von JQ1 gesenkt, während hingegen Fibroblasten eine etwa 1000fach höhere Konzentration nötig ist, um einen ähnlichen Effekt zu erzielen. **(B und C)** Immunhistochemische Analysen der Xenografts. Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Kontrolltumors und eines mit JQ1 behandelten Tumors. Der Anteil an klein blau-rundzelligen Zellen ist in dem JQ1 behandelten Tumor geringer, als im Kontrolltumor. Außerdem zeigt der JQ1 behandelte Tumor mehr stromareiche Anteile. Der Anteil von proliferierenden Zellen wurde mittels Ki67-Färbung bestimmt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mittels gespaltener Caspase 3 Färbung bestimmt. In JQ1 behandelten Tumoren war der Anteil proliferierender Zellen signifikant verringert. Des Weiteren war der Anteil an apoptotischen Zellen in den JQ1 behandelten Tumoren signifikant erhöht. **(C)** Nachweis der MYCN Expression mittels Westernblot. In JQ1 behandelten Tumoren war die MYCN Expression deutlich niedriger, als in Tumoren die nur mit dem Lösungsmittel behandelt wurden.

5.5 Nutzen des LSL-*Lin28b* Mausmodells für die Untersuchung anderer Tumorentitäten

Durch Verpaarungen von LSL-*Lin28b* Mäusen mit *Alb-Cre* Mäusen zeigte sich die Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) nach etwa 300 Tagen in 10% der Tiere (n=10; Abbildung 26 A und B). Das *Alb-Cre* Mausmodell exprimiert die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Albumin Promotors¹²⁷. Albumin wird in reifen Hepatozyten exprimiert¹²⁷. Eine Rolle von LIN28b bei der Entstehung vom HCC konnte 2006 zumindest *in vitro* bestätigt werden^{128,129}. Das LSL-*Lin28b*;*Alb-Cre* Mausmodell ist das erste Mausmodell, das die Rolle von Lin28b im HCC *in vitro* beschreibt (Daten nicht gezeigt).

Außerdem wurden LSL-*Lin28b* Mäuse mit *Nes-Cre* Mäusen verpaart. 100% der LSL-*Lin28b*;*Nes-Cre* Mäuse wiesen in einem Alter von 13 Tagen einen vergrößerten Kopf und Koordinationsstörungen auf (Abbildung 26 C; n=2). Außerdem waren die doppeltransgenen Tiere deutlich kleiner, als Tiere gleichen Alters (Daten nicht gezeigt). Nestin ist ein intermediär Filament, das im Kleinhirn und im Bulbus Olfactorius exprimiert wird. *Nes-Cre* Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Nestin Promotors^{130,131}. Es konnte gezeigt werden, dass hohe LIN28b Expression mit einer schlechten Prognose für Patienten mit Medulloblastomen korreliert¹³². Das Medulloblastom ist ein Tumor des Kleinhirns. Daher ist es gut möglich, dass Lin28b die Entstehung von Medulloblastomen in diesem Modell hervorruft. Zu diesem Zeitpunkt ist die Charakterisierung des LSL-*Lin28b*;*Nes-Cre* Mausmodells jedoch noch nicht abgeschlossen.

Weitere Verkeuzungen mit diversen Cre-Rekombinase Stämmen sind möglich, um die Wirkung von Lin28b Überexpression in diversen Geweben zu untersuchen.

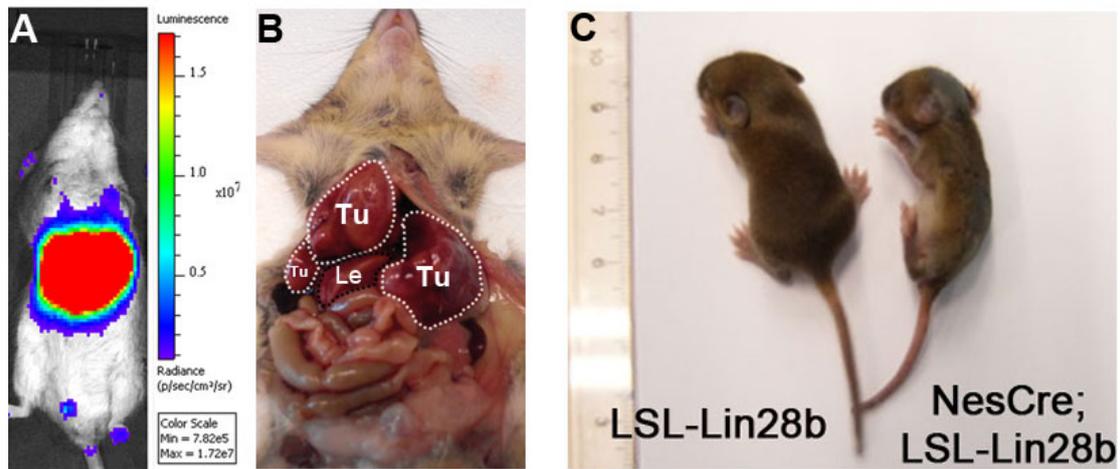


Abbildung 26: Hinweise auf die Funktion von Lin28b in anderen Tumorentitäten.

(A) Die Co-Expression der Luciferase und des Lin28b Transgens konnten in *Alb-Cre;LSL-Lin28b* Tieren gezeigt werden. **(B)** Die Sektion von einer von 10 *Alb-Cre;LSL-Lin28b* Mäusen zeigte die Präsenz eines Lebertumors (Tu = Tumor; Le = Leber). **(C)** Vergleich einer *LSL-Lin28b* Maus und einer doppelt-transgenen *Nes-Cre;LSL-Lin28b* Maus. Die doppelt-transgenen Maus ist deutlich kleiner und hat Koordinationsprobleme (unpubliziert).

6 Diskussion

6.1 Nutzung von JoMa1 zur Validierung potentieller Onkogene des Neuroblastoms

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die Zelllinie JoMa1 geeignet ist, um pathogenetische Prozesse des NB zu untersuchen. Die zugrundeliegende Annahme war, dass das NB aus Neuralleisten Vorläuferzellen (NLVZ) entsteht. Dafür sprechen die Lokalisationen des NB, die denen migrierender NLVZ entsprechen¹¹. Außerdem führt Expression von MYCN unter dem neuralleistenspezifischen Promotor von Tyrosinhydroxylase zu murinen NB¹³. Des Weiteren weist das Vorhandensein von NB *in situ* auf die NLVZ als Ursprung des NB hin¹². Darüber hinaus ähneln sich die Expressionsmuster von NB und Neuroblasten¹⁴ (3.4). JoMa1 eine Zelllinie ist, die alle Kriterien einer NLVZ-Linie erfüllt. JoMa1 Zellen werden durch 4-OHT induzierbares c-MYC in einem proliferierenden und dedifferenzierten Zustand gehalten. Ohne 4-OHT ist die Proliferation hingegen stark reduziert und JoMa1 Zellen differenzieren.

Erste Hinweise zur Stützung der Hypothese ergaben sich nach MYCN Transfektion von JoMa1 Zellen. Die JoMa1 Zelllinie fungieren hierbei ähnlich wie BaF3 Zellen in einem Transformationsassay⁶⁴. Die Überexpression von MYCN führte in JoMa1 Zellen zur Transformation *in vitro* und *in vivo*¹¹³. Dies zeigt, dass die Überexpression von MYCN in NLVZ wahrscheinlich ein wichtiger Schritt bei der Entstehung eines NB sein könnte. In Xenografts konnte gezeigt werden, dass transformierte JoMa1-MYCN Zellen *in vivo* ihre Proliferation beibehalten und dies zur Entstehung von Tumoren führt. Ein weiterer Punkt, der für die Eignung des JoMa1-Systems spricht, sind die Expression der NB-Markergene TH, Phox2b, NSE und CD56 (5.1.1) in den Tumoren, die durch JoMa1-MYCN hervorgerufen werden. Analog hierzu lassen sich TH, Phox2b und NSE mRNAs im Blut von NB Patienten nachweisen⁹⁸⁻¹⁰⁰. Mittels Messung von CD56 im Knochenmark werden Metastasen bei NB Patienten diagnostiziert⁹⁶. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass es sich bei den JoMa1-MYCN induzierten Tumoren um Neuroblastome handelt. Damit konnte gezeigt werden, dass sich NLVZ mittels MYCN transformieren lassen und diese transformierten Zellen *in vivo* NB bilden.

Interessanterweise scheinen die MYCN Expressionslevel in JoMa1-MYCN Tumoren mit der Wachstumsrate der Tumoren zu korrelieren. Es zeigte sich, dass Tumoren mit geringer MYCN Expression länger brauchten, um das Abbruchkriterium von \geq

1000 mm³ Tumolvolumen zu erreichen, als Tumoren mit höherer MYCN Expression (siehe 5.1). Die Tumoren JoMa1-MYCN 1 und 2 haben nur geringe MYCN Expression und wuchsen ca. 100 Tage, bis sie ein Volumen von ≥ 1000 mm³ erreichten, während die JoMa1-MYCN Tumoren 3-6 die gleichen Ausmaße nach ca. 60 Tage erreichten (5.1). Ein ähnlicher Effekt zeigt sich auch im TH-MYCN Mausmodell, bei dem MYCN unter der Kontrolle eines Tyrosinhydroxylase Promotors exprimiert wird. Homozygote TH-MYCN Mäuse haben mehr MYCN Transkripte und bekommen signifikant früher einen Tumor als heterozygote Tiere¹³³.

