

**Etablierung eines *MYCN*-vermittelten
murinen Neuroblastommodells und Analyse
tumorsuppressiver mikroRNAs**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Kristina Althoff

aus Herne

August 2013

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

1. Gutachter:	Prof. Dr. Johannes Schulte
2. Gutachter:	Prof. Dr. Bertram Opalka
Vorsitzender des Prüfungsausschusses:	Prof. Dr. Peter Bayer
Tag der mündlichen Prüfung:	12. Dezember 2013

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das Neuroblastom	1
1.2	Molekulare Marker und Risikostratifikation	2
1.3	Die Maus als Neuroblastom-Modellorganismus.....	4
1.3.1	Modelle mit neuralleisten-spezifischer, stabiler Überexpression eines Onkogens.....	4
1.3.2	Konditionale Modelle.....	5
1.4	MikroRNAs	7
1.4.1	Die Biogenese und Funktion von miRNAs.....	7
1.4.2	Die Rolle von miRNAs bei der Pathogenese des Neuroblastoms und anderen Tumorentitäten	8
2	ZIEL DER ARBEIT	12
3	MATERIAL UND METHODEN.....	13
3.1	Tierexperimentelle Methoden	13
3.1.1	Generierung der LSL-MYCN Maus.....	13
3.1.2	Zucht von LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen und Detektion von Tumoren	16
3.1.3	Xenografts und Nanopartikel-Behandlung.....	18
3.2	Molekularbiologische Methoden	18
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	18
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	20
3.2.3	Klonierung der Konstrukte pDEST30-KDM1A und pDEST30-Survivin.....	21
3.2.4	Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA.....	21
3.2.5	Isolierung genomischer DNA	22
3.2.6	mRNA- und miRNA-Isolierung.....	22
3.2.7	Reverse Transkription von komplementärer DNA aus isolierter mRNA und miRNA.....	22
3.2.8	Quantitative PCR.....	22
3.2.9	Array-basierte comparative genomische Hybridisierung.....	24
3.2.10	mRNA qPCR profiling	24
3.2.11	miRNA qPCR profiling	25
3.3	Biochemische Methoden	26
3.3.1	Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung ihrer Konzentration.....	26
3.3.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	26
3.3.3	Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen	27
3.3.4	Proteomanalyse	29
3.3.5	Herstellung von Calcium-Phosphat-Nanopartikeln.....	29
3.4	Histologische Methoden	30
3.4.1	Histologische und immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten	30
3.4.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Gewebeschnitten.....	30
3.4.3	Immunfluoreszenzfärbungen von Proteinen in humanen Zelllinien	31

3.5	Zellbiologische Methoden.....	31
3.5.1	Kultivierung von Zellen	31
3.5.2	Transiente Transfektionen von miRNA und siRNA	32
3.5.3	Generierung von stabilen Zellklonen und Induktion von konditionalen Konstrukten.....	33
3.5.4	Mikroskopische Aufnahmen von Zellen.....	34
3.5.5	Zellviabilitäts-Assay	34
3.5.6	Apoptose-Assay.....	35
3.5.7	Proliferations-Assay.....	35
3.5.8	Zellzyklusanalyse	36
3.5.9	Luziferase Reporter Assay	36
3.6	Genset <i>Enrichment</i> Analyse, statistische Methoden und Bildbearbeitung	37
3.6.1	Genset <i>Enrichment</i> Analyse	37
3.6.2	Statistische Analysen	38
3.6.3	Bildbearbeitung	38
4	ERGEBNISSE.....	39
4.1	Das LSL-<i>MYCN</i>;Dbh-<i>iCre</i> Mausmodell.....	39
4.1.1	Generierung der transgenen Mauslinie LSL- <i>MYCN</i>	39
4.1.2	LSL- <i>MYCN</i> Beobachtungskohorte	39
4.1.3	Genotypisierungen.....	40
4.1.4	Embryotoxizität des Genotyps LSL- <i>MYCN</i> ;Dbh- <i>iCre</i>	40
4.1.5	Tumorinzidenz und -lokalisierung.....	41
4.1.6	Tumorhistologie und Expression spezifischer Neuroblastommarker	47
4.1.7	Vergleich der Tumorinzidenz des LSL- <i>MYCN</i> ;Dbh- <i>iCre</i> Mausmodells mit der des etablierten <i>TH-MYCN</i> Mausmodells	48
4.1.8	Genomische Aberrationen von LSL- <i>MYCN</i> ;Dbh- <i>iCre</i> Tumoren.....	49
4.1.9	mRNA Profiling.....	51
4.1.10	miRNA Profiling	54
4.1.11	miR-542 als potentiell tumormodulierende miRNA im Neuroblastom.....	57
4.2	Die tumorsuppressive Funktion von miR-542 in humanen Neuroblastomen und Zelllinien	58
4.2.1	Expressionsanalyse von miR-542 und Survivin in humanen Primärtumoren	58
4.2.2	Funktion von miR-542-3p Expression in Zelllinien.....	62
4.2.3	Regulation der Expression von Survivin durch miR-542-3p.....	66
4.2.4	Direkte Bindung von miR-542-3p an Survivin 3'UTR.....	67
4.2.5	Funktion von Survivin Herunterregulation in Zelllinien	68
4.2.6	Partielle Wiederherstellung des Phänotyps der miR-542-3p Expression mittels Hochregulation von Survivin ohne miRNA-Bindestelle.....	71
4.2.7	MiR-542-3p beladene Nanopartikel zur miRNA-Behandlung von Neuroblastomzellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	72

4.3	Die tumorsuppressive Funktion von miR-137 in humanen Neuroblastomen und Zelllinien	77
4.3.1	KDM1A als potentielles Ziel einer Neuroblastomtherapie	77
4.3.2	Expressionsanalyse von miR-137 in humanen Primärtumoren	79
4.3.3	Funktion von miR-137 in Zelllinien	80
4.3.4	Validierung von <i>KDM1A</i> als direktes Ziel von miR-137 in Zelllinien	83
4.3.5	Funktion von KDM1A Herunterregulation in Zelllinien	85
4.3.6	Partielle Wiederherstellung des Phänotyps der miR-542-3p Expression mittels Hochregulation von KDM1A ohne miRNA-Bindestelle.....	87
4.3.7	Identifizierung und Validierung von AKAP2 als weiteres Ziel von miR-137.....	88
5	DISKUSSION.....	91
5.1	Das LSL-MYCN;Dbh-iCre Mausmodell.....	91
5.1.1	Tumore des LSL-MYCN;Dbh-iCre Mausmodells lassen sich als murine Neuroblastoma beschreiben.....	91
5.1.2	Gegenüberstellung der beiden Neuroblastom-Mausmodelle LSL-MYCN;Dbh-iCre und TH-MYCN.....	93
5.1.3	Identifikation enurer Ziele einer Neuroblastomtherapie anhand des LSL-MYCN;Dbh-iCre Mausmodells.....	96
5.1.4	Mögliche Weiterentwicklungen des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells, die neue Erkenntnisse für die Forshcung am humanen Neuroblastom geben könnten	103
5.1.5	Die Relevanz des LSL-MYCN Mausmodells für die Genese anderer Tumorentitäten	105
5.2	Tumorsuppressive miRNAs im Neuroblastom.....	106
5.2.1	Die tumorsuppressive Funktion von miR-542 im Neuroblastom	107
5.2.2	Die tumorsuppressive Funktion von miR-137 im humanen Neuroblastom.....	111
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	114
7	ABSTRACT.....	1146
8	LITERATUR.....	117
9	ABKÜRZUNGEN	131
10	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	133
10.1	Abbildungsverzeichnis	133
10.2	Tabellenverzeichnis.....	136
11	ANHANG.....	137
11.1	Danksagung.....	137
11.2	Publikationen und Kongressbeiträge	138
11.2.1	Publikationen	138
11.2.2	Kongressbeiträge.....	139
11.3	Lebenslauf	141
11.4	Erklärungen.....	142

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist der häufigste solide Tumor des Kindesalters und verantwortlich für ca. 15% aller pädiatrisch-onkologischen Todesfälle. Die Prävalenz beträgt 1:7.000, die Inzidenz 1,3 Neuerkrankungen auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren, wobei das mittlere Alter bei Diagnose bei 17,4 Monaten liegt^{1,2}. Neuroblastome entwickeln sich aus primitiven Neuralleistenzellen, die entlang des sympathischen Grenzstranges sowie im Nebennierenmark lokalisiert sind³. Histologisch wird das Neuroblastom zusammen mit dem Rhabdomyosarkom, dem Non-Hodgkin Lymphom und dem Ewing Sarkom zu den klein-, blau-, rundzelligen Tumoren gezählt¹. Es handelt sich um einen heterogenen, bösartigen Tumor, der sich bei günstiger Biologie (Stadien 1, 2 und 4s) häufig auch ohne Therapie komplett zurückbildet oder differenziert, während eine ungünstige Biologie (Stadien 3 und 4) trotz Anwendung modernster, multimodaler Therapie nicht selten zum Tod des Patienten führt⁴. Die Einteilung der Stadien erfolgt nach dem 1988 entwickelten⁵ und 1993 modifizierten⁶ *International Neuroblastoma Staging System* (INSS). Die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 59%, wobei diese stark mit dem Stadium assoziiert ist^{7,8} (Tab. 1). Nach einem Rückfall wird jedoch eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 8-31% postuliert⁹⁻¹¹ und aktuelle Behandlungsprotokolle können nur 25-35% der Patienten mit hohem Stadium heilen⁴. Demnach ist die Notwendigkeit für neue zielgerichtete Neuroblastomtherapien sehr groß.

Tab. 1: International Neuroblastoma Staging System (INSS)^{3,5,6}

Stadium	Definition	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 Disseminationen zu entfernten Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder anderen Organen	< 20%
4s	lokalisierter Primärtumor mit Disseminationen begrenzt auf Haut, Leber und/oder Knochenmark, beschränkt auf Kinder < 1 Jahr	~ 75%

1.2 Molekulare Marker und Risikostratifikation

Neben dem Patientenalter bei Diagnose, dem Tumorstadium sowie den Serum-Ferritin und Laktatdehydrogenase-Spiegeln^{12,13} gibt es genetische und biologische Marker, die prädiktiv für den Verlauf der Erkrankung sind.

Eine Amplifikation des Onkogens *MYCN* (*v-myc myelocytomatosis viral related oncogen, neuroblastoma derived*), lokalisiert auf Chromosom 2p24, ist bei 20% aller Neuroblastome detektierbar und mit fortgeschrittenem Stadium, schnellem Tumorwachstum und schlechter Prognose assoziiert^{14,15}. DNA-Sequenzanalysen zeigen nur in seltenen Fällen Mutationen in *MYCN* kodierenden Regionen¹⁶, was vermuten lässt, dass das erhöhte Maß an transkriptionell aktivem Wildtyp Gen, das mit hohen *MYCN* mRNA Level einhergeht, zur Tumorformation führt. *MYCN* agiert zusammen mit seinen beiden Co-Faktoren *MAD* und *MAX* als Transkriptionsfaktor und beeinflusst die Expression von Genen, die sowohl bei Entwicklung und Migration als auch bei Apoptose und Proliferation eine Rolle spielen¹⁷.

Die Expression des Neurotrophinrezeptors *NTRK1* korreliert mit niedrigem Tumorstadium und günstiger Prognose von Neuroblastompatienten¹⁸, während die Expression des Neurotrophinrezeptors *NTRK2* mit schlechter Prognose assoziiert ist¹⁹.

Die meisten familiären und 10% der sporadischen Neuroblastome weisen aktivierende Mutationen der Anaplastischen Lymphom Kinase (*ALK*) auf. Die *ALK^{F1174L}* Mutation ist

nicht nur eine der häufiger vorkommenden Mutationen, sondern auch die Mutation mit der größten Korrelation zu einem aggressiven Krankheitsverlauf²⁰⁻²².

Die prognostische Aussagekraft eines teilweisen oder kompletten Zugewinns von Chromosom 17q, der bei 63-83% aller Neuroblastome auftritt, ist umstritten²³. Innerhalb dieser Region liegt das Gen *BIRC5* (*Baculoviral IAP repeat-containing 5*), welches für das Protein Survivin kodiert^{23,24}. Im Vergleich zu Normalgewebe, Malignomen bei Erwachsenen und nicht-malignen fetalen Neuroblasten der Nebenniere ist die Expression von Survivin im Neuroblastom erhöht. Die Überexpression von Survivin im Tumor korreliert außerdem mit einer ungünstigen Prognose der Patienten^{25,26}. Survivin interagiert mit Aurora B Kinase (AURKB), INCENP und Borealin, die zusammen den chromosomalen *Passenger* Komplex (CPC) bilden. Dieser Komplex reguliert Schlüsselereignisse während der Mitose wie die Korrektur von Fehlern bei der Anheftung der Chromosomen an die Mikrotubuli, die Aktivierung von Kontrollpunkten beim Aufbau des Spindelapparates und die Konstruktion und Regulation des kontraktilen Apparates, der die Zytokinese antreibt²⁷. Außerdem stabilisiert Survivin die Mikrotubuli durch direkte Bindung an diese²⁸.

Die Lysin-spezifische Demethylase 1 (KDM1A), die die Entfernung der einfachen oder doppelten Methylierung sowohl von Lysin 4 als auch von Lysin 9 an Histon 3 katalysiert, spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation von Genen während der Entwicklung²⁹. Eine Überexpression von KDM1A, die mit erhöhter Zellproliferation einhergeht, wird in verschiedenen Tumorentitäten postuliert³⁰⁻³⁴. In primären Neuroblastomen ist die Expression von KDM1A invers mit Differenzierung und günstigem Krankheitsverlauf korreliert. Die Herunterregulation von KDM1A in humanen Neuroblastomzelllinien führt außerdem zur Reduktion der Zellviabilität³⁵.

1.3 Die Maus als Neuroblastom-Modellorganismus

Tiermodelle humaner Erkrankungen können für das Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Pathogenese der Erkrankung unterliegen, sehr hilfreich sein. Aufgrund der kurzen Generationszeit, der geringen Größe, der einfachen Haltungsbedingungen, der Ähnlichkeit zum Menschen und des komplett sequenzierten Genoms stellt die Labormaus (*Mus musculus*) eines der geeignetsten Modelle zur Untersuchung von Krebserkrankungen dar³⁶. Für das Krankheitsbild des Neuroblastoms werden verschiedene gentechnisch-veränderte Mausmodelle beschrieben, die allesamt auf die Überexpression eines bestimmten, für diese Tumorentität relevanten, Transgens zurückzuführen sind. Dabei wird zwischen konventionellen und konditionalen Mausmodellen unterschieden.

1.3.1 Modelle mit neuralleisten-spezifischer, stabiler Überexpression eines Onkogens

1.3.1.1 Das TH-MYCN Modell

Basierend auf der Erkenntnis, dass eine *MYCN*-Amplifikation beim Neuroblastom ein häufiges Ereignis darstellt generierten Weiss *et al.* 1997 das *TH-MYCN*-Mausmodell. Ein Plasmidkonstrukt wurde entwickelt, in das cDNA für humanes *MYCN* hinter einen Tyrosin Hydroxylase (*TH*) Promotor aus der Ratte ligiert wurde. Mittels Pronukleus-Injektion wurde das Plasmid in murine Blastozysten eingebracht und transgene Mäuse generiert³⁷. Der Promotor ist, wie schon 1992 beschrieben wurde, sowohl im Zentralnervensystem als auch in den sympathischen Ganglien und der Nebenniere aktiv³⁸. Mittels des *TH-MYCN* Mausmodells konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Überexpression von *MYCN* das Potential besitzt die Entstehung muriner Neuroblastome zu treiben, da transgene Mäuse dieser Linie klein-, blau- und rundzellige Tumore entwickeln, die unifokal aus dem *Ganglion coeliacum* entstehen. Die Inzidenz der Neuroblastomentwicklung heterozygoter Tiere liegt im 129x1/SvJ Stamm bei 70% und im C57Bl/6N Stamm bei 5%. Kommt das Transgen homozygot vor, liegt die Inzidenz im 129x1/SvJ Stamm bei über 90%³⁷.

1.3.1.2 Das *TH-ALK^{F1174L}* Modell

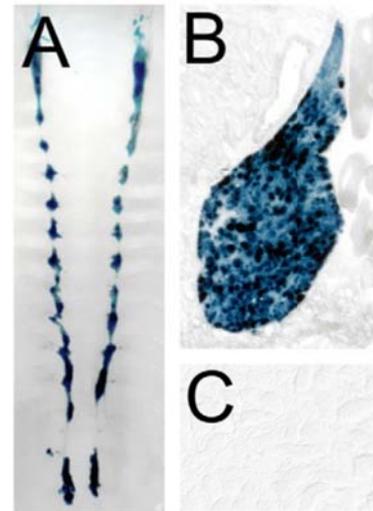
Berry *et al.* generierten das *TH-ALK^{F1174L}* Mausmodell, indem sie humanes *ALK^{F1174L}* hinter den *TH* Promotor aus der Ratte klonierten und dieses Konstrukt in murine Blastozysten injizierten. Keine der transgenen Tiere entwickelt einen Tumor, während die Verkreuzung mit der *TH-MYCN* Maus jedoch zu einer signifikanten Steigerung der Tumorpenetranz dieses Modells führt, vergleichbar mit der homozygoter *TH-MYCN* Tiere³⁹.

1.3.2 **Konditionale Modelle**

Das Cre-lox-Rekombinationssystem ermöglicht eine genetische Modifikation spezifischer Zell- und Gewebearten. Die Cre-Rekombinase wird dabei hinter einen spezifischen Promotor kloniert und nur in den Zellen exprimiert, in denen der Promotor aktiv ist. Ein Gen, das von *loxP* Sequenzen flankiert ist, wird in Cre-exprimierenden Zellen aufgrund der Rekombinase-Aktivität ausgeschnitten. In konditionalen Mausmodellen wird diese Technik zum einen zum Stilllegen von Genen und zum anderen zur Entfernung von Sequenzen, die die Transkription von Transgenen verhindern, verwendet. Im letzteren Fall wird das Transgen nach dem Ausschneiden der *loxP* Sequenzen exprimiert. Es kommt häufig vor, dass nicht alle Zellen des Zielgewebes die Cre-Rekombinase exprimieren, was zu einem mosaikartigen Ausschneiden der *loxP* Stellen führt. Dieses Phänomen spiegelt die Situation eines spontanen Tumors wider, bei dem ebenfalls nicht alle Zellen des Gewebes, aus dem dieser entsteht, die Mutation aufweisen. Die Aktivität des Promotors, der die Expression der Cre-Rekombinase antreibt, ist häufig nicht nur auf die Ziel-Zelltypen beschränkt, was eine genaue Untersuchung des Expressionsmusters des zu verwendenden Cre-Modells unabdingbar macht.

Etablierte konditionale Neuroblastommodelle nutzen das *Dbh-iCre* Mausmodell zur spezifischen Expression des jeweiligen Onkogens. Die Cre-Rekombinase steht hier unter Kontrolle des murinen Dopamin beta-Hydroxylase (*Dbh*) Promotors. Stanke *et al.* zeigten anhand der Verkreuzung mit einer ROSA26 Reportermaus, dass die Cre-Rekombinase im *Dbh-iCre* Modell ausschließlich in noradrenergen Neuronen des peripheren und des zentralen Nervensystems exprimiert wird⁴⁰ (Abb. 1).

Abb. 1: Expression der Cre-Rekombinase im *Dbh-iCre* Mausmodell Verkreuzung mit einer ROSA26 Reporter Mauslinie; β -Galaktosidase Färbung in sympathischen Ganglien von Embryonen (E16,5) zur Detektion der Cre-vermittelten lacZ Expression: **(A,B)** positiv im sympathischen Grenzstrang, **(C)** negativ in Schweißdrüsen-gewebe. Modifiziert nach Stanke *et al.*⁴⁰.



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

Anhand der Erkenntnis, dass eine hohe Expression von LIN28 Homolog B (*LIN28B*) mit schlechtem Gesamtüberleben von Neuroblastompatienten assoziiert ist, generierten Molenaar *et al.* ein konditionales Mausmodell zur Überexpression des murinen Gens. Verkreuzt mit dem *Dbh-iCre* Modell entwickeln LSL-*Lin28b* Mäuse murine Neuroblastome, die eine hohe Expression von *MYCN* aufweisen. Die Neuroblastomgenese dieses Modells wird über die Hochregulation von *MYCN* durch *Lin28b* vermittelt⁴¹.

1.3.2.2 Das LSL-*ALK*^{F1174L}; *Dbh-iCre* Modell

Heukamp *et al.* entwickelten ein konditionales Neuroblastommodell, das bei Verkreuzung mit einer Cre-Maus humanes *ALK*^{F1174L} überexprimiert. In vier von zehn Tieren konnte die Entwicklung eines Neuroblastoms beobachtet werden. Die Verkreuzung mit dem *TH-MYCN* Modell führte zu einer signifikanten Steigerung der Tumorzinzidenz⁴².

1.4 MikroRNAs

MikroRNAs (miRNAs) sind kurze, hoch-konservierte, nicht-kodierende RNA Moleküle, die die Expression von Zielgenen mit komplementären Sequenzen regulieren können. Über 800 verschiedene humane miRNAs konnten bisher identifiziert werden (www.mirbase.org) und es wird vermutet, dass bis zu 30% aller humanen Gene Ziel einer Regulation durch miRNAs sind⁴³.

1.4.1 Die Biogenese und Funktion von miRNAs

Die Biogenese von miRNAs (Abb. 2) beginnt mit der Transkription des miRNA-Gens durch die RNA Polymerase II, wobei die primäre miRNA (pri-miRNA) gebildet wird (500–3000 Basen)^{44,45}. Die erhaltene Haarnadel-Struktur wird von Drosha, einer Endonuklease der RNase III Familie, abgespalten und die ca. 70 Basen lange Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) freigesetzt⁴⁶. Hierzu bildet Drosha mit seinem Co-Faktor DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) einen Komplex, der auch als Mikroprozessor-Komplex bekannt ist⁴⁷. Mittels des Ran-abhängigen Kerntransport-Rezeptors Exportin-5 wird die pre-miRNA aus dem Nukleus in das Zytoplasma exportiert⁴⁸. Die zytoplasmatische RNase III Dicer prozessiert die pre-miRNA in ca. 22 Nukleotide lange miRNA-Doppelstränge⁴⁹. Die ausgereifte miRNA wird mittels einer RNA-Helicase in zwei Einzelstränge konvertiert⁵⁰ und lagert sich mit dem RNA-induzierten *silencing* Komplex (RISC) zum miRNA-RISC Effektor-Komplex zusammen. Während der 3' Einzelstrang der miRNA (3p-Isoform) häufig degradiert wird, interagiert der 5' Einzelstrang (5p-Isoform) mit dem RISC-Komplex^{51,52}. Die miRNA erkennt komplementäre Sequenzen spezifischer Ziel-mRNAs in der 3' untranslatierten Region (UTR), meistens an der 2-8 Nukleotide langen Bindestelle am 5' Ende, und der miRNA-RISC-Komplex unterdrückt die Genexpression durch Inhibierung der Translation oder Induktion von mRNA Degradation^{53,54}. Jede miRNA kann an mehrere mRNAs binden und jede mRNA kann von verschiedenen miRNAs reguliert werden. Mittels *in silico* Analysen können potentielle Ziele von miRNAs vorhergesagt werden (www.targetscan.org). Jedoch beruht die biologische Funktionalität der miRNA nicht nur auf der Bindung an komplementäre Basen, sondern wird auch durch andere Faktoren, wie der Anzahl der Zielsequenzen der umliegenden Sequenzen der mRNA⁵⁵ und der Okkupation von Bindestellen durch RNA-bindende Proteine⁵⁶, beeinflusst. Demzufolge ist es notwendig vorhergesagte Ziele von

miRNAs in biologischen Experimenten, beispielsweise mittels Luziferase Reporter Analysen, zu validieren.

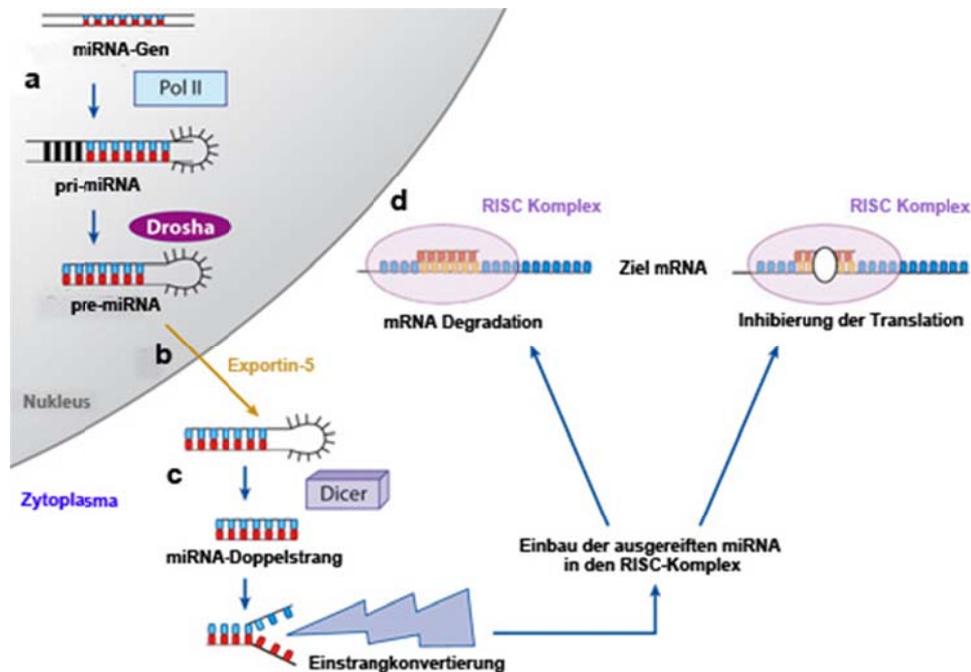


Abb. 2: Die Biogenese von miRNAs (a) Transkription des miRNA Gens in primäre miRNA (pri-miRNA) durch RNA Polymerase II (Pol II); Abspaltung der haarnadel-förmigen Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) durch Drosha. (b) Export ins Zytoplasma durch Exportin-5 und (c) Prozessierung durch Dicer; Inkorporation in den RNA-induzierten *silencing* Komplex (RISC). (d) spezifische mRNA Degradation oder Inhibierung der Translation von Proteinen. Modifiziert nach Garzon *et al.*⁵⁷.

1.4.2 Die Rolle von miRNAs bei der Pathogenese des Neuroblastoms und anderen Tumorentitäten

MiRNAs spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Mechanismen, wie Proliferation, Apoptose, Zellwachstum und Zellzyklus, weshalb es nicht verwunderlich ist, dass sie auch mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden. Abhängig davon, ob sie mRNAs regulieren, die tumorsuppressive oder onkogene Proteine kodieren, wirken sie als onkogene oder tumorsuppressive miRNAs⁵⁸.

1.4.2.1 Das onkogene miR-17-92-Cluster

Das bekannteste Beispiel für die Beteiligung von miRNAs an der Pathogenese des Neuroblastoms ist das miR-17-92-Cluster, das sechs miRNAs umfasst (miR-17, -18a, -19a, -19b -20a und -92), die in Neuroblastomzelllinien mit hoher *MYCN* Expression stärker exprimiert werden als in Zelllinien mit niedrigem *MYCN* Level. Mittels Luziferase Reporter Analyse konnte gezeigt werden, dass *MYCN* in verschiedenen Genregionen des miR-17-92-Clusters direkt bindet und die miRNAs hochreguliert. Eine ektoische Expression des miR-17-92-Clusters in der Neuroblastomzelllinie SK-N-AS, die nur eine Kopie des *MYCN* Gens trägt, führt zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen⁵⁹. Auch in primären Neuroblastomen konnte eine Hochregulation in Hoch-Risiko-Patienten gezeigt werden^{60,61}.

1.4.2.2 Tumorsuppressive miRNAs

Die erste miRNA, deren tumorsuppressive Funktion im Neuroblastom beschrieben wurde, ist miR-34a, die auf der chromosomalen Region 1p36.23 lokalisiert ist. Besonders in humanen Neuroblastomen, die eine *MYCN* Amplifikation aufweisen, liegt diese Region häufig homozygot deletiert vor. Tumore mit 1p Deletion weisen eine niedrige Expression von miR-34a auf und die exogene Expression der miRNA in Neuroblastomzelllinien führt zu einer Reduktion der Proliferation und induziert Apoptose^{62,63}. Interessanterweise weist die 3'UTR von *MYCN* zwei funktionelle Bindestellen der miR-34a auf und die Bindung der miRNA an diese Bindestellen führt zu einer Herunterregulation von *MYCN* auf Proteinebene⁶⁴. Es wird vermutet, dass genau diese Regulation den Phänotyp der miR-34a Überexpression erklärt⁶⁵. Chen *et al.* beschreiben einen weiteren Signalweg in dieser Achse. Sie konnten zeigen, dass *MYCN* in Neuroblastomzelllinien direkt die Expression von Survivin durch Bindung an den Survivin Promoter reguliert⁶⁶.

Schulte *et al.* analysierten die Expression von 430 miRNAs in 69 Tumoren von Neuroblastompatienten mittels multiplex Hochdurchsatz-qPCR⁶⁷. Anhand einer Kaplan-Meier Analyse können diese Neuroblastompatienten anhand der miRNA Expressionsprofile in Langzeit und- Kurzzeit-Überlebende separiert werden. Auf Basis der 20 miRNAs mit der höchsten positiven und der 20 miRNAs mit der höchsten negativen Beteiligung, die zu einer effizienten Separation der Patienten führt, wurde eine nicht-überwachte Clusteranalyse durchgeführt (Abb. 3). Beide Isoformen der miR-542 sind in Tumoren mit hohem Stadium niedriger exprimiert als in Tumoren mit

günstiger Biologie. Die miR-542 Expression ist signifikant niedriger in Tumoren mit *MYCN* Amplifikation im Vergleich zu Tumoren mit nur einer Kopie von *MYCN* sowie in Tumoren von Patienten mit Rückfall im Vergleich zu Patienten mit Tumor-freiem Überleben⁶⁷.

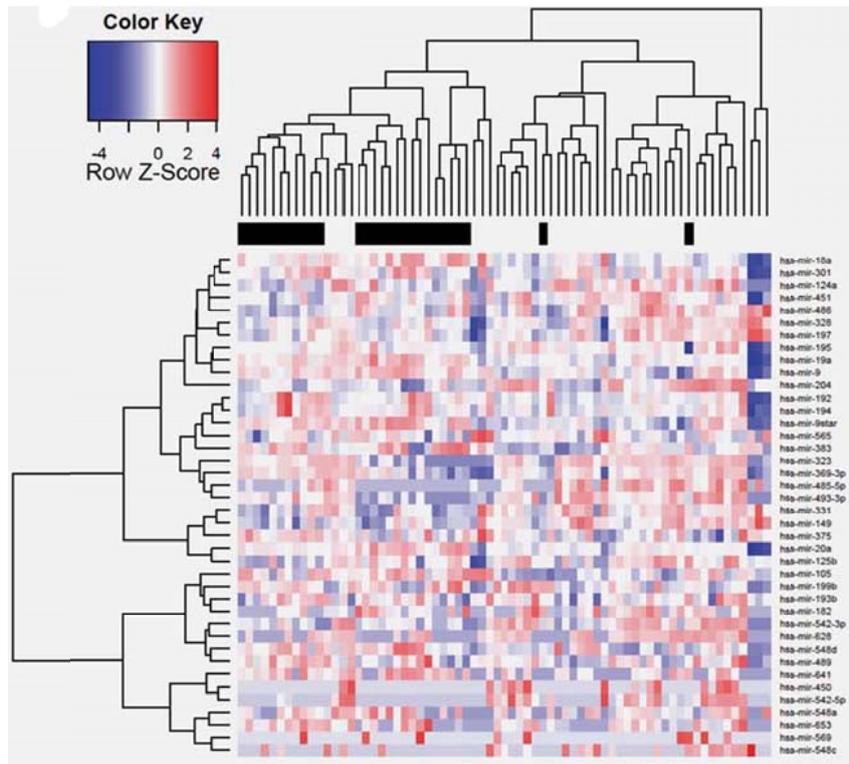


Abb. 3: Auftrennung von Neuroblastompatienten mit guter und schlechter Prognose anhand von miRNA Expressionsprofilen Zwei-dimensionale Clusteranalyse basierend auf 40 miRNAs. Schwarze Balken = Patienten mit Rückfall. Grüne Pfeile = Expression der miR-542-3p und miR-542-5p. Modifiziert nach Schulte *et al.*⁶⁷.

Bray *et al.* beschreiben ebenfalls eine Korrelation zwischen fehlender Expression von miR-542-5p und sowohl schlechterem Ereignis-freiem als auch schlechterem Gesamtüberleben in 144 Neuroblastompatienten⁶⁸. Nach exogener Expression dieser miRNA kann zwar kein Unterschied in der Proliferationsrate der Neuroblastomzelllinien Kelly, SK-N-AS und NB1691 detektiert werden, aber sowohl Kelly als auch SK-N-AS Zellen reagieren mit signifikant verringerter Invasivität durch eine Matrigel-Matrix. Die Expression von miR-542-3p induziert eine Reduktion der Proliferationsrate der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549, der humanen Zervixkarzinomzelllinie HeLa und der humanen Brustkrebszelllinie MCF7⁶⁹. Des Weiteren reduziert miR-542-3p die Fähigkeit von A549 Zellen zur Koloniebildung. Sowohl in A549 als auch in HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass Survivin ein direktes Target von miR-542-3p ist.

Ein weiteres Beispiel für eine miRNA mit tumorsuppressiver Funktion ist miR-137, die auf dem humanen Chromosom 1p22 lokalisiert ist. MiR-137 ist in verschiedenen humanen Tumorentitäten, wie dem Glioblastom⁷⁰, dem Kolorektalkarzinom⁷¹, dem Mundhöhlenkarzinom und dem Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Nackens herunterreguliert⁷². Die exogene Expression von miR-137 in den Mundhöhlenkarzinomzelllinien HSC-6 und HSC-7 reduziert deren Wachstum und Konfluenz *in vitro*⁷².

2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Dissertation war es, ein neues konditionales *MYCN* vermitteltes Mausmodell zu generieren und zu etablieren. Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

1. Entwickeln *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäuse Tumore, die als murine Neuroblastome beschrieben werden können?

Anhand der Lokalisation sowie der histologischen und molekularen Eigenschaften der Tumore, die sich in transgenen *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen entwickeln, soll untersucht werden, ob sich das Modell als murines Neuroblastommodell eignet. Weiterhin sollen verschiedene Bildgebungsmethoden angewendet werden, um das Modell genauer zu charakterisieren.

2. Wie unterscheiden sich die Tumore des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells von denen des etablierten *TH-MYCN* Modells?

In diesem Teil der Arbeit sollen die Eigenschaften des neuen *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodells mit denen des etablierten Neuroblastommodells *TH-MYCN* verglichen werden, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede herauszuarbeiten.

3. Kann das *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodell genutzt werden, um neue Ziele einer Neuroblastomtherapie zu identifizieren und sind diese validierbar?

Anhand des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodells sollen potentiell tumorsuppressive miRNAs detektiert werden, die sowohl bei der Genese als auch für die Therapie des Neuroblastoms eine Rolle spielen könnten. Nach erfolgreicher Identifikation soll die funktionelle Bedeutung ausgewählter miRNAs *in vitro* in etablierten humanen Neuroblastomzelllinien analysiert werden. Dazu sollen die miRNAs ektopisch exprimiert und die phänotypischen Auswirkungen auf die Zellen untersucht werden. Des Weiteren sollen aus anderen Tumorentitäten bekannte Zielgene dieser miRNAs im Neuroblastom validiert werden.

3 Material und Methoden

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, falls nicht anders erwähnt, von den in Deutschland vertretenen Firmen Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), AppliChem GmbH (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen. Die Synthese von Oligonukleotidprimern erfolgte bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem, *Millipore*-gereinigtem Wasser angesetzt. Puffer und Lösungen, die unter sterilen Bedingungen Verwendung finden sollten, wurden vor ihrer Benutzung autoklaviert. pH-Werte wurden mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

3.1 Tierexperimentelle Methoden

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, Soest) erhielten die Tiere *ad libitum*.

3.1.1 Generierung der LSL-MYCN Maus

Die LSL-MYCN Maus wurde im Auftrag des hämatologisch-onkologischen Labor der Kinderklinik III bei der Firma TaconicArtemis GmbH (Köln) unter regelmäßiger gegenseitiger Absprache generiert.

3.1.1.1 Konstruktion des LSL-MYCN Vektors

In einen geschützten Vektor mit Rekombinase-vermittelter Kassettenaustauschsstelle (RCME) wurde humane MYCN cDNA (Gen-ID: ENSG00000134323) hinter einen Hühner-Aktin-Promotor (CAG) sowie eine *loxP*-flankierte Polyadenyl-Stoppsequenz (LSL) und vor eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) sowie ein Luziferase Gen (Fluc) kloniert (Abb. 4 (II)).

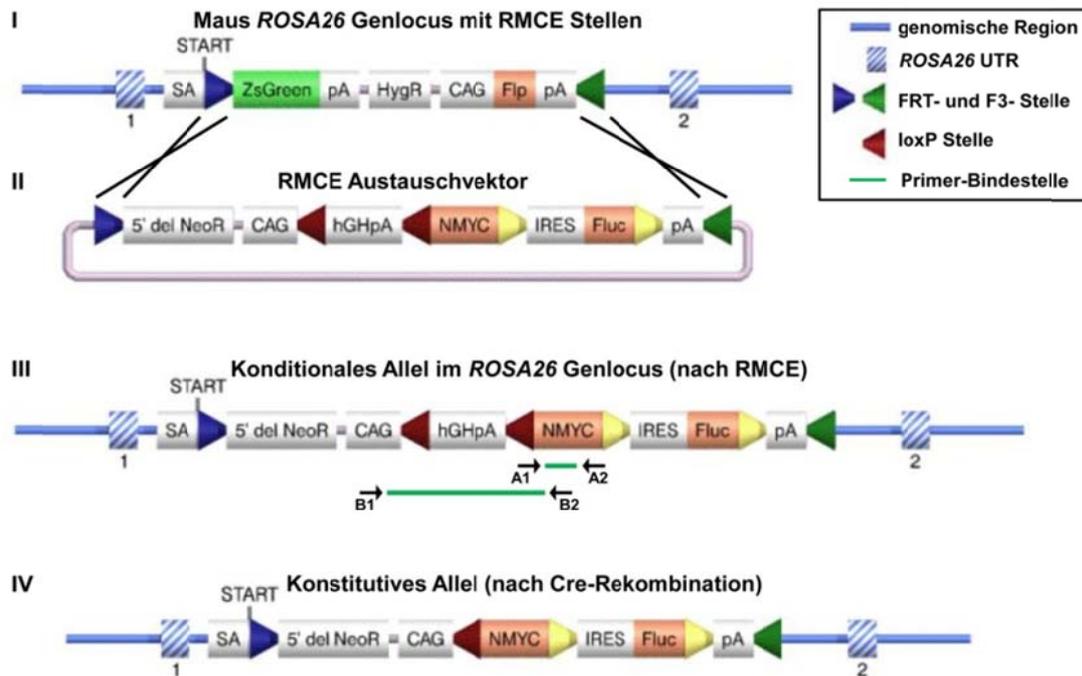


Abb. 4: Schema der Vektorkonstruktion zur Generierung transgener LSL-MYCN Mäuse (I) Schema des *ROSA26* Genlokus der F1 RMCE 103 embryonalen Mausstammzellen mit Rekombinase-vermittelten Kassettenaustauschstellen (RCME), benutzt um den (II) CAG-*LSL-MYCN*-IRES-Fluc-RMCE-Austauschvektor einzubauen; der *ROSA26* Genlocus nach der (III) Insertion des konditionalen Allels und (IV) dem Cre-Rekombinase-vermittelten Ausschneiden der Polyadenyl-Stoppssequenz. CAG = Hühner-Aktin-Promotor; hGHpA = Polyadenyl-Stoppssequenz, hergestellt aus humanem Wachstumshormon; NMYC = offenes Leserasters von humanem *MYCN*; A1/A2 = Primer zur Amplifikation des *MYCN*-Transgens; B1/B2 = Primer zur Validierung des Ausschneidens der Polyadenyl-Stoppssequenz. Modifiziert nach *Milestone Report* TaconicArtemis GmbH.

3.1.1.2 Generierung von LSL-MYCN tragenden embryonalen Stammzellen

TaconicArtemis F1 RMCE 103 embryonale Mausstammzellen (ES-Zellen) mit dem genetischen Hintergrund 129S6;C57Bl6/N, die im *ROSA26* Genlocus über RMCE Stellen verfügten (Abb. 4 (I)), wurden auf einer mitotisch inaktivierten, murinen Fibroblastenschicht kultiviert. Die Kotransfektion der ES-Zellen mit dem CAG-*LSL-MYCN*-IRES-Fluc-RMCE-Austauschvektor und einem Flpe-Rekombinase exprimierenden Vektor (pCAG Flpe pA) erfolgte mittels Lipofektion unter Verwendung eines Standardprotokolls. Der Austausch der Kassetten erfolgt an den Positionen FRT und F3. Positive Klone wurden sieben Tage lang mit G418 selektiert und morphologisch verschiedene Kolonien wurden isoliert. Mittels Southern Blot Analyse wurde die korrekte Rekombination überprüft. Die 5'-Sonde diente zum Nachweis der korrekten Rekombination in 5'-Richtung des Vektors, die 3'-Sonde für die korrekte Rekombination in 3'-Richtung. Anhand der Hybridisierung mit der neo-Sonde wurde die Einzelintegration überprüft. Die verwendeten Sonden und die zu erwartenden Fragmentgrößen bei Verdau mit verschiedenen

Restriktionsenzymen sind in einer Tabelle zusammengefasst (Tab. 2). Validierte Klone wurden vermehrt und in flüssigen Stickstoff gelagert.

Tab. 2: Sonden für die Southern Blot Analyse Modifiziert nach *Milestone Report TaconicArtemis GmbH*.

Sonde	Enzyme	Fragmentgröße [kb]		
		Wildtyp-Allel	F1 RMCE Allel	LSL-MYCN Allel
5'	HindIII	4,4	3,9	7,0
	EcoRI	15,6	4,3	7,8
	PciI	9,5	16,4	13,1
3'	AvrII	5,3	12,1	6,6
	PciI	9,5	16,4	6,7
	StuI	4,9	8,3	15,3
neo	HindIII	-	-	7,0
	EcoRI	-	-	7,8
	AseI	-	-	4,5

3.1.1.3 Generierung von chimären Mäusen

Tetraploide Maus-Blastozysten wurden aus superovulierten Balb/c Weibchen (Tag 3 *post coitum*) isoliert. In 60 Blastozysten wurden je 7-10 rekombinante ES-Zellen (C57Bl/6N) injiziert. Je 20 Blastozysten wurden dann drei scheinträchtigen Weibchen in den Uterus implantiert, woraufhin 10 chimäre Nachkommen geboren wurden. Die chimären Nachkommen, die sich sowohl aus den transgenen ES-Zellen als auch aus den Zellen der Blastozyste entwickelten, wurden weitergezüchtet und keimbahnmutierte männliche Tiere (schwarze/weiße Fellfarbe) durch Verpaarung mit C57Bl/6N Weibchen vermehrt. Der Nachweis der Keimbahntransmission erfolgte anhand der schwarzen Fellfarbe. Das Transgen wurde mittels LSL-MYCN Primern in einer PCR amplifiziert (s. 3.2.1 – Tab. 3), um den Einbau zu validieren. Heterozygote LSL-MYCN Mäuse wurden an unsere Arbeitsgruppe transferiert (Abb 4 (III)) und durch Verpaarung mit Wildtyp-Tieren weiter gezüchtet.

3.1.1.4 Genotypisierungen

Zur Genotypisierung aller verwendeten Mausstämmen wurde den Nachkommen an Tag 5 bis 8 nach der Geburt eine Schwanzbiopsie entnommen. Die Vervielfältigung des LSL-*MYCN*-Amplikons aus genomischer Schwanz-DNA erfolgte anhand einer PCR mit LSL-*MYCN*-Primern (Abb. 4: A1/A2 und Tab. 3) und die Detektion mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.2.1 und 3.2.2). Homozygote LSL-*MYCN* Mäuse wurden mit *ROSA26*-Wildtyp-Primern identifiziert (Tab. 3). Die Genotypisierung von *Dbh-iCre* Mäusen erfolgte unter Verwendung von *Dbh-iCre*-Primern (Tab. 3).

3.1.2 **Zucht von LSL-*MYCN*; *Dbh-iCre* Mäusen und Detektion von Tumoren**

Dbh-iCre Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hermann Rohrer (Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Heterozygote *Dbh-iCre* Tiere wurden mit heterozygoten LSL-*MYCN* Tiere verpaart. Doppelt-transgene Nachkommen wurden mittels LSL-*MYCN*- und *Dbh-iCre*-Genotypisierungs-PCRs (s. 3.1.1.4) identifiziert und als LSL-*MYCN*; *Dbh-iCre* bezeichnet.

Durch wöchentliches Abtasten des Abdomens und des Halsbereiches wurden Tumore detektiert. Sowohl mittels Lumineszenz-Bildgebung (s. 3.1.2.1) als auch Ultraschall-Bildgebung (s. 3.1.2.2) wurden ertastete Tumore validiert. Alle tumor-tragenden LSL-*MYCN*; *Dbh-iCre* Mäuse wurden bei Erreichen eines Tumolvolumens von ca. 500 mm³ oder bei schlechtem Habitus durch zervikale Dislokation getötet und sezirt. Abmagerung, Bewegungseinschränkung und Atembeschwerden aufgrund eines Tumors in der Nähe der Luftröhre wurde als schlechter Habitus definiert. Mittels einer handelsüblichen Kamera (Panasonic Lumix DMC-FZ248) wurden makroskopische Fotos der Tumore erzeugt. Herz, Hirn, Milz, Muskulatur aus dem Femur, Nebennieren (wenn nicht mit Tumor verwachsen), Nieren, Schwanz und Teile der Leber sowie der Tumore wurden sofort in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei -80°C gelagert. Außerdem wurden Femur sowie Teile der Leber und der Tumore in 4% Paraformaldehyd in PBS pH 7,2 (Morphisto, Frankfurt am Main) eingelagert.

In den Tumoren wurde das konstitutive Allel anhand der ausgeschnittenen Polyadenyl-Stoppsequenz im Vergleich zu Kontrollgeweben mittels *flox out* Primern (Tab. 3) validiert.

3.1.2.1 Biolumineszenz-Bildgebung von Tumor-tragenden LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen

Zellen der LSL-MYCN;Dbh-iCre Maus, in denen die Cre-Rekombinase aktiv ist und damit die Transkriptionsabbruchstelle (hGHpA) herausgeschnitten wurde, sollten neben dem Onkogen MYCN auch Luziferase exprimieren. Zur Detektion dieser Zellen wurde Mäusen, die einen tastbaren Tumor trugen, in die Schwanzvene D-Luciferin in PBS (PerkinElmer, Rodgau) injiziert (50 mg/kg Körpergewicht). In Gegenwart von Luziferase wird Luciferin oxidiert und bei der daraus resultierenden Abspaltung von Teilgruppen wird Energie in Form von Licht abgegeben. Tiere wurden mit 3% Isofluran (Forene®; Abbott, Wiesbaden) in Sauerstoff narkotisiert und in die Kammer des IVIS Lumina II (PerkinElmer), in der eine kontinuierliche Behandlung mit 2% Isofluran in Sauerstoff aufrechterhalten wurde, gelegt. Mittels dieses Lumineszenz-Bildgebungsgerätes wurde die Intensität der Lumineszenz-Emission gemessen und die Bilder im TIF-Format exportiert.

3.1.2.2 Ultraschall-Bildgebung verschiedener Gewebe von LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen

Hochfrequenter Schall außerhalb des hörbaren Bereichs des Menschen (>16 kHz) wird als Ultraschall bezeichnet. In der Humanmedizin dient die Ultraschall-Untersuchung (Sonografie) zur Bildgebung bei verschiedenen Erkrankungen. Man macht sich zu Nutze, dass die Ultraschallwellen, die von einem Schallkopf ausgesendet werden, je nach Gewebeart entweder absorbiert oder reflektiert werden. Der Schallkopf empfängt die reflektierten Wellen wieder und die Reflektion wird auf dem Bildschirm als Graustufen dargestellt. Wässrige Strukturen werden schwarz dargestellt, während Luft, die kein Ultraschall leitet, weiß erscheint.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Ultraschall-Bildgebungssystem Vevo® 2100 (*Visual Sonics*, Amsterdam, Niederlande) verwendet, um Gewebe und Tumore der LSL-MYCN;Dbh-iCre Maus zu untersuchen. Enthaarte Tiere wurden mit 3% Isofluran (Forene®) in Sauerstoff narkotisiert und auf dem beheizbaren Untersuchungstisch so fixiert, dass eine Ableitung der Herz- und Atemfrequenz ermöglicht wurde. Die Ultraschall-Untersuchung wurde unter kontinuierlicher Narkose mit 2% Isofluran in Sauerstoff mittels eines MicroScan-Schallkopfs (MS550D - *Visual Sonics*) durchgeführt. Anhand der 3D-Funktion wurden in 100 µm Abstand Schnitte durch Gewebe gemacht, dessen Oberfläche anhand des Geräts berechnet wurde. Durch Aneinanderreihen dieser Schnitte wurde die 3D-Struktur des jeweiligen Gewebes rekonstruiert und das Volumen berechnet.

3.1.3 Xenografts und Nanopartikel-Behandlung

Sechs-Wochen alten thymuslosen NCR (*nu/nu*) Mäusen wurden subkutan in die Flanke $1 \cdot 10^7$ WACII-Zellen, suspendiert in 200 μ l Matrigel™ (BD, Heidelberg), injiziert. Mittels einer elektronischen Schieblehre (Baumarkt Obi, Essen) wurden die Tumore drei Mal pro Woche vermessen und das Volumen mittels der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Tumorvolumen [mm}^3\text{]} = \frac{1}{2} \cdot \text{Länge [mm]} \cdot \text{Breite [mm]} \cdot \text{Höhe [mm]}$$

Sobald die Tumore ein Volumen von ca. 500 mm³ erreicht hatten, wurden jeweils drei Tiere intravenös mit miR-542-3p- bzw. Negativkontroll-miRNA-beladenen Nanopartikeln (Herstellung s. 3.3.5) behandelt. Eine zweite Injektion erfolgte 24 Std. nach der ersten. Nach weiteren 24 Std. wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Sowohl Teile von Lebern als auch von Tumoren wurden für qPCR- und Western Blot Analysen in Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für histologische Untersuchungen wurden Teile von Lebern und Tumoren in 4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,2 (Morphisto) fixiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Saiki *et al.* entwickelte 1985 das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), mittels der DNA-Sequenzen vervielfältigt werden können⁷³. In einem Puffersystem werden die Ausgangs-DNA (*template*), zwei spezifische Oligonukleotidprimer, eine thermostabile Taq-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) vermischt. Die eigentliche PCR erfolgt in drei Reaktionsschritten. Im Denaturierungsschritt (94°C) wird das *template* in seine beiden Einzelstränge aufgetrennt, an die die spezifischen Oligonukleotidprimer im Annealingschritt hybridisieren. Der Elongationsschritt, bei dem die Polymerase aus dem gebundenen Primer das *template* neu synthetisiert, findet beim Temperaturoptimum der Polymerase statt (72°C). Jede PCR besteht aus 25-40 Zyklen, wobei die Menge des eingesetzten *templates* bei optimalen Bedingungen in jedem Zyklus verdoppelt wird.

In dieser Arbeit wurde die Methode der PCR zur Genotypisierung transgener Mäuse und zur Validierung der ausgeschnittenen Polyadenyl-Stoppsequenz benutzt, wobei die GoTaq® *Hot Start* Polymerase (Promega, Mannheim) Verwendung fand. Die Stocklösung der Primer hatte eine Konzentration von 20 mM. Folgendes Pipettierschema wurde für jeden PCR-Ansatz verwendet:

5x GoTaq® Flexi Puffer	4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
dNTP-Mix (Bio-Budget, Krefeld)	0,6 µl
Primer <i>forward</i>	1 µl
Primer <i>reverse</i>	1 µl
GoTaq® Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
<i>template</i> DNA	1 µl
DNase-freies H ₂ O	11,1 µl

Die Amplifikation der *templates* erfolgte im C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, München), wobei die Annealingtemperatur vom GC-Gehalt der verwendeten Primer und die Elongationszeit von der Länge des zu synthetisierenden DNA-*templates* (60 Sek. pro 1 kb) abhängig war. Die verwendeten Primer, sowie die spezifischen Annealingtemperaturen und Elongationszeiten wurden in einer Tabelle zusammengefasst (Tab. 3). Folgendes allgemeines Programm wurde benutzt:

180 Sek.	94°C	} 39x
30 Sek.	94°C	
30 Sek.	55-65°C	
30-180 Sek.	72°C	
300 Sek.	72°C	

Tab. 3: Oligonukleotidprimer für PCR fwd = forward; rev = reverse

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Produktlänge	Annealingtemperatur	Elongationszeit
<i>Dbh-iCre</i>	fwd: ctgccagggacatggccagg rev: gcacagtcgaggctgatcagg	300 bp	59°C	45 Sek.
<i>flox-out</i>	fwd: gcccgcggtgatgcctttgagg rev: cggggactgggcggtggaac	2241 bp 703 bp	67,7°C	240 Sek.
<i>LSL-MYCN</i>	fwd: accacaaggcctcagtacc rev: tgggacgcacagtgatgg	168 bp	60°C	30 Sek.
<i>ROSA26-Wildtyp</i>	fwd: ctcttcctcgtgatctgcaactcc rev: catgtcttaatctacctcgatgg	299 bp	62°C	45 Sek.

Die Auswertung der PCRs erfolgte mittels der Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.2.2), wobei jeweils 14 µl des PCR-Ansatzes aufgetragen wurden.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer negativen Ladung bewegen sich sowohl DNA- als auch RNA-Stränge in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Laufgeschwindigkeit von Nukleinsäure-Strängen in Agarosegelen korreliert mit der Fragmentgröße, da Agarosegele eine siebartige Struktur aufweisen und kleineren Fragmenten einen geringeren Widerstand bieten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1-2%-ige Agarosegele benutzt, die in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) angesetzt wurden. Die Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1,25 µM), ein Farbstoff, dessen Absorptionsspektrum sich bei Interkalation mit Nukleinsäuren verändert, diente zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde parallel zu den zu analysierenden Proben ein DNA-Standard (*LifeTechnologies*, Darmstadt) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Tris-Acetat-EDTA-Puffer bei 120 V für 45 bis 60 Min. und die Visualisierung am Dokumentationsgerät *Biodoc Analyzer* (Biometra, Göttingen).

3.2.3 Klonierung der Konstrukte pDEST30-*KDM1A* und pDEST30-*Survivin*

Humane *KDM1A* cDNA ohne 3'UTR wurde im Vektor pDONR™ erworben (E1871-BC048134.1; THP Medical Products, Wien, Österreich). Humane *Survivin* cDNA ohne 3'UTR im Gateway® pENTR™ Vektor (*LifeTechnologies*) wurde freundlicherweise von Fieke Lamers aus der Arbeitsgruppe Humangenetik der Universität Amsterdam zur Verfügung gestellt⁷⁴. Beide *genes of interest* (GOIs) konnten aus diesen Donorplasmiden anhand der Gateway-Klonierung sehr effizient in Zielvektoren kloniert werden. Mittels Gateway® LR-Clonase® II Enzym-Mix (*LifeTechnologies*) wurden die GOIs nach Herstelleranweisungen in den Zielvektor Gateway® pT-Rex™-DEST30 (*LifeTechnologies*) kloniert. Ein Konstrukt mit GFP als GOI war schon in unserer Arbeitsgruppe vorhanden. Die Hitzeschocktransformation in chemisch kompetente *E.coli* TOP 10 (*LifeTechnologies*) erfolgte nach Herstellerangaben. Je 50 und 200 µl der transformierten *E.coli* wurden auf LB_{AMP}-Platten (10% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10% NaCl, 1% Agar-Agar, pH 7,0, 0,01% Ampicillin) über Nacht inkubiert und Einzelzellklone gepickt. Um größere Mengen des Plasmids zu gewinnen wurden Einzelzellklone in 100 ml LB_{AMP}-Medium (10% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10% NaCl, pH 7,0, 0,01% Ampicillin) vermehrt. Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Um sicherzustellen, dass das GOI fehlerfrei im Zielvektor vorlag, wurden bei der Firma *Seqlab* (Göttingen) Sequenzierungen in Auftrag gegeben, wobei die Sequenzierungsprimer benutzt wurden, die vom Hersteller für Gateway® pT-Rex™-DEST30 empfohlen wurden. Auf der Homepage des *National Center for Biotechnology* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wurden die aus der Sequenzierung erhaltenen Ergebnisse mit BLASTN analysiert.

3.2.4 Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA

Die Messung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte photometrisch mittels des Nano-Drop 2000c (Thermo Scientific). Dabei wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Eventuelle Verunreinigungen durch Proteine wurden bei 280 nm detektiert. Der Quotient aus der OD₂₆₀ und der OD₂₈₀ liegt bei reinen DNA-Präparationen bei 1,8 und bei reinen RNA-Präparationen bei 2,0. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur reine Nukleinsäure-Präparationen weiter verwendet.

3.2.5 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA aus Geweben von *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen wurde mittels des *peqGOLD Tissue DNA Mini Kits* (peqlab, Erlangen) nach Anweisungen des Herstellers isoliert und in 70 µl DNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.2.6 mRNA- und miRNA-Isolierung

Die Extraktion von mRNA aus pelletierten humanen Zelllinien und murinen Geweben erfolgte anhand des *RNeasy® Micro* oder *Midi Kits* (Qiagen). MiRNAs wurden aus Geweben mittels des *miRNeasy Mini Kits* (Qiagen) extrahiert. Sämtliche Kits wurden nach Herstelleranweisungen inklusive des optionalen DNase-Verdau mittels des *RNase-free DNase Sets* (Qiagen) durchgeführt. Die Lagerung isolierter mRNA und miRNA erfolgte bei -80°C.

3.2.7 Reverse Transkription von komplementärer DNA aus isolierter mRNA und miRNA

Die reverse Transkription zur Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus mRNA erfolgte mittels der *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Life Technologies). Die cDNA aus miRNA wurde mittels des *miScript Reverse Transcription Kits* (Qiagen) transkribiert. Beide Kits wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und die synthetisierte cDNA bei -20°C gelagert.

3.2.8 Quantitative PCR

Die Methode der quantitativen PCR (qPCR), die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, dient zur Analyse der Transkription spezifischer Gene. Die aus isolierter mRNA mittels reverser Transkription generierte cDNA wird während der Amplifikation mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt, der in die DNA interkaliert. Die messbare Fluoreszenz der Probe nimmt proportional zur vorhandenen DNA-Menge zu. Der Schwellenwert-Zyklus (Ct-Wert) beschreibt den PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Analyse von cDNA, die aus isolierten mRNAs synthetisiert wurden, abhängig vom Oligonukleotidprimer der *Fast SYBR® Green Master Mix* (Life Technologies) oder der *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Life Technologies)

verwendet. Die Detektion von cDNA, die aus miRNAs transkribiert wurde, erfolgte anhand des *miScript SYBR Green* PCR Kits (Qiagen). Mittels des *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (*Life Technologies*) wurde die qPCR durchgeführt. Die dabei benutzten Programme variierten in Abhängigkeit des benutzten Kits (Tab. 4).

Tab. 4: Programme der qPCR

<i>Fast SYBR® Green Master Mix</i>		<i>TaqMan® Fast Advanced Master Mix</i>		<i>miScript SYBR Green PCR Kit</i>		
95°C	20 Sek.	95°C	20 Sek.	95°C	20 Sek.	} 40x
95°C	3 Sek.	95°C	1 Sek.	95°C	3 Sek.	
60°C	30 Sek.	60°C	20 Sek.	60°C	30 Sek.	

Sowohl die verwendeten Primer als auch das benutzte Kit wurden tabellarisch zusammengefasst (Tab. 5).

Tab. 5: Oligonukleotidprimer für qPCR hs = human; mm = murin; fwd = forward; rev = reverse

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') oder Bestellnummer	qPCR Kit
Mm_Dbh	fwd: tcatgcacatacaacacaga rev: tgcacatagttgacacacat	<i>Fast SYBR® Green Master Mix</i>
Hs_GAPDH	fwd: catcaagaaggtggtgaagc rev: gagcttgacaaagtggctgt	<i>Fast SYBR® Green Master Mix</i>
Mm_GAPDH	QT01658692 (Qiagen)	<i>Fast SYBR® Green Master Mix</i>
Hs_KDM1A	QT00099442 (Qiagen)	<i>Fast SYBR® Green Master Mix</i>
Mm_Phox2b	fwd: ggcagaggaattgaggtaag rev: cgtctccacatccatcttt	<i>Fast SYBR® Green Master Mix</i>
Hs_miR-542-3p	MS00010073 (Qiagen)	<i>miScript SYBR Green PCR Kit</i>
Hs_MYCN	QT00201404 (Qiagen)	<i>Fast SYBR® Green Master Mix</i>
Hs_NEFL	QT00096369 (Qiagen)	<i>Fast SYBR® Green Master Mix</i>
Hs_RNU6B	MS00007497 (Qiagen)	<i>miScript SYBR Green PCR Kit</i>
Hs_Survivin	Hs03063352 (<i>Life Technologies</i>)	<i>TaqMan® Fast Advanced Master Mix</i>
Hs_TFPI2	fwd: gtcgattctgctgctttcc rev: ggagacagatctccgcgta	<i>Fast SYBR® Green Master Mix</i>
Mm_Th	fwd: aggtggtgacacttatccaa rev: agtgccagagaggacaag	<i>Fast SYBR® Green Master Mix</i>

Der Ct-Wert von zu analysierenden mRNAs wurde gegen den des ubiquitär-exprimierten Enzyms Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der gleichen Spezies normalisiert. Der Ct-Wert der ubiquitär-exprimierten miRNA RNU6B diente zur Normalisierung des Ct-Wertes der zu analysierenden miRNAs. Anhand der $\Delta\Delta$ -Ct Methode⁷⁵ wurde die mRNA bzw. miRNA Expression relativ zur jeweiligen Kontrolle kalkuliert.

3.2.9 Array-basierte komparative genomische Hybridisierung

Die Technik der Array-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (aCGH) findet in der 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 gelabelt und gegen ein Raster von DNA-Fragmenten hybridisiert. Das Verhältnis der Fluoreszenzsignale gibt Aufschluss auf chromosomale Aberrationen.

Für die Detektion chromosomaler Aberrationen, die in Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells auftraten, wurden jeweils 13 Proben 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 Array (AMADID 027411 - *Agilent Technologies*, Böblingen), der das komplette Mausgenom enthielt, analysiert. Je 400 ng DNA aus Tumorgewebe wurde mittels *Random priming* (*Life Technologies*) Cy3 (Perkin Elmer, Rodgau) gelabelt, während die gleiche Menge DNA aus Schwanzgewebe mit Cy5 (Perkin Elmer) markiert wurde. Die Hybridisierung und Waschung der Proben erfolgte nach Herstellerangaben des Arrays. Die Messung der Fluoreszenz-Intensitäten wurde anhand des Agilent Scanners G2505C (*Agilent Technologies*) durchgeführt. Das Software Programm *Feature Extraction v10.1.1.1* (*Agilent Technologies*) fand bei der Extrahierung der Daten Anwendung. Diese wurden mit Hilfe von *aCGHbase* (<http://medgen.ugent.be/arraycghbase>) weiter bearbeitet. Verluste und Zugewinne von Genen wurden anhand des *circular binary segmentation* (CBS) Algorithmus berechnet^{76,77}.

3.2.10 mRNA qPCR profiling

Anhand von Exon-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 gelabelt. Der spezifische Mikroarray-Genchip,

der eine Auswahl von DNA-Spots enthält, hybridisiert die cDNA oder cRNA der zu analysierenden Probe. Nach Abwaschen der nicht-gebundenen Nukleinsäuren, 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 Tumoren des LSL-*MYCN*; *Dbh-iCre* Modells und aus nicht-malignen Nebennieren von Wildtyp-Tieren 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, Freiburg*). Die Hybridisierung der cDNA auf Mausgenom-Genchips 430 2.0 (*Affymetrix*), die Sonden zur Detektion aller Gene 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.

Die Kalkulation der *MYCN* mRNA Signatur basierte auf dem von *Fredlund et al.* publizierten Algorithmus⁷⁸.

3.2.11 miRNA qPCR profiling

Isolierte miRNAs aus Tumoren des LSL-*MYCN*; *Dbh-iCre* Modells und nicht-malignen Nebennieren aus Wildtyp-Mäusen wurden mittels des *TaqMan miRNA Reverse Transcription Kits* (*Life Technologies*) unter Verwendung des *rodent stem-loop Megaplex RT Primer Pools A und B (v2.0 - Life Technologies)* nach Herstelleranweisungen in cDNA transkribiert. Ein 12 Zyklen langer Amplifikationsschritt zur Herstellung einer größeren Menge an cDNA wurde durchgeführt. Amplifizierte cDNA wurde 1 zu 4 verdünnt und mittels des *TaqMan® MicroRNA Assay 7900 HT* (*Life Technologies*) in folgender qPCR Reaktion quantifiziert:

<i>TaqMan® Assay</i>	1,5 µl
<i>TaqMan® gene expression master mix</i>	1,75 µl
cDNA	0,02 µl
DNase-freies H ₂ O	0,23 µl

Rohdaten der miRNA Expressionswerte wurden anhand des *Cq-cutoff* gefiltert und normalisiert anhand des *global mean*⁷⁹.