Möglicherweise beeinflussen weitere genetische Faktoren das Wachstum der JoMa1-MYCN Tumoren. Mittels aCGH konnte gezeigt werden, dass die schneller wachsenden Tumoren 3-6 jeweils einen Bereich des Chromosoms 8.86p und des Bereichs 15q amplifiziert haben, der in den langsam wachsenden Tumoren 1-2 nicht amplifiziert ist (5.1). Dies deutet darauf hin, dass in diesem Bereich ein Onkogen liegen könnte, welches für das Wachstum des Tumors von entscheidender Bedeutung ist. Die Bereiche des murinen Chromosoms 8.86p entsprechen größtenteils Regionen der humanen Chromosomen 16 und 19¹³⁴. Diese Regionen tragen jedoch im humanen NB nur sehr selten Zugewinne/Amplifikationen¹⁷. Mosse et al. beschreiben einen geringen Zugewinn auf Chromosom 19 in der Gruppe der hoch Risiko NB Patienten ohne MYCN Amplifikation¹⁷. Häufiger finden sich Deletionen des kompletten Chromosomen 16 in den Gruppen mit geringen und intermediärem Risiko¹⁷. Des Weiteren zeigte eine Literaturrecherche, dass die ca. 50 Gene, die im Bereich 8.86p liegen, bis jetzt keine nachgewiesene Relevanz im humanen NB haben.

2008 konnte gezeigt werden, dass ca. 12% aller NB eine Mutation des ALK Gens haben⁶⁰⁻⁶³. Schulte et al. zeigten außerdem, dass hohe Expression des ALK Wildtyp Gens mit einer schlechten Prognose für das Überleben des Patienten korreliert⁶⁷. Weiterhin konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die Expression von ALK[F1174L] in der Neuralleiste und ihren Derivaten zu (murinen) NB führen kann⁶⁵. Um die Auswirkungen der Expression von mutierten ALK auf NLVZ zu untersuchen, wurden JoMa1 Zellen mit ALK[F1174L], ALK[R1275Q] oder ALK-WT transfiziert. Wie in der Literatur beschrieben, zeigte sich bei JoMa1-ALK[F1174L] im Vergleich zu JoMa1-ALK-WT eine stark erhöhte Viabilität und BrdU Inkorporation⁶⁴. JoMa1-ALK[R1275Q] zeigte eine Viabilität und BrdU Inkorporation, die zwischen JoMa1-ALK-WT und JoMa1-ALK[F1174L] liegt⁶⁴. Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur,

dass es sich bei der Mutation [F1174L] um die aggressivste ALK Variante handelt⁶⁴⁻⁶⁶, sondern auch das NLVZ tatsächlich durch ALK[F1174L] und die ALK[R1275Q]-Variante immortalisiert werden können. Außerdem werden die Ergebnisse der Xenografts mit JoMa1-ALK[F1174L], in denen in 2 von 6 Nacktmäusen ein Tumorzustand (5.2), durch die Publikation von Heukamp et al. nochmals untermauert⁶⁵. Heukamp et al. konnten zum ersten Mal zeigen, dass die neuralleistenspezifische ALK[F1174L] Mutation hinreichend ist die Entstehung von murinen NB zu induzieren⁶⁵. Auch in diesem Mausmodell war die Tumorzinzidenz geringer als im TH-MYCN Modell⁶⁵, was sich mit den Ergebnissen der JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK[F1174L] Zellen deckt (5.1 und 5.2). Zhu et al. beschrieben, dass ALK[F1174L] im Gegensatz zu ALK-WT die Apoptose von unreifen Neuroblasten während der Entwicklung hemmt^{135,136}. Dieses Modell könnte auch die Wirkung von ALK[F1174L] auf JoMa1 Zellen erklären. Es ist vorstellbar, dass ALK[F1174L] die noch nicht differenzierten Neuroblasten während der Embryogenese an der Apoptose hindert und sich diese anreichern. Durch eine weitere Mutation könnten diese Neuroblasten dann zu einem NB werden.

Die funktionelle Bedeutung einer bis dahin nicht mit dem NB assoziierte Aberration des *FOXR1* Gens (*FOXR1*), konnte ebenfalls in JoMa1 bestätigt werden⁷⁵. *FOXR1* liegt auf Chromosomenabschnitt 11q23. Diese Position ist bei NB Patienten ohne *MYCN* Amplifikation oft deletiert. Dadurch kann das *FOXR1* Gen mit anderen Genen fusioniert sein, oder unter der Kontrolle eines anderen Promotors stehen^{74,75}. Um die Wirkung von *FOXR1* auf NLVZ zu studieren, wurden JoMa1-Zellen mit humaner *FOXR1* oder *MLL-FOXR1* cDNA transfiziert. Es zeigte sich, dass JoMa1-*FOXR1* Zellen durch *FOXR1* Expression transformiert wurden und deren Viabilität mit und ohne 4-OHT nicht signifikant voneinander abwich (Abbildung 10). Dies zeigte sich nicht bei JoMa1-*MLL-FOXR1* Zellen (Daten nicht gezeigt). Daraus kann man schließen, dass *FOXR1* Überexpression in der Neuralleiste zur Transformierung von benignen Neuroblasten führen könnte. Sehr wahrscheinlich sind jedoch noch weitere Mutationen nötig, denn die aktivierenden Mutationen des *FOXR1* Gens sind im NB eher selten (3 von 225 untersuchten NB)⁷⁵. Das *MLL-FOXR1* Fusionsgen spielt vermutlich eher eine Rolle in Leukämien¹³⁷.

Weitere Gene, bei denen keine Transformation von JoMa1 Zellen feststellbar war, waren das *miR-17-92* cluster, TrkA und GFP (Daten nicht gezeigt). C-Myc bewirkte

eine moderate Transformation von JoMa1.3, einem klonalen Abkömmling der JoMa1 Zelllinie^{37,113}.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass sich JoMa1 Zellen dazu eignen, potentielle Neuralleisten-spezifische Onkogene zu validieren. Außerdem sind JoMa1 Zellen eine Art Schnittstelle zwischen der Validierung *in vitro* und *in vivo*, da man JoMa1 Zellen mit dem zu untersuchenden Gen transfizieren kann und dann s.c. injizieren kann. *In vivo* steht JoMa1 Zellen kein 4-OHT zur Verfügung, daher kann die transformierende Wirkung des zu untersuchenden Gens *in vivo* in Abwesenheit von c-Myc analysiert werden. Wenn nötig, könnte man den Mäusen auch 4-OHT i.p. verabreichen, um das c-Myc-ER^T Fusionsprotein *in vivo* zu aktivieren¹³⁸.

6.2 Chromosomale Aberrationen der aus JoMa1-MYCN entstandenen Tumoren weisen Homologien zum humanen Neuroblastom auf

Bei der Untersuchung der chromosomalen Aberrationen der JoMa1-MYCN Tumoren fiel auf, dass schnell wachsende, hohe Level an MYCN exprimierende,) Tumoren bestimmte Aberrationen aufwiesen, die in langsam wachsenden JoMa1-MYCN Tumoren nicht vorhanden waren (5.1). Es zeigte sich, dass die schnell wachsenden JoMa1-MYCN Tumoren 3-6 einen Zugewinn im Bereich des Chromosoms 8.86p und des Chromosoms 15q aufwiesen. Diese Bereiche zeigten in den JoMa1-MYCN Tumoren 1-2 keinen Zugewinn. Die Bereiche des murinen Chromosoms 8.83p entsprechen im Wesentlichen den humanen Chromosomen 16 und 19 (NCBI Homology Maps). In diesem Bereich liegen etwa 50 Gene, von denen keines bis jetzt in Relation mit dem NB steht (Literaturrecherche PubMed, Stand August 2013). In diesen chromosomalen Bereichen kommt es beim humanen NB überwiegend zu Deletionen^{17,41}. Nur in der Hochrisiko-Gruppe ohne *MYCN* Amplifikation und in der Hochrisikogruppe mit *MYCN* Amplifikation kommt es auch zu Zugewinnen des Bereichs 15q des humanen Chromosoms¹⁷. Demnach wären die JoMa1-MYCN 3-6 Tumoren eher in diese beiden Hochrisikogruppen einzuordnen. Das murine Chromosom 15q entspricht Teilen der humanen Chromosomen 8, 12 und 22 (NCBI Homology Maps). Während die homologen Bereiche der humanen Chromosomen 8 und 22 keine Auffälligkeiten zeigen¹⁷, finden sich im humanen Chromosom 12 in allen Risikogruppen Zugewinne, die allerdings das ganze Chromosom betreffen^{17,41}. Diese Aberration des murinen Chromosoms 15q lassen sich daher generell dem NB

zuordnen, jedoch nicht einer bestimmten molekularen Untergruppe. Interessanterweise haben die JoMa1-MYCN Tumoren 1-2, die geringe MYCN Expression haben, eine exklusive Deletion im Chromosomenabschnitt 12.74-78. Die Deletion ist in beiden Tumoren exakt gleich groß und umfasst einen Bereich von 95 Genen. In diesem Bereich liegt kein mit dem NB assoziiertes Tumorsuppressorgen (Literaturrecherche PubMed, Stand August 2013). Das murine *Mycn* Gen liegt auch auf dem Chromosom 12, jedoch ca. 50 Mbp entfernt von der Deletion. Interessanterweise ist von der Deletion jedoch auch das Gen *Max* betroffen (Quelle: PubMed Genome Browser). Max ist der Homodimerisierungspartner von Mycn/MYCN, ohne den die Transkription der Zielgene von Mycn/MYCN nicht möglich ist. Das Fehlen von Max und die geringe humane MYCN Expression könnten das langsame Wachstum der JoMa1-MYCN Tumoren 1-2 erklären. Des Weiteren ist der deletierte Bereich größtenteils homolog zum humanen Chromosom 2 und 14. Während beim humanen NB im Chromosom 2 (auf dem das humane *MYCN* Gen liegt) zu Zugewinnen kommt, kommt es beim Chromosom 14 häufig zu Deletionen^{17,41}. Diese Deletionen kommen in allen Risikogruppen vor, aber häufiger bei Patienten mit geringem oder mittlerem Risiko, ohne *MYCN* Amplifikation^{17,41}.

Zusammengenommen zeigt die Untersuchung der chromosomalen Aberrationen von JoMa1-MYCN Tumoren, dass diese Tumoren typische Aberrationen des humanen NB aufweisen. Außerdem erklären die geringe MYCN Expression und die Deletionen auf dem Chromosomen 12.74-78 wahrscheinlich das langsamere Wachstum der JoMa1-MYCN Tumoren 1-2.