Die Kalkulation der *MYCN* miRNA Signatur basierte auf dem von *Mestdagh et al.* publizierten Algorithmus⁸⁰.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung ihrer Konzentration

Zellpellets bzw. Tumorgewebe wurde für 30 Min. auf Eis in RIPA-Puffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 0,1% SDS, *cOmplete* Protease Inhibitoren und *PhosSTOP* Phosphatase Inhibitoren (Roche) nach Herstellerangaben) lysiert. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 g für 30 Min. wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Bei der Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen findet häufig die Methode nach Bradford Anwendung. Diese macht sich zu Nutze, dass sich das Absorptionsmaximum des Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 bei der Bindung an Proteine von 470 nm auf 595 nm verschiebt⁸¹.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden je 2 µl des zu analysierenden Proteinlysats mit 998 µl 1x Roti[®]-Quant (Roth) vermischt und 5 Min. inkubiert. Die Absorption wurde am NanoDrop 2000c (*Thermo Scientific*, Braunschweig) gemessen und gegen den Leerwert normalisiert. Anhand einer BSA-Standardreihe wurde die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

3.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels der Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrer Kettenlänge, die proportional zur Molekülmasse ist, aufgetrennt werden. Durch Zugabe von SDS wird die Eigenladung der Proteine von einer konstanten negativen Ladung überdeckt. Die Linearisierung der Proben erfolgt durch Erhitzen auf 95°C, wobei Sekundär- und Tertiärstrukturen durch die Unterbrechung von Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden. Aufgetragen auf ein SDS-Gel werden größere Proteine im elektrischen Feld stärker zurückgehalten als kleine, was zur Auftrennung dieser führt⁸². Anhand eines Molekulargewichtsstandard kann die Proteingröße nach Färbung mit einem Farbstoff abgeschätzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden je 50 µg Gesamtprotein mit LAEMMLI-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 10% Glycerol, 10% β-Mercaptoethanol) versetzt, 5 Min. bei 95°C im Heizblock denaturiert und zusammen mit dem Molekulargewichtsstandard *Page Ruler* (Fermentas) auf *NuPAGE*[®] Novex 4-12% Bis-Tris Gele

(Invitrogen) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten elektrischen Spannung von 120 V je nach Laufweite der Farbfront für 90-120 Min.

3.3.3 Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Der Western Blot ist eine proteinbiochemische Methode, mit der Proteine vom SDS-Gel auf eine Membran aus Nitrozellulose transferiert werden können⁸³. Die Proteine wandern dabei durch ein senkrecht zum SDS-Gel angelegtes elektrisches Feld in Richtung der Anode auf die Membran, auf der sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Das an den Proteinen angelagerte SDS wird ausgewaschen, wodurch die Proteine ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen. Freie unspezifische Bindungsstellen der Proteine werden mit einer Lösung aus entfettetem Milchpulver blockiert. Die Detektion bestimmter Proteine kann mit spezifischen Primärantikörpern, die an ihr Antigen binden, erfolgen. Mittels eines Sekundärantikörpers, der spezifisch an den primären bindet und ein Reporterenzym enthält, das das Substrat Luminol umsetzt, wird die Proteinbande visualisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufgetrennte Proteine mittels des Trans-Blot® Turbo™ (Biorad) vom SDS-Gel auf die *Hybond™C Extra* Nitrozellulose-Membran (*Amersham Biosciences*, Freiburg) transferiert. Dazu wurden zuerst zwei Filterpapiere (Whatman) mit Anodenpuffer 1 (300 mM Tris, 20% Methanol) getränkt und in der Blotkammer übereinander positioniert. Ein weiteres Filterpapier, mit Anodenpuffer 2 (25 mM Tris, 20% Methanol) getränkt, wurde auf die beiden Filterpapiere gelegt. Als nächstes wurde die Membran (in Anodenpuffer 2) und das SDS-Gel, welches mit Kathodenpuffer (25 mM Tris, 40 mM Glycine, 10% Methanol) getränkt war, aufgestapelt. Drei weitere Filterpapiere (in Kathodenpuffer) bildeten den Abschluss. Bei einer konstanten elektrischen Stromstärke von 90 mA wurden die Proteine für 1 Std. übertragen. Die Membran wurde mit TBS-T_{0,1} (0,1% Tween 20 in TBS) gewaschen und die Proteine mit PonceauS-Lösung (0,1% PonceauS, 5% Essigsäure) zur Überprüfung des Transfers und zur Einzeichnung der Markerbanden angefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die unspezifischen Proteinbindestellen für 1 Std. mit *Bovine Lacto Transfer Techniques Optimizer* (*BLOTTO* - 5% Milchpulver, 50 mM Tris HCl pH 8, 80 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,2% NP-40) blockiert. Die Inkubation des Primärantikörpers in *BLOTTO* erfolgte über Nacht bei 4°C, gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Der Sekundärantikörper, an den Meerettich-

peroxidase gekoppelt war, inkubierte in TBS-T_{0,1} für eine Std. bei Raumtemperatur, ebenfalls gefolgt von einem Waschschrift. Verwendete Verdünnungen der Antikörper wurden tabellarisch aufgeführt (Tab. 6). Proteine wurden mittels des Detektionsreagenz ECL Plus™ (*Amersham Biosciences*) visualisiert, im FusionFX (peqlab) detektiert und die Bilder als jpeg exportiert.

Tab. 6: Antikörper für den immunologischen Nachweis von Proteinen

Antigen	Bestellnummer	Verdünnung
Aurora B kinase	3094 (<i>Cell Signaling</i>)	1:1.000
AKAP2	Ab64904 (<i>Abcam</i>)	1:1.000
Aktin	A3853 (<i>Sigma-Aldrich</i>)	1:2.000
Caspase 9	IM3434 (<i>Immunotech</i>)	1:1.000
GAPDH	MAB374 (<i>Millipore</i>)	1:2.000
Kaninchen-IgG	NA9340V (<i>GE Healthcare</i>)	1:5.000
KDM1A	2139 (<i>Cell Signaling</i>)	1:1.000
Maus-IgG	NA9310V (<i>GE Healthcare</i>)	1:5.000
N-Myc	sc-53993 (<i>Santa Cruz</i>)	1:1.000
Survivin	2808 (<i>Cell Signaling</i>)	1:1.000
TetR	631131 (<i>Clontech</i>)	1:2.000

3.3.4 Proteomanalyse

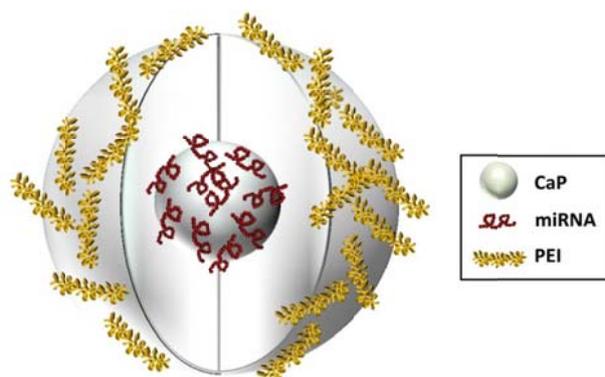
Proteomanalysen wurden im Rahmen des BMBF-Projekts „ENGINE“ in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kai Stühler (*Molecular Proteomics Laboratory (MPL)*, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Proteom von SHEP Zellen 96 Std. nach transienter Transfektion mit Negativkontroll-miRNA oder miR-542-3p verglichen. Die Transfektionen erfolgten in 12-well Platten.

3.3.5 Herstellung von Calcium-Phosphat-Nanopartikeln

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Epple (Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen) wurden miRNA-beladene Calcium-Phosphat-Nanopartikel synthetisiert, wie in Sokolova *et al.* beschrieben^{84,85}. Nanopartikel wurden aus einer wässrigen Lösung aus Calciumnitrat (6,25 mM) und Diammonium-hydrogenphosphat (3,74 mM) präzipitiert und unter sterilen Bedingungen mit Pre-miR™ miRNA-542-3p *Precursor* Molekülen bzw. der Pre-miR™ Negativkontrolle funktionalisiert (19 µM). Diese Konstrukte wurden mittels einer zusätzlichen Hülle aus Calcium-Phosphat geschützt und weiter stabilisiert mit verzweigtem Poly-Ethylenimin (PEI – 2 mg/ml) (Abb. 5). In beiden Dispersionen betragen die Konzentrationen der miRNAs 1,08 µM und die von PEI 357 µg/ml.

Abb 5: Struktur der verwendeten miRNA-beladenen Calcium-Phosphat-Nanopartikel Diagrammatischer Aufbau von miRNA-beladenem Nanopartikel der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Epple (Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen). CaP = Calcium-Phosphat; PEI = Poly-Ethylenimin. Graphik generiert von Diana Kozlova.



3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Histologische und immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung wird in der Histologie angewendet, um verschiedene Strukturen von Gewebeschnitten anzufärben. Hämalaun färbt saure Strukturen wie DNA und Ribosomen blau, während Eosin basische Strukturen wie Plasmaproteine und Mitochondrien rot erscheinen lässt. In der Immunhistochemie werden markierte Antikörper benutzt, um Proteine in Gewebeschnitten sichtbar zu machen.

Formalin-fixierte Gewebe wurden in Paraffin eingebettet und in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Demaskierung der Antigene erfolgte mittels der *Target Retrieval Solution* (Dako, Hamburg) 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* (Dako) wurden die verschiedenen Antikörper (Tab. 7) nach Herstellerangaben inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mittels des *EnVision™* Kits (Dako).

Tab. 7: Antikörper für den immunhistochemischen Nachweis von Proteinen auf Gewebeschnitten

Antigen	Bestellnummer	Verdünnung
Caspase 3	9661 (<i>Cell Signaling</i>)	1:200
CD56	ab6123 (abcam)	1:500
Mib-1	RM-9106 (<i>Thermo Scientific</i>)	1:25
TH	Ab76442 (abcam)	1:200

3.4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Gewebeschnitten

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Geweben wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Lukas Heukamp (Institut für Pathologie, Universitätsklinik Köln) durchgeführt.

Calcium-Phosphat-Nanopartikel wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Epple (Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen) mittels Raster-elektronenmikroskopie anhand ihrer dynamischen Lichtstreuung charakterisiert.

3.4.3 Immunfluoreszenzfärbungen von Proteinen in humanen Zelllinien

Die Immunfluoreszenz ist eine spezielle Immunfärbung, bei der die verwendeten Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.

Für Immunfluoreszenz-Färbungen der Proteine Survivin und Aurora B Kinase wurden Zellen auf 35 mm Glasboden Kulturschalen (Mattek) transfiziert und 96 Std. inkubiert. Nach der Fixierung der Zellen in 4% Paraformaldehyd für 20 Min., wurden die Zellen mit 0,1% Triton-X-100 in PBS für 10 Min. permeabilisiert. Die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte für jeweils 1 Std. in der folgenden Reihenfolge, wobei alle Antikörper mit 10% BSA in PBS verdünnt wurden:

anti-Aurora B (Becton Dickinson, 1:500)

anti-Maus-Alexa-Flour-568 (Invitrogen, 1:1.000)

anti-Survivin (Novus, 1:250)

anti-Kaninchen-Alexa-Fluor-488 (Invitrogen, 1:1.000).

Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% Hoechst 33343 in PBS für 10 Min. gefärbt. Die mikroskopische Analyse erfolgte bei Raumtemperatur in PBS mittels eines inversen Fluoreszenz-Mikroskops (AxioObserver, Zeiss, Darmstadt), ausgestattet mit einer digitalen monochromatischen Kamera (AxioCam MRm Rev.2 CCD, Zeiss) und einem Öl-Objektiv (Plan-Apochromat 63x/1.40, Zeiss). Die Bilder wurden bei gleichen Expositionseinstellungen akquiriert und als TIF Dateien exportiert.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Kultivierung von Zellen

Die humanen Neuroblastomzelllinien IMR-32, SHEP und SK-N-BE sowie die humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293 wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) erworben. Die humane Neuroblastomzelllinie WACII wurde freundlicherweise von Frank Westermann (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Eine Authentifizierung der Zelllinien erfolgte bei der DSMZ. Alle Kulturen wurden anhand des MycoAlert™ *Mycoplasma Detection Kits* (Lonza, Basel, Schweiz) in regelmäßigen Abständen auf Kontaminationen durch Mykoplasmen untersucht.

Sämtliche verwendete Zelllinien wurden in RPMI1640 Medium supplementiert mit 10% FCS, Amphotericin B (3 µg/ml), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37°C, 80% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Bei Erreichen etwa 80%-iger Konfluenz wurden die Zellen mit 0,2% Trypsin/EDTA für 2-3 Min. abgelöst. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Reaktion abgestoppt. Die Zellen wurden mittels des TC10™ *Automated Cell Counter* (BioRad) gezählt und in für die Versuche erforderlichen Verdünnungen ausgesät oder weiter kultiviert.

Die Kryokonservierung von Zellen erfolgte in FCS mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen bei 37°C für ca. 1 Min. inkubiert und die Zellen in Kulturmedium aufgenommen.

3.5.2 Transiente Transfektionen von miRNA und siRNA

Für transiente Transfektionen von miRNA und siRNA in humane Zelllinien *in vitro* wurden Zellen in verschiedenen Zahlen ausgesät, abhängig von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und Größe. Die im Rahmen dieser Arbeit ausgesäten Zellzahlen wurden tabellarisch zusammengefasst (Tab. 8).

Tab. 8: Ausgesäte Zellzahlen der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zellzahl		
	96-well	12-well	35 mm Glasboden Kulturschale (Mattek)
HEK-293	$2 \cdot 10^4$	-	-
IMR-32	$1,5 \cdot 10^4$	$12 \cdot 10^4$	$18 \cdot 10^4$
SHEP	$0,5 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$
SK-N-BE	$1 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^4$	$12 \cdot 10^4$
WACH	$0,5 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$

Transiente Transfektionen der Pre-miRs™ (AM17100 - *Life Technologies*) miR-137 (PM10513), miR-542-3p (PM11340) und miR-542-5p (PM13010) *Precursor* Molekülen und der Pre-miR™ Negativkontrolle (AM17110 - *Life Technologies*) erfolgten mittels des Transfektionsreagenzes siPort™ NeoFX™ (*Life Technologies*) in einer Endkonzentration von 30 nM nach Anweisungen des Herstellers.

Die FlexiTube siRNAs (1027417 - Qiagen) Hs_AKAP2_8 (SI04233201), Hs_BIRC5_5 (SI00299453) und Hs_KDM1A_5 (SI02780932) sowie die *AllStars* Negativkontroll-siRNA (1027280 - Qiagen) wurden in einer Endkonzentration von 33 nM mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamine™ RNAiMax (*Life Technologies*) nach Herstellerangaben in die Zellen eingebracht.

3.5.3 Generierung von stabilen Zellklonen und Induktion von konditionalen Konstrukten

Der Vektor pcDNA™6/TR (V1025-20 - *Life Technologies*) ist ein Expressionsvektor, mit dem hohe Level des Tetracyclin-Repressor Proteins exprimiert werden können. Außerdem verfügt das Plasmid über den Säugetier-Selektionsmarker Blasticidin (Abb. 6).

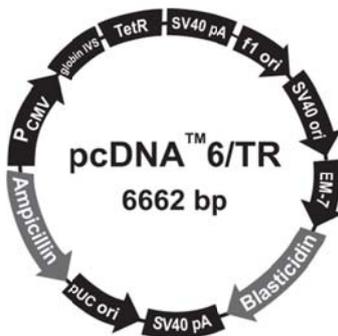
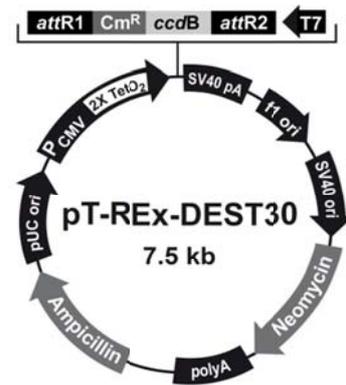


Abb. 6: Vektorkarte von pcDNA™6/TR Besonderheiten: Expression des Tetracyclin-Repressor Proteins (TetR); Blasticidinresistenz zur Selektion von stabil-transfizierten Säugetierzellen. Modifiziert nach www.lifetechnologies.com.

pcDNA™6/TR wurde mittels Elektroporation (*Neon™ transfection system*, Invitrogen) bei 1.000 V und 50 ms in SHEP Zellen eingebracht, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. Durch Zugabe von Blasticidin (7,5 µg/ml) zum Medium wurden positive Klone selektiert. Einzelzellklone wurden mittels *Limited Dilution* generiert. Die Überprüfung der Klone erfolgte mittels Western Blot (s. 3.3.3).

Der Vektor Gateway® pT-Rex™-DEST30 (12301-016 - *Life Technologies*) dient zur Expression hoher Level eines GOIs in Säugetierzellen. Der Vektor verfügt über Tetracyclin Operator 2 Stellen, die in Tetracyclin Repressor-exprimierenden Zellen eine Tertacyclin-regulierte Expression des GOI erlauben. Der Säugetier-Selektionsmarker Neomycin ist ebenfalls vorhanden (Abb. 7).

Abb. 7: Vektorkarte von pT-Rex-DEST30 Besonderheiten: Tetracyclin Operator 2 Stellen (TetO₂) zur Tetracyclin-regulierten Expression des GOIs in Tetracyclin Repressor-exprimierenden Zellen; Neomycinresistenz zur Selektion von stabil-transfizierten Säugetierzellen. Modifiziert nach www.lifetechnologies.com.



Die Konstrukte pT-RexTM-DEST30-*KDM1A*, pT-RexTM-DEST30-*Survivin* (Klonierung s. 3.2.3) und pT-RexTM-DEST30-*GFP* als Kontrolle wurden mittels Elektroporation bei 1.000 V für 50 ms in den validierten Einzelzellklon SHEP- pcDNATM6/TR eingebracht. Es wurde nach Herstelleranweisungen gearbeitet. Transfizierte Zellen wurden durch Zugabe von Geneticin (0,5 mg/ml) zum Kulturmedium selektiert und Einzelzellklone mittels *Limited Dilution* generiert. Durch Zugabe von Tetrazyklin (1 µg/ml) zum Medium wurde die Expression von GFP, KDM1A oder Survivin induziert. Einzelzellklone, die induzierbar GFP exprimierten, wurden am Axiovert 40CFL Mikroskop (Carl Zeiss *Microscopy* GmbH, Jena) detektiert. Die Überprüfung der induzierbaren Expression von KDM1A und Survivin erfolgte mittels Western Blot (s. 3.3.3). Ausgewählte Klone wurden mit SHEP-GFP, SHEP-KDM1A und SHEP-Survivin bezeichnet.

3.5.4 Mikroskopische Aufnahmen von Zellen

Mikroskopische Aufnahmen von Zellen auf 12-well Platten, die mit miRNAs transfiziert wurden, erfolgten am Axiovert 40CFL Mikroskop (Carl Zeiss *Microscopy* GmbH) unter Verwendung der Software ZEN (Version 2011 (*blue edition*) Carl Zeiss *Microscopy* GmbH). Fotos wurden als TIF exportiert.

3.5.5 Zellviabilitäts-Assay

Der gelbe, wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) wird bei seiner Reduktion zu blau-violettem, wasserunlöslichen Formazan. Beim MTT-Test wird die metabolische Aktivität von Zellen anhand der Reduktion des Farbstoffs bestimmt⁸⁶. Die Reduktionsrate hängt von der Glykolyserate der Zellen ab und wird definiert als ihre Zellviabilität.

Die Analyse der Viabilität von Zellen erfolgte im 96-*well* Format zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72, 96 und 120 Std.) nach der transienten Transfektion von miRNAs und siRNAs (s. 3.5.2). Der Farbstoff MTT wurde in PBS gelöst (10 mM) und 20 µl pro *well* zu den Zellen gegeben (Endkonzentration 1,7 mM). Nach einer Inkubationszeit von 2 Std. bei 37°C wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Formazan in 100 µl Solubilisierungslösung (10% SDS, 0,6% Essigsäure in DMSO) gelöst. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) im Epoch Spektralphotometer-System (BioTech, Bad Friedrichshall). Alle Experimente wurden mindestens drei Mal, jeweils in dreifach-Bestimmung durchgeführt.

3.5.6 Apoptose-Assay

Zellen, die aufgrund von Apoptose sterben, geben Mono- und Oligonukleosome ins Zytoplasma ab. Das *Cell Death Detection* ELISA^{PLUS} Kit (11774425001 - Roche) verwendet Antikörper, die spezifisch gegen DNA und Histone gerichtet sind, um diese Mono- und Oligonukleosome zu detektieren. Die Umsetzung eines spezifischen Substrates korreliert mit der Fraktion apoptotischer Zellen in der Probe.

Die Analyse der apoptotischen Zellen erfolgte nach Herstellerangaben im 96-*well* Format 96 Std. nach Transfektion von miRNAs oder siRNAs (s. 3.5.2). Die Messung erfolgte anhand des Epoch Spektralphotometer-Systems (BioTech). Alle Experimente wurden drei Mal, jeweils in dreifach-Bestimmung durchgeführt.

3.5.7 Proliferations-Assay

Die Synthese von DNA ist ein indirekter Parameter der Zellproliferation. Das Prinzip des *Cell Proliferation* ELISA Kits (1647229001 - Roche) beruht auf dem Einbau von 5-bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die genomische DNA von proliferierenden Zellen. Mittels eines Antikörpers wird das eingebaute BrdU gebunden. Der Umsatz des Substrats gibt Aufschluss auf die Proliferationsrate einer Zellprobe.

Die Analyse der proliferierenden Zellen erfolgte im 96-*well* Format 96 Std. nach der Transfektion von miRNAs oder siRNAs (s. 3.5.2). Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die Messung erfolgte anhand des Epoch Spektralphotometer-Systems (BioTech). Alle Experimente wurden mindestens drei Mal und jeweils in dreifach-Bestimmung durchgeführt.

3.5.8 Zellzyklusanalyse

Der Farbstoff Propidiumiodid interkaliert mit Nukleinsäuren von perforierten Zellen. Bei der Zellzyklusanalyse wird anhand von Durchflusszytometrie der DNA-Gehalt von Zellen bestimmt. Dieser gibt Aufschluss auf den Zellzyklusstatus einzelner Zellen. Die sub G1-Phase ist charakterisiert durch degradierte DNA und damit ein Charakteristikum apoptotischer Zellen. In der G1-Phase liegt in der Zelle ein vollständiger Chromosomensatz vor. Befindet sich eine Zelle in der S-Phase, in der die DNA repliziert wird, liegt ein 1-2-facher Chromosomensatz vor. Die G2/M-Phase ist durch das Vorhandensein zweier Chromosomensätze charakterisiert.

Zu analysierende Zellen wurden in 12-well Platten mit miRNAs oder siRNAs transient transfiziert (s. 5.3.2) und nach 96 Std. analysiert. Zellpellets wurden mit PBS gewaschen (5 Min. bei 1.000 g), in 70% Ethanol auf Eis für 1 Std. fixiert und zentrifugiert (5 Min. bei 1.000 g). Das Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert und die RNA durch Zugabe von RNase A (Endkonzentration 0,25 mg/ml) für 1 Std. bei 37°C verdaut. Propidiumiodid wurde in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben. Der zelluläre DNA-Gehalt von jeweils 5.000 Zellen wurde mittels des *Flow Cytometers* FC500 (Beckman Coulter, Krefeld) gemessen und anhand der Software CXP analysiert. Alle Experimente wurden mindestens drei Mal durchgeführt

3.5.9 Luziferase Reporter Assay

Die direkte Bindung einer miRNA an eine vorhergesagte Ziel-mRNA kann mittels einer Luziferase Reporter Analyse validiert werden. Das Luziferase-Reporter-Plasmid enthält die potentielle Bindestelle der miRNA. Die Bindung der miRNA an die Bindestelle führt zur Hemmung der Luziferase Expression und somit zur geringeren Aktivität.

Die Bindung von miR-137 an die 3'UTR von *KDM1A* wurde wie folgt untersucht: Das Glühwürmchen-Luziferase Reporter Plasmid pMir-Target (OriGene), welches die 3'UTR von *KDM1A* beinhaltet (SC0204616 - NM_015013), das Plasmid pRL-TK (E224A – Promega, Mannheim), das als Transfektionskontrolle Renilla-Luziferase exprimierte, und Negativkontroll-miRNA oder miR-137 wurden im 12-well Format sowohl in HEK-293 als auch in SHEP Zellen kotransfiziert.

Die Validierung der miR-542-3p Bindung an die 3'UTR von *Survivin* erfolgte mit freundlicher Weise von Dr. Kwanghee Baek (Graduiertenschule für Biotechnologie, Kyung Hee Universität, Yongin, Korea) zur Verfügung gestellten Psi-Check2-Vektoren (Promega),

die die 3'UTR von *Survivin* enthielten. Auf einem der beiden Vektoren war die 3'UTR so mutiert, dass die vorhergesagte Bindestelle der miR-542-3p zerstört vorlag. HEK-293 und SHEP Zellen wurden mit jeweils einem der beiden Vektoren und entweder mit der Negativkontroll-miRNA oder miR-542-3p kotransfiziert.

Die Messung der Luziferase-Aktivitäten erfolgte 48 Std. nach der Transfektion mit dem *Dual-Luciferase*[®] Reporter Assay System (Promega) nach Herstelleranweisungen. Die Expression der Glühwürmchen-Luziferase wurde gegen die der Seefeder-Luziferase normalisiert.

3.6 Genset *Enrichment* Analyse, statistische Methoden und Bildbearbeitung

3.6.1 Genset *Enrichment* Analyse

Anhand einer Genset *Enrichment* Analyse (GSEA) mittels einer Online-Software (www.broadinstitute.org) wurden Signalwege oder Gruppen von funktionell verwandten Genen identifiziert, die in Tumoren des LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre* Mausmodells im Vergleich zu nicht-malignen Nebennieren aus Wildtyp-Mäusen dereguliert wurden. Die Software verwendet die *Molecular Signatures* Datenbank (MSigDB v3.1), die eine Kollektion etablierter Gensets enthält⁸⁷. Das Ziel einer GSEA ist es Gruppen von Genen zu identifizieren, die gemeinsame, biologische Funktionen haben und am Anfang oder Ende der Rangliste der verschiedenen regulierten Gene stehen. Bei der GSEA wird der *Enrichment Score* (ES) als Maß definiert, wie stark ein Genset innerhalb der Rangliste der Gene überrepräsentiert ist. Die Signifikanz des ES wird auf Basis eines Permutations p-Wert berechnet und anhand der falsch-positiv Rate (FDR) angegeben. Ein FDR < 0,25 wird als signifikant definiert. Bei der Berechnung des normalisierten ES (NES) werden die Unterschiede in der Größe der Gensets und in der Korrelation zwischen Gensets und Expressionsdaten normalisiert. Dadurch können Ergebnisse von Analysen verschiedener Gensets miteinander verglichen werden. Ein NES > 2 zeigt eine sehr starke Anreicherung des Gensets an und ein NES = 1-2 eine moderate bis starke Anreicherung, während NES < 1 für keine Anreicherung steht. In dieser Arbeit wurde die GSEA auf eine Kollektion von 3.272 Gensets (C2) angewendet. Bei der Analyse wurden Gensets, die weniger als 15 Gene oder mehr als 500 Gene enthielten ausgeschlossen.

3.6.2 Statistische Analysen

Sämtliche Graphen wurden mit *GraphPad Prism*® 5.0 erstellt. Statistische Analysen wie der Student's t-Test, der Log-Rank-Test und der Wilcoxon Test erfolgten ebenfalls mittels dieser Software. Statistische Untersuchungen zum Verlauf zweier Graphen wurden von Johannes Köster (*Genome Informatics*, Institut für Humane Genetik, Universität Duisburg-Essen) anhand eines Permutationstests durchgeführt. Expressionsdaten aus qPCR-Analysen einzelner mRNAs wurden mit *Biogazelle qbasePLUS 2.0* berechnet. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei experimentell verschieden behandelten Gruppen wurde mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

3.6.3 Bildbearbeitung

Eingescannte histologische Schnitte wurden mit *Panoramic Viewer* 1.15.2 analysiert und als TIF-Dateien exportiert. Die Qualität von Fotos und anderen Dateien wurde mittels der Software *Photoshop*® CS4 (Adobe) sinnerhaltend aufgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Das LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre* Mausmodell

4.1.1 Generierung der transgenen Mauslinie LSL-*MYCN*

Die korrekte Rekombination des LSL-*MYCN* Konstrukts in ES-Zellen wurde anhand von Southern Blot Analysen untersucht (Abb. 8).

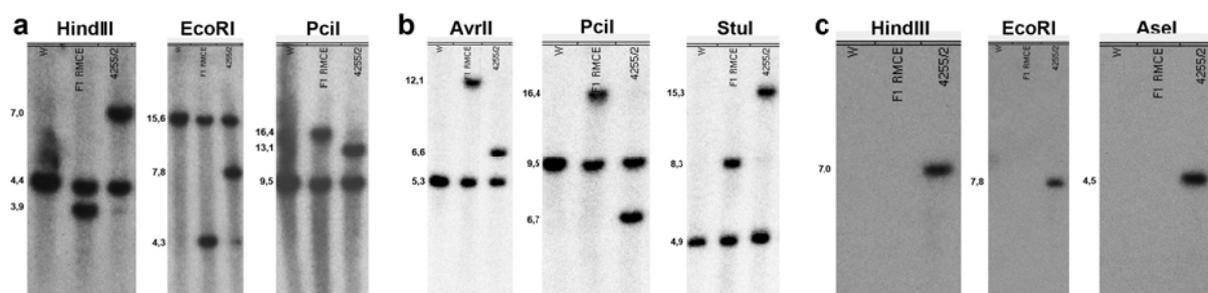


Abb. 8: Repräsentative Southern Blot Analyse eines ES-Zellklons (a) 5'-Sonde (b) 3'-Sonde (c) neo-Sonde. Modifiziert nach Milestone Report von TaconicArtemis GmbH.

Einer der validierten Klone wurde vermehrt, in Blastozysten injiziert und in schein-trächtige Mäuse implantiert. Die chimären Nachkommen wurden mit Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6N) weiter verpaart, nach schwarzer Fellfarbe selektiert, mittels PCR validiert und an unsere Arbeitsgruppe transferiert.

4.1.2 LSL-*MYCN* Beobachtungskohorte

Eine Beobachtungskohorte aus 21 heterozygoten Tieren der transgenen Mauslinie LSL-*MYCN* wurde auf Auffälligkeiten im Verhalten und auf Unterschiede in der Lebenszeit über einen Zeitraum von 17-23 Monaten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet. Auffälligkeiten konnten nicht festgestellt werden.

4.1.3 Genotypisierungen

Aus Schwanzbiopsien von potentiell transgenen LSL-*MYCN* Mäusen isolierte genomische DNA wurde mittels PCR auf Vorhandensein des humanen *MYCN*-Transgens untersucht (Primer LSL-*MYCN* – Tab. 3). Während bei Wildtyp-Mäusen kein Produkt amplifiziert werden konnte, wiesen sowohl heterozygote als auch homozygote LSL-*MYCN* Tiere ein 168 Basenpaar (bp) langes Amplikon auf (Abb. 9a). Die Zygote des Transgens wurde anhand der *ROSA26*-Wildtyp-PCR festgestellt (Primer *ROSA26*-Wildtyp – Tab. 3). Wildtyp- und heterozygote Mäuse zeigten eine 299 bp Bande, während bei homozygot transgenen Tieren kein Produkt amplifiziert werden konnte (Abb. 9b). Dies lag darin begründet, dass die Elongationszeit von 45 s im Falle des Vorhandenseins des Transgens, das aus ~13.000 bp besteht, zu kurz war, um das Produkt zu bilden. *Dbh-iCre*-Mäuse wurden ausschließlich heterozygot gezüchtet. Die Genotypisierungs-PCR (Primer *Dbh-iCre* – Tab. 3) amplifizierte ein 300 bp langes Produkt, welches in Wildtyp-Mäusen nicht generiert werden konnte (Abb. 9c).

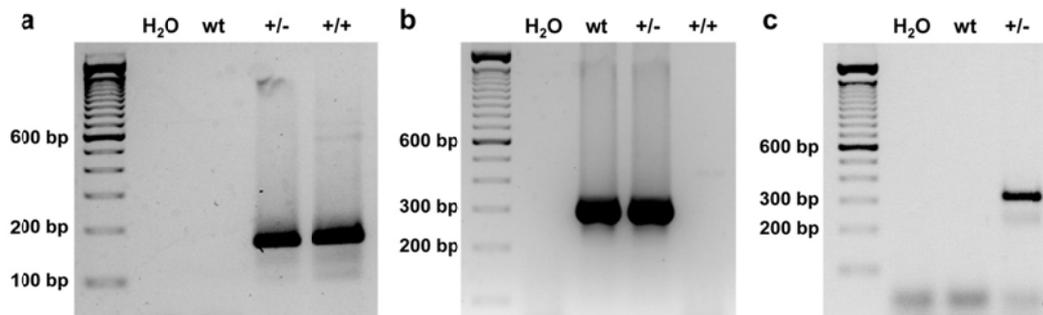


Abb. 9: Repräsentative Genotypisierungs-PCRs der verwendeten Mauslinien LSL-*MYCN* und *Dbh-iCre* (a) *MYCN* Transgen (Primer LSL-*MYCN*), amplifiziert aus genomischer DNA einer heterozygoten und einer homozygoten LSL-*MYCN* Maus. (b) *ROSA26*-Wildtyp-Genlokus (Primer *ROSA26*-Wildtyp), amplifiziert aus genomischer DNA einer Wildtyp- und einer heterozygoten LSL-*MYCN*-Maus. (c) *Dbh-iCre* Transgen (Primer *Dbh-iCre*), amplifiziert aus genomischer DNA einer heterozygoten *Dbh-iCre* Maus. wt = Wildtyp; +/- = heterozygot; +/+ = homozygot. Primer: Tab. 3.

4.1.4 Embryotoxizität des Genotyps LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre*

Die Nachkommen aus Verpaarungen von heterozygoten LSL-*MYCN* und *Dbh-iCre* Mäusen wurden hinsichtlich ihres Genotyps ausgezählt und der prozentuale Anteil berechnet (Abb. 10). Mittels des Chi-Quadrat-Tests wurde analysiert, ob die Verteilung der Genotypen den Mendelschen Regeln entsprach. Es wurde vermutet, dass 25% der Nachkommen keines der Transgene erben, 50% eines der Transgene erhalten und 25% über

beide Transgene verfügen. Es wurde die Nullhypothese aufgestellt, dass kein Unterschied zwischen den zu erwartenden und den beobachteten Verteilungen der Genotypen vorlag. Der Chi-Quadrat-Test bestätigte diese Hypothese ($p = 0,68$), woraus sich schließen ließ, dass der Genotyp *LSL-MYCN;Dbh-iCre* nicht unmittelbar letal war.

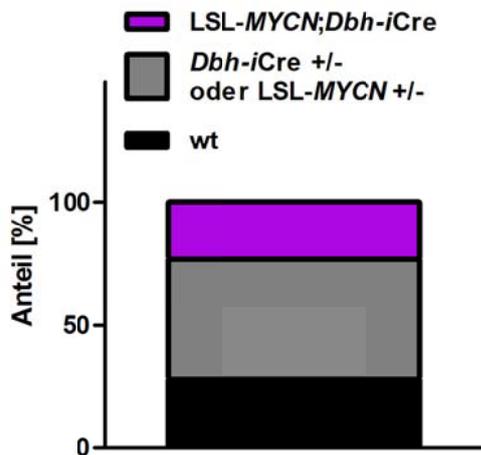


Abb. 10: Verteilung der auftretenden Genotypen aus Verpaarungen von heterozygoten *LSL-MYCN* und *Dbh-iCre* Mäusen Anteil der möglichen Genotypen als Prozentbalken ($n = 239$). Chi-Quadrat-Test: $\chi^2 = 0,17$; Freiheitsgrad = 1; $p = 0,68$. Beobachtete Verteilung entspricht der erwarteten.

4.1.5 Tumorinzidenz und -lokalisierung

Heterozygote *LSL-MYCN* Mäuse wurden mit heterozygoten *Dbh-iCre* Tieren verpaart und doppelt-transgene Nachkommen wöchentlich auf Tumore abgetastet. Mittels Kaplan-Meier-Analyse wurde das Tumor-freie Überleben der doppelt-transgenen Tiere ($n = 38$) im Vergleich zu der Beobachtungskohorte ($n = 21$ – s. 4.1.2), die aus heterozygoten *LSL-MYCN* Mäusen bestand, aufgezeichnet (Abb. 11). Während keine der *LSL-MYCN* Mäuse innerhalb der Beobachtungszeit von 394 bis 688 Tagen einen Tumor aufwies, wurde bei *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen eine Tumorinzidenz von 76,3% beobachtet, wobei sich die Tumore im Alter von 26-337 Tagen entwickelten. Die meisten Tumore entwickelten sich spätestens in einem Alter von 123 Tagen (96,5%), während nur ein Tumor der Kohorte nach dieser Zeit entstand. Tumor-tragende Mäuse bildeten in 88,8% der Fälle einen oder zwei Tumore an den Nebennieren aus, während Tumore an den oberen Zervikalganglien (33,3%) und dem *Ganglion coeliacum* (11,1%) seltener vorkamen. Häufig waren mehrere Tumore an den verschiedenen Geweben in einer Maus zu finden. Tumore am *Ganglion coeliacum* kamen ausschließlich in Verbindung mit Nebennierentumoren vor, während Tumore am oberen Zervikalganglion auch einzeln auftraten (11,1%). Ein Zusammenhang zwischen diesen Beobachtungen konnte statistisch nicht untersucht werden, da die Anzahl der observierten Fälle zu gering war.

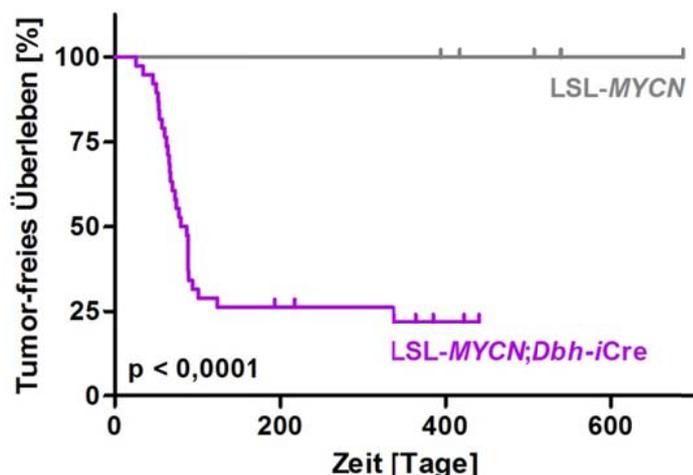


Abb. 11: Entwicklung von Tumoren im LSL-MYCN;Dbh-iCre Mausmodell
Kaplan-Meier-Analyse des Tumorfreien Überlebens von LSL-MYCN Mäusen (Beobachtungskohorte; $n = 21$) im Vergleich zu LSL-MYCN;Dbh-iCre Tieren ($n = 38$). Tumorentwicklung an den Nebennieren, dem *Ganglion coeliacum* und dem oberen Zervikalganglion. Log-Rank Test.

Zellen der LSL-MYCN;Dbh-iCre Maus, in denen die Cre-Rekombinase aktiv war, da die Polyadenyl-Stoppsequenz herausgeschnitten wurde, sollten neben dem Onkogen MYCN auch Luziferase exprimieren. Luziferin wird in Gegenwart von Luziferase oxidiert und kann mittels Lumineszenz-Bildgebung visualisiert werden (Abb. 12). Repräsentative Tumore konnten sowohl an den Nebennieren (I, II und III), als auch am oberen Zervikalganglion (I) und am *Ganglion coeliacum* (III) nachgewiesen werden.

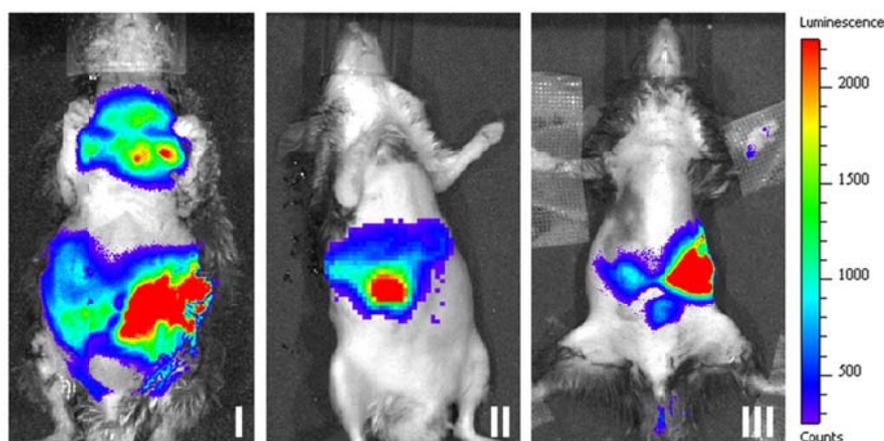


Abb. 12: Luziferase-Expression dreier repräsentativer Tumore aus LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen
In vivo Biolumineszenz Bildgebung repräsentativer Tumore von drei LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen an den Nebennieren (I, II und III), am oberen Zervikalganglion (I) und am *Ganglion coeliacum* (III). Luziferase-Aktivität: blau = niedrig; rot = hoch.

Die Tumore des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodells wurden mittels Ultraschall-Bildgebung weiter untersucht. Während die oberen Zervikalganglien aufgrund ihrer geringen Größe in heterozygoten *LSL-MYCN* Tieren nicht genau dargestellt werden konnten (Abb. 13a), waren repräsentative Tumore die aus diesen Geweben entstanden waren, deutlich als echoärmere, raumfordernde Struktur in der Halsregion rechts und links der Luftröhre nachweisbar (Abb. 13b). Zur Auffindung einer Nebenniere wurde zunächst die Lokalisation der Niere anhand ihrer auffälligen Struktur aus Nierenrinde, -mark und -becken, die im Ultraschall deutlich erkennbar waren, definiert (nicht gezeigt). In Richtung kranial konnte bei heterozygoten *LSL-MYCN* Tieren die Nebenniere am vorderen Nierenpol dargestellt werden (Abb. 13c). Die Nebennierenrinde war als echoarme Struktur deutlich erkennbar, während das innenliegende Nebennierenmark ein stärkeres Echo aufwies. Tumore der Nebenniere, die im *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodell auftraten, konnten als echoarme Strukturen am oberen Nierenpol dargestellt werden (Abb. 13d). Mittels der 3D-Funktion des Vevo2100 wurden die 3-dimensionalen Strukturen verschiedener Gewebe rekonstruiert (Abb. 13e) und ihre Volumina bestimmt. Nicht-maligne Nebennieren ausgewachsener Mäuse wiesen ein mittleres Volumen von $2,18 \text{ mm}^3$ ($\pm 0,61 \text{ mm}^3$) auf (Daten nicht gezeigt). Die Volumina der Nebennieren von je sechs *LSL-MYCN* und *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tieren wurden über 100 Tage wöchentlich gemessen und gegen das Alter der Tiere aufgetragen (Abb. 13f). Zwischen den Volumina nicht-maligner Nebennieren von *LSL-MYCN;Dbh-iCre* und *LSL-MYCN* Mäusen konnte kein Unterschied detektiert werden. Zwei der doppelt-transgenen Mäuse entwickelten innerhalb der Beobachtungszeit Tumore an einer der beiden Nebennieren, anhand deren Volumina sich ein exponentielles Wachstum nachweisen ließ. Ein weiteres *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tier dieser Kohorte bildete einen Tumor des oberen Zervikalganglions mit schneller Volumenvergrößerung aus und musste nach 50 Beobachtungstagen getötet werden (Daten nicht gezeigt). Die Tumorzinzidenz der hier beobachteten Kohorte lag innerhalb der Streuung der Gesamtkohorte.

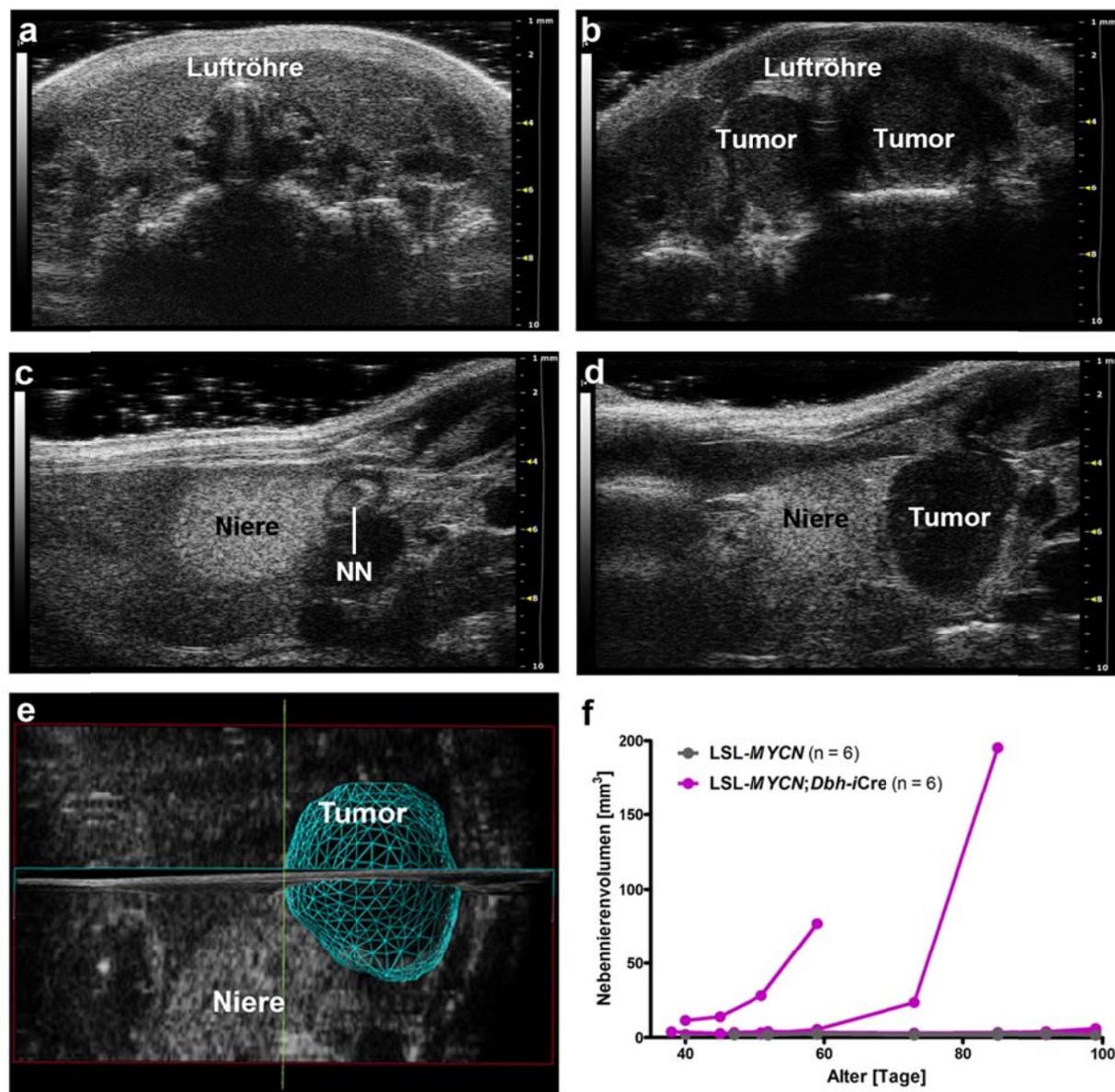


Abb. 13: Ultraschall-Bildgebung von Tumoren aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen
(a) Durchschnitt der Halsregion einer heterozygoten *LSL-MYCN* Maus in Höhe der oberen Zervikalganglien (aufgrund der geringen Größe nicht genau definierbar). **(b)** Durchschnitt durch beidseitig aus den oberen Zervikalganglien entstandene Tumore einer repräsentativen *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Maus. **(c)** Durchschnitt der am vorderen Nierenpol lokalisierten Nebenniere (NN) einer heterozygoten *LSL-MYCN* Maus. Nebennierenrinde schwarz; Nebennierenmark weiß-meliert. **(d)** Durchschnitt durch einen aus der Nebenniere hervorgegangenen Tumor einer *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Maus. **(e)** 3D-Rekonstruktion eines repräsentativen Nebennierentumors einer *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Maus. **(f)** Nebennierenvolumina von je 6 *LSL-MYCN* und *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen mittels 3D-Rekonstruktion aufgetragen gegen das Alter des jeweiligen Tieres. Zwei der doppelt-transgenen Tiere entwickelten innerhalb der Beobachtungszeit einen Tumor an einer der Nebennieren.

Sobald ein Tumor ein Volumen von 500 mm³ überschritt, die Atmung eines Tieres aufgrund eines die Luftröhre zudrückenden Tumors eingeschränkt war oder ein Tier einen allgemeinen schlechten Habitus aufwies, wurde dieses durch zervikale Dislokation getötet. Während der Sektion wurden makroskopische Aufnahmen gemacht, anhand derer sowohl Tumore der Nebennieren und des *Ganglion coeliacum* (Abb. 14a) als auch des oberen Zervikalganglions (Abb. 14b) dokumentiert wurden.

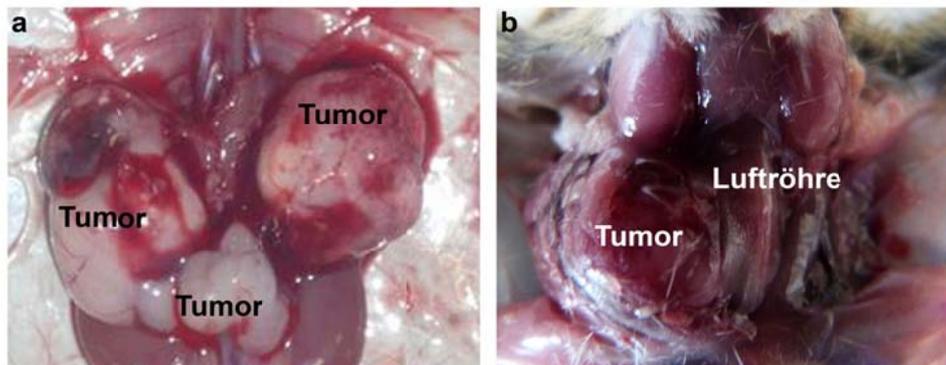


Abb. 14: Makroskopische Aufnahmen repräsentativer Tumore des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells (a) Darstellung beidseitig entstandener Nebennierentumore (rechts und links) und eines Tumors des *Ganglion coeliacum* (Mitte). (b) Darstellung eines Tumors, hervorgegangen aus dem oberen Zervikalganglion nahe der Luftröhre.

Das Vorhandensein der spezifischen Polyadenyl-Stoppsequenz in genomischer DNA von LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen deutete darauf hin, dass in dem jeweiligen Gewebe keine Rekombination stattgefunden hatte, also keine Cre-Rekombinase exprimiert wurde. Mittels PCR (Primer *flox-out* - Tab. 3) konnte in genomischer DNA aus Herzgewebe von LSL-MYCN;Dbh-iCre Tieren, ein 2241 bp langes Amplikon nachgewiesen werden (Abb. 15). In genomischer DNA aus Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells, in welcher die Polyadenyl-Stoppsequenz aufgrund der Expression der Cre-Rekombinase ausgeschnitten wurde, war das Amplikon 703 bp lang. Die Aktivierung des Transgens durch ein Rekombinationsereignis konnte so in den Tumoren nachgewiesen werden.

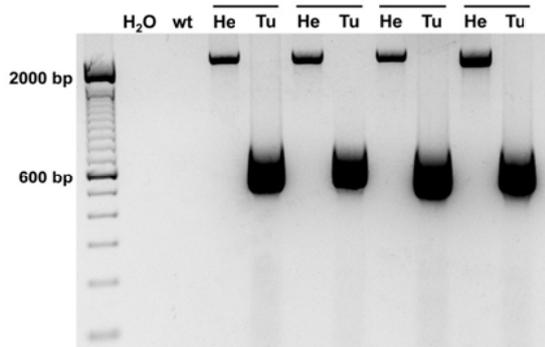


Abb 15: PCR zur Validierung der ausgeschnittenen Polyadenyl-Stoppsequenz in vier repräsentativen Tumoren aus LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen Konditionales LSL-MYCN Allel im Herz 2241 bp lang, konstitutives Allel im Tumor der jeweils gleichen Maus 703 bp lang. Primer *flox out* (Tab. 3). wt = Wildtyp; He = Herz; Tu = Tumor.

Die Expression des Transgens *MYCN* wurde sowohl auf mRNA-Ebene mittels qPCR als auch auf Protein-Ebene mittels Western Blot in Kontrollgeweben von Wildtyp-Tieren und Tumoren von LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen analysiert. Die *MYCN* mRNA Expression vier repräsentativer Tumore sowie der Kontrollgewebe Niere, Leber, Herz und Gehirn wurde relativ zur Expression der nicht-malignen Nebenniere aufgetragen (Abb. 16a). Tumore zeigten im Vergleich zu Nebennieren eine signifikant, im Mittel 14,5-fach, erhöhte Expression von *MYCN* mRNA. Im Vergleich der Tumore zu den anderen analysierten Kontrollgeweben war die Hochregulation von *MYCN* mRNA noch deutlicher. Die erhöhte Expression des Proteins MYCN im Tumor im Vergleich zum Herz der jeweils gleichen Maus wurde in vier repräsentativen LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen dargestellt (Abb. 16b).

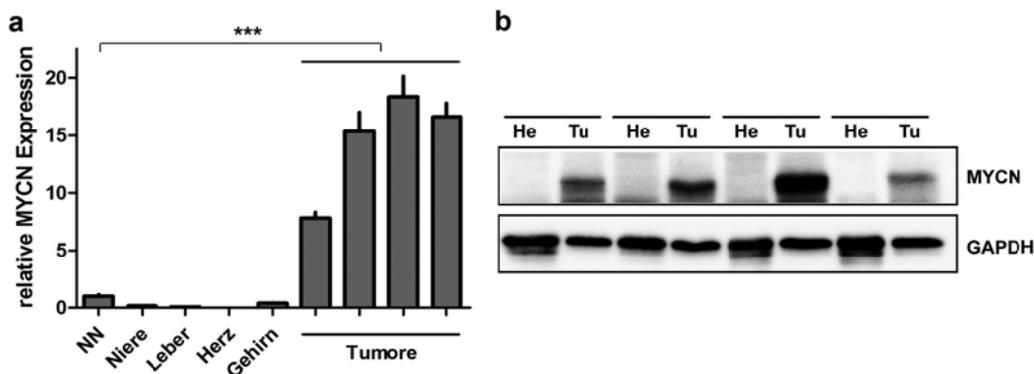


Abb. 16: Überexpression von MYCN in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells (a) Balkendiagramm der *MYCN* mRNA Expression vier repräsentativer Tumore und Kontrollgeweben aus einer Wildtyp-Maus relativ zur Expression der Nebenniere (NN). Student's t-Test: $p = 0,0002$. (b) MYCN Protein Expression im Herz (He) und Tumor (Tu) vier repräsentativer Mäuse. GAPDH als Ladungskontrolle.

4.1.6 Tumorhistologie und Expression spezifischer Neuroblastommarker

Die Expression der Neuroblastommarker *Dbh*, *Th* und *Phox2b* wurde auf mRNA-Ebene mittels qPCR in verschiedenen Geweben des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells analysiert. Die Marker-Expression vier repräsentativer Tumore und der Kontrollgewebe Niere, Leber, Herz und Gehirn wurde relativ zur Expression der nicht-malignen Nebenniere aufgetragen (Abb. 17). Innerhalb der Kontrollgewebe war die Expression aller Marker in der Nebenniere am höchsten. Die Tumore wiesen verglichen mit nicht-malignen Nebennieren im Mittel eine 2,4-fach erhöhte Expression von *Dbh*, eine 4,2-fach erhöhte Expression von *Th* und eine 22-fach erhöhte Expression von *Phox2b* auf. Die Hochregulation der analysierten Neuroblastommarker in den Tumoren war signifikant.

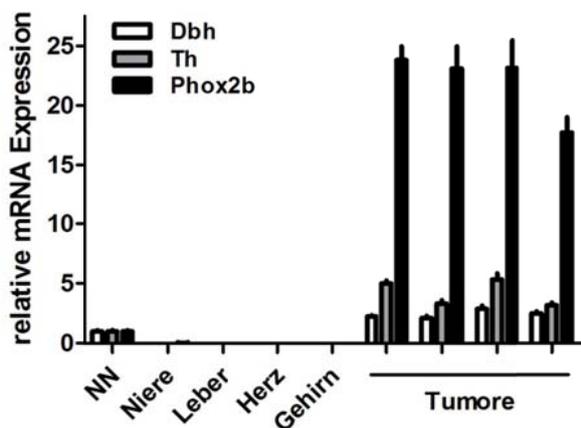


Abb. 17: mRNA Expression von Neuroblastommarkern in vier repräsentativen Tumoren aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen

Balkendiagramm der Neuroblastommarker mRNA Expression vier repräsentativer Tumore und Kontrollgeweben relativ zur Expression der nicht-malignen Nebenniere (NN). Signifikante Hochregulation in Tumoren im Vergleich zur Nebenniere (Student's t-Test: *Dbh*: $p = 0,005$; *Th*: $p = 0,02$; *Phox2b*: $p = 0,0006$). *Dbh* = Dopamin-beta Hydroxylase; *Th* = Tyrosin Hydroxylase.

Die Struktur repräsentativer Tumore aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen wurde anhand histologischer Schnitte, die mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt wurden, untersucht. Die Tumore bestanden aus kleinen, blauen, runden Zellen, typisch für das Neuroblastom, das auch im humanen Organismus diese Struktur aufweist¹ (Abb. 18a). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten neurosekretorische Vesikel, die für neuronales Gewebe spezifisch sind¹ (Abb. 18b). Weiterhin wurde *CD56*, ein neuronales Zelladhäsionsmolekül, das in neuronalen und neuroendokrinen Geweben und Tumoren exprimiert wird⁸⁸, immunhistochemisch dargestellt (Abb. 18c). Die Expression des Neuroblastommarkers *Th*, die schon auf Transkriptionsebene gezeigt werden konnte, wurde anhand immunhistochemischer Färbungen auf Proteinebene validiert (Abb. 18d).

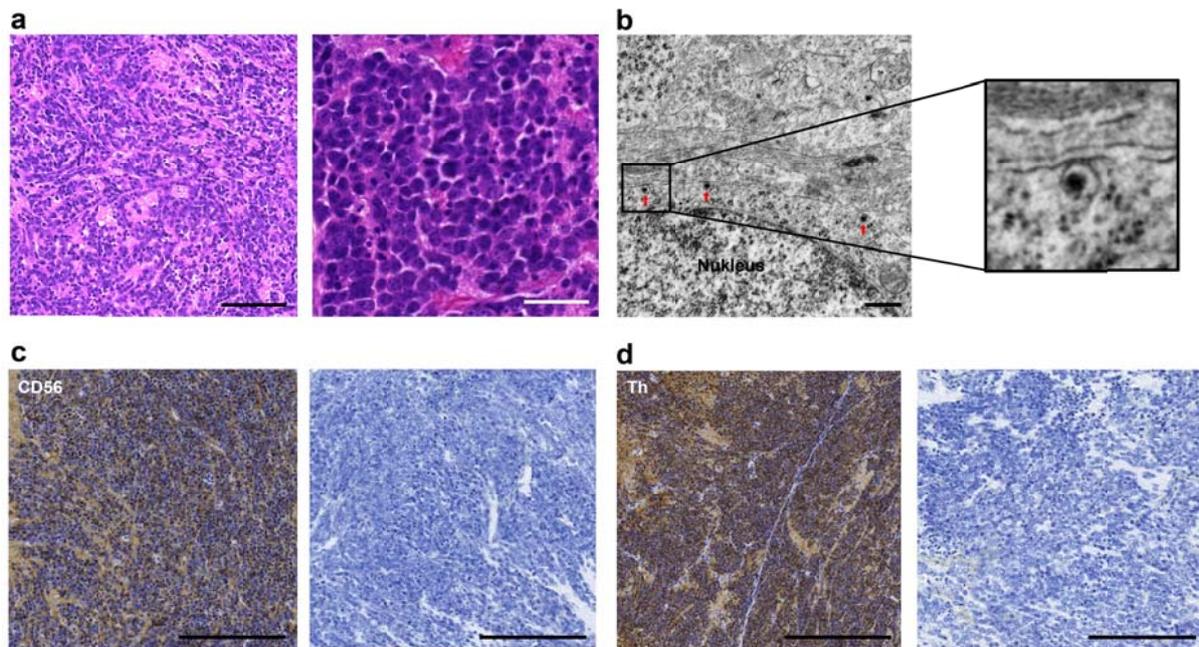


Abb. 18: Histologische und molekulare Charakteristika von Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells (a) Hämatoxylin und Eosin Färbung. Überwiegend kleine, runde, blaue Zellen. Maßstabsbalken: links = 100 μm ; rechts = 50 μm . (b) Elektronenmikroskopische Aufnahme mit neurosekretorischen Vesikeln (Pfeile). Maßstabsbalken = 500 nm. (c) Immunhistochemische Färbung von *CD56* (links) und Negativkontrolle nur mit Sekundärantikörper (rechts). Maßstabsbalken = 200 μm . (d) Immunhistochemische Färbung von *Th* (links) und Negativkontrolle nur mit Sekundärantikörper (rechts). Maßstabsbalken = 200 μm .

4.1.7 Vergleich der Tumorinzidenz des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodells mit der des etablierten *TH-MYCN* Mausmodells

Das Tumor-freie Überleben von *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen wurde mit dem des etablierten *TH-MYCN* Neuroblastommodells verglichen. Die *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tiere befanden sich im gemischten genetischen Hintergrund aus C57Bl6/N (75%) und 129x1/SvJ (25%), während der genetische Hintergrund der analysierten *TH-MYCN* Mäuse 100% 129x1/SvJ war. *TH-MYCN* Tiere im gemischten Hintergrund aus C57Bl6/N (50%) und 129x1/SvJ (50%) entwickelten keine Tumore (Daten nicht gezeigt), wie schon in vorherigen Publikationen beschrieben wurde³⁷. *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen zeigten im Vergleich zu *TH-MYCN* Tieren ein signifikant schlechteres Tumor-freies Überleben, ermittelt anhand einer Kaplan-Meier-Analyse (Abb. 19). Die Tumorinzidenz des *TH-MYCN*-Modells betrug 48% und war damit geringer als die des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells (76,3%). Das mediane Tumor-freie Überleben von *TH-MYCN* Mäusen betrug 154 Tage, während das von *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tieren bei 82,5 Tagen lag. Diejenigen Tiere, die im Laufe der Beobachtung mindestens einen Tumor

ausbildeten, entwickelten diesen im *TH-MYCN* Modell im Mittel nach 85,3 Tagen ihres Lebens, im *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modell nach 79,6 Tagen.

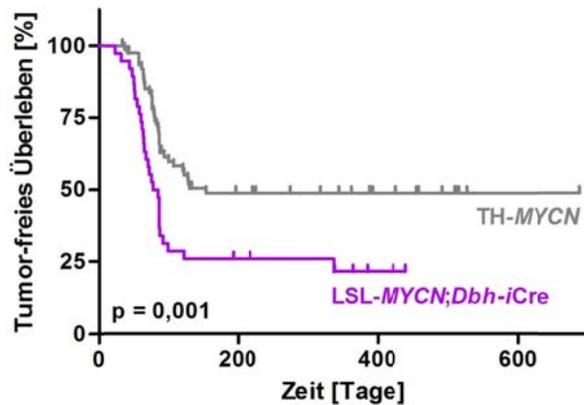


Abb. 19: Vergleich der Tumorinzidenz zwischen dem *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modell und dem *TH-MYCN* Modell Kaplan-Meier-Analyse des Tumor-freien Überlebens von heterozygot transgenen *TH-MYCN* Mäusen (n = 84) und *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tieren (n = 38). Tumorinzidenz in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen signifikant höher (Log-Rank Test).

4.1.8 Genomische Aberrationen von *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren

Genomische Aberrationen von 13 *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren (elf Tumore der Nebennieren und zwei Tumore des oberen Zervikalganglions) wurden relativ zu Gewebe aus dem Schwanz der jeweils gleichen Maus mittels einer aCGH Analyse detektiert und in einer Übersichtsgraphik den jeweiligen Chromosomen zugeteilt (Abb. 20a). Die mittlere Zeit bis zur Entwicklung eines Tumors in dieser Kohorte betrug 80,4 Tage. In zwei Tumoren wurden keine chromosomalen Aberrationen detektiert. Die mittlere Zeit bis zur Entwicklung dieser beiden Tumore betrug 46 Tage. Ein Zusammenhang zwischen der Zeit bis zur Tumorentwicklung und dem Auftreten chromosomaler Aberrationen konnte aufgrund der geringen Anzahl an analysierten Tumoren nicht untersucht werden.

Einer der analysierten Tumore einer Nebenniere zeigte eine teilweise Zunahme des Chromosoms 1. In acht Tumoren der Nebenniere und einem Tumor des oberen Zervikalganglions wurde eine Zunahme des kompletten Chromosoms 3 detektiert. Eine Zunahme des kompletten Chromosoms 6 zeigten fünf der analysierten Tumore, wobei sowohl Tumore der Nebennieren als auch des oberen Zervikalganglions betroffen waren. Auf diesem Chromosom liegt der *ROSA26* Genloкус, in den das Transgen des *LSL-MYCN* Mausmodells kloniert wurde. Ein Tumor der Nebenniere und einer des oberen Zervikalganglions amplifizierten diesen Lokus sogar (Abb. 20b). Eine niedriger frequentierte Zunahme der distalen Hälfte des Chromosoms 11 wurde in vier der Tumore gefunden (Abb. 20c), entsprechend einer Region auf dem humanen Chromosom 17, die in 50% aller humaner Neuroblastome eine Zunahme aufweist⁴². In drei der Tumore wurde eine komplette Zunahme des Chromosoms 12 festgestellt. Beide Tumore

des oberen Zervikalganglions sowie ein Tumor der Nebenniere wiesen diese Aberration auf.