6.3 Homologien der murinen Neuroblastome des LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Mausmodells zum humanen Neuroblastom

Während zuvor die Rolle von LIN28b in der Embryonalentwicklung und diversen Tumorentitäten bekannt war, so lag ein Fokus dieser Arbeit auf der Analyse von Lin28b im NB^{82,85,91}. Durch Überexpression von humanem LIN28b in JoMa1 Zellen wurde deutlich, dass JoMa1-LIN28b Zellen mit und ohne 4-OHT keine signifikant unterschiedliche Viabilität zeigten (5.4.6). Dies zeigt, dass JoMa1-LIN28b Zellen durch LIN28b Expression transformiert wurden (Abbildung 17). Außerdem deutet es darauf hin, dass eine hohe LIN28b Expression während der Neurulation Neuralleisten-Stammzellen transformieren kann.

Durch spezifische Expression von murinem Lin28b in der Neuralleiste und Neuralleistenderivaten entwickelten sich in ca. 60% der LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre transgenen Mäusen Tumoren an den Nebennieren, dem Ganglion Coeliacum und dem oberen Zervikalganglion (5.4). Diese Lokalisationen entsprechen sowohl Derivaten der Neuralleiste, als auch den Lokalisationen des humanen NB². Immunhistochemisch zeigte sich mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung ein Erscheinungsbild mit kleinen, blau-rundzelligen Tumoren, was ein klinisches Kriterium zur Identifikation von humanen NB ist². Außerdem können zur Identifizierung von Tumoren endokrinen Ursprungs die Expression der Gene DBH (Dopamin-β-Hydroxylase), TH (Tyrosinhydroxylase) und Phox2b (engl. *Paired-like homeobox 2b*) genutzt werden. Die Expression dieser Marker zeigte sich auch in den Tumoren des LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Mausmodells (Abbildung 19), was die Homologie zum humanen NB bestätigt. Die in der Literatur beschriebene regulatorische LIN28b-*let-7-MYCN* Achse konnte auch in den Tumoren des LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Mausmodells bestätigt werden^{91,92}. Es zeigte sich, dass die Lin28b Expression, wie zu erwarten, in den Tumoren erhöht war (Abbildung 16). Die Expression der *let-7* miRNAs war niedriger als in den Kontrollgeweben (Abbildung 16). Dies hatte zur Folge, dass die murine Mycn Expression de-reprimiert wurde und auch die Expression der Mycn Zielgene erhöht war (Abbildung 16). Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Tumore unter anderen indirekt von der Lin28b Expression getrieben werden, indem die endogene Mycn Expression hochreguliert wird

6.4 Reguliert LIN28b MYCN oder reguliert MYCN LIN28b?

In der Literatur wird beschrieben das LIN28b durch MYCN bzw. c-Myc reguliert wird^{45,85,104,139}. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Modell und in JoMa1 Zellen eindeutig Mycn/MYCN durch Lin28b/LIN28b reguliert wird. Dafür sprechen folgende Hinweise:

Die erste eindeutige Hinweis ist, dass die Mycn Expression im LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Modell nur in den Tumoren hoch reguliert ist, da hier Lin28b exprimiert wird (Abbildung 16). Zweitens ließ sich in JoMa1-LIN28b Zellen keine gesteigerte c-Myc Expression nachweisen was zeigt, dass LIN28b in NB nicht c-Myc reguliert (Abbildung 17 C), jedoch die Mycn Expression. Drittens zeigt sich in JoMa1-MYCN keine Lin28b Expression was deutlich macht, dass MYCN nicht die murine Lin28b

Expression steigern kann (Abbildung 17 D). Wohingegen humanes LIN28b die Expression von murinem Mycn steigert (Abbildung 17 D). Viertens sind in JoMa1-MYCN, im Gegensatz zu JoMa1-LIN28b, ein Großteil der *let-7* miRNAs nicht reprimiert, was darauf hindeutet das MYCN nur *let-7g*, *a* und *b* miRNAs reguliert und diese keinen Einfluss auf die Lin28b Expression haben (Abbildung 17 B). Des Weiteren ist dies ein Hinweis darauf, dass MYCN Lin28b nicht reguliert, da sonst das Expressionsmuster der *let-7* miRNAs in JoMa1-MYCN und JoMa1-LIN28b identisch wären. Der fünfte Hinweis zeigt sich beim Vergleich der *let-7* miRNA Expression vom TH-MYCN und LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* Mausmodell. Es zeigte sich, dass *let-7* miRNAs nur im LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* Mausmodell reprimiert werden und im TH-MYCN Modell die Expression zwischen Kontrollgeweben und LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* Tumoren rangiert (Abbildung 16 B). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Lin28b/LIN28b nicht durch Mycn/MYCN reguliert wird (Abbildung 16 B). Würde MYCN/Mycn in TH-MYCN Modell Lin28b regulieren, so wären die Expressionsmuster der *let-7* miRNAs stark ähnlich. Sechstens wäre zu erwarten, dass NB mit hoher MYCN Expression auch hohe LIN28b Expression haben, Molenaar et al. konnten jedoch keine Korrelation feststellen⁹¹. Ein letzter Punkt, ist das Tumore und Zelllinien vom TH-MYCN Modell mit wenigen Ausnahmen kein Lin28b exprimieren^{91,123}. Dies bestätigt nochmals *in vitro*, dass MYCN zumindest im NB nicht LIN28b reguliert sondern vielmehr LIN28b MYCN regulieren kann.

6.5 Wie kommt es zu Überexpression von LIN28b im Neuroblastom?

Da LIN28b nicht durch MYCN reguliert wird (6.4), stellt sich die Frage, wie es im humanen NB zu einer hohen LIN28b Expression kommt. Zum einen kann dies natürlich durch die Amplifikation des *LIN28b* Gens geschehen, was mit einer sehr hohen LIN28b Expression korreliert⁹¹. LIN28b Amplifikationen kommen aber selten in NB vor (3.8.5). Molenaar et al. konnten zeigen, dass sich in der Promotorregion oder im *LIN28b* Gen selbst keine aktivierenden Mutationen finden. Daher kann dies als Grund für die hohe Expression ausgeschlossen werden^{91,140}. Vielmehr wird ein Mechanismus diskutiert, bei dem die miRNA *125b* (*miR-125b*) die Expression von *LIN28b* reguliert. Die Interaktion von *LIN28b* und *miR-125b* konnte *in vitro* bereits nachgewiesen werden^{129,141}. Es wird davon ausgegangen, dass geringe *miR-125b* Expression zur De-Reprimierung von *LIN28b* führt. Zu der geringen *miR-125b* Expression kommt es wahrscheinlich, da *miR-125b* in der 11q23 Region liegt, die im

NB häufig von Deletionen betroffen ist (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**)⁷⁵. Ein weiterer Mechanismus, der zur Überexpression von LIN28b führen kann, ist das *let-7* miRNAs die Expression von *LIN28b* regulieren¹⁴². Dadurch kann es zu einem 'feedback loop' kommen, durch den hohe LIN28b Expression zu Reprimierung von *let-7* miRNAs führt, was wiederum zu erhöhter LIN28b Expression führt. Teile der *let-7* miRNA Familie liegen ebenfalls auf Chromosomenabschnitten, die häufig Deletionen im NB aufweisen. So liegt z.B. das Gen für *let-7a* in Chromosomenbande 11q24 und das Gen für *let-7g* in Bande 3q21⁹¹. Durch Verlust der Expression dieser *let-7* miRNAs im NB kann es zur Überexpression von LIN28b kommen.

6.6 Vergleich des LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Mausmodells mit anderen Neuroblastom Mausmodellen

Wie bei existierenden Mausmodellen zur Untersuchung des NB auch, entstehen im LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Modells NBs durch hohe Expression eines Neuroblastom-spezifischen Onkogens⁹¹, in diesem Fall, *Lin28b*, während die anderen Tumormodelle durch hohe MYCN, ALK[F1174L] oder Expression beider Gene entstehen^{13,65,66,91}. Tumoren des TH-MYCN Mausmodells spiegeln die humanen NB wider, die eine MYCN Amplifikation haben (20% aller NB)^{1,122}. Die auf ALK[F1174L] beruhenden murinen NB entsprechen der Hälfte aller humanen NB mit ALK Mutation und insgesamt 15% aller NB⁶³. Die Tumoren des LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Mausmodells könnten hingegen einen Großteil aller NB widerspiegeln, da hohe LIN28b Expression beim humanen NB mit einer schlechten Prognose für den Patienten korreliert^{91,92}. Hinzu kommt, dass hohe LIN28b Expression unabhängig von MYCN Amplifikation, ALK Mutation und von der Einteilung in das INSS Staging System (Tabelle 1) ein Risikofaktor bleibt⁹¹. Außerdem konnten Diskin et al. LIN28b eindeutig mittels einer genomweiten Assoziationsstudie mit dem NB assoziieren¹⁰⁴. Ein Vorteil des LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Mausmodells ist außerdem, dass die *Mycn* Expression im Gegensatz zu anderen Modellen nicht unter der Kontrolle eines artifiziellen Promotors steht, sondern unter der Kontrolle des natürlichen Promotors. Damit ist es möglich MYCN-gerichtete Behandlungen zu testen, die bei der Verwendung artifizieller Promotoren nicht möglich sind. So konnte in dieser Arbeit z.B. die Wirkung von JQ1 anhand von LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Xenografts nachvollzogen werden (5.4.11). Im Unterschied zum TH-MYCN und ALK^{F1174L} NB Mausmodell NB

ist beim LSL-*Lin28b* Modell die Integration des Transgens bekannt, da es mittels homologer Rekombination in den *ROSA26* Locus eingebracht wurde¹⁴³.