Interessanterweise wies einer der Tumore des oberen Zervikalganglions die gleichen Aberrationen auf wie der Tumor aus der Nebenniere der gleichen Maus (Abb. 20a (Tumor 12 und 13)), während der zweite analysierte Tumor des oberen Zervikalganglions andere Aberrationen als der dazugehörige Tumor der Nebenniere zeigte (Abb. 20a (Tumor 8 und 9)).

Teilweise oder komplette Verluste ganzer Chromosomen wurden in Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells nicht detektiert.

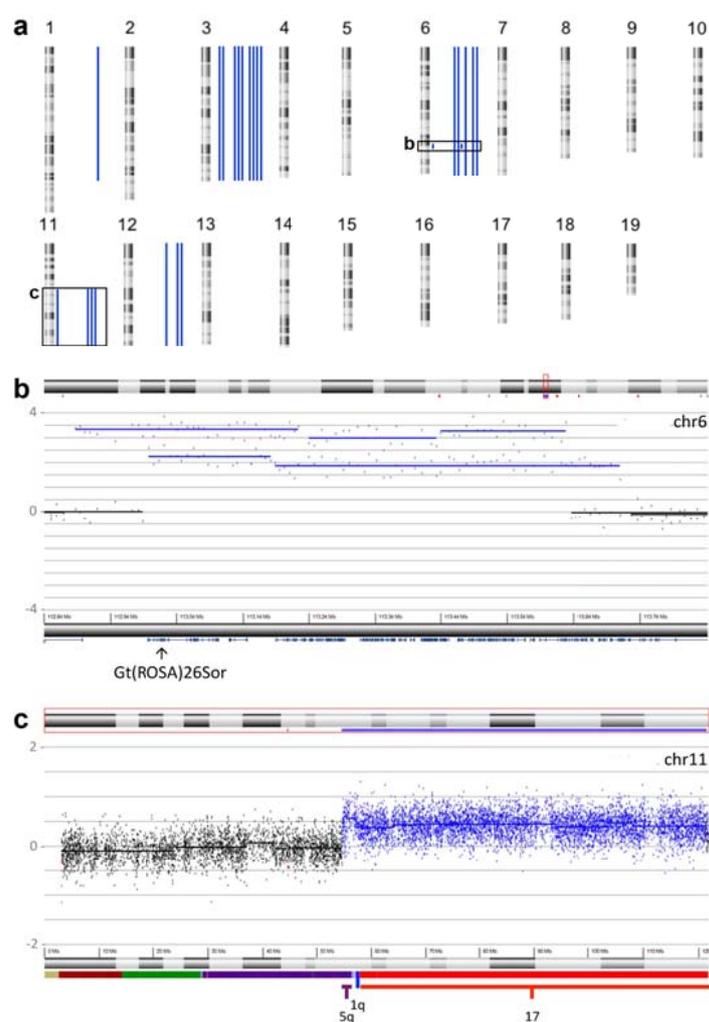


Abb. 20: Genomische Aberrationen von Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells

Analyse von 13 *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren relativ zu Gewebe aus dem Schwanz der jeweils gleichen Maus. **(a)** Überblick über genomische Aberrationen aller analysierten Tumore. blau = Zunahme; rot = Abnahme. **(b)** Repräsentative Darstellung des in zwei der Tumore amplifizierten *ROSA26* Genlokus auf Chromosom 6. **(c)** Repräsentative Ansicht der Zunahme der distalen Hälfte des Chromosoms 11 in vier der Tumore. Graphik generiert in Zusammenarbeit mit Anneleen Beckers.

4.1.9 mRNA Profiling

Mittels Affymetrix mRNA Arrays wurden mRNA Expressions Profile von drei nicht-malignen Nebennieren und acht LSL-MYCN;Dbh-iCre Tumoren erstellt.

4.1.9.1 Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) von Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Mausmodells

Eines der am stärksten angereicherten Gensets innerhalb der in Tumoren von LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen hochregulierten Gene, das anhand der GSEA detektiert wurde, beinhaltete Marker pädiatrischer Krebserkrankungen⁸⁹ (Abb. 21a (oben)). Dieses Genset besteht aus in Xenografts, die acht verbreitete pädiatrische Tumore repräsentieren, verschiedenen exprimierten Genen im Vergleich zu Normalgewebe. Ein weiteres Genset, das in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells stark angereichert war, beinhaltete Gene, die in B Zell Lymphomen, die eine aktivierte Form von MYC exprimieren, hochreguliert sind⁹⁰ (Abb. 21a (unten)). Weitere von MYC hochregulierte Gensets waren in Tumoren aus LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen angereichert⁹¹⁻⁹³, während von MYC herunterregulierte Gensets^{90,93,94} in Nebennieren angereichert wurden (Abb. 21b). Zusätzlich waren verschiedene Gene, die die DNA Replikation und den Zellzyklus betreffen⁹⁵⁻⁹⁸, statistisch signifikant hochreguliert in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells. Ein weiteres Genset, das Gene repräsentierte, die während neuraler Differenzierung herunterreguliert sind⁹⁹, wurde in Tumoren aus LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen hochreguliert, was die Hypothese eines undifferenzierten Phänotyp unterstützt.



Abb. 21: Genset Enrichment Analyse Acht LSL-MYCN;Dbh-iCre Tumore und drei nicht-maligne Nebennieren von Wildtyp-Mäusen. **(a)** Hochregulation eines Gensets, das Marker pädiatrischer Krebserkrankungen repräsentiert (oben) und eines MYCN-abhängigen Gensets (unten). Gezeigt ist der Plot der Rangsummen des MSigDB (v3.1) Gensets. **(b)** Tabelle ausgewählter Gensets der MSigDB C2 Kollektion, die in LSL-MYCN;Dbh-iCre bzw. in Nebennieren signifikant angereichert waren. Rang = Rang des Gensets innerhalb aller Gensets, geordnet nach abfallendem NES, Größe = Anzahl der Gene in jedem Genset, NES = normalisierter *Enrichment Score*, FDR = falsch-positiv Rate. Graphik generiert in Zusammenarbeit mit Anneleen Beckers.

4.1.9.2 Expression einer Signatur MYC(N) regulierter mRNAs in LSL-MYCN;Dbh-iCre Tumoren

An den gleichen mRNA Array Daten, die für die GSEA verwendet wurden, wurde auf Basis der von Fredlund *et al.* publizierten MYC(N) Signatur humaner Neuroblastome⁷⁸ eine zwei-dimensionale Clusteranalyse durchgeführt (Abb. 22). Des Weiteren wurde die Regulation dieser mRNAs in humanen MYCN-amplifizierten im Vergleich zu nicht-amplifizierten Neuroblastomen⁷⁸ und die der Internet-Datenbank www.myc-cancer-gene.org anhand von Pfeilen dargestellt.

Die nicht überwachte Clusteranalyse anhand der Gene der MYCN Signatur führte zu einer eindeutigen Separation von Nebennieren und LSL-MYCN;Dbh-iCre Tumoren.

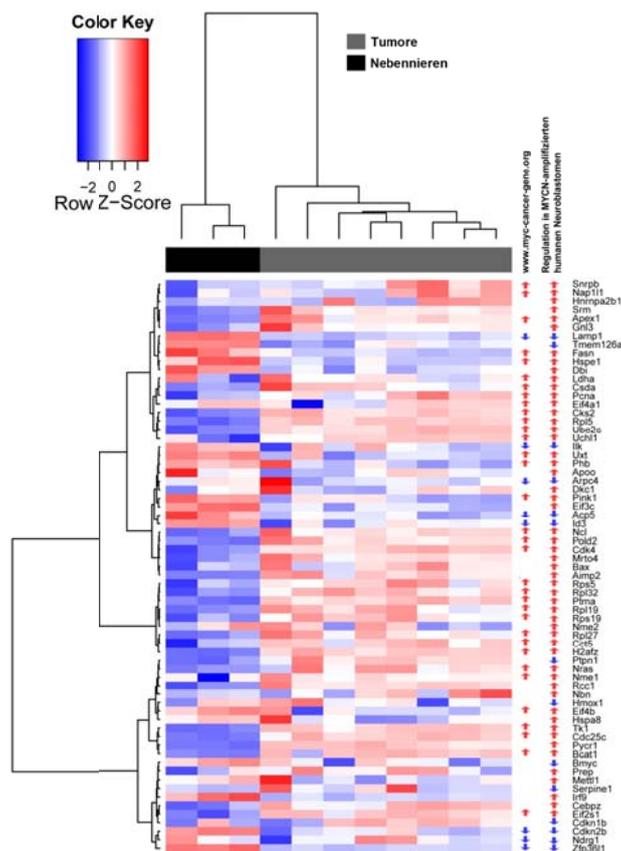


Abb. 22: Regulierte mRNAs in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Mausmodells Zwei-dimensionale hierarchische Clusteranalyse basierend auf der Expression der mRNAs der MYCN Signatur von Fredlund *et al.*⁷⁸ in acht LSL-MYCN;Dbh-iCre Tumoren und drei nicht-malignen Nebennieren. Regulation in MYCN-amplifizierten humanen Neuroblastomen⁷⁸ und Regulation in Datenbank (www.myc-cancer-gene.org) als Pfeile. Expression: blau = hoch; rot = niedrig. Graphik generiert in Zusammenarbeit mit Anneleen Beckers.

Die Hochregulation von *Nras*, die auch für das humane Neuroblastom bekannt ist¹⁰⁰, konnte im Mausmodell validiert werden. Dem Gen *UBE2C* wird eine positive Rolle in der Mitose von Neuroblastomzelllinien zugeschrieben¹⁰¹. Auch in LSL-MYCN;Dbh-iCre konnte eine Hochregulation detektiert werden. In humanen Neuroblastomen ist eine hohe *NME1* Expression mit einem ungünstigen Stadium assoziiert¹⁰². Tumore des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells überexprimierten diese mRNA ebenfalls. Der Laktat-Dehydrogenase Level im Blut von Neuroblastompatienten dient in der Klinik als Tumormarker¹³. Die Regulation des Gens in LSL-MYCN;Dbh-iCre Tumoren zeigte, dass auch murine Neuroblastome dieses Enzym überexprimierten. *SRM*, ein bekanntes nachgeordnetes Target von MYCN¹⁰³, war im LSL-MYCN;Dbh-iCre Modell ebenfalls signifikant reguliert.

4.1.9.3 Regulation bekannter MYCN mRNA Targets in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Mausmodells

Die Expression bekannter MYCN regulierter Targets wurde gesondert untersucht (Abb. 23). Die Carbamoyl-Phosphat Synthetase 2 (*Cad*) wird in verschiedenen Publikationen als von MYC und MYCN hochreguliertes Enzym beschrieben^{92,104,105}. Ein ebenfalls von MYC hochreguliertes Ziel ist die Cyclin-abhängige Kinase 4 (*Cdk4*), die eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt^{106,107}. Eine signifikant erhöhte Expression konnte auch in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells im Vergleich zu nicht-malignen Nebennieren festgestellt werden. Die MYCN-induzierte Herunterregulation von Dickkopf-3 (*Dkk3*) wird in humanen Neuroblastomzellen mit der direkten Bindung von miR-19b und miR-92a an die 3'UTR erklärt^{108,109}. Tumore der LSL-MYCN;Dbh-iCre Maus zeigten im Vergleich zu nicht-malignen Nebennieren eine signifikante Herunterregulation von *Dkk3*.

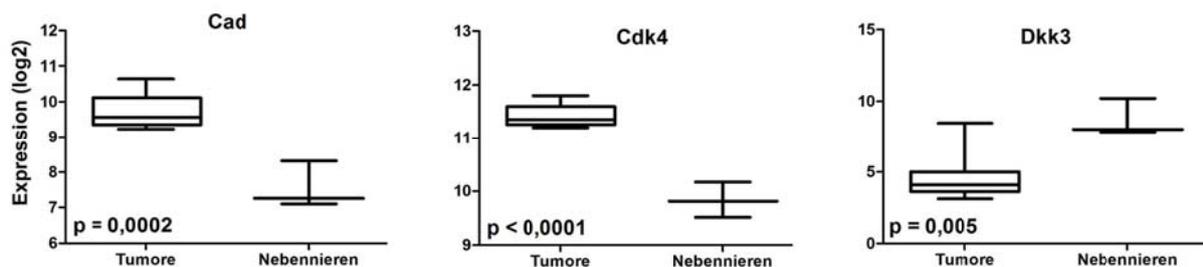


Abb. 23: Regulierte MYC Targets in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells Expression (log2) MYCN hochregulierter (*Cad* und *Cdk4*) und MYCN herunterregulierter (*Dkk3*) Zielgene in LSL-MYCN;Dbh-iCre Tumoren und nicht-malignen Nebennieren. Student's t-test.

4.1.10 miRNA Profiling

Mittels qPCR wurden miRNA Profile von fünf nicht-malignen Nebennieren und elf LSL-MYCN;Dbh-iCre Tumoren erstellt.

4.1.10.1 Expression einer Signatur MYCN regulierter miRNAs in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells

Eine zwei-dimensionale Clusteranalyse wurde auf Basis der von Mestdagh *et al.* publizierten MYC Signatur humaner Neuroblastome durchgeführt⁸⁰ (Abb. 24). Die Regulation der miRNAs in humanen MYCN-amplifizierten im Vergleich zu nicht-amplifizierten

Neuroblastomen, auf der die MYCN Signatur beruht, wurde anhand von Pfeilen dargestellt.

Die nicht überwachte Clusteranalyse anhand der miRNAs der MYCN Signatur führte zu einer eindeutigen Separation von Nebennieren und Tumoren aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen.

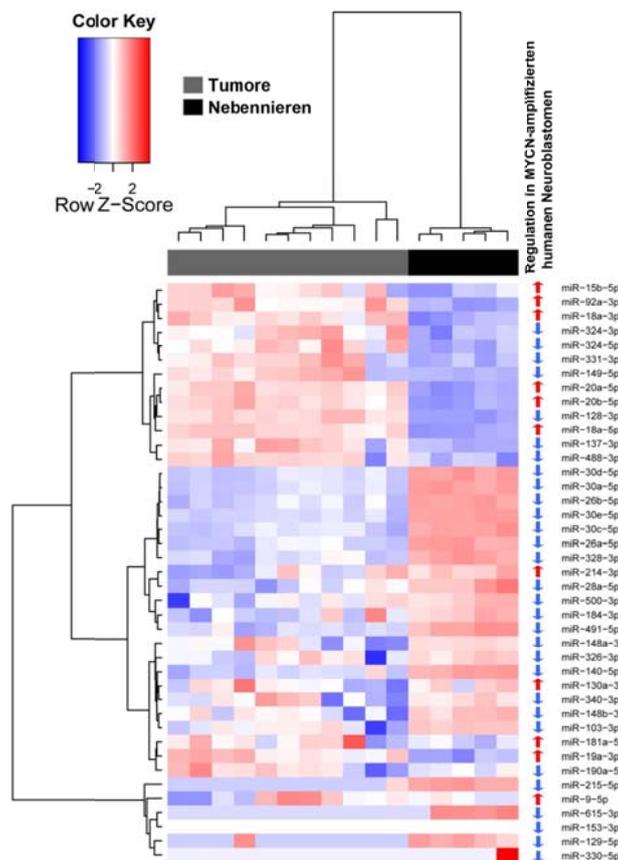


Abb. 24: Regulierte miRNAs in Tumoren von *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen Zwei-dimensionale hierarchische Clusteranalyse basierend auf der Expression der miRNAs der MYCN Signatur von Mestdagh *et al.*⁸⁰ in elf *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren und fünf nicht-malignen Nebennieren. Regulation in MYCN-amplifizierten humanen Neuroblastomen als Pfeile⁸⁰. Expression: blau = hoch; rot = niedrig. Graphik generiert in Zusammenarbeit mit Anneleen Beckers.

Verschiedene miRNAs des bekannten onkogenen miR-17-92 Clusters¹¹⁰ (miR-18a-3p, miR-18a-5p, miR-19a-3p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-92a-3p) waren in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren signifikant höher exprimiert als in nicht-malignen Nebennieren. Die onkogene, direkt von MYCN regulierte⁸⁰, miR-181a zeigte eine Überexpression in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren. Verschiedene beschriebene miRNAs mit potentiell tumorsuppressiver Funktion im Neuroblastom wie miR-103-3p¹¹¹, miR-184-3p^{112,113}, miR-214-3p¹¹⁴, miR-340-3p¹¹⁵ und miR-542-5p^{67,116} zeigten auch in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren eine Herunterregulation. Weitere miRNAs, die im humanen Neuroblastom

gleich reguliert werden wie in Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells waren miR-15b, miR-30c, miR-103, miR-140, miR-148a, miR-326, miR-491, miR-500 und miR-615⁸⁰. Verschiedene miRNAs, wie zum Beispiel die bekannte onkogene miR-9-5p, die im humanen Neuroblastom von MYC induziert wird¹¹⁷, zeigte in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren keine eindeutige Regulation. Andere miRNAs waren entgegengesetzt zum humanen Neuroblastom reguliert. Zum Beispiel ist die miR-137 in humanen Primärtumoren signifikant herunterreguliert (s. 4.3), während Tumore des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells eine eindeutige Hochregulation zeigten.

4.1.10.2 Regulation von miRNAs des miR-17-92 Clusters in Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodells

Die Expression bekannter MYCN regulierter Targets des miR-17-92 Clusters wurde ebenfalls untersucht (Abb. 25). Eine signifikante Hochregulation von miR-17-5p, miR-19a-3p und miR-92a-3p in Tumoren von *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen im Vergleich zu nicht-malignen Nebennieren konnte validiert werden. Weiterhin waren auch die anderen Mitglieder des Clusters (miR-17-3p, miR-18a-5p, miR-18a-3p, miR-20a-5p und miR-19b-3p) signifikant hochreguliert (Daten nicht gezeigt).

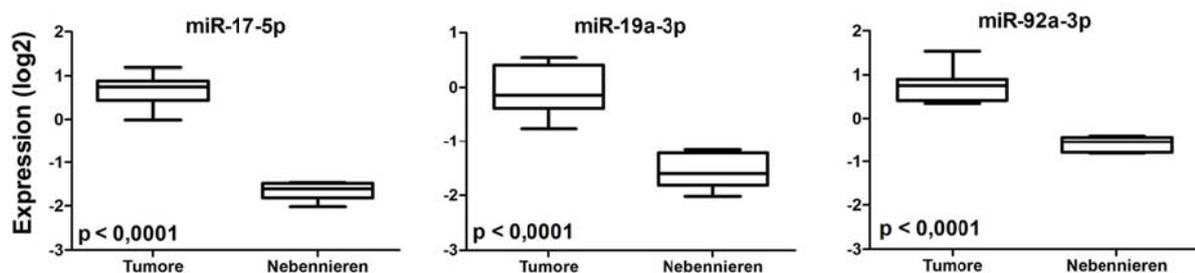


Abb. 25: Regulierte MYCN miRNA Targets in Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells
Expression (log2) ausgewählter MYCN hochregulierter miRNAs des miR-17-92 Clusters in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren und nicht-malignen Nebennieren. Student's t-test.

4.1.11 miR-542 als potentiell tumormodulierende miRNA im Neuroblastom

Eine tumorsuppressive Funktion der 5p-Isoform von miR-542 ist bereits in Neuroblastomzellen gezeigt worden⁶⁸. Auch für miR-542-3p konnte eine tumorsuppressive Funktion im Kolonkarzinom nachgewiesen werden⁶⁹. Die Analyse der Expression dieser miRNA im *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modell sollte Aufschluss darüber geben, ob diese miRNA auch im murinen Neuroblastommodell reguliert wurde.

Es stellte sich heraus, dass beide Isoformen der miR-542 in Tumoren aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen im Vergleich zu nicht-malignen Nebennieren signifikant herunterreguliert waren. In 91% der analysierten Tumore war die Expression von miR-542-5p so niedrig, dass diese nicht detektiert werden konnte. Dies galt auch für die Expression von miR-542-3p in 55% der Tumore. Weiterhin wurde die Expression von miR-542-5p in zehn und die miR-542-3p Expression in 21 *TH-MYCN* Tumoren re-analysiert. Auch in diesen Tumoren waren beide Isoformen signifikant herunterreguliert und in 90% (miR-542-5p) bzw. 76% (miR-542-3p) sogar nicht detektierbar (Abb. 26).

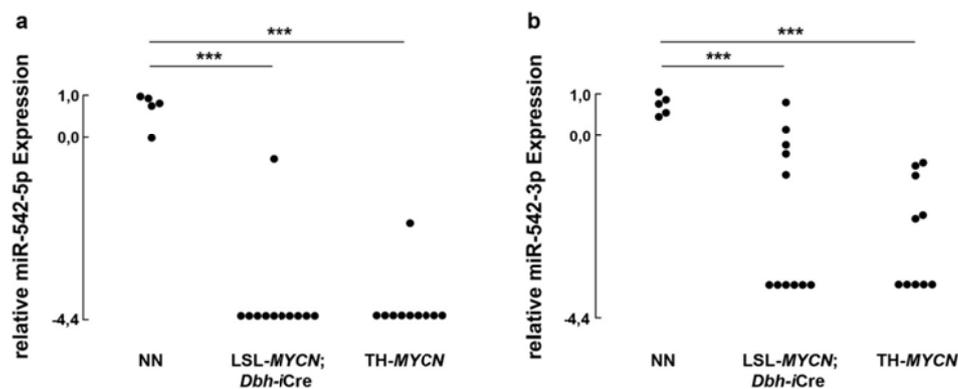


Abb. 26: Regulation von miR-542 in Tumoren der Mausmodelle *LSL-MYCN;Dbh-iCre* und *TH-MYCN* Dotplots der Expression von (a) miR-542-5p und der von (b) miR-542-3p in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* und *TH-MYCN* Tumoren relativ zur Expression nicht-maligner Nebennieren (NN). Student's t-Test: *** = $p < 0,001$.

Aufgrund der bekannten Rollen der Isoformen von miR-542 in verschiedenen Tumorzelllinien und ihrer starken Regulation im neuen *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodell, wurde deren potentiell tumorsuppressive Funktion in humanen Neuroblastomen und Zelllinien weiter analysiert (s. 4.2).

4.2 Die tumorsuppressive Funktion von miR-542 in humanen Neuroblastomen und Zelllinien

Beide Isoformen der miR-542 wurden bei der Analyse der miRNA Expressionsprofile von Tumoren aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen im Vergleich zu nicht-malignen Nebennieren herunterreguliert gefunden, was im *TH-MYCN* Mausmodell validiert werden konnte. In diesem Teil der Arbeit sollte die tumormodulierende Funktion dieser miRNA in humanen primären Neuroblastomen und Zelllinien untersucht werden.

4.2.1 Expressionsanalyse von miR-542 und Survivin in humanen Primärtumoren

In einer vorherigen Studie wurden sowohl die miRNA als auch die mRNA Expressionsprofile von 69 Primärtumoren humaner Neuroblastompatienten anhand von qPCR Daten generiert⁶⁷. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der vorhandene Datensatz in Bezug auf die Regulation der miR-542 Isoformen re-analysiert. Genaue Informationen sowohl über die Patienten als auch das Stadium und den Verlauf der Erkrankung waren bekannt (Tab. 9).

Tab. 9: Zusammensetzung der 69 Neuroblastopatienten der miRNA und mRNA Expressions-Kohorte Modifiziert nach Althoff *et al.*⁶⁷.

Anzahl Patienten		69
Geschlecht	männlich	37
	weiblich	32
Alter bei Diagnose	< 1 Jahr	25
	≥ 1 Jahr	44
Stadium	1+2	13
	3+4	38
	4s	18
MYCN Amplifikation	nein	53
	ja	16
11q	Wildtyp	36
	Deletion	16
	Ungleichgewicht	2
1p36	Wildtyp	44
	Deletion	15
	Ungleichgewicht	6
17q	Zugewinn	13
Verlauf	Rückfall	28
	Ereignis-freies Überleben	41
	Tod	20
	Überleben	49
Ereignis-freies Überleben [Tage]	Median	2283
	Bereich	456-4844
Gesamt-Überleben [Tage]	Median	2260
	Bereich	456-4844

Die Expression beider miR-542 Isoformen wurde gegen verschiedene bekannte prognostische Marker der Kohorte aufgetragen (Abb. 27a). Sowohl miR-542-5p als auch -3p waren in Tumoren von Patienten, die später einen Rückfall erlitten, herunterreguliert. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen niedriger miR-542-5p und -3p Expression und hohem Stadium sowie *MYCN* Amplifikation gezeigt werden. Neuroblastome mit hoher *NTRK1* Expression wiesen erhöhte Level beider miR-542 Isoformen auf. Mittels Kaplan-Meier Analyse konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Tumoren mit hoher miR-542-5p bzw. -3p Expression eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit eines Ereignis-freien Überlebens aufwiesen, als diejenigen mit niedriger Expression der miRNAs (Abb. 27b).

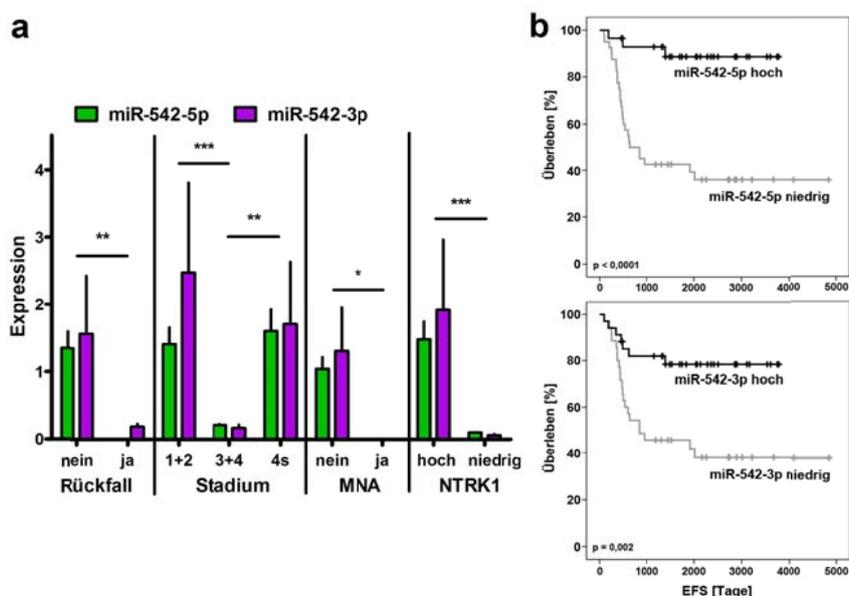


Abb. 27 Korrelation von miR-542-5p und -3p Expression mit prognostischen Markern und Überleben in humanen Neuroblastomen Expression von miR-542-5p und -3p in Primärtumoren von 69 Neuroblastompatienten anhand vorhandener qPCR Daten⁶⁷ (Tab. 9). **(a)** Vergleich der Expression der Tumore von Patienten mit oder ohne Rückfall, verschiedener Stadien, mit oder ohne *MYCN* Amplifikation (MNA) und mit hoher oder niedriger *NTRK1* Expression. Mann-Whitney U-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. **(b)** Kaplan-Meier-Analyse des Ereignis-freien Überlebens (EFS) von Patienten mit Tumoren mit hoher oder niedriger miR-542-5p bzw. -3p Expression. Log-Rank Test.

Zur Bestimmung der absoluten miR-542-5p und -3p Expression wurden miRNA Expressionsprofile, die mittels *Next-Generation-Sequenzierung* in einem weiteren vorhandenen Datensatz erstellt wurden¹¹⁰, re-analysiert. Dieser Datensatz bestand aus Profilen von je fünf Neuroblastomen mit günstigem und ungünstigem Verlauf. Genauere Informationen über den Krankheitsverlauf, sowie Stadium und *MYCN* Amplifikation waren bekannt (Tab. 10).

Tab. 10: Zusammensetzung der Patienten der Next-Generation-Sequenzierungs-Kohorte Modifiziert nach Schulte *et al.*¹¹⁰.

		günstiger Verlauf	ungünstiger Verlauf
Anzahl Patienten		5	5
Stadium		1	4
Alter bei Diagnose [Tage]	Median	456	1045
	Bereich	103-961	496-4827
<i>MYCN</i> Amplifikation		nein	ja
Tod aufgrund von Erkrankung		nein	ja
Ereignis-freies Überleben [Tage]	Median	3109	261
	Bereich	2856-3745	184-946
Gesamtüberleben [Tage]	Median	3109	539
	Bereich	2856-3745	207-1375

Sowohl miR-542-5p als auch miR-542-3p waren in Neuroblastomen mit ungünstigem Verlauf im Vergleich zu Tumoren mit günstigem Verlauf herunterreguliert. Ihre absolute Expression fiel niedriger aus als die Expression der miRNAs des onkogenen miR-17-92-Clusters, sogar in Neuroblastomen mit günstigem Verlauf (Abb. 28a). Ein Vergleich der absoluten Expressionslevel der beiden miR-542-Isoformen untereinander führte zu dem Ergebnis, dass diese etwa gleich hoch exprimiert wurden (Abb. 28b).

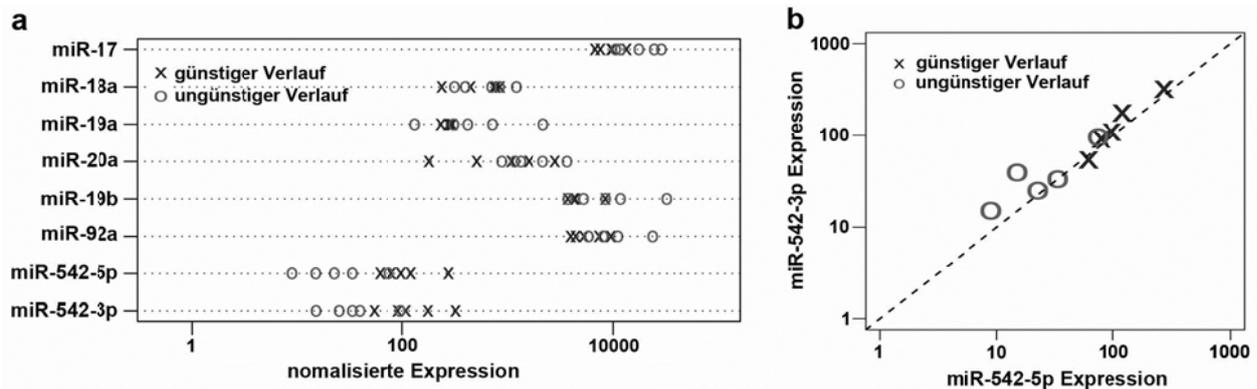


Abb. 28: Korrelation von miR-542-5p und -3p Expression mit günstigem Verlauf humaner Neuroblastome Re-Analyse von *Next-Generation-Sequenzierungs-Daten* von je fünf Neuroblastomen mit günstigem und ungünstigem Verlauf¹⁰ (Tab. 10). **(a)** Darstellung der absoluten Expression des miR-17-92-Clusters und beider miR-542-Isoformen. **(b)** Expressionslevel von miR-542-5p und -3p äquivalent.

Da in *in silico* Analysen Survivin als potentiell Ziel für miR-542-3p vorhergesagt wurde⁶⁹, sollte eine Korrelation zwischen miR-542-3p und Survivin in den vorhandenen qPCR Daten der 69 Neuroblastompatienten⁶⁷ untersucht werden. Die Korrelation von niedriger Survivin Expression und hoher miR-542-3p Expression konnte anhand eines Scatterplots gezeigt werden (Abb. 29a). Außerdem war die *Survivin* Expression von Tumoren mit hoher miR-542-3p Expression signifikant niedriger als von Tumoren mit niedriger Expression der miRNA (Abb. 29b). Weiterhin bestand eine signifikante Korrelation zwischen hoher Survivin Expression und schlechterem Überleben der Patienten, analysiert anhand einer Kaplan-Meier-Analyse (Abb. 29c).