Um das LSL-*Lin28b;Dbh-iCre* Modell weiter zu charakterisieren, könnte man Verpaarungen mit der sogenannten *iLet-7* Maus durchführen¹⁴⁴. In diesem Mausmodell lässt sich die Expression der *let-7* miRNA Familie mittels Doxycyclin induzieren¹⁴⁴. Durch die Induktion dieser miRNA sollten die Zielgene der *let-7* miRNAs (z.B. *Mycn*) wieder reprimiert werden und dies könnte mit Reduktion des Tumorwachstums einhergehen.

7 Zusammenfassung

Das Neuroblastom (NB) ist der häufigste extrakranielle Tumor des Kindesalters¹. Es deuten viele Hinweise darauf hin, dass das NB aus Neuralleistenvorläuferzellen (NLVZ) entsteht^{11,13,14,125}. In dieser Arbeit wurde eine durch c-Myc immortalisierte NLVZ-Linie genutzt, um die initiale Pathogenese des NB zu untersuchen. Durch Transfektion der NLVZ-Linie JoMa1 mit MYCN, LIN28b, FOXR1, ALK-WT ALK[F1174L] und ALK[R1275Q] konnte gezeigt werden, dass NLVZ durch potentielle Onkogene des NB *in vitro* transformiert werden können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass JoMa1 Zellen durch MYCN und ALK[F1174L] derart transformiert werden, dass sie *in vivo* NB ähnliche Tumore bilden. Darüber hinaus zeigten die durch JoMa1-MYCN entstandenen Tumoren, spezifische chromosomale Aberrationen, die homolog zu denen des humanen NB sind. Außerdem wiesen die Tumoren mikroskopische Strukturen auf, die typisch für neuroendokrine Tumoren sind. Es wurde jedoch auch deutlich, dass nicht die Überexpression jedes x-beliebigen Gens zur Transformierung von NLVZ *in vitro* und *in vivo* führt. Die Gene *TrkA*, *miR-17-92*, *MLL-FOXR1* und *GFP* lösten keine Transformierung in JoMa1-Zellen aus. Zusammengefasst zeigen diese Resultate, dass sich JoMa1 als Modell für die funktionelle Untersuchung NB-relevanter Onkogene eignet.

Gestützt von *in vitro* Daten und Hochdurchsatzanalysen wurde LIN28b als wichtiges Onkogen im NB identifiziert⁹¹. LIN28b ist häufig genomisch amplifiziert und hoch exprimiert. Molenaar et al. zeigten, dass LIN28b in humanen NB Zelllinien entscheidend für die Viabilität ist. Darüber hinaus wurde deutlich, dass LIN28b in humanen NB Zelllinien miRNAs der *let-7* Familie reprimierte, was zu De-Reprimierung von MYCN führte und die Viabilität steigerte. Diese *LIN28b-let-7-Mycn*

regulatorische Achse ließ sich auch in JoMa1 Zellen, die mit LIN28b transfiziert wurden, nachweisen. Mittels der in dieser Arbeit etablierten und charakterisierten transgenen LSL-*Lin28b* (Lox-Stop-Lox-*Lin28b*-IRES-*FLuc*) Maus sollte die neuralleistenspezifische Expression von *Lin28b* näher untersucht werden. Dafür wurden die LSL-*Lin28b* Mäuse mit *Dbh-iCre* Mäusen¹⁰³ verpaart. LSL-*Lin28b*;*Dbh-iCre* doppelt transgene Mäuse exprimieren konditional *Lin28b* in der Neuralleiste und in Neuralleistenderivaten. 35% dieser doppelt transgenen Mäuse entwickelten mit einem durchschnittlichen Altern von 65 Tagen tastbare Tumoren. Die Tumoren entstanden aus den Neuralleistenderivaten, aus denen sie auch beim humanen NB entstehen (z.B. Nebennierenmark). Mittels Luciferase-Aktivitäts-Bestimmung konnte gezeigt werden, dass *Lin28b* in den Tumoren exprimiert wird. Die Untersuchung der Tumoren hinsichtlich der Expression humaner NB Markergene zeigte, dass es sich bei den Tumoren um murine NB handelte. Die Tumoren exprimierten *Dbh*, *Th* und NSE. Interessanterweise wiesen diese Tumore chromosomale Aberrationen auf, die zu denen des humanen NB homolog sind. Wie in JoMa1-LIN28b, so konnte auch in den Tumoren des LSL-*Lin28b*;*Dbh-iCre* Mausmodells die funktionale regulatorische *Lin28b-let-7-Mycn* Achse nachgewiesen werden. Abschließend konnte gezeigt werden, dass der Bromodomänen-Inhibitor JQ1 die *Mycn* Expression und *Mycn* gesteuerte Transkription inhibiert. Dies hatte zur Folge, dass die Apoptose in den Tumoren stark erhöht war und die Proliferation stark gesenkt wurde. Das LSL-*Lin28b*;*Dbh-iCre* Mausmodell stellt damit ein präklinisches Modell zur Untersuchung der NB Pathogenese dar.

8 Abstract

Neuroblastoma is presumed to arise from the neural crest, whereas the cells of origin remain to be determined. To date, few recurrent genetic changes contributing to neuroblastoma formation, such as amplification of the MYCN oncogene and activating mutations of the ALK oncogene, have been identified. The possibility to model neuroblastoma in mice allows investigation of the cells of origin hypothesis in further detail. Murine neural crest progenitor cells, JoMa1 cell line, were maintained in an undifferentiated state by a tamoxifen-activated c-Myc transgene (c-Myc-ERT). Either MYCN, ALK[F1174L], one of the oncogenic ALK variants identified in primary neuroblastomas, TrkA or GFP were ectopically expressed. Subsequently, growth

independence of c-Myc-ERT transgene was monitored *in vitro*, and tumorigenicity of transfected cells was evaluated in an *in vivo* model. JoMa1 cells expressing MYCN or ALK[F1174L] were able to grow independently of c-Myc-ERT activity *in vitro* and caused formation of tumors *in vivo*, in contrast to parental JoMa1 cells and JoMa1 cells expressing TrkA, *miR-17-92*, MLL-FOXR1 or GFP. Tumors resembled human neuroblastomas in morphology, expression of neuroblastoma marker genes TH, Phox2b, DC56 and in the presence of neurosecretory vesicles and synaptic structures as determined by electron microscopy. Tumorigenicity was enhanced upon serial transplantation of tumor-derived cells. Our findings support neural crest progenitor cells as the precursor cells of neuroblastoma, and indicate that neuroblastoma arise as their malignant progeny. The JoMa1 model system is a valid and fast tool to analyze the effect of genes suspected to contribute to neuroblastomagenesis in an *in vivo* model or to implement screening strategies to identify such genes. The former strategy has already been successfully applied for FOXR1, LIN28b and *miR-17-92*.

Overexpression of LIN28b has been reported in neuroblastomas (NB). LIN28b is known to repress *let-7* miRNAs, which target MYCN. We overexpressed murine Lin28b in the neural crest to determine if Lin28b can drive neuroblastomagenesis. Conditional murine Lin28b expressing mice (LSL-*Lin28b*) were crossbred with *Dbh-iCre* mice to target expression to the neural crest. Arising tumors were characterized using histology, immunohistochemistry, PCR and western blotting. 30% of all LSL-*Lin28b*;*Dbh-iCre* double-transgenic mice developed tumors at a median age of 65 days. The macroscopic tumor appearance, primary tumor sites, tumor histology and marker gene expression confirmed these tumors as murine NB. Lin28b and Mycn proteins were expressed in all tumors and *let-7* miRNAs were downregulated. Treating mice with the bromodomain inhibitor JQ1 resulted in enhanced cell death and decreased cell proliferation. Our results suggest that, similar to human NB, MYCN is induced via downregulation of *let-7* miRNAs by Lin28b. Therapeutic approaches aimed at inhibiting Lin28b-*let-7* interaction may be a useful therapeutic perspective.

9 Ausblick

In dieser Arbeit wurden in JoMa1 Zellen nur wenige Gene hinsichtlich ihrer Transformierungskapazität untersucht. Um die Austestung in größerem Maßstab durchzuführen, sind auch Screenings mit ganzen shRNA Bibliotheken oder cDNA Bibliotheken möglich, wie sie unter anderem von Zuber et al. durchgeführt wurden¹⁴⁵. Dabei würden die shRNA Bibliotheken zur Identifizierung von Tumorsuppressorgenen genutzt werden und die cDNA Bibliotheken zur Identifizierung von Onkogenen.

Mit Hilfe des etablierten LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* Mausmodells konnte ein Beitrag, zum Verständnis der Entstehung des murinen NB, geleistet werden. Es konnte gezeigt werden, dass Hochdurchsatzverfahren wie aCGH und Mikroarrays zur Identifizierung potentieller Onkogene genutzt werden können. Außerdem ist es, Dank der heutigen gentechnischen Methoden (TALENs und CRISPR/Cas^{146,147}), möglich zügig diese potentiellen Onkogene auch *in vivo* zu evaluieren. Nichts desto trotz ist es auch nützlich vom *in vivo* Modell wieder zurück zu *in vitro* Versuchen zu gehen. Während dieser Arbeit wurde daher mehrfach versucht eine Zelllinie aus einem der LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* Tumoren zu etablieren. Da Tumoren nicht aus einem einzigen Zelltyp bestehen¹⁴⁸, sind Zelllinien, die mittels Einzelzell-Klonierung aus einem Tumor gewonnen werden ideal, um Studien an einer definierten Zellpopulation durchzuführen. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden daher LSL-*Lin28b*; LSL-*EYFP*; *Dbh-iCre* (*EYFP* = Enhanced Yellow Fluorescent Protein¹⁴⁹) Mäuse gezüchtet. Tumorzellen dieser Mäuse exprimieren nicht nur *Lin28b* sondern auch YFP. Mittels Durchflusszytometrie lassen sich dadurch die Tumorzellen heraussortieren, die YFP und *Lin28b* exprimieren. Dies kann sogar im Einzelzell-Maßstab durchgeführt werden¹⁵⁰. Es konnte festgestellt werden, dass sich ein modifiziertes Neurobasal A Medium als ideales Kulturmedium für die Zellen der LSL-*Lin28b*; *Dbh-iCre* Tumoren eignete¹⁵¹. Ein interessanter weiterer Nutzen der LSL-*Lin28b*; LSL-*EYFP*; *Dbh-iCre* Mäuse ist, dass man auch die Zellen der Leber oder des Knochenmarks mittels Durchflusszytometrie untersuchen kann. Dadurch lässt sich der Anteil an *EYFP* positiven Zellen abschätzen und man kann nicht nur feststellen, ob sich in Leber oder Knochenmark Metastasen befinden, sondern auch aus diesen Zellen Zelllinien etablieren. Eine endgültige Etablierung einer Zelllinie gelang bis zum Abschluss der Arbeit jedoch nicht. Nach ca. 3 Passagen verloren die Zellen ihre Luciferase-Aktivität, was darauf schließen lässt, dass auch *Lin28b* nicht mehr exprimiert wurde.

Neben der Behandlung mit JQ1 ist auch noch eine Therapie Simulation von Mycn-Inhibierung möglich. Dazu müssten LSL-*Lin28b* Mäuse mit der sogenannten Omomyc-Maus (TRE-*Omomyc*;CMVrtTA)¹⁵² verkreuzt werden und in einem zweiten Schritt mit der *Dbh-iCre* Maus. Die Omomyc-Maus kann mittels Doxycyclin ein mutiertes Myc Protein (Omomyc) exprimieren. Dieses mutierte Protein kann weiterhin mit Mad, Max, Myc oder Mycn Heterodimerisieren. Die Mutationen in Omomyc bewirken jedoch, dass die Bindung des Omomyc + Protein X Heterodimers an die DNA nicht mehr möglich ist. Dadurch wird das endogene Myc sozusagen abgefangen und die Myc getriebene Transkription wird unterbunden¹⁵². Soucek et al. konnten dies schon in einem Ras/Myc getriebenen Bronchialkarzinom Mausmodell nachweisen¹⁵². Im LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre würde die nochmals beweisen, dass die entstandenen Tumoren von hoher Mycn Expression abhängig sind. Im Laufe dieser Arbeit wurde bereits mit der Verkreuzung der beiden Modelle begonnen, da die Tiere für die Therapie-Simulation jedoch 4-fach transgen (LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre;TRE-*Omomyc*;CMVrtTA) sein müssen, ist die Verpaarungsstrategie entsprechend aufwändig und langwierig.

Mittels Kaplan-Meier Analyse wurde deutlich, dass 12 transgene LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Mäuse murine NB zwischen 36-110 Tagen entwickelten (Abbildung 13). Es stellt sich die Frage, warum die anderen 22 Tiere keine NB entwickelten. Die Untersuchung von 5 LSL-*Lin28b*;Dbh-iCre Tieren, die keinen Tumor hatten zeigte keine Vergrößerung der Nebennieren oder der betroffenen Ganglien (Daten nicht gezeigt). Ein Grund für die moderate Tumorzinzidenz von 35% könnte sein, dass die Tumorentstehung nur in einem bestimmten Zeitfenster, in dem die Neuralleistenzellen besonders sensibel gegenüber Transformierungen sind, möglich ist. Um dieses Zeitfenster einzugrenzen könnte man die LSL-*Lin28b* Maus mit der *Dbh-CT* (CT = CreERT2) Maus verpaaren¹³⁸. Die *Dbh-CT* Maus exprimiert eine Cre-Rekombinase, die ähnlich wie das c-Myc-ER^T Gen an den mutierten Östrogenrezeptor fusioniert ist¹³⁸. Die Cre-Rekombinase kann nur durch 4-OHT aktiviert werden und wird daraufhin in den Nucleus transportiert. Dadurch lässt sich testen, wann die *Lin28b* Expression zur Tumorentstehung führen kann und wann dieser Zeitpunkt bereits überschritten ist.

10 Veröffentlichungen

Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival.

Oehme I, Linke JP, Böck BC, Milde T, Lodrini M, Hartenstein B, Wiegand I, Eckert C, Roth W, Kool M, Kaden S, Gröne HJ, Schulte JH, **Lindner S**, Hamacher-Brady A, Brady NR, Deubzer HE, Witt O.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jun 25

LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression.

Molenaar JJ, Domingo-Fernández R, Ebus ME, **Lindner S**, Koster J, Drabek K, Mestdagh P, van Sluis P, Valentijn LJ, van Nes J, Broekmans M, Haneveld F, Volckmann R, Bray I, Heukamp L, Sprüssel A, Thor T, Kieckbusch K, Klein-Hitpass L, Fischer M, Vandesompele J, Schramm A, van Noesel MM, Varesio L, Speleman F, Eggert A, Stallings RL, Caron HN, Versteeg R, Schulte JH.

Nat Genet. 2012 Oct 7. doi: 10.1038/ng.2436

Beitrag zu dieser Publikation: Alle Arbeiten mit der LSL-*Lin28b* Maus, bzw. den *Dbh-iCre*;LSL-*Lin28b* Mäusen. Alle Assays mit JoMa1, JoMa1-MYCN und JoMa1-LIN28b Zellen. Arbeiten mit NHO2A Zellen.

Oncogenic activation of FOXR1 by 11q23 intrachromosomal deletion-fusions in neuroblastoma.

Santo EE, Ebus ME, Koster J, Schulte JH, Lakeman A, van Sluis P, Vermeulen J, Gisselsson D, Ora I, **Lindner S**, Buckley PG, Stallings RL, Vandesompele J, Eggert A, Caron HN, Versteeg R, Molenaar JJ.

Oncogene. 2012 Mar 22;31(12):1571-81. doi: 10.1038/onc.2011.344. Epub 2011 Aug 22.

Targeted Expression of Mutated ALK Induces Neuroblastoma in Transgenic Mice.

Heukamp LC, Thor T, Schramm A, De Preter K, Kumps C, De Wilde B, Odersky A, Peifer M, **Lindner S**, Spruessel A, Pattyn F, Mestdagh P, Menten B, Kuhfittig-Kulle S, Künkele A, König K, Meder L, Chatterjee S, Ullrich RT, Schulte S, Vandesompele J, Speleman F, Büttner R, Eggert A, Schulte JH.

Sci Transl Med. 2012 Jul 4;4(141):141ra91.

MYCN and ALK[F1174L] are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells.

J H Schulte, **S Lindner**, A Bohrer, J Maurer, K De Preter, S Lefever, L Heukamp, S Schulte, J Molenaar, R Versteeg, T Thor, A Künkele, J Vandesompele, F Speleman, H Schorle, A Eggert and A Schramm

Oncogene 9 April 2012; doi: 10.1038/onc.2012.106

LIN28B drives neuroblastoma oncogenesis through let7-MYCN signaling

S Lindner, J Molenaar, T Thor, A Sprüssel, HN Caron, R Versteeg, A Schramm, A Eggert, JH Schulte

Klin Padiatr 2012; 224 - A31 DOI: 10.1055/s-0032-1310498

11 Eigene Poster und Kongressbeiträge

11.1 Eigene Kongressbeiträge

Neuroblastoma develops from neural crest stem cells

S Lindner, JH Schulte, A Bohrer, J Maurer, K DePreter, S Lefever, L Heukamp, J Molenaar, R Versteeg, T Thor, J Vandesompele, F Speleman, H Schorle, A Eggert, A Schramm

- Kind-Phillip Tagung 2011, Wilsede

LIN28B drives neuroblastoma oncogenesis through let7-MYCN signaling

S. Lindner, JJ. Molenaar, P. Mestdagh, T. Thor, A. Sprüssel, HN. Caron, R. Versteeg, A. Schramm, A. Eggert, JH. Schulte

- 5th Annual Meeting of NGFN Plus and NGFN Transfer in the Program of Medical Genome Research 2012, Heidelberg

- Kind-Phillip Tagung 2012, Wilsede

11.2 Eigene Poster

MYCN or ALK[F1174L] are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells

S. Lindner, KD. Preter, L. Heukamp, JJ. Molenaar, R. Versteeg, J. Vandesompele, F. Speleman, A. Schramm, A. Eggert, JH. Schulte

- 10. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen 2011

- Kind-Phillip Tagung 2011, Wilsede

- 5th Annual Meeting of NGFN Plus and NGFN Transfer in the Program of Medical Genome Research 2012, Heidelberg

Eigene Poster und Kongressbeiträge

- Advanced Neuroblastom Research Conference 2012, Toronto

- 4th International Tuebingen Symposium in Pediatric Solid Tumors – From Bench to Bedside in Neuroblastoma 2012, Tübingen

- Pediatric Cancer Research at the INTERFACE 2013, Wien

LIN28B drives neuroblastoma oncogenesis through let7-MYCN signaling

S. Lindner, JJ. Molenaar, P. Mestdagh, T. Thor, A. Sprüssel, HN. Caron, R. Versteeg, A. Schramm, A. Eggert, JH. Schulte

- 11. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen 2012

- Pediatric Cancer Research at the INTERFACE 2013, Wien

Impact of the neural crest cell progenitor marker SOX10 on the neuroblastoma proteome

S. Lindner, G. Poschmann, B. Beine, HE. Meyer, K. Stühler, JH. Schulte, A. Schramm

- Pediatric Cancer Research at the INTERFACE 2013, Wien

12 Literaturverzeichnis

- 1 Brodeur, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews. Cancer* **3**, 203-216, doi:10.1038/nrc1014 (2003).
- 2 Pizzo, P. A. & Poplack, D. G. *Principles and practice of pediatric oncology*. 5th edn, (Lippincott Williams & Wilkins, 2006).
- 3 Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. & Cohn, S. L. Neuroblastoma. *Lancet* **369**, 2106-2120, doi:10.1016/S0140-6736(07)60983-0 (2007).
- 4 Brodeur, G. M. *et al.* Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **11**, 1466-1477 (1993).
- 5 Brodeur, G. M. *et al.* International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **6**, 1874-1881 (1988).
- 6 Strenger, V. *et al.* Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients. *Pediatric blood & cancer* **48**, 504-509, doi:10.1002/pbc.20888 (2007).
- 7 Gardner, H., Gaedicke, G. & Niemeyer, C. *P*adiatrische H*amatologie und Onkologie*. (Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2006).
- 8 Schwab, M., Westermann, F., Hero, B. & Berthold, F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The lancet oncology* **4**, 472-480 (2003).
- 9 Prado, G. L. *et al.* Olfactory neuroblastoma visualized by Technetium-99m-ECD SPECT. *Radiation medicine* **19**, 267-270 (2001).
- 10 Schilling, F. H. *et al.* Neuroblastoma screening at one year of age. *The New England journal of medicine* **346**, 1047-1053, doi:10.1056/NEJMoa012277 (2002).
- 11 Bronner-Fraser, M. Mechanisms of neural crest cell migration. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **15**, 221-230, doi:10.1002/bies.950150402 (1993).
- 12 Turkel, S. B. & Itabashi, H. H. The natural history of neuroblastic cells in the fetal adrenal gland. *The American journal of pathology* **76**, 225-244 (1974).
- 13 Weiss, W. A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B. G. & Bishop, J. M. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *The EMBO journal* **16**, 2985-2995, doi:10.1093/emboj/16.11.2985 (1997).