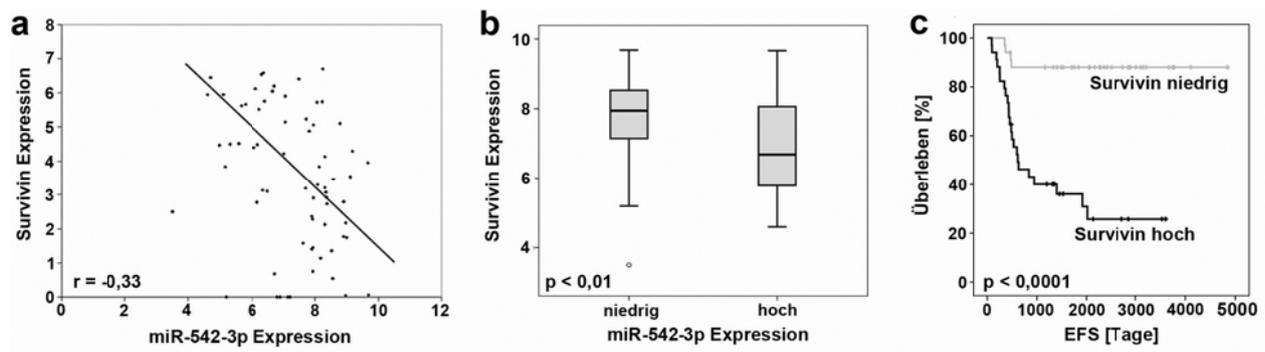


Abb. 29: Korrelation von miR-542-3p und Survivin in humanen Neuroblastomen Analyse der Expression von miR-542-3p und *Survivin* mRNA in humanen Neuroblastomen anhand vorhandener qPCR Daten⁶⁷ (Tab. 9). **(a/b)** Korrelation von hoher miR-542-3p Expression mit niedriger *Survivin* Expression anhand von Scatter- und Boxplot. Student's t-Test. **(c)** Kaplan-Meier-Analyse des Ereignis-freies Überlebens von Neuroblastompatienten mit hoher und niedriger *Survivin* Expression. Log-Rank Test.

4.2.2 Funktion von miR-542-3p Expression in Zelllinien

Die im Vergleich zum Kontrollgewebe niedrige Expression von miR-542-5p und -3p im LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre* Modell und in humanen Primärtumoren ließ vermuten, dass diese miRNA eine tumorsuppressive Funktion im Neuroblastom haben könnte. Zur weiteren Überprüfung dieser Hypothese wurden verschiedene *in vitro* Versuche in etablierten humanen Neuroblastomzelllinien durchgeführt.

Eine für keine miRNA kodierende Negativkontroll-miRNA oder eine der beiden Isoformen der miR-542 wurden in den humanen Neuroblastomzelllinien IMR-32, SHEP, SK-N-BE und WACII exprimiert. Die relative Zellviabilität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels des MTT Assay gemessen, auf den 24 Std. Wert der Negativkontroll-miRNA normalisiert und gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 30). Alle analysierten Zelllinien, die mit der Negativkontroll-miRNA transfiziert wurden, wiesen Steigerungen der Zellviabilität über die Zeit auf. Die Expression von miR-542-5p führte zu Zelllinien-spezifischen Reaktionen. Während IMR-32, SK-N-BE und WACII keine Reduktion der Zellviabilität zeigten, führte die Expression in SHEP zu einer signifikanten Verringerung der Zellviabilität über die Zeit. Die Expression der miR-542-3p hingegen verringerte die Viabilität aller untersuchten Zelllinien im Vergleich zur Negativkontroll-miRNA signifikant.

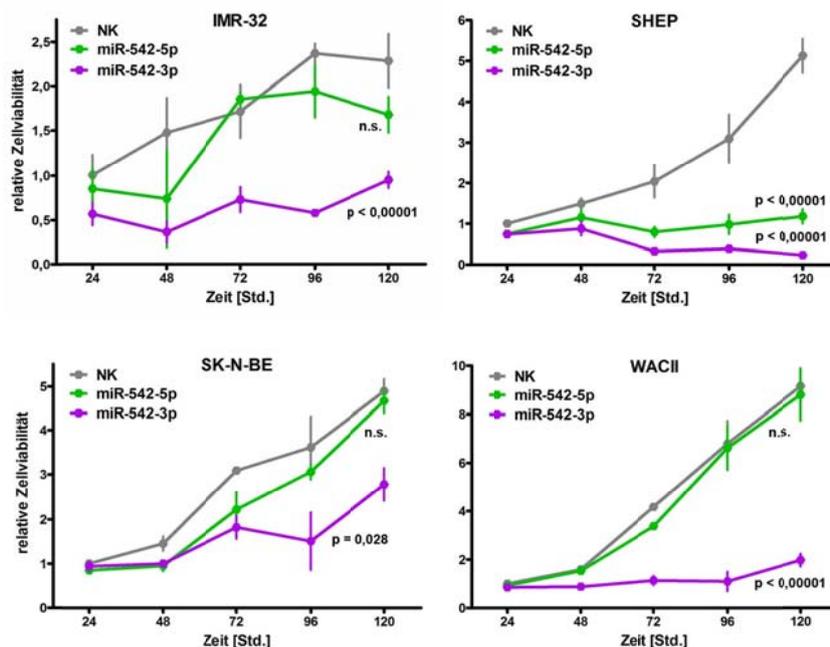


Abb. 30: Reduktion der Viabilität von humanen Neuroblastomzelllinien mittels miR-542-3p Expression Transiente Transfektion der humanen Neuroblastomzelllinien IMR-32, SHEP, SK-N-BE und WACII mit Negativkontroll-miRNA (NK), miR-542-5p oder miR-542-3p und Messung der Zellviabilität anhand des MTT Assay. Angegebene p-Werte für die Signifikanz von miR-542-5p oder -3p gegen NK berechnet anhand eines Permutationstests.

Zur genaueren Untersuchung der Mechanismen, die der Reduktion der Zellviabilität durch miR-542-3p Expression zugrunde liegen, wurden weitere Analysen 96 Std. nach Transfektion durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die Viabilität aller analysierten Zellen am stärksten verringert werden konnte. Anhand von makroskopischen Aufnahmen miR-542-3p exprimierender Zellen konnte im Vergleich zur Negativkontroll-miRNA exprimierenden Zellen eine deutlich verringerte Konfluenz festgestellt werden. Auch bei Expression von miR-542-5p zeigten Neuroblastomzellen eine geringere Konfluenz als nach Transfektion mit Negativkontroll-miRNA, jedoch war der Effekt hier nicht so deutlich wie mit miR-542-3p (Abb. 31).

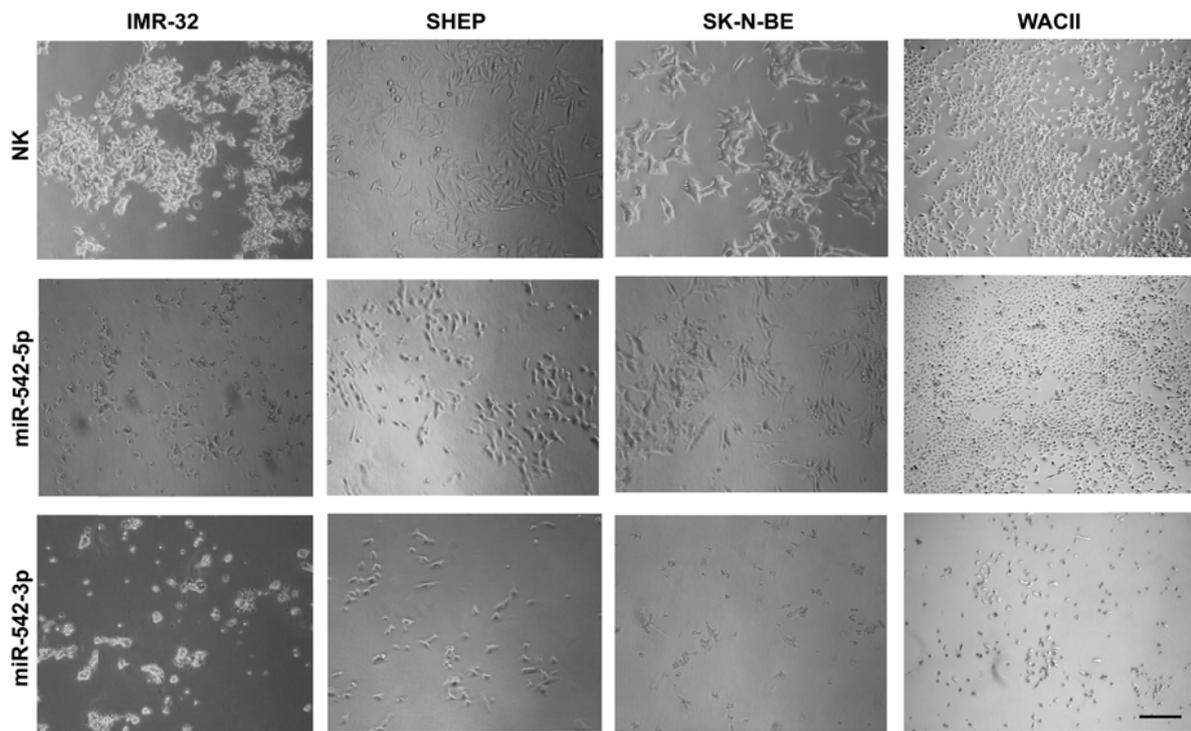


Abb. 31: Reduzierte Konfluenz von Neuroblastomzellen nach miR-542-3p Expression
 Mikroskopische Aufnahmen von Neuroblastomzellen 96 Std. nach Transfektion mit Negativkontroll-miRNA (NK), miR-542-5p oder miR-542-3p. Maßstabsbalken = 200 μ m.

Weiterhin wurde mittels Durchflusszytometrie der Zellzyklus 96 Std. nach Transfektion untersucht. Während die Expression von miR-542-3p im Vergleich zur Expression der Negativkontroll-miRNA zu einer signifikant gesteigerten Fraktion von Zellen in der subG1-Phase, demnach mutmaßlich apoptotischen Zellen, führte, blieb dieser Effekt bei Expression von miR-542-5p aus (Daten nicht gezeigt). Die prozentualen Anteile der Zellen in den Zellzyklus-Phasen Postmitose (G1), Synthese (S) und Prämitose/Mitose (G2/M) wurden als Balken dargestellt (Abb. 32). Die Expression von miR-542-5p führte in keiner der analysierten Zelllinien zu einer signifikanten Veränderung der einzelnen Zellzyklus-Fractionen. Dahingegen wurde in allen mit miR-542-3p transfizierten Zelllinien eine signifikante Steigerung der Fraktion von Zellen in der S-Phase detektiert, die in IMR-32, SHEP und WACII Zellen mit einer signifikanten Reduktion der G1-Phase einherging. Eine tendenziell verringerte G1-Phase konnte auch in SK-N-BE Zellen vermutet werden.

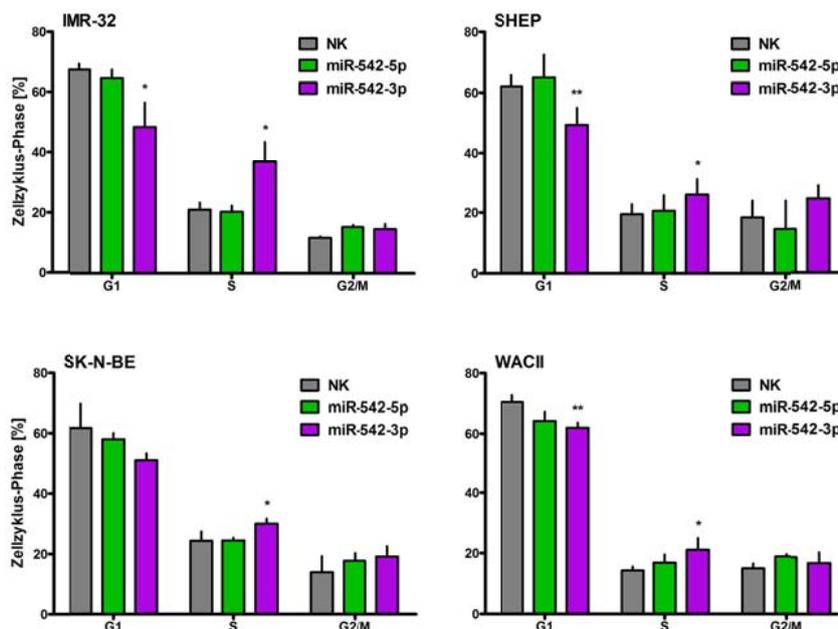


Abb. 32: Verschiebung des Zellzyklus durch gesteigerte S-Phase in Neuroblastomzellen nach miR-542-3p Expression Analyse des Zellzyklus 96 Std. nach Transfektion von Negativkontroll-miRNA (NK), miR-542-5p oder -3p. Anteil der Zellen in den Zellzyklus-Phasen G1 (Postmitose), S (Synthese) und G2/M (Prämitose und Mitose) als Prozent-Balken. Student's t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Die relative Anzahl apoptotischer Zellen wurde 96 Std. nach Expression beider miR-542 Isoformen im Vergleich zur Negativkontroll-miRNA anhand des ELISA *Cell death* Assays untersucht. Die Behandlung mit miR-542-3p induzierte signifikant den Anteil apoptotischer Zellen, während mit miR-542-5p kein Effekt detektiert wurde (Abb. 33a). Die Zellproliferation, die anhand der ELISA-basierten BrdU Inkorporation gemessen wurde, nahm 96 Std. nach miR-542-3p Expression in allen analysierten Zelllinien signifikant ab, während ein derartiger Effekt bei Expression von miR-542-5p nur in SK-N-BE Zellen erreicht wurde (Abb. 33b).

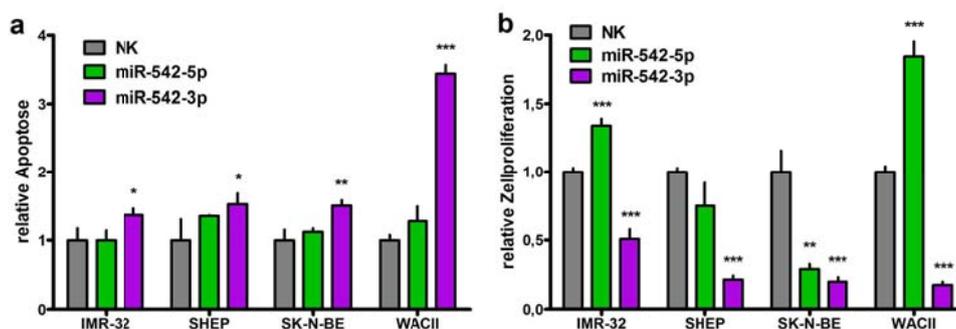


Abb. 33: Induktion von Apoptose und Reduktion von Proliferation in Neuroblastomzellen nach miR-542-3p Expression Analyse 96 Std. nach Transfektion von Negativkontroll-miRNA (NK), miR-542-5p oder -3p. (a) Balkendiagramm der Zahl apoptotischer Zellen relativ zu NK, gemessen mittels *Cell death* ELISA. (b) Balkendiagramm der Zahl proliferierender Zellen relativ zu NK, gemessen anhand von ELISA-basierter BrdU Inkorporation. Student's t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.2.3 Regulation der Expression von Survivin durch miR-542-3p

Die 3'UTR von Survivin weist eine Bindestelle für miR-542-3p auf, die schon in der Adenokarzinomzelllinie A549 und der Brustkrebszelllinie MCF7 validiert wurde⁶⁹. In diesem Teil der Arbeit sollte die Regulation von Survivin durch miR-542-3p in humanen Neuroblastomzellen validiert werden. Dazu wurden Negativkontroll-miRNA, miR-542-5p oder miR-542-3p transient in IMR-32, SHEP, SK-N-BE und WACII Zellen exprimiert und die Expression von Survivin 96 Std. nach Transfektion untersucht.

Die Survivin mRNA Expression von miR-542-5p bzw. -3p exprimierenden Zellen wurde relativ zu Negativkontroll-miRNA exprimierenden aufgetragen. Die Expression von miR-542-3p führte zu einer signifikanten Reduktion von *Survivin* mRNA in IMR-32, SHEP und WACII Zellen und in SK-N-BE Zellen konnte eine Tendenz zur Herunterregulation von *Survivin* mRNA gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Expression von miR-542-5p keinen Effekt auf die *Survivin* Expression (Abb. 34a). In Western Blot Analysen wurden zum einen das Protein Survivin und zum anderen der Komplexpartner AURKB detektiert. Anhand der Ladungskontrolle Aktin konnte eine ungleichmäßige Beladung der Gele ausgeschlossen werden. Sowohl die Proteinexpression von Survivin als auch die von AURKB wurden nach Expression von miR-542-3p im Vergleich zur Negativkontroll-miRNA deutlich herunterreguliert, während dieser Effekt mit miR-542-5p nicht erreicht wurde (Abb. 34b). In Immunfluoreszenzfärbungen wurde DAPI eingesetzt, um die Zellkerne nach Behandlung mit der Negativkontrolle oder miR-542-3p anzufärben. Die Konfluenz der Zellen nach Transfektion mit miR-542-3p war geringer als nach Behandlung mit der Negativkontroll-miRNA, ein Effekt, der schon in vorherigen Versuchen (Abb. 31) gezeigt werden konnte. Sowohl Survivin als auch AURKB wurde in allen mit Negativkontroll-miRNA behandelten Zellen detektiert. Nach Expression von miR-542-3p dagegen war die Expression beider Proteine deutlich verringert (Abb. 34c).

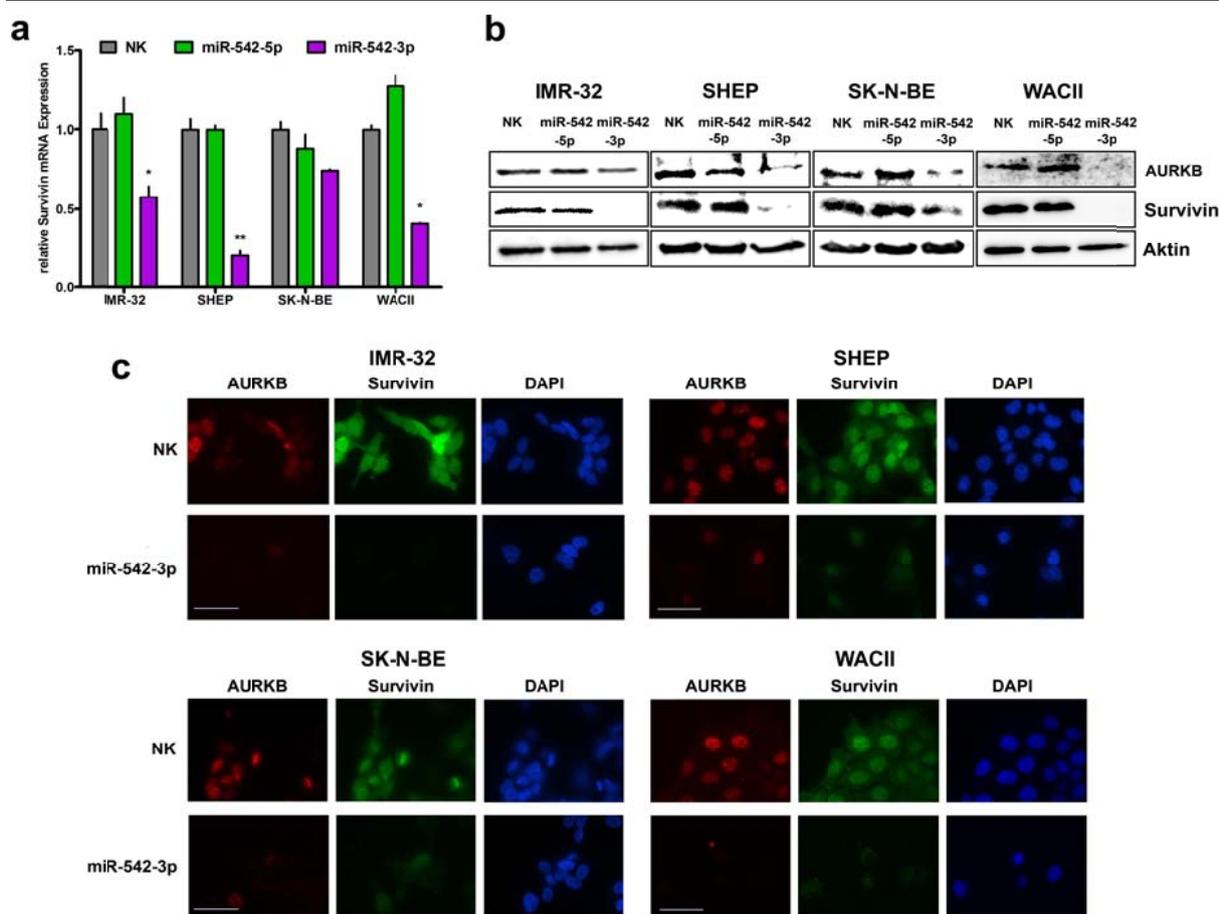


Abb. 34: Herunterregulation von Survivin in Neuroblastomzellen nach miR-542-3p Expression (a) *Survivin* mRNA nach miR-542-5p und -3p Expression relativ zu Negativkontroll-miRNA (NK), detektiert mittels qPCR und normalisiert gegen *GAPDH* Expression. Student's t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. (b) Western Blot Analyse der Proteine Survivin und AURKB nach Expression von NK, miR-542-5p oder -3p. Aktin als Ladungskontrolle. (c) Immunfluoreszenz-Färbung von Survivin (Alexa-Fluor-488 - grün) und AURKB (Alexa-Fluor-568 - rot) nach NK oder miR-542-3p Expression. Zellkerne im selben Feld mittels DAPI (blau) angefärbt. Maßstabsbalken = 50 μm .

4.2.4 Direkte Bindung von miR-542-3p an *Survivin* 3'UTR

Anhand von Luziferase Reporter Analysen sollte untersucht werden, ob die Herunterregulation von Survivin nach der Expression von miR-542-3p auf eine direkte Bindung von miR-542-3p an die 3'UTR von *Survivin* zurückgeführt werden konnte. Beide Psi-Check2-Vektoren enthielten die 3'UTR von Survivin, jedoch war diese auf einem der beiden Vektoren so mutiert, dass die vorhergesagte Bindestelle der miR-542-3p zerstört vorlag. HEK-293 und SHEP Zellen wurden mit jeweils einem der beiden Vektoren und entweder mit der Negativkontroll-miRNA oder miR-542-3p kotransfiziert. Nach 48 Std. wurde sowohl die Aktivität der Seefeder- als auch die der Glühwürmchen-Luziferase gemessen. Die Aktivität der Glühwürmchen-Luziferase wurde auf die der Seefeder-Luziferase, die als Transfektionskontrolle exprimiert wurde, normalisiert. Die normierte Glühwürm-

chen-Luziferase-Aktivität, die bei Expression von miR-542-3p berechnet wurde, wurde relativ zur Aktivität nach Negativkontroll-miRNA Transfektion aufgetragen (relative Reporter-Gen-Aktivität). Sowohl in HEK-293 als auch in SHEP Zellen wurde die relative Reporter-Gen-Aktivität bei Kotransfektion mit dem Wildtyp 3'UTR von Survivin signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu, konnte dieser Effekt bei der Kotransfektion mit der mutierten Bindestelle nicht gezeigt werden (Abb. 35). Die direkte Bindung von miR-542-3p an die 3'UTR von *Survivin* konnte damit validiert werden.

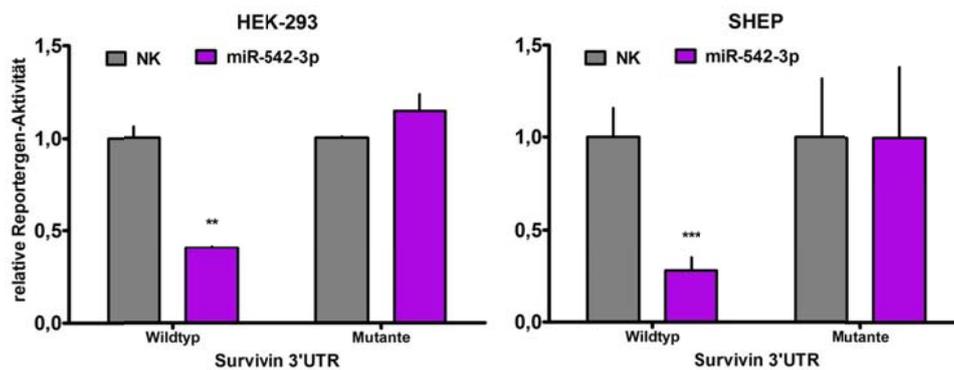
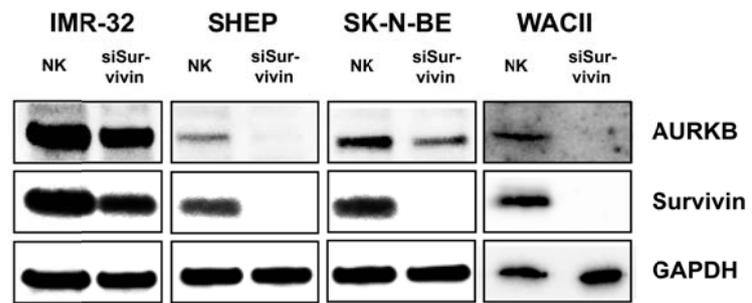


Abb. 35: Direkte Bindung von miR-542-3p an Survivin 3'UTR Kotransfektion von HEK-293 und SHEP Zellen entweder mit Negativkontroll-miRNA (NK) oder miR-542-3p und einem Wildtyp- oder mutierten *Survivin* 3'UTR tragenden Luziferase Reporter. Messung der Glühwürmchen-Luziferase-Aktivität nach 48 Std. und Normalisierung gegen Seefeder-Luziferase-Aktivität. Student's t-Test: ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.2.5 Funktion von Survivin Herunterregulation in Zelllinien

Eine direkte Bindung von miR-542-3p an das 3'UTR von *Survivin* und die damit verbundene Herunterregulation von Survivin mRNA und Protein konnte gezeigt werden. Nun sollte untersucht werden, ob eine Herunterregulation von Survivin in den humanen Neuroblastomzelllinien IMR-32, SHEP, SK-N-BE und WACII phänotypische Veränderungen mit sich bringen würde, die denen der miR-542-3p Expression entsprächen. Die Zellen wurden entweder mit einer Negativkontroll-siRNA oder einer spezifischen siRNA gegen Survivin (siSurvivin) transient transfiziert. Zur Überprüfung der Effektivität von siSurvivin wurde die Expression des Proteins 48 Std. nach der Transfektion mittels Western Blot analysiert, wobei GAPDH als Ladungskontrolle diente. Sowohl die Proteinexpression von Survivin, als auch die des Komplexpartners AURKB konnte mittels der siRNA herunterreguliert werden (Abb. 36).

Abb. 36: Spezifische Reduktion von Survivin Protein mittels siRNA Western Blot Analyse der Expression von Survivin und AURKB 48 Std. nach transienter Transfektion von Neuroblastomzelllinien mit Negativkontroll-siRNA (NK) oder spezifischer siRNA gegen Survivin (siSurvivin). GAPDH als Ladungskontrolle.



Die Viabilität der Zellen nach Transfektion mit Negativkontroll-siRNA bzw. siSurvivin wurde mittels MTT Assay untersucht und gegen die Zeit aufgetragen. Während mit Negativkontroll-siRNA transfizierte Zellen einen Anstieg ihrer Viabilität über die Zeit aufwiesen, zeigten die mit siSurvivin behandelten Zellen eine Reduktion. Der Vergleich beider Datensätze beschrieb den Verlauf der Graphen innerhalb der analysierten Zelllinien als signifikant verschieden (Abb. 37).

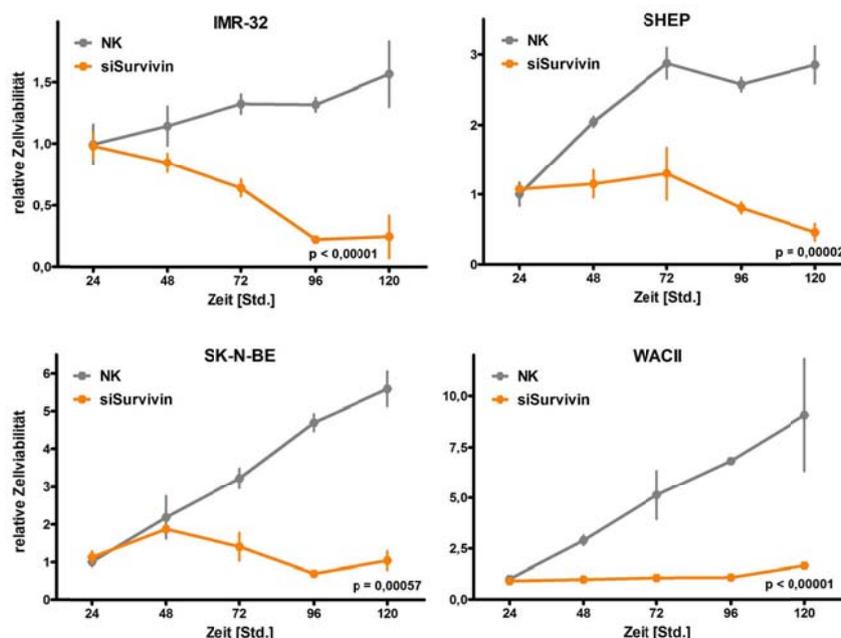


Abb. 37: Reduktion der Viabilität humaner Neuroblastomzelllinien durch Herunterregulation von Survivin MTT Assay nach transienter Transfektion mit Negativkontroll-siRNA (NK) oder siRNA gegen Survivin (siSurvivin). Angegebene p-Werte für die Signifikanz von siSurvivin gegen NK berechnet anhand eines Permutationstests Permutationstest.

Die Transfektion von siSurvivin führte im Vergleich zur Transfektion von Negativkontroll-siRNA zu einem signifikanten Anstieg der subG1 Phase, die auf eine Induktion von Apoptose hinwies (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte bei Vergleich der Zellzyklusphasen G1, S und G2/M (Abb. 38) sowohl in IMR-32 und SHEP als auch in SK-N-BE

Zellen eine signifikante Steigerung der S-Phase mit einhergehender Reduktion der G1-Phase detektiert werden. WACII Zellen zeigten eine Tendenz zur erhöhten S-Phase. SHEP und WACII Zellen reagierten außerdem mit einem signifikanten Anstieg der G2/M-Phase.

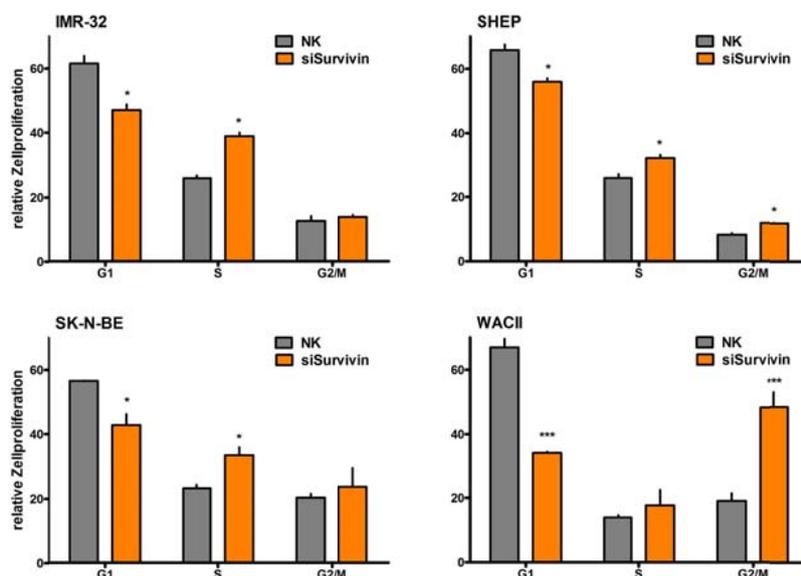


Abb. 38: Verschiebung des Zellzyklus durch gesteigerte S- bzw. G2/M-Phase in Neuroblastomzellen nach Herunterregulation von Survivin Fraktionen von Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Analyse mittels Durchflusszytometrie 96 Std. nach transienter Transfektion von Negativkontroll-siRNA (NK) oder siRNA gegen Survivin (siSurvivin). Student's t-Test: * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

Der Effekt auf die Zellproliferation nach siSurvivin im Vergleich zu Negativkontroll-siRNA wurde anhand der ELISA-basierten BrdU-Inkorporation ermittelt. Alle vier analysierten Zelllinien reagierten auf die Herunterregulation von Survivin mit signifikanter Reduktion der Zellproliferation (Abb. 39).