- 14 De Preter, K. *et al.* Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes. *Genome biology* **7**, R84, doi:10.1186/gb-2006-7-9-r84 (2006).
- 15 Maris, J. M. & Matthay, K. K. Molecular biology of neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **17**, 2264-2279 (1999).
- 16 Bown, N. *et al.* Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **340**, 1954-1961, doi:10.1056/NEJM199906243402504 (1999).
- 17 Mosse, Y. P. *et al.* Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. *Genes, chromosomes & cancer* **46**, 936-949, doi:10.1002/gcc.20477 (2007).
- 18 Graham, A. The neural crest. *Current biology : CB* **13**, R381-384 (2003).
- 19 Tucker, R. P. Neural crest cells: a model for invasive behavior. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**, 173-177 (2004).
- 20 Morrison, S. J., White, P. M., Zock, C. & Anderson, D. J. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* **96**, 737-749 (1999).
- 21 Bronner-Fraser, M. & Fraser, S. E. Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* **335**, 161-164, doi:10.1038/335161a0 (1988).
- 22 Stemple, D. L. & Anderson, D. J. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* **71**, 973-985 (1992).
- 23 Bixby, S., Kruger, G. M., Mosher, J. T., Joseph, N. M. & Morrison, S. J. Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron* **35**, 643-656 (2002).
- 24 Kruger, G. M. *et al.* Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* **35**, 657-669 (2002).
- 25 Anderson, D. J. *et al.* Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **62**, 493-504 (1997).
- 26 Paratore, C., Goerich, D. E., Suter, U., Wegner, M. & Sommer, L. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development* **128**, 3949-3961 (2001).

- 27 Dorsky, R. I., Moon, R. T. & Raible, D. W. Environmental signals and cell fate specification in premigratory neural crest. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **22**, 708-716, doi:10.1002/1521-1878(200008)22:8<708::AID-BIES4>3.0.CO;2-N (2000).
- 28 Sieber-Blum, M. Factors controlling lineage specification in the neural crest. *International review of cytology* **197**, 1-33 (2000).
- 29 Shah, N. M., Groves, A. K. & Anderson, D. J. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* **85**, 331-343 (1996).
- 30 Reid, K. *et al.* Multiple roles for endothelin in melanocyte development: regulation of progenitor number and stimulation of differentiation. *Development* **122**, 3911-3919 (1996).
- 31 Takano, N. *et al.* Fibronectin combined with stem cell factor plays an important role in melanocyte proliferation, differentiation and migration in cultured mouse neural crest cells. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **15**, 192-200 (2002).
- 32 Lahav, R., Ziller, C., Dupin, E. & Le Douarin, N. M. Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 3892-3897 (1996).
- 33 Ido, A. & Ito, K. Expression of chondrogenic potential of mouse trunk neural crest cells by FGF2 treatment. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**, 361-367, doi:10.1002/dvdy.20635 (2006).
- 34 Anderson, D. J. Cell and molecular biology of neural crest cell lineage diversification. *Current opinion in neurobiology* **3**, 8-13 (1993).
- 35 Hall, B. K. & Hall, B. K. *The neural crest and neural crest cells in vertebrate development and evolution*. 2nd edn, (Springer, 2009).
- 36 Etchevers, H. Primary culture of chick, mouse or human neural crest cells. *Nature protocols* **6**, 1568-1577, doi:10.1038/nprot.2011.398 (2011).
- 37 Maurer, J. *et al.* Establishment and controlled differentiation of neural crest stem cell lines using conditional transgenesis. *Differentiation; research in biological diversity* **75**, 580-591, doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00164.x (2007).
- 38 Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G. & Evan, G. I. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic acids research* **23**, 1686-1690 (1995).

- 39 Jordan, V. C. Fourteenth Gaddum Memorial Lecture. A current view of tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. *British journal of pharmacology* **110**, 507-517 (1993).
- 40 Jager, R., Maurer, J., Jacob, A. & Schorle, H. Cell type-specific conditional regulation of the c-myc proto-oncogene by combining Cre/loxP recombination and tamoxifen-mediated activation. *Genesis* **38**, 145-150, doi:10.1002/gene.20014 (2004).
- 41 Vandesompele, J. *et al.* Multicentre analysis of patterns of DNA gains and losses in 204 neuroblastoma tumors: how many genetic subgroups are there? *Medical and pediatric oncology* **36**, 5-10, doi:10.1002/1096-911X(20010101)36:1<5::AID-MPO1003>3.0.CO;2-E (2001).
- 42 Caron, H. *et al.* Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with N-myc amplification. *Nature genetics* **4**, 187-190, doi:10.1038/ng0693-187 (1993).
- 43 Henrich, K. O. *et al.* CAMTA1, a 1p36 tumor suppressor candidate, inhibits growth and activates differentiation programs in neuroblastoma cells. *Cancer research* **71**, 3142-3151, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3014 (2011).
- 44 Knoepfler, P. S., Cheng, P. F. & Eisenman, R. N. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes & development* **16**, 2699-2712, doi:10.1101/gad.1021202 (2002).
- 45 Cotterman, R. & Knoepfler, P. S. N-Myc regulates expression of pluripotency genes in neuroblastoma including *lif*, *klf2*, *klf4*, and *lin28b*. *PloS one* **4**, e5799, doi:10.1371/journal.pone.0005799 (2009).
- 46 Schwab, M. *et al.* Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* **305**, 245-248 (1983).
- 47 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* **224**, 1121-1124 (1984).
- 48 Seeger, R. C. *et al.* Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *The New England journal of medicine* **313**, 1111-1116, doi:10.1056/NEJM198510313131802 (1985).
- 49 Tsai, J. *et al.* Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3041-3046, doi:10.1073/pnas.0711741105 (2008).

- 50 Gamble, L. D., Kees, U. R., Tweddle, D. A. & Lunec, J. MYCN sensitizes neuroblastoma to the MDM2-p53 antagonists Nutlin-3 and MI-63. *Oncogene* **31**, 752-763, doi:10.1038/onc.2011.270 (2012).
- 51 Van Maerken, T. *et al.* Functional analysis of the p53 pathway in neuroblastoma cells using the small-molecule MDM2 antagonist nutlin-3. *Molecular cancer therapeutics* **10**, 983-993, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-1090 (2011).
- 52 Chantry, Y. H. *et al.* Paracrine signaling through MYCN enhances tumor-vascular interactions in neuroblastoma. *Science translational medicine* **4**, 115ra113, doi:10.1126/scitranslmed.3002977 (2012).
- 53 Maris, J. M. *et al.* Initial testing of the aurora kinase A inhibitor MLN8237 by the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP). *Pediatric blood & cancer* **55**, 26-34, doi:10.1002/pbc.22430 (2010).
- 54 Faisal, A. *et al.* The aurora kinase inhibitor CCT137690 downregulates MYCN and sensitizes MYCN-amplified neuroblastoma in vivo. *Molecular cancer therapeutics* **10**, 2115-2123, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0333 (2011).
- 55 Puissant, A. *et al.* Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition. *Cancer discovery* **3**, 308-323, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0418 (2013).
- 56 Delmore, J. E. *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* **146**, 904-917, doi:10.1016/j.cell.2011.08.017 (2011).
- 57 Filippakopoulos, P. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* **468**, 1067-1073, doi:10.1038/nature09504 (2010).
- 58 Morris, S. W. *et al.* Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* **263**, 1281-1284 (1994).
- 59 Iwahara, T. *et al.* Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* **14**, 439-449, doi:10.1038/sj.onc.1200849 (1997).
- 60 Janoueix-Lerosey, I. *et al.* Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* **455**, 967-970, doi:10.1038/nature07398 (2008).
- 61 Chen, Y. *et al.* Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* **455**, 971-974, doi:10.1038/nature07399 (2008).
- 62 George, R. E. *et al.* Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* **455**, 975-978, doi:10.1038/nature07397 (2008).

- 63 Mosse, Y. P. *et al.* Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* **455**, 930-935, doi:10.1038/nature07261 (2008).
- 64 De Brouwer, S. *et al.* Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 4353-4362, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2660 (2010).
- 65 Heukamp, L. C. *et al.* Targeted expression of mutated ALK induces neuroblastoma in transgenic mice. *Science translational medicine* **4**, 141ra191, doi:10.1126/scitranslmed.3003967 (2012).
- 66 Berry, T. *et al.* The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer cell* **22**, 117-130, doi:10.1016/j.ccr.2012.06.001 (2012).
- 67 Schulte, J. H. *et al.* High ALK receptor tyrosine kinase expression supersedes ALK mutation as a determining factor of an unfavorable phenotype in primary neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 5082-5092, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2809 (2011).
- 68 Soda, M. *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448**, 561-566, doi:10.1038/nature05945 (2007).
- 69 Mosse, Y. P. *et al.* Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *The lancet oncology* **14**, 472-480, doi:10.1016/S1470-2045(13)70095-0 (2013).
- 70 Sasaki, T. *et al.* The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer research* **70**, 10038-10043, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2956 (2010).
- 71 Schonherr, C. *et al.* Activating ALK mutations found in neuroblastoma are inhibited by Crizotinib and NVP-TAE684. *The Biochemical journal* **440**, 405-413, doi:10.1042/BJ20101796 (2011).
- 72 Marsilje, T. H. *et al.* Synthesis, Structure-Activity Relationships and In Vivo Efficacy of the Novel Potent and Selective Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Inhibitor LDK378 Currently In Phase 1 and 2 Clinical Trials. *Journal of medicinal chemistry*, doi:10.1021/jm400402q (2013).
- 73 Kato, M. & Kato, M. Human FOX gene family (Review). *International journal of oncology* **25**, 1495-1500 (2004).

- 74 Guo, C. *et al.* Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* **18**, 4948-4957, doi:10.1038/sj.onc.1202887 (1999).
- 75 Santo, E. E. *et al.* Oncogenic activation of FOXR1 by 11q23 intrachromosomal deletion-fusions in neuroblastoma. *Oncogene* **31**, 1571-1581, doi:10.1038/onc.2011.344 (2012).
- 76 Galili, N. *et al.* Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature genetics* **5**, 230-235, doi:10.1038/ng1193-230 (1993).
- 77 Parry, P., Wei, Y. & Evans, G. Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes, chromosomes & cancer* **11**, 79-84 (1994).
- 78 Myatt, S. S. & Lam, E. W. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nature reviews. Cancer* **7**, 847-859, doi:10.1038/nrc2223 (2007).
- 79 Krivtsov, A. V. & Armstrong, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nature reviews. Cancer* **7**, 823-833, doi:10.1038/nrc2253 (2007).
- 80 Moss, E. G., Lee, R. C. & Ambros, V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* **88**, 637-646 (1997).
- 81 Horvitz, H. R., Sternberg, P. W., Greenwald, I. S., Fixsen, W. & Ellis, H. M. Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **48 Pt 2**, 453-463 (1983).
- 82 Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920, doi:10.1126/science.1151526 (2007).
- 83 Peng, S., Maihle, N. J. & Huang, Y. Pluripotency factors Lin28 and Oct4 identify a sub-population of stem cell-like cells in ovarian cancer. *Oncogene* **29**, 2153-2159, doi:10.1038/onc.2009.500 (2010).
- 84 King, C. E. *et al.* LIN28B promotes colon cancer progression and metastasis. *Cancer research* **71**, 4260-4268, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4637 (2011).
- 85 Viswanathan, S. R. *et al.* Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nature genetics* **41**, 843-848, doi:10.1038/ng.392 (2009).
- 86 Nam, Y., Chen, C., Gregory, R. I., Chou, J. J. & Sliz, P. Molecular basis for interaction of let-7 microRNAs with Lin28. *Cell* **147**, 1080-1091, doi:10.1016/j.cell.2011.10.020 (2011).

- 87 Newman, M. A., Thomson, J. M. & Hammond, S. M. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *Rna* **14**, 1539-1549, doi:10.1261/rna.1155108 (2008).
- 88 Viswanathan, S. R., Daley, G. Q. & Gregory, R. I. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* **320**, 97-100, doi:10.1126/science.1154040 (2008).
- 89 Heo, I. *et al.* Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Molecular cell* **32**, 276-284, doi:10.1016/j.molcel.2008.09.014 (2008).
- 90 Koscianska, E. *et al.* Prediction and preliminary validation of oncogene regulation by miRNAs. *BMC molecular biology* **8**, 79, doi:10.1186/1471-2199-8-79 (2007).
- 91 Molenaar, J. J. *et al.* LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nature genetics* **44**, 1199-1206, doi:10.1038/ng.2436 (2012).
- 92 Powers, J., Spina, C., Collins, J. & Daley, G. Q. Abstract 2948: The role of the RNA binding protein LIN28B in neuroblastoma. *Cancer research* **72**, doi:10.1158/1538-7445.AM2012-2948 (2012).
- 93 Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience* **24**, 677-736, doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.677 (2001).
- 94 Hayashita, Y. *et al.* A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer research* **65**, 9628-9632, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2352 (2005).
- 95 Mestdagh, P. *et al.* The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-beta pathway in neuroblastoma. *Molecular cell* **40**, 762-773, doi:10.1016/j.molcel.2010.11.038 (2010).
- 96 Park, S. J. *et al.* Detection of bone marrow metastases of neuroblastoma with immunohistochemical staining of CD56, chromogranin A, and synaptophysin. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* **18**, 348-352, doi:10.1097/PAI.0b013e3181d2ed4c (2010).
- 97 Phimister, E., Kiely, F., Kemshead, J. T. & Patel, K. Expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in neuroblastoma. *Journal of clinical pathology* **44**, 580-585 (1991).
- 98 Massaron, S. *et al.* Neuron-specific enolase evaluation in patients with neuroblastoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **19**, 261-268 (1998).

- 99 Stutterheim, J. *et al.* Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers. *Clinical chemistry* **55**, 1316-1326, doi:10.1373/clinchem.2008.117945 (2009).
- 100 Kagedal, B. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: still a ways to go. *Clinical chemistry* **55**, 1268-1270, doi:10.1373/clinchem.2009.127308 (2009).
- 101 Banerjee, S. A., Hoppe, P., Brilliant, M. & Chikaraishi, D. M. 5' flanking sequences of the rat tyrosine hydroxylase gene target accurate tissue-specific, developmental, and transsynaptic expression in transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**, 4460-4467 (1992).
- 102 Orban, P. C., Chui, D. & Marth, J. D. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 6861-6865 (1992).
- 103 Stanke, M. *et al.* Target-dependent specification of the neurotransmitter phenotype: cholinergic differentiation of sympathetic neurons is mediated in vivo by gp 130 signaling. *Development* **133**, 141-150, doi:10.1242/dev.02189 (2006).
- 104 Diskin, S. J. *et al.* Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nature genetics* **44**, 1126-1130, doi:10.1038/ng.2387 (2012).
- 105 Nakagawara, A. *et al.* Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **328**, 847-854, doi:10.1056/NEJM199303253281205 (1993).
- 106 Katoh, M., Igarashi, M., Fukuda, H., Nakagama, H. & Katoh, M. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes. *Cancer letters* **328**, 198-206, doi:10.1016/j.canlet.2012.09.017 (2013).
- 107 De Brouwer, S. *et al.* Dickkopf-3 is regulated by the MYCN-induced miR-17-92 cluster in neuroblastoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **130**, 2591-2598, doi:10.1002/ijc.26295 (2012).
- 108 Pajtler, K. *et al.* Production of chick embryo extract for the cultivation of murine neural crest stem cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*, doi:10.3791/2380 (2010).
- 109 Menten, B. *et al.* arrayCGHbase: an analysis platform for comparative genomic hybridization microarrays. *BMC bioinformatics* **6**, 124, doi:10.1186/1471-2105-6-124 (2005).
- 110 Olshen, A. B., Venkatraman, E. S., Lucito, R. & Wigler, M. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy

- number data. *Biostatistics* **5**, 557-572, doi:10.1093/biostatistics/kxh008 (2004).
- 111 Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**, 156-159, doi:10.1006/abio.1987.9999 (1987).
- 112 Amati, B. & Land, H. Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Current opinion in genetics & development* **4**, 102-108 (1994).
- 113 Schulte, J. H. *et al.* MYCN and ALKF1174L are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells. *Oncogene* **32**, 1059-1065, doi:10.1038/onc.2012.106 (2013).
- 114 Bourne, S. P. *et al.* A monoclonal antibody (ERIC-1), raised against retinoblastoma, that recognizes the neural cell adhesion molecule (NCAM) expressed on brain and tumours arising from the neuroectoderm. *Journal of neuro-oncology* **10**, 111-119 (1991).
- 115 Cangemi, G. *et al.* Prognostic value of ferritin, neuron-specific enolase, lactate dehydrogenase, and urinary and plasmatic catecholamine metabolites in children with neuroblastoma. *OncoTargets and therapy* **5**, 417-423, doi:10.2147/OTT.S36366 (2012).
- 116 Goldammer, D. & Goebel, H. H. Dense core vesicles in the desmoplastic variant of cerebral neuroblastoma. *Acta neuropathologica* **50**, 81-83 (1980).
- 117 Friedman, G. K. & Castleberry, R. P. Changing trends of research and treatment in infant neuroblastoma. *Pediatric blood & cancer* **49**, 1060-1065, doi:10.1002/pbc.21354 (2007).
- 118 Chang, T. C. *et al.* Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3384-3389, doi:10.1073/pnas.0808300106 (2009).
- 119 Canete, A. *et al.* Poor survival for infants with MYCN-amplified metastatic neuroblastoma despite intensified treatment: the International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 1014-1019, doi:10.1200/JCO.2007.14.5839 (2009).
- 120 Mestdagh, P. *et al.* High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucleic acids research* **36**, e143, doi:10.1093/nar/gkn725 (2008).
- 121 Schulte, J. H. *et al.* MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **122**, 699-704, doi:10.1002/ijc.23153 (2008).