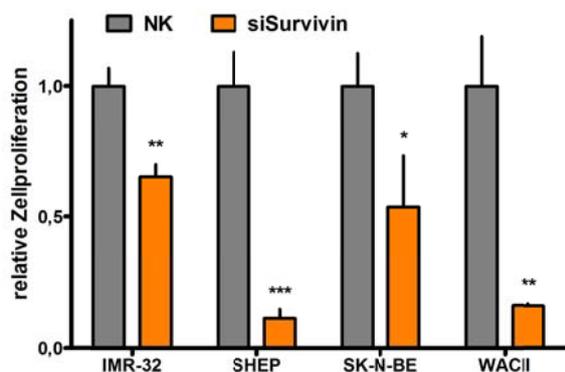
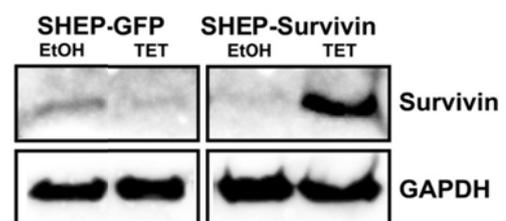


Abb. 39: Reduktion der Proliferation humaner Neuroblastomzelllinien durch Herunterregulation von Survivin BrdU-Inkorporation von Zellen 96 Std. nach Transfektion mit Negativkontroll-siRNA (NK) oder siRNA gegen Survivin (siSurvivin). Student's t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.2.6 Partielle Wiederherstellung des Phänotyps der miR-542-3p Expression mittels Hochregulation von Survivin ohne miRNA-Bindestelle

Die Herunterregulation von Survivin mittels siRNA führte in den analysierten humanen Neuroblastomzelllinien zu erhöhter Apoptose und verringerter Zellviabilität und Proliferation. Dieser Phänotyp ähnelte dem der Expression von miR-542-3p, der mit der Herunterregulation von Survivin einherging. Es sollte nun untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Phänotyp der miR-542-3p Expression und der Survivin Herunterregulation bestand. Dazu wurde Survivin cDNA, die keine Bindestelle für miR-542-3p enthielt, stabil mittels eines Vektorsystems in SHEP Zellen eingebracht und Einzelzellklone selektiert (SHEP-*Survivin*). Ein Negativkontroll-Klon, der das gleiche Konstrukt, jedoch mit einer cDNA für *GFP* statt *Survivin* trug, wurde ebenfalls generiert (SHEP-*GFP*). Die Expression beider cDNAs konnte durch Behandlung mit Tetrazyklin induziert werden. Mittels Western Blot wurde die Induktion der Survivin Expression 24 Std. nach Tetrazyklin-Behandlung in SHEP-*Survivin* im Vergleich zum nicht-induzierten und zum SHEP-*GFP*-Klon ermittelt, wobei GAPDH als Ladungskontrolle diente (Abb. 40). Aufgrund der hohen Induktion von Survivin konnte nur mit einem Fünftel der Gesamtproteinmenge gearbeitet werden, die in vorherigen Versuchen verwendet wurde. In nicht-induzierten SHEP-Zellen war deshalb im Vergleich zu vorherigen Western Blots (Abb. 34 und Abb. 36) nur eine geringe Survivin Expression detektierbar.

Abb. 40: Survivin Überexpression in SHEP-*Survivin* nach Induktion mit Tetrazyklin Western Blot Analyse der Survivin Expression 24 Std. nach Tetrazyklin- (TET) bzw. Lösungsmittel- (EtOH) Behandlung von stabil-transfizierten SHEP-Zellen mit einem Tetrazyklin-induzierbaren Vektorkonstrukt mit *GFP* (SHEP-*GFP*) oder *Survivin* cDNA ohne 3'UTR (SHEP-*Survivin*).



Die generierten Zellklone SHEP-*GFP* und SHEP-*Survivin* wurden über 96 Std. entweder mit Tetrazyklin oder dem Lösungsmittel Ethanol behandelt und gleichzeitig mit Negativkontroll-miRNA oder mit miR-542-3p transient transfiziert. Mittels des MTT Assays wurde die Zellviabilität aller Ansätze bestimmt. Die Expression von miR-542-3p ging mit einer signifikant reduzierten Zellviabilität des SHEP-*GFP*-Klons, unabhängig ob mit Tetrazyklin behandelt oder nicht, und des unbehandelten SHEP-*Survivin*-Klons einher. Die gleichzeitige Expression der *Survivin* cDNA ohne Bindestelle für die miRNA und miR-

542-3p führte zwar im Vergleich zur Negativkontroll-miRNA zu einer tendenziell verringerten Zellviabilität, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant (Abb. 41).

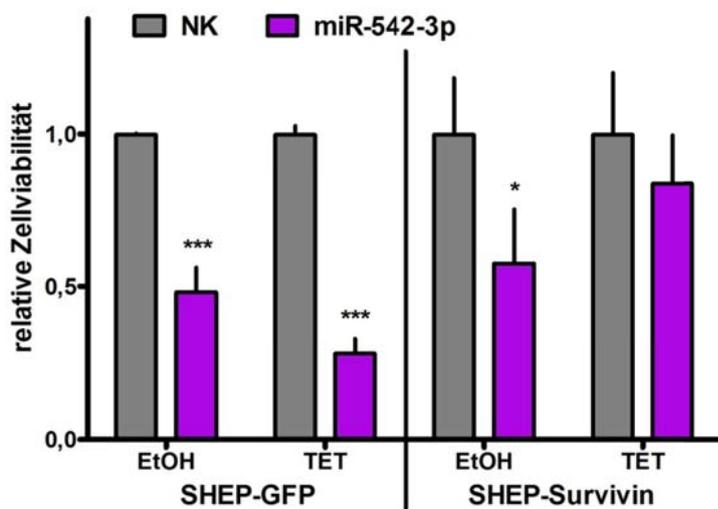


Abb. 41: Partielle Wiederherstellung des miR-542-3p Phänotyps mittels Überexpression von Survivin ohne miR-542-3p Bindestelle

MTT Assay 96 Std. nach Expression von Negativkontroll-miRNA (NK) oder miR-542-3p und gleichzeitiger Tetrazyklin- (TET) bzw. Lösungsmittel- (EtOH) Behandlung von SHEP-Zellen mit einem induzierbaren Vektor-konstrukt mit *GFP* (SHEP-*GFP*) oder *Survivin* cDNA ohne miR-542-3p Bindestelle (SHEP-*Survivin*). Student's t-Test: * = p < 0,05; *** = p < 0,001.

4.2.7 MiR-542-3p beladene Nanopartikel zur miRNA-Behandlung von Neuroblastomzellen *in vitro* und *in vivo*

Zusätzlich zum Nachweis der tumorsuppressiven Funktion von miR-542-3p in Neuroblastomzelllinien *in vitro*, sollte diese auch in Neuroblastomzellen untersucht werden, die als Xenografts in Mäusen *in vivo* wuchsen. Da die Injektion von miRNA in die Maus zu einem sofortigen Abbau derselben führen würde, wurden Calcium-Phosphat-Nanopartikel als Transporter verwendet^{84,85}. Die verschiedenen beladenen Nanopartikel waren sphärisch und hatten einen mittleren Durchmesser von weniger als 200 nm. Ihr Zeta-Potential betrug +37 mV. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnten keine strukturellen Unterschiede zwischen Negativkontroll-miRNA- und miR-542-3p-geladenen Nanopartikeln festgestellt werden (Abb. 42).

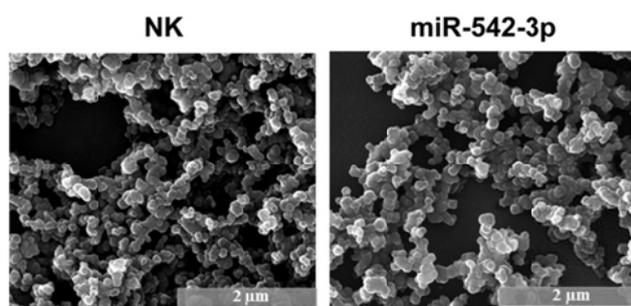


Abb. 42: Struktur von miRNA-beladenen Nanopartikeln

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Negativkontroll-miRNA- (NK) und miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln. Graphik erstellt von Diana Kozlova.

Zur Untersuchung der Funktionalität der Nanopartikel *in vitro* wurden WACII Zellen ausgewählt, da diese in den vorherigen transienten Transfektionen am stärksten auf die Expression der miR-542-3p reagiert hatten. Die Zellen wurden mit Negativkontroll-miRNA- oder miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln behandelt und der Effekt auf die Zellen in verschiedenen Assays untersucht. Die relative Zellviabilität, gemessen mittels MTT Assay, wurde an verschiedenen Zeitpunkten detektiert, auf den 24 Std. Wert unbehandelter Zellen normalisiert und gegen die Zeit aufgetragen. Die Behandlung mit Negativkontroll-miRNA beladenen Nanopartikeln führte im Vergleich zu unbehandelten Zellen tendenziell zu einer Reduktion der Zellviabilität über die Zeit, die jedoch nicht signifikant war. Währenddessen verringerte die Behandlung mit miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln die Viabilität der Zellen signifikant, sowohl im Vergleich zu unbehandelten als auch zu mit Negativkontroll-miRNA beladenen Nanopartikeln behandelten Zellen (Abb. 43a). Der Anteil apoptotischer Zellen wurde 96 Std. nach Behandlung mit den verschieden beladenen Nanopartikeln anhand des ELISA *Cell death* Assay untersucht. Wie schon bei der Analyse der Zellviabilität wurde auch in diesem Assay ein tendenzieller Effekt der mit Negativkontroll-miRNA beladenen Nanopartikel beobachtet, der jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte. Dagegen reagierten die Zellen bei Behandlung mit miR-542-3p beladenen Nanopartikeln mit einer signifikanten Induktion von Apoptose, sowohl im Vergleich zu unbehandelten Zellen als auch zu mit Negativkontroll-miRNA behandelten Zellen (Abb. 43b). Die Abnahme der BrdU Inkorporation bei mit miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln war im Vergleich zu allen Kontrollen signifikant vermindert. Allerdings zeigten die mit Negativkontroll-miRNA beladenen Nanopartikel bereits eine signifikant verminderte BrdU Inkorporation im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 43c). Die Funktionalität der miR-542-3p Expression nach Behandlung mit miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln in WACII Zellen wurde anhand der Expression des Zielproteins Survivin analysiert. Eine Western Blot Analyse zeigte, dass die Behandlung mit miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln im Vergleich zu unbehandelten und mit Negativkontroll-miRNA behandelten Zellen zu einer deutlichen Herunterregulation der Survivin Proteinexpression führte (Abb. 43d). Die Spezifität der miR-542-3p Expression durch Behandlung mit miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln *in vitro* konnte somit bewiesen werden.

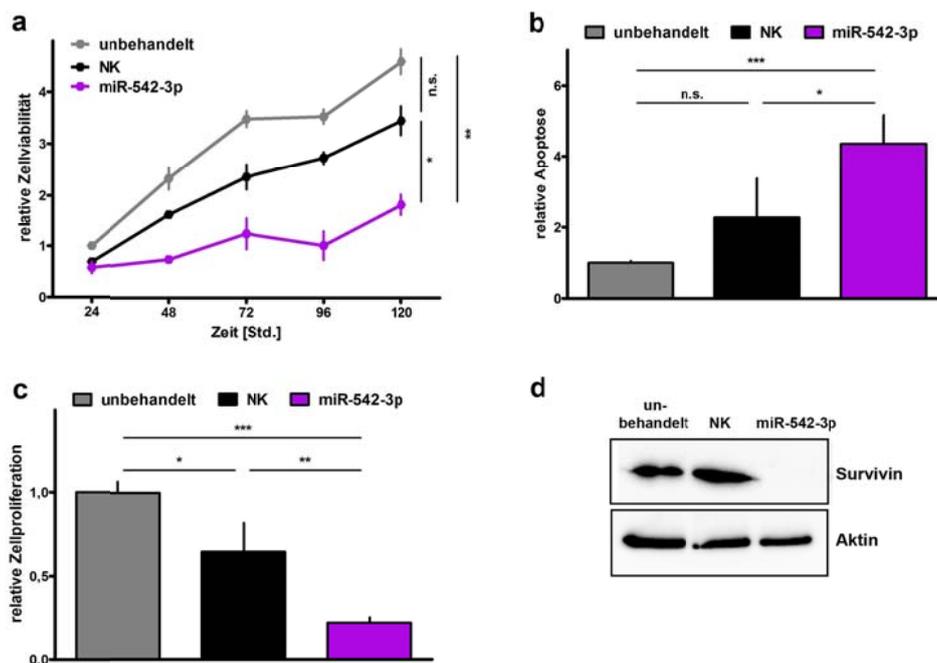


Abb. 43: Reduktion der Zellviabilität und der Proliferation, Induktion von Apoptose und Herunterregulation von Survivin mittels miR-542-3p-beladenen Nanopartikel in WACII Zellen *in vitro* Behandlung mit Negativkontroll-miRNA- (NK) oder miR-542-3p- beladenen Nanopartikeln. **(a)** Zellviabilität relativ zu 24 Std. Wert der unbehandelten Kontrolle, gemessen anhand des MTT Assay. Signifikanz berechnet anhand eines Permutationstest. **(b)** Balkendiagramm des zur unbehandelten Kontrolle relativen Anteils apoptotischer Zellen nach 96 Std., gemessen anhand des ELISA *Cell death*. Student's t-Test. **(c)** Balkendiagramm des zur unbehandelten Kontrolle relativen Anteil proliferierender Zellen nach 96 Std., gemessen anhand von ELISA-basierter BrdU Inkorporation. Student's t-Test. **(d)** Western Blot Analyse des Proteins Survivin nach 48 Std. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Zur Untersuchung des Effekts der synthetisierten Nanopartikel auf WACII Zellen, die als Xenografts in nu/nu Mäusen wuchsen, wurden Xenograft-tragende Mäuse sowohl mit Negativkontroll-miRNA- als auch mit miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln behandelt und die Leber sowie die Tumore analysiert. Die Expression von miR-542-3p wurde mittels qPCR gemessen und gegen die Expression von RNU6B normalisiert. In mit miR-542-3p-behandelter Leber konnte im Vergleich zu mit Negativkontroll-miRNA-behandelter eine 200-fach erhöhte Expression der miRNA detektiert werden (Student's t-Test: $p = 0,006$; Daten nicht gezeigt). Die miR-542-3p Expression der Tumore wurde relativ zu der Expression eines der mit Negativkontroll-miRNA behandelten aufgetragen. Im Mittel war die miR-542-3p Expression der mit dieser miRNA behandelten Tumore im Vergleich zu mit Negativkontroll-miRNA behandelten Tumoren 25,8-fach, signifikant erhöht (Abb. 44a). Die Funktionalität der in den Tumoren exprimierten miR-542-3p wurde anhand des Einflusses auf die Expression des Targets Survivin gemessen. In Western Blot Analysen konnte eine reduzierte Expression des Survivin Proteins in

mit miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln behandelten Tumoren gezeigt werden. Als Ladungskontrolle diente GAPDH (Abb. 44b).

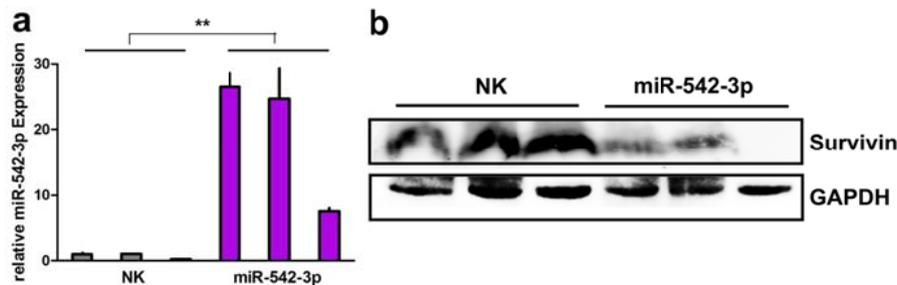


Abb. 44: Expression von miR-542-3p und Herunterregulation von Survivin mittels miRNA-beladenen Nanopartikeln in WACII-Xenografts *in vivo* (a) Expression von miR-542-3p in mit Negativkontroll-miRNA- (NK) oder miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln behandelten Neuroblastom-Xenografts anhand von qPCR-Daten. Student's t-Test: $p = 0,008$. (b) Western Blot Analyse von Survivin Protein in den gleichen Tumoren. GAPDH als Ladungskontrolle.

Die tumorsuppressive Wirkung der miR-542-3p Expression wurde anhand histologischer Schnitte der mit Negativkontroll-miRNA und der mit miR-542-3p-behandelten Tumoren analysiert. Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung offenbarte die Neuroblastom-spezifischen klein-, blau- und rundzelligen Tumore¹, die den Xenograft bildeten (Abb. 45a). Weiterhin wurde Mib-1, ein Marker für aktiv-proliferierende Zellen, auf den Schnitten angefärbt. Die mit miR-542-3p-beladenen Nanopartikel-behandelten Tumoren wiesen wesentlich weniger aktiv-proliferierende Zellen auf als die mit Negativkontroll-miRNA behandelten. Mittels der Färbung von gespaltener Caspase 3 wurde der Anteil der apoptotischen Zellen gefärbt. In miR-542-3p behandelten Tumoren wurde ein höherer Anteil apoptotischer Zellen detektiert, als in Tumoren, die mit Negativkontroll-miRNA behandelt wurden. Der Anteil der Mib-1 bzw. gespaltene Caspase 3 gefärbten Zellen wurde relativ zur Gesamtzellzahl von drei repräsentativen Ausschnitten jedes Tumors ausgezählt. Die Mittelwerte der mit miR-542-3p-behandelten Tumoren wurden relativ zu denen von Tumoren, die mit Negativkontroll-miRNA behandelt wurden, aufgetragen. Die Zellproliferation der miR-542-3p-behandelten Tumore war relativ zu den Negativkontroll-miRNA-behandelten signifikant um 85% reduziert (Abb. 45b). Der Anteil apoptotischer Zellen war in diesen Tumoren signifikant um den Faktor 2,9 erhöht (Abb. 45c).

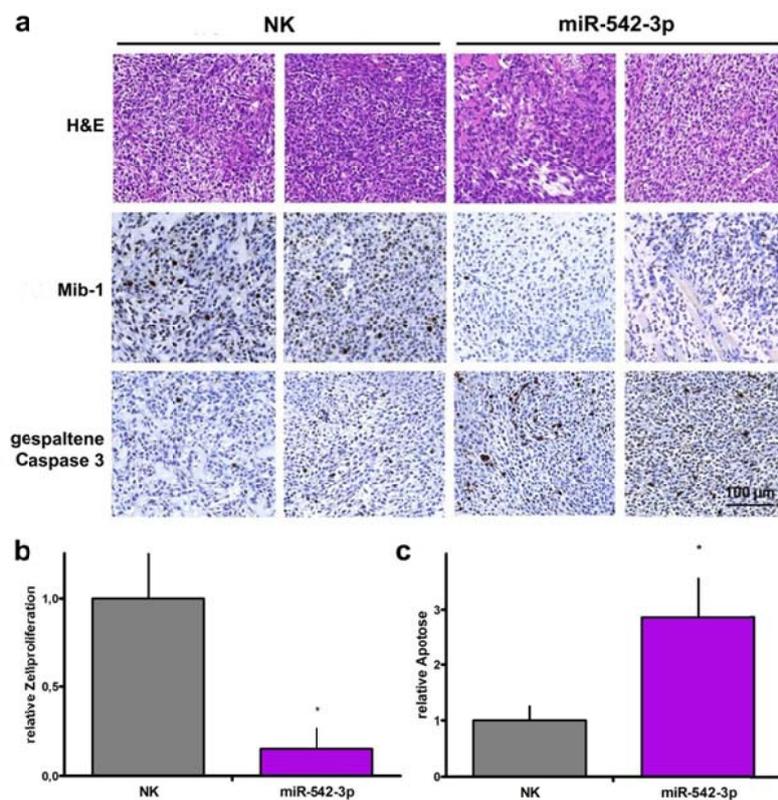


Abb. 45: Hemmung der Proliferation und Induktion von Apoptose in miR-542-3p-exprimierenden Neuroblastom-Xenografts (a) Je zwei repräsentative Bilder von Hämatoxilin und Eosin gefärbten und Mib-1 (aktiv-proliferierende Zellen) sowie gespaltene Caspase 3 (apoptotische Zellen) gefärbten Schnitten der mit Negativkontroll-miRNA- (NK) und miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln-behandelten Neuroblastom-Xenografts. **(b/c)** Mittlere Proliferation anhand von Mib-1 und Apoptose anhand von gespaltener Caspase 3 in miR-542-3p-behandelten Tumoren relativ zu mit Negativkontroll-miRNA (NK) behandelten. Kalkulation durch Auszählung von drei repräsentativen Ausschnitten relativ zur Gesamtzellzahl jedes Xenografts. Student's t-Test: * = $p < 0,05$.

4.3 Die tumorsuppressive Funktion von miR-137 in humanen Neuroblastomen und Zelllinien

4.3.1 KDM1A als potentielles Ziel einer Neuroblastomtherapie

KDM1A ist in undifferenzierten Neuroblastomen hochreguliert. In weiteren Untersuchungen konnte außerdem eine Hochregulation in aggressiven Medulloblastomen und Retinoblastomen gezeigt werden (Prof. Dr. Johannes Schulte, persönliche Mitteilung). Die Regulation dieses potentiell therapeutisch relevanten Targets wurde deshalb auch in Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodells untersucht.

Tumore zeigten im Vergleich zu nicht-malignen Nebennieren eine signifikant erhöhte Expression von *Kdm1a*. Zur Validierung dieses Resultats wurde die Expression auch in sieben *TH-MYCN* Tumoren untersucht, die ebenfalls eine signifikant erhöhte *Kdm1a* Expression aufwiesen (Abb. 46).

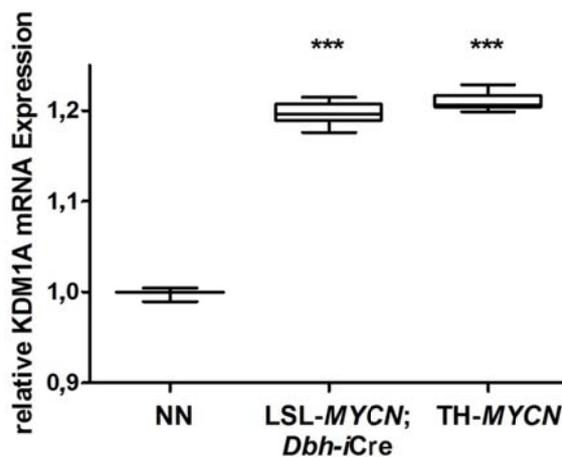


Abb. 46: Regulation von *Kdm1a* mRNA in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* und *TH-MYCN* Tumoren Boxplot der *Kdm1a* mRNA Expression in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* und *TH-MYCN* Tumoren relativ zur Expression nicht-maligner Nebennieren (NN). Student's t-Test: *** = $p < 0,001$.

Aufgrund der potentiell onkogenen Aktivität von KDM1A wurden in *in silico* Analysen nach miRNAs gesucht, für die 3'UTR von humanem *KDM1A* eine direkte Bindestelle aufweisen. Für miR-137 wurde ein passende Bindestelle (7mer-m8) an 3'UTR von *KDM1A* vorhergesagt (www.Targetscan.org). Innerhalb der 327 bp langen 3'UTR von *KDM1A* lag diese Bindestelle zwischen den Positionen 65 und 71 (Abb. 47).

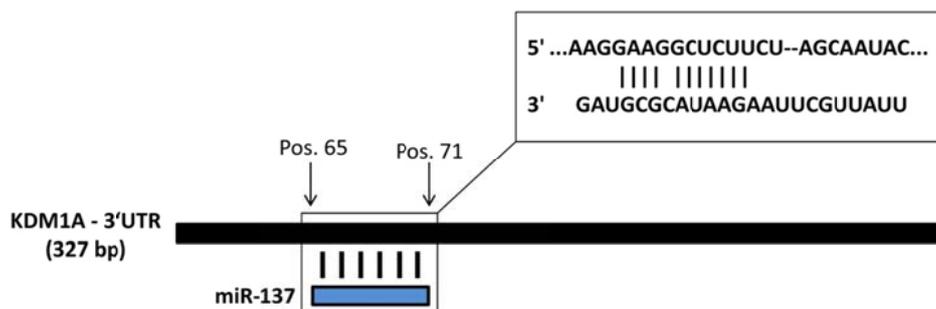
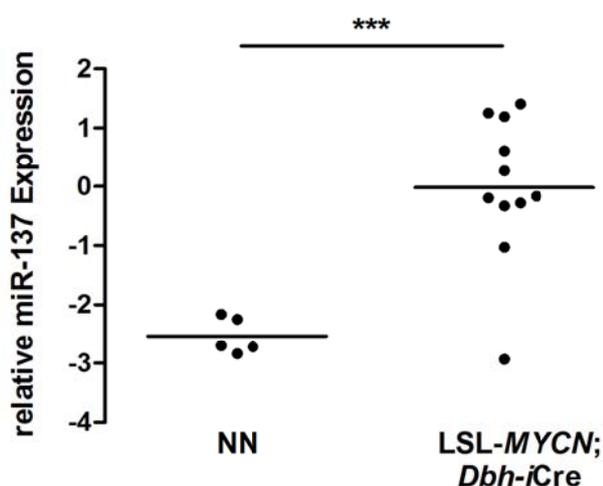


Abb. 47: 3'UTR von *KDM1A* mit Bindestelle von miR-137 Schematisches Diagramm der vorhergesagten Bindestelle von miR-137 innerhalb der 3'UTR von *KDM1A* (TargetsCan). Pos. = Position. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

In verschiedenen humanen Tumorentitäten wie dem Kolorektalkarzinom^{119,120}, Lungentumoren¹²¹, Melanomzellen¹²² und Brustkrebs¹²³ ist eine tumorsuppressive Funktion dieser miRNA bereits bekannt.

Die Expression von miR-137 wurde auch in Tumoren aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen analysiert, wobei sich herausstellte, dass sie in den Tumoren im Vergleich zu Nebennieren von Wildtyp-Mäusen hochreguliert war (Abb. 48). Im murinen Neuroblastom konnte die Hypothese einer tumorsuppressiven Funktion von miR-137 demnach nicht bestätigt werden. Dies könnte darin begründet liegen, dass dem im humanen Neuroblastom vorhergesagten Target *KDM1A* im murinen Organismus keine Bindestelle für miR-137 vorhergesagt wird (www.targetsCan.org).

Abb. 48: Regulation von miR-137 in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren Boxplot der Expression von miR-137 in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren im Vergleich zur Expression in nicht-malignen Nebennieren (NN). Student's t-Test: *** = $p < 0,001$.



Im folgenden Teil dieser Arbeit sollte sowohl die potentiell tumorsuppressive Funktion von miR-137 als auch das onkogene Target *KDM1A* im humanen Neuroblastom untersucht werden.

4.3.2 Expressionsanalyse von miR-137 in humanen Primärtumoren

Wie schon für miR-542 durchgeführt, wurde in den vorhandenen qPCR Daten von 69 Neuroblastompatienten⁶⁷ (Tab. 9) auch die Expression von miR-137 untersucht.

In Bezug auf verschiedene prognostische Marker des Neuroblastoms, gegen die die miR-137 Expression aufgetragen wurde, zeigte sich, dass eine hohe Expression dieser miRNA signifikant mit günstigem Stadium einherging. Außerdem stellte sich eine Tendenz für die Herunterregulation von miR-137 in *MYCN*-amplifizierten Tumoren heraus. Die Expression von *NTRK1* korrelierte signifikant mit der Expression von miR-137 (Abb. 49a). Mittels Kaplan-Meier-Analysen wurde gezeigt, dass eine hohe miR-137 Expression für die Patienten sowohl mit einer höheren Wahrscheinlichkeit des Ereignisfreien- als auch des Gesamtüberlebens einherging (Abb. 49b).

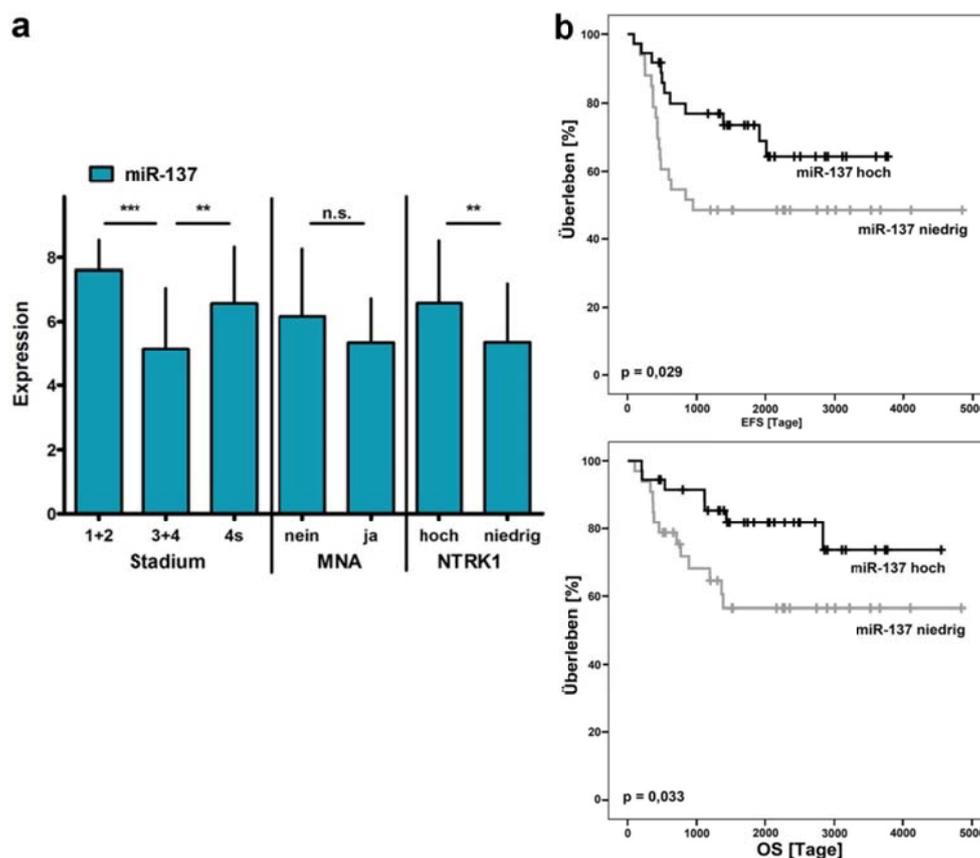


Abb. 49: Korrelation der Expression von miR-137 mit prognostischen Markern und Überleben in humanen Primärtumoren Expression von miR-137 in Primärtumoren von 69 Neuroblastompatienten anhand vorhandener qPCR Daten⁶⁷ (Tab. 9). **(a)** Vergleich der Expression von Patienten verschiedener Stadium, mit oder ohne *MYCN* Amplifikation (MNA) und mit hoher oder niedriger *NTRK1* Expression als Balkendiagramm. Student's t-Test.: ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant. **(b)** Kaplan-Meier-Analyse des Ereignis-freien- (EFS) und des Gesamtüberlebens (OS) von Patienten mit Tumoren mit hoher gegen niedriger miR-137 Expression. Wilcoxon-Test. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

Die Re-Analyse des vorhandenen *Next-Generation-Sequenzierungs-Datensatzes*¹¹⁰ (Tab. 10), in dem die absoluten Expressionen von miRNAs in fünf Neuroblastomen mit günstigem und ungünstigem Verlauf untersucht wurden, die schon für miR-542 durchgeführt wurde, sollte auch für miR-137 ausgeführt werden.

Die Expression von miR-137 korrelierte signifikant mit günstigem Verlauf ($p = 0,046$) und fiel signifikant niedriger aus als die der onkogenen miRNAs miR-17 ($p < 0,001$) und miR-92a ($p < 0,001$; Abb. 50).

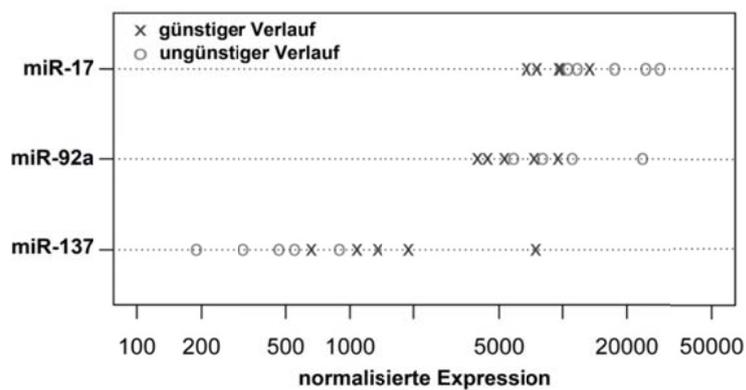


Abb. 50: Korrelation von miR-137 Expression mit günstigem Verlauf humaner Neuroblastome Re-Analyse vorhandener *Next-Generation-Sequenzierungs-Daten* von je fünf Neuroblastomen mit günstigem und ungünstigem Verlauf¹¹⁰ (Tab. 10). Darstellung der absoluten Expression von miR-137 und der onkogenen miRNAs miR-17 und miR-92a. Student's t-Test. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

4.3.3 Funktion von miR-137 in Zelllinien

Die hohe Expression von miR-137 in humanen Neuroblastomen mit günstiger Tumorbilologie unterstützte die These einer tumorsuppressiven Funktion dieser miRNA. Diese These sollte mittels *in vitro* Studien in humanen Neuroblastomzelllinien validiert werden.

Wie schon für miR-542 wurden die humanen Zelllinien IMR-32, SHEP und SK-N-BE mit einer für keine miRNA kodierenden Negativkontroll-miRNA oder mit miR-137 transient transfiziert und die Zellviabilität anhand der metabolischen Aktivität der Zellen mittels MTT Assay untersucht. Die relativ zum jeweiligen Wert nach 24 Std. gemessene Zellviabilität wurde gegen die Zeit aufgetragen. Alle drei analysierten Zelllinien reagierten auf die Expression von miR-137 im Vergleich zu Negativkontroll-miRNA exprimierenden Zellen mit einer signifikanten Verringerung der Viabilität über die Zeit (Abb. 51).