- 122 Westermann, F. *et al.* Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas. *Genome biology* **9**, R150, doi:10.1186/gb-2008-9-10-r150 (2008).
- 123 Cheng, A. J. *et al.* Cell lines from MYCN transgenic murine tumours reflect the molecular and biological characteristics of human neuroblastoma. *European journal of cancer* **43**, 1467-1475, doi:10.1016/j.ejca.2007.03.008 (2007).
- 124 NCBI. *NCBI Homology Maps*, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/homology/maps/index.shtml>> (2013).
- 125 Ikeda, Y., Lister, J., Bouton, J. M. & Buyukpamukcu, M. Congenital neuroblastoma, neuroblastoma in situ, and the normal fetal development of the adrenal. *Journal of pediatric surgery* **16**, 636-644 (1981).
- 126 Huang, R. *et al.* MYCN and MYC regulate tumor proliferation and tumorigenesis directly through BMI1 in human neuroblastomas. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 4138-4149, doi:10.1096/fj.11-185033 (2011).
- 127 Postic, C. *et al.* Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *The Journal of biological chemistry* **274**, 305-315 (1999).
- 128 Guo, Y. *et al.* Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene* **384**, 51-61, doi:10.1016/j.gene.2006.07.011 (2006).
- 129 Liang, L. *et al.* MicroRNA-125b suppressed human liver cancer cell proliferation and metastasis by directly targeting oncogene LIN28B2. *Hepatology* **52**, 1731-1740, doi:10.1002/hep.23904 (2010).
- 130 Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M. & Mori, K. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport* **11**, 1991-1996 (2000).
- 131 Tronche, F. *et al.* Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature genetics* **23**, 99-103, doi:10.1038/12703 (1999).
- 132 Rodini, C. O. *et al.* Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. *Journal of neuro-oncology* **106**, 71-79, doi:10.1007/s11060-011-0647-9 (2012).
- 133 Rasmuson, A. *et al.* Tumor development, growth characteristics and spectrum of genetic aberrations in the TH-MYCN mouse

- model of neuroblastoma. *PloS one* **7**, e51297, doi:10.1371/journal.pone.0051297 (2012).
- 134 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/homology/maps/mouse/chr8/>> (2008, 20 March).
- 135 Zhu, S. *et al.* Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer cell* **21**, 362-373, doi:10.1016/j.ccr.2012.02.010 (2012).
- 136 Liu, Z. & Thiele, C. J. ALK and MYCN: when two oncogenes are better than one. *Cancer cell* **21**, 325-326, doi:10.1016/j.ccr.2012.03.004 (2012).
- 137 Liu, H., Cheng, E. H. & Hsieh, J. J. MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer biology & therapy* **8**, 1204-1211 (2009).
- 138 Stubbusch, J. *et al.* Generation of the tamoxifen-inducible DBH-Cre transgenic mouse line DBH-CT. *Genesis* **49**, 935-941, doi:10.1002/dvg.20773 (2011).
- 139 Helland, A. *et al.* Deregulation of MYCN, LIN28B and LET7 in a molecular subtype of aggressive high-grade serous ovarian cancers. *PloS one* **6**, e18064, doi:10.1371/journal.pone.0018064 (2011).
- 140 Molenaar, J. J. *et al.* Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* **483**, 589-593, doi:10.1038/nature10910 (2012).
- 141 Wang, J. *et al.* MicroRNA-125b/Lin28 pathway contributes to the mesendodermal fate decision of embryonic stem cells. *Stem cells and development* **21**, 1524-1537, doi:10.1089/scd.2011.0350 (2012).
- 142 Rybak, A. *et al.* A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nature cell biology* **10**, 987-993, doi:10.1038/ncb1759 (2008).
- 143 Tchorz, J. S. *et al.* A modified RMCE-compatible Rosa26 locus for the expression of transgenes from exogenous promoters. *PloS one* **7**, e30011, doi:10.1371/journal.pone.0030011 (2012).
- 144 Zhu, H. *et al.* The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* **147**, 81-94, doi:10.1016/j.cell.2011.08.033 (2011).
- 145 Zuber, J. *et al.* RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* **478**, 524-528, doi:10.1038/nature10334 (2011).
- 146 Yang, H. *et al.* One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*, doi:10.1016/j.cell.2013.08.022 (2013).
- 147 Wefers, B. *et al.* Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America* **110**, 3782-3787, doi:10.1073/pnas.1218721110 (2013).
- 148 Marjanovic, N. D., Weinberg, R. A. & Chaffer, C. L. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clinical chemistry* **59**, 168-179, doi:10.1373/clinchem.2012.184655 (2013).
- 149 Srinivas, S. *et al.* Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC developmental biology* **1**, 4 (2001).
- 150 Yan, K. S. *et al.* The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 466-471, doi:10.1073/pnas.1118857109 (2012).
- 151 Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K. & Price, P. J. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *Journal of neuroscience research* **35**, 567-576, doi:10.1002/jnr.490350513 (1993).
- 152 Soucek, L. *et al.* Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature* **455**, 679-683, doi:10.1038/nature07260 (2008).

13 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der Neuroblastompathogenese.....	9
Abbildung 2: Entwicklung der Neuralleiste während der Neurulation.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Migration von Neuralleistenzellen (NLZ).	10
Abbildung 4: Aufbau des c-MycER ^T -Fusionsgens.....	13
Abbildung 5: LIN28 Protein-Struktur und Expression in verschiedenen Geweben. ...	20
Abbildung 6: Schema der Luciferase-Reaktion.	53
Abbildung 7: Hohe MYCN Expression fördert schnelles Wachstum transformierter JoMa1 Zellen und spezifische chromosomale Aberrationen.....	59
Abbildung 8: JoMa1-MYCN Tumoren exprimieren Markergene des humanen Neuroblastoms.	61

Abbildung 9: Wirkung von ALK Mutationen auf die Zellviabilität und BrdU Inkorporation.....	62
Abbildung 10: Auswirkung von FOXR1 auf die Zellviabilität von JoMa1 Zellen.	64
Abbildung 11: Klonierungsstrategie und genetisches Design der LSL- <i>Lin28b</i> Maus.	66
Abbildung 12: Genotypisierungs- und flox-out-PCR der LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> doppel-transgenen Mäuse.....	67
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Analyse der Tumor-inzidenz von LSL- <i>Lin28b</i> Mäusen im Vergleich zu LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> Mäusen.....	68
Abbildung 14: <i>In vivo</i> Biolumineszenz-Bildgebung.....	69
Abbildung 15: Makroskopische Bilder der Tumoren während der Sektion.....	69
Abbildung 16: Nachweis der <i>Lin28b-let-7-Mycn</i> regulatorischen Achse in den Tumoren der LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> Maus.	71
Abbildung 17: Charakterisierung der <i>LIN28b-let-7-Mycn</i> regulatorischen Achse <i>in vitro</i> in JoMa1 Zellen	73
Abbildung 18: Knockdown von <i>Lin28b</i> hat keinen Effekt auf die Expression von MYCN mit fehlender 3' -UTR.....	74
Abbildung 19: Ähnlichkeit der LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> Tumoren zum humanen NB.	76
Abbildung 20: Übersicht der chromosomalen Aberrationen des LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> Mausmodells und von JoMa1-MYCN Tumoren.	78
Abbildung 21: Transgenexpression in LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> Xenografts.....	79
Abbildung 22: Aggressives und invasives Wachstum der LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> Xenografts.	80
Abbildung 23: Inhibierung der <i>Lin28b-let-7-Mycn</i> Achse in LSL- <i>Lin28b</i> ; <i>Dbh-iCre</i> Xenografts mit JQ1.....	82
Abbildung 24: JQ1 reduziert die c-Myc- und MYCN Expression sowie die Zellviabilität von humanen NB Zelllinien.....	84

Abbildung 25: Reduktion der Zellviabilität von Xenografts der humanen Neuroblastom Zelllinie IMR5/75 durch JQ1..... 86

Abbildung 26: Hinweise auf die Funktion von Lin28b in anderen Tumorentitäten..... 88

14 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Stadien des Neuroblastoms (<i>International Neuroblastoma Staging System – INSS</i>)	6
Tabelle 2: Liste der Gene mit denen JoMa1 Zellen transfiziert wurden und deren Rolle im NB.....	26
Tabelle 3: Genutzte Geräte	28
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller	29
Tabelle 5: Genutzte Chemikalien und Bezugsquellen.....	30
Tabelle 6: Diverse genutzte Enzyme und ihre Hersteller	31
Tabelle 7: Kits und ihre Bezugsquellen	32
Tabelle 8: Erst- und Zweit-Antikörper und ihre Bezugsquellen	32
Tabelle 9: Lösungen der Zellkultur	33
Tabelle 10: Liste der für die PCR genutzten Oligonukleotide.....	45
Tabelle 11: Liste der genutzten qRT-PCR Oligonukleotide.....	50
Tabelle 12: Liste der genutzten Antikörper für die immunhistochemischen Analysen der Tumorschnitte und Tumorzellen.....	54
Tabelle 13: Übersicht über die chromosomalen Aberrationen des LSL- <i>Lin28b;Dbh-iCre</i> Mausmodells und den homologen Bereichen der humanen Chromosomen.....	78

15 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

16 Eidesstattliche Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Untersuchung der Neuroblastompathogenese aus Neuralleistenvorläuferzellen in vitro und in vivo*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Sven Lindner befürworte.

Essen, den 22.10.2013

Prof. Dr. med. Johannes H. Schulte

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 22.10.2013

Sven Lindner

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den 22.10.2013

Sven Lindner

Folgende Arbeiten wurden von Frau Anna Bohrer im Rahmen ihrer medizinischen Doktorarbeit gemacht: Die Transfektion von JoMa1 Zellen mit pMSCVpuro-MYCN. Die Durchführung der Xenografts mit JoMa1-MYCN und die Replantation der aus JoMa1-MYCN entstandenen Tumoren.

Alle Hämatoxylin-Eosin, Ki67 und gespaltene Caspase 3 Färbungen, sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Herrn Lukas Heukamp und Frau Alexandra Florin (Pathologie Uniklinikum Köln) in Kooperation mit der AG Schulte angefertigt.

Alle aCGH Analysen wurden Frau Anneleen Beckers (Gent, Belgien, Center for Medical Genetics) in Kooperation mit der AG Schulte durchgeführt und prozessiert. Die Auswertung wurde von Sven Lindner angefertigt.

Alle qRT-PCRs der *let-7* miRNA Familie wurde von Herrn Pieter Mestdagh (Gent, Belgien, Center for Medical Genetics) in Kooperation mit der AG Schulte durchgeführt und ausgewertet.

Der mRNA Array in Abbildung 16 C wurden von Herrn Ludger Klein-Hitpass (Uniklinikum Essen) durchgeführt und die Daten wurden von Herrn Jan Molenaar (Amsterdam, Niederlande, Akademisches Medizinisches Zentrum) ausgewertet.