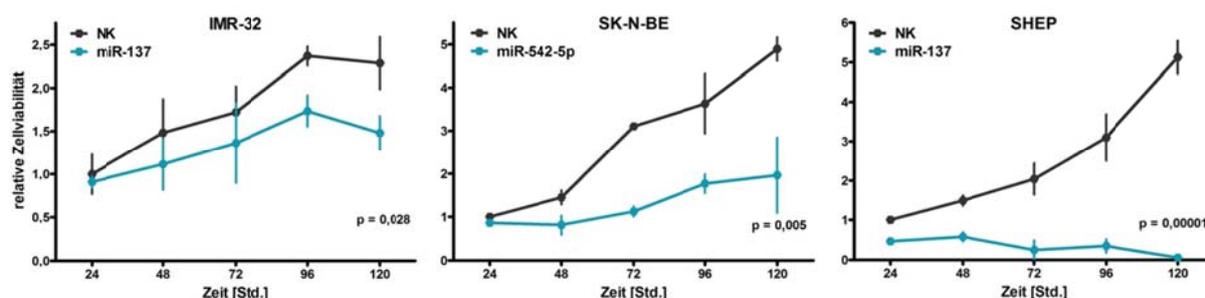


Abb. 51: Reduktion der Viabilität humaner Neuroblastomzelllinien mittels exogener miR-137 Expression Transiente Transfektion der humanen Neuroblastomzelllinien IMR-32, SHEP und SK-N-BE mit Negativkontroll-miRNA (NK) oder miR-137. Verlauf der Zellviabilität über die Zeit signifikant verschieden. Statistische Signifikanz berechnet anhand eines Permutationstest. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

Makroskopische Aufnahmen der Zellen zeigten 96 Std. nach Transfektion mit miR-137 eine deutlich verringerte Konfluenz im Vergleich zur Transfektion von Negativkontroll-miRNA (Abb. 52).

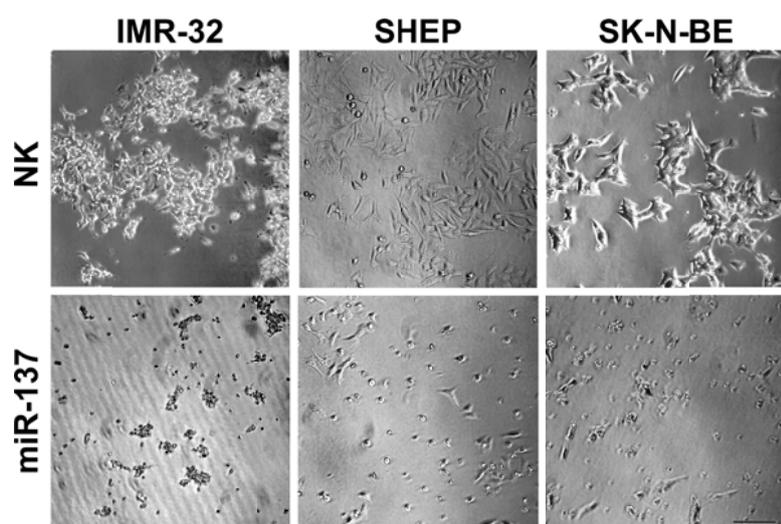


Abb. 52: Reduktion der Konfluenz humaner Neuroblastomzelllinien nach exogener miR-137 Expression Mikroskopische Aufnahmen von Zellen 96 Std. nach der Transfektion mit Negativkontroll-miRNA (NK) oder miR-137. Maßstabsbalken = 200 μ m. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

Mittels Analyse des Zellzyklus konnte ein Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen (subG1) in allen analysierten Zelllinien nach miR-137 Expression detektiert werden. Dieser Effekt dominierte in SHEP Zellen, war aber auch für IMR-32 und SK-N-BE Zellen signifikant (Abb. 53a). Die relative Anzahl apoptotischer Zellen nach Transfektion von miR-137 gegen Negativkontroll-miRNA wurde anhand des ELISA *Cell death* Assays bestimmt und zeigte eine signifikante Induktion von Apoptose in allen drei Zelllinien (Abb. 53b). In einer Western Blot Analyse wurde der Anteil der gespaltenen Caspase 9, ein Effekt der in pro-apoptischen Zellen auftritt, untersucht. Die Induktion der Caspase 9 Aktivität konnte deutlich gezeigt werden (Abb. 53c). Anhand der ELISA-ba-

sierten BrdU Inkorporation gemessen, wurde die Proliferationsrate von miR-137-exprimierenden Zellen relativ zu Negativkontroll-miRNA exprimierenden analysiert. In allen drei Zelllinien reduzierte miR-137 die Proliferation signifikant (Abb. 53d).

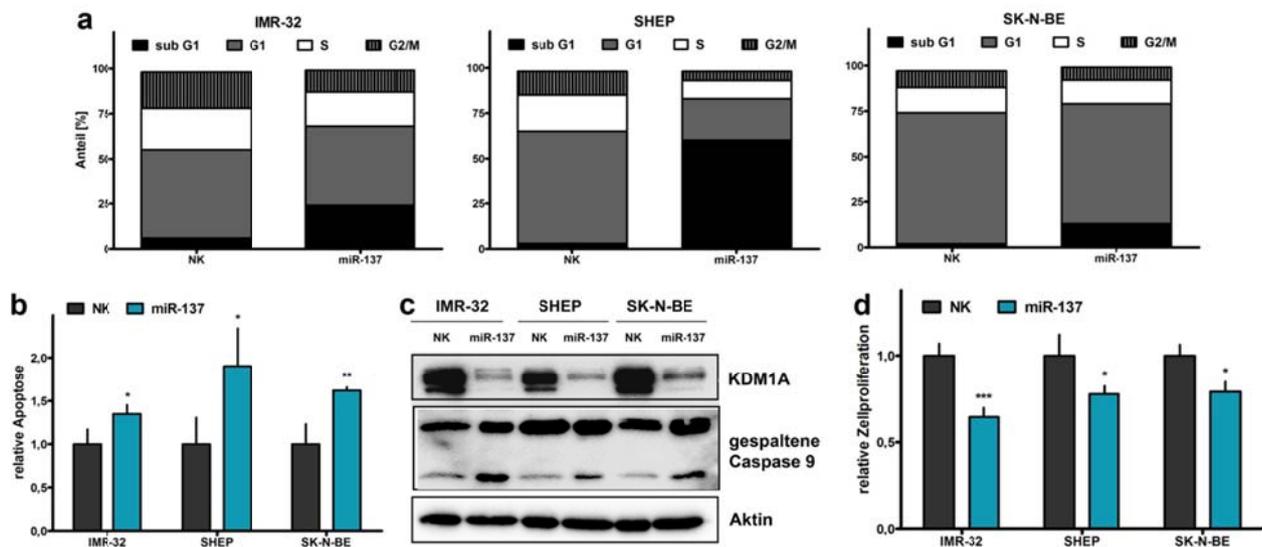


Abb. 53: Induktion von Apoptose und Reduktion der Proliferation in miR-137 exprimierenden Zellen Analysen des Phänotyps von miR-137-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu Negativkontroll-miRNA-exprimierenden (NK) 96 Std. nach Transfektion. **(a)** Fraktionen von Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus als Prozent-Balken. SubG1-Fraktion in miR-137 exprimierenden Zellen signifikant erhöht. Student's t-Test: $p < 0,05$. **(b)** Balkendiagramm der Zahl apoptotischer Zellen relativ zu NK, gemessen mittels ELISA *Cell death*. Student's t-Test. **(c)** Western Blot Analyse von KDM1A und gespaltener Caspase 9. Aktin als Ladungskontrolle. **(d)** Balkendiagramm der Zahl proliferierender Zellen relativ zu NK, gemessen mittels ELISA-basierter BrdU Inkorporation. Student's t-Test. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

Um zu testen, ob miR-137 neuronale Differenzierung von Neuroblastomzellen einleiten kann, wurde anhand einer qPCR die Expression von Neurofilament, einem bekannten Marker für neuronale Differenzierung, gemessen und gegen *GAPDH* normalisiert. Relativ zu Negativkontroll-miRNA-exprimierenden Zellen wurde deutlich, dass Neurofilament in miR-137-exprimierenden Zellen signifikant hochreguliert wurde (Abb. 54).

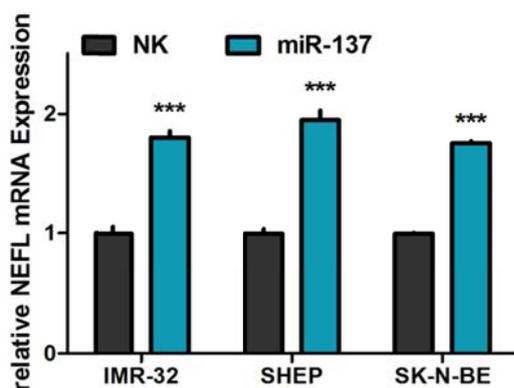


Abb. 54: Einleitung neuronaler Differenzierung in miR-137-exprimierenden Zellen Neurofilament (*NEFL*) mRNA nach miR-137 Expression relativ zu Negativkontroll-miRNA Expression (NK), detektiert mittels qPCR und normalisiert gegen *GAPDH*. Student's t-Test: * = $p < 0,001$. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

4.3.4 Validierung von KDM1A als direktes Ziel von miR-137 in Zelllinien

Die vorhergesagte, direkte Bindung von miR-137 an die 3'UTR von *KDM1A* sollte in diesem Teil der Untersuchung validiert werden. Dazu wurden mit miR-137-transfizierte Zellen im Vergleich zu mit Negativkontroll-miRNA-transfizierten auf ihre Expression von *KDM1A* untersucht. Mittels qPCR wurde die *KDM1A* mRNA Expression gemessen und auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Relativ zur Expression in Negativkontroll-miRNA-exprimierenden Zellen, wurde *KDM1A* mRNA in miR-137-exprimierenden Zellen signifikant herunterreguliert (Abb. 55a). In Western Blot Analysen konnte die Herunterregulation von KDM1A auch auf Proteinebene validiert werden (Abb. 55b).

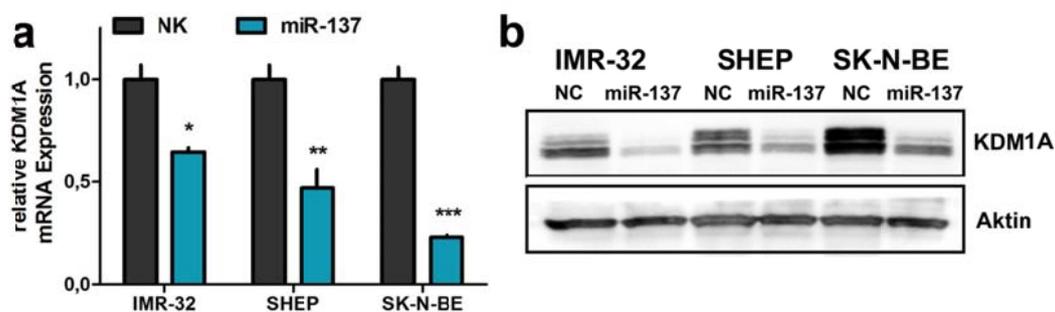
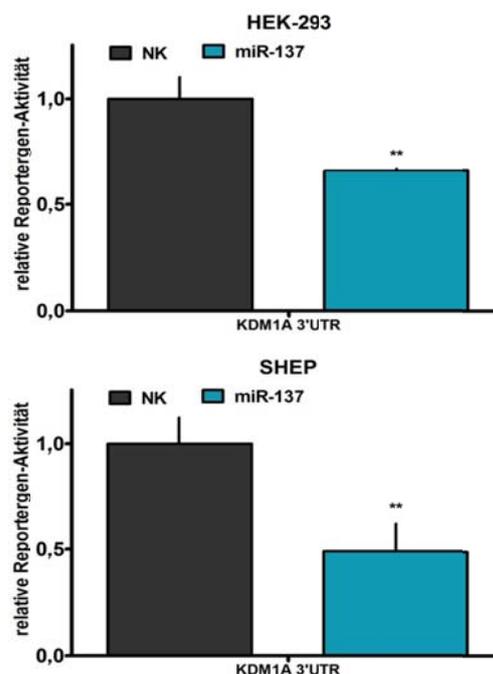


Abb. 55: Herunterregulation von KDM1A in miR-137-exprimierenden Zellen (a) *KDM1A* mRNA nach miR-137 Expression relativ zu Negativkontroll-miRNA (NK) in humanen Neuroblastomzellen detektiert mittels qPCR und normalisiert gegen *GAPDH* Expression. Student's t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. (b) Western Blot Analyse der KDM1A Protein Expression Negativkontroll-miRNA- (NK) und miR-137-exprimierender Zellen. Aktin als Ladungskontrolle. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

Zur Validierung der direkten Bindung von miR-137 an die Bindestelle der 3'UTR von *KDM1A* (Abb. 46) wurde ein Reporter Assay durchgeführt. Ein Glühwürmchen-Luziferase Reporter Plasmid, welches die 3'UTR von *KDM1A* beinhaltete, das Plasmid pRL-TK, das als Transfektionskontrolle Renilla-Luziferase exprimierte, und Negativkontroll-miRNA oder miR-137 wurden sowohl in HEK-293 als auch in SHEP Zellen ko-transfiziert. Relativ zu Negativkontroll-miRNA-exprimierenden Zellen, wurde die gegen Seefeder normalisierte Glühwürmchen-Luziferase-Aktivität signifikant reduziert (Abb. 56). Die vorhergesagte direkte Bindung von miR-137 an die 3'UTR von *KDM1A* konnte damit validiert werden.

Abb. 56: Direkte Bindung von miR-137 an die 3'UTR von KDM1A Ko-Transfektion von HEK-293 und SHEP Zellen entweder mit Negativkontroll-miRNA (NK) oder miR-137 und einem *KDM1A* 3'UTR tragenden Glühwürmchen-Luziferase Reporter Plasmid. Messung der Glühwürmchen-Luziferase-Aktivität nach 48 Std. und Normalisierung gegen Seefeder-Luziferase-Aktivität der Transfektionskontrolle pRL-TK. Student's t-Test: ** = $p < 0,01$. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.



Im Weiteren sollte untersucht werden, ob die Herunterregulation von *KDM1A* nach miR-137 Expression für Signalwege des Proteins von Bedeutung ist. Ein bekanntes Target von *KDM1A* ist *TFPI2* (*tissue factor pathway inhibitor 2*), das bei Herunterregulation von *KDM1A* in Neuroblastomzelllinien hochreguliert wird³⁵. Die Expression von *TFPI2* in Negativkontroll-miRNA- und miR-137-exprimierenden Zellen wurde anhand einer qPCR gemessen und gegen *GAPDH* normalisiert. Relativ zur Kontrolle wurde die Expression von *TFPI2* in allen analysierten Zelllinien mit miR-137 signifikant hochreguliert, was die Funktionalität der *KDM1A* Herunterregulation validierte (Abb. 57).

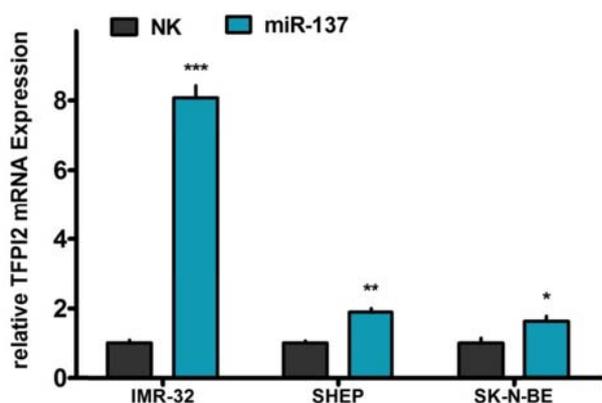
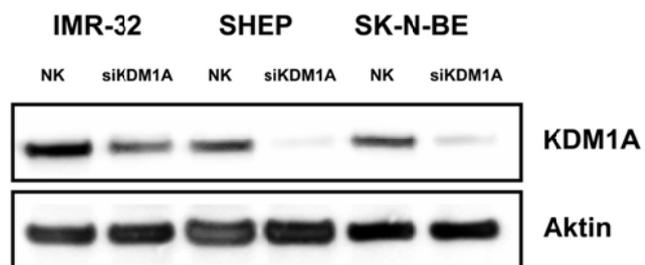


Abb. 57: Reaktion von *KDM1A* Zielen auf miR-137-induzierte Herunterregulation von *KDM1A* *TFPI2* (*tissue factor pathway inhibitor 2*) mRNA in Zelllinien nach miR-137 Expression relativ zu Negativkontroll-miRNA (NK), detektiert mittels qPCR und normalisiert gegen *GAPDH* Expression. Student's t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

4.3.5 Funktion von KDM1A Herunterregulation in Zelllinien

KDM1A wurde als direktes Target von miR-137, die an die 3'UTR bindet, validiert. Diese Bindung führte sowohl zu einer Herunterregulation auf mRNA-, als auch auf Proteinebene. *TPFI2*, ein bekanntes Ziel von KDM1A, konnte ebenfalls validiert werden. Damit war gezeigt, dass die Bindung von miR-137 an die 3'UTR von *KDM1A* funktionelle Auswirkungen auf die Neuroblastomzellen hervorruft, die auch bei direkter Herunterregulation von KDM1A eintreten. Nun sollte untersucht werden, ob der Phänotyp der direkten KDM1A Herunterregulation mittels siRNA in den humanen Neuroblastomzellen IMR-32, SHEP und SK-N-BE den Phänotyp der miR-137 Expression ähneln würde. Die Zelllinien wurden transient mit einer Negativkontroll-siRNA oder mit einer spezifischen siRNA gegen *KDM1A* (siKDM1A) transfiziert. Zunächst wurde die Spezifität dieser siRNA 48 Std. nach Transfektion anhand einer Western Blot Analyse untersucht, wobei eine Reduktion des KDM1A Proteins validiert werden konnte (Abb. 58).

Abb. 58: Spezifische Reduktion von KDM1A Protein mittels siRNA Western Blot Analyse der KDM1A Expression 48 Std. nach transienter Transfektion von Neuroblastomzelllinien mit Negativkontroll-siRNA (NK) oder spezifischer siRNA gegen *KDM1A*. Aktin als Ladungskontrolle. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.



Die im MTT Assay ermittelte Zellviabilität wurde gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 59). Alle analysierten Zelllinien reagierten auf die Herunterregulation von KDM1A im Vergleich zur Negativkontrolle mit einer signifikant reduzierten Viabilität über die Zeit.

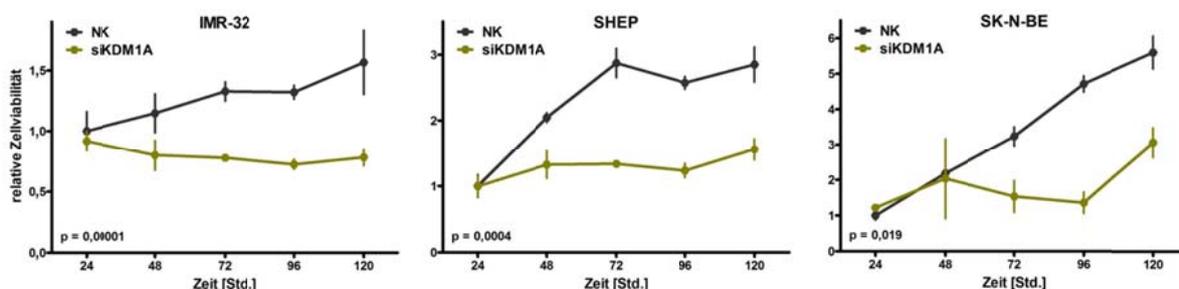


Abb. 59: Reduktion der Zellviabilität durch Herunterregulation von KDM1A MTT Assay relativ zum jeweiligen 24 Std. Wert nach transienter Transfektion von Negativkontroll-siRNA (NK) oder siRNA gegen KDM1A (siKDM1A). Angegebene p-Werte für die Signifikanz von siKDM1A gegen NK berechnet anhand eines Permutationstests Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

Die detaillierte Untersuchung der Mechanismen der Reduktion der Zellviabilität nach Herunterregulation von KDM1A mittels siRNA wurde anhand einer Zellzyklusanalyse, eines *Cell death* ELISA und der ELISA-basierten BrdU Inkorporation 96 Std. nach Transfektion untersucht. Der Anteil apoptotischer Zellen stieg bei Transfektion von siKDM1A im Vergleich zur Negativkontroll-siRNA an (Abb. 60a). Mittels *Cell death* ELISA konnte die Induktion von Apoptose validiert werden (Abb. 60b). Außerdem wurde eine Reduktion der Proliferation, die relativ zur Negativkontroll-miRNA aufgetragen wurde, detektiert (Abb. 60c).

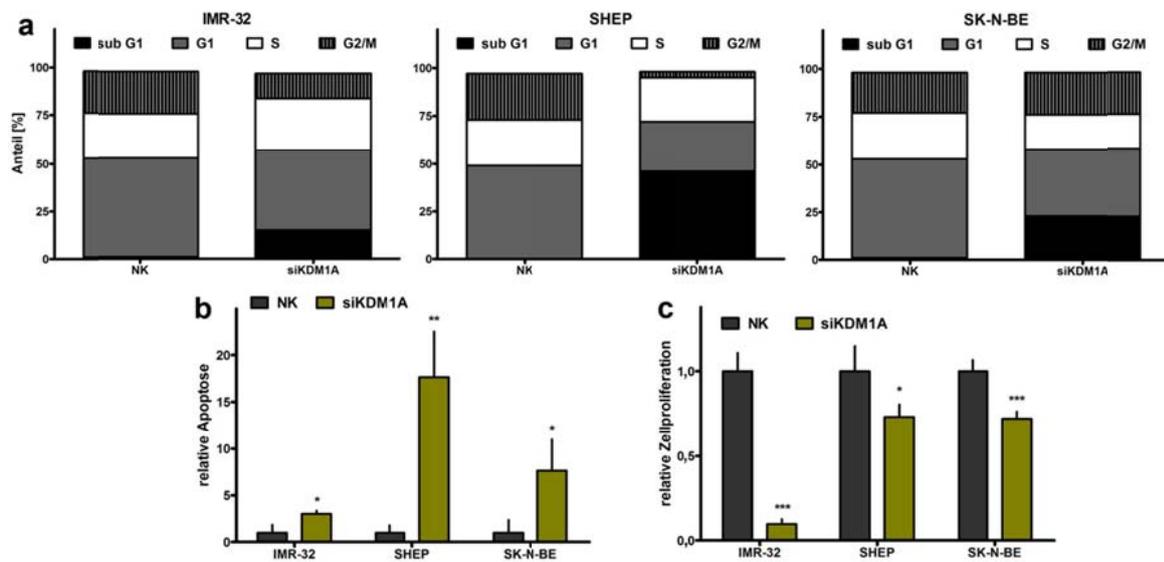


Abb. 60: Induktion von Apoptose und Reduktion der Viabilität und Proliferation von Zellen durch Herunterregulation von KDM1A Analysen 96 Std. nach Transfektion von Negativkontroll-miRNA (NK) oder siRNA gegen KDM1A (siKDM1A). **(a)** Fraktionen von Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus als Prozentbalken. **(b)** Balkendiagramm der apoptotischen Zellen, relativ zu NK, gemessen mittels ELISA *Cell death*. Student's t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. **(c)** Balkendiagramm der Zahl proliferierender Zellen relativ zu NK, gemessen anhand der ELISA-basierten BrdU Inkorporation. Student's t-Test: * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

4.3.6 Partielle Wiederherstellung des Phänotyps der miR-542-3p Expression mittels Hochregulation von *KDM1A* ohne miRNA-Bindestelle

Der Phänotyp von Neuroblastomzelllinien nach der Herunterregulation von *KDM1A* mittels siRNA ähnelte dem der Expression von miR-137. Nun wurde untersucht, ob der miR-137-Phänotyp aufgrund der durch miR-137 Expression herunterregulierten *KDM1A* Expression auftrat. *KDM1A* ohne miR-137-Bindestelle (3'UTR) wurde mittels eines Tetrazyklin-induzierbaren Vektors stabil in SHEP Zellen eingebracht (SHEP-*KDM1A*). Als Kontrolle wurden SHEP Zellen mit dem gleichem Vektor aber einer induzierbaren Expression von GFP generiert (SHEP-*GFP*). Unabhängig von der Behandlung mit Tetrazyklin wurde die Expression von *KDM1A* in SHEP-*GFP* Zellen bei Expression von miR-137 reduziert. Auch in SHEP-*KDM1A* Zellen reduzierte die Expression von miR-137 die Expression von *KDM1A* in Abwesenheit von Tetrazyklin. Bei Behandlung mit Tetrazyklin wurde die Expression von *KDM1A* ohne 3'UTR in SHEP-*KDM1A* Zellen induziert, die resistent gegen die Expression von miR-137 war (Abb. 61a). Mittels MTT Assay wurde die Zellviabilität unter den gleichen Bedingungen wie im Western Blot analysiert. Die Viabilität der Zellen bei Expression von miR-137 wurde dazu relativ zur jeweiligen Negativkontroll-miRNA exprimierenden Viabilität aufgetragen. Die Expression von miR-137 reduzierte die Viabilität sowohl von SHEP-*GFP* als auch von SHEP-*KDM1A* Zellen in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin signifikant. Innerhalb der SHEP-*GFP* Zellen konnte kein Unterschied zwischen der Zellviabilität von nicht-induzierten und induzierten Zellen, die mit miR-137 behandelt wurden, detektiert werden. Zwischen miR-137 exprimierenden SHEP-*KDM1A* war die Reduktion der Zellviabilität in induzierten Zellen signifikant weniger stark als in nicht-induzierten Zellen (Abb. 61b).

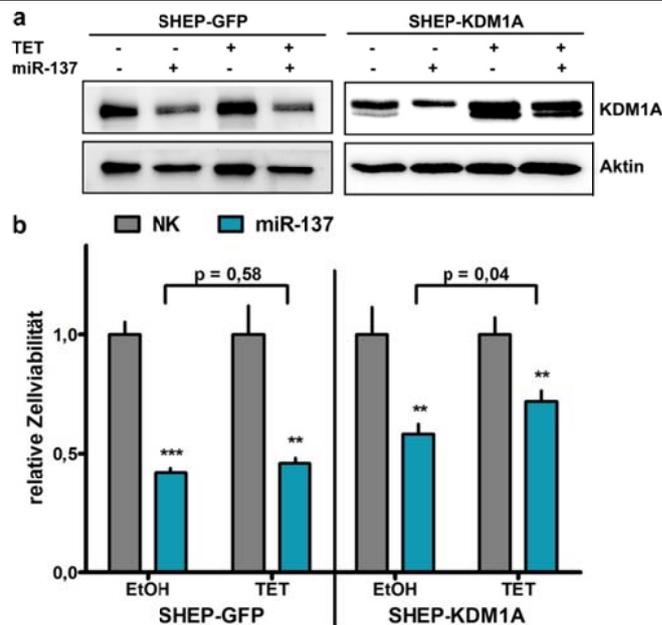


Abb. 61: Induzierbare Expression von KDM1A in SHEP-KDM1A Zellen resistent gegen miR-137 Expression (a) Western Blot Analyse der KDM1A Expression 96 Std. nach Tetrazyklin- (TET) oder Lösungsmittel-Behandlung von stabil-transfizierten SHEP-Zellen mit einem Tetrazyklin-induzierbaren Vektorkonstrukt mit *GFP* (SHEP-*GFP*) oder *KDM1A* cDNA ohne 3'UTR. Gleichzeitige Expression von miR-137. Aktin als Ladungskontrolle. (b) Balkendiagramm der Zellviabilität von miR-137 exprimierenden SHEP-*GFP* und SHEP-*KDM1A* Zellen relativ zu Negativkontroll-miRNA exprimierenden in Ab- und Anwesenheit von Tetrazyklin, gemessen mittels MTT Assay. Student's t-Test: ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Modifiziert nach Althoff *et al.*¹¹⁸.

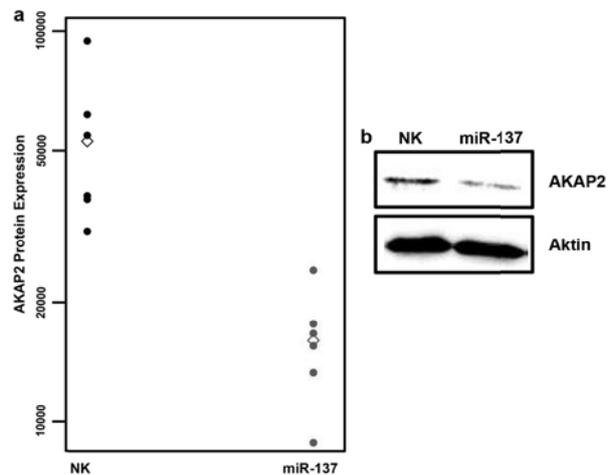
4.3.7 Identifizierung und Validierung von AKAP2 als weiteres Ziel von miR-137

Das durchgeführte Rettungsexperiment des miR-137 Phänotyps demonstrierte, dass zwar ein Teil des Effekts der miR-137 Expression auf die Herunterregulation von KDM1A zurückzuführen war, aber dass der größere Anteil nicht allein auf die Regulation von KDM1A, sondern allein oder zusätzlich auf weitere miR-137 Ziele zurückgeführt werden musste.

Zur Detektion weiterer potentieller Ziele wurde 96 Std. nach Transfektion eine Proteomanalyse von miR-137 exprimierenden SHEP Zellen durchgeführt, wobei Negativkontroll-miRNA exprimierende Zellen als Vergleich dienten. Dabei wurden 38 Proteine gefunden, die durch miR-137 Expression signifikant reguliert waren (Daten nicht gezeigt). Mittels *in silico* Analyse wurde untersucht, welche dieser regulierten Proteine sowohl eine Bindestelle für miR-137 aufwies, als auch als potentielles Onkogen in Frage kam.

Das Protein AKAP2 (*A kinase anchor protein 2*) war in miR-137 exprimierenden SHEP Zellen bei der Analyse des Proteoms als signifikant herunterreguliert gefunden wurden (Abb. 62a), was im Western Blot validierbar war (Abb. 62b).

Abb. 62: Herunterregulation von AKAP2 mittels Expression von miR-137 (a) Vergleich der Expression von AKAP2 in Negativkontroll-miRNA (NK) exprimierenden und miR-137 exprimierenden Zellen anhand einer Proteomanalyse. (b) Western Blot Analyse der gleichen Proben wie (a). Aktin als Ladungskontrolle.



Dem Protein AKAP2, über dessen tumormodulierende Funktion bisher noch nichts bekannt ist, wurden vier direkte Bindestellen von miR-137 am 3'UTR der mRNA vorhergesagt (www.targetscan.org). Innerhalb der 4014 bp langen 3'UTR lagen diese Bindestellen an den Positionen 912-918 (7mer-1A), 1634-1640 (7mer-m8), 1775-1782 (8mer) und 3851-3857 (7mer-m8)(Abb. 63).

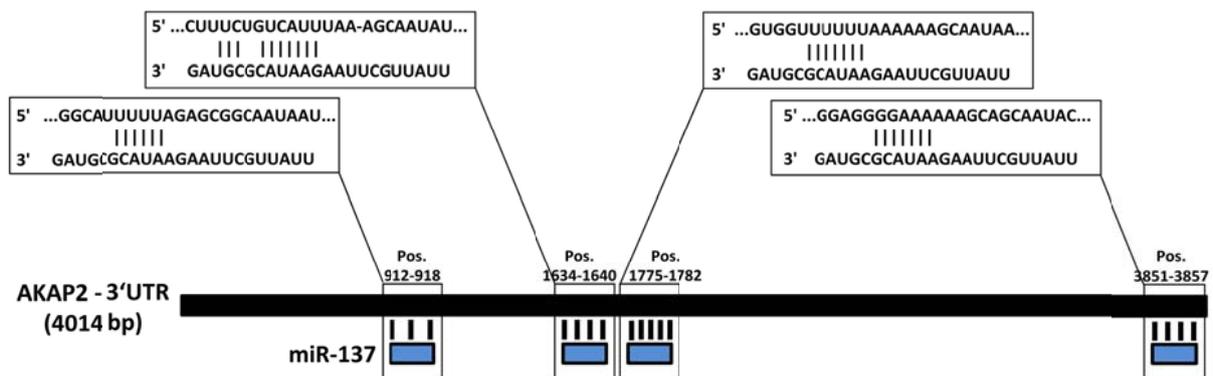


Abb. 63: 3'UTR von AKAP2 mit Bindestellen von miR-137 Schematisches Diagramm der vorhergesagten Bindestellen von miR-137 innerhalb der 3'UTR von AKAP2 (www.targetscan.org). Pos. = Position.

Anhand einer Analyse der Expression von AKAP2 in humanen primären Neuroblastomen sollte festgestellt werden, ob dieses Protein eine tumormodulierende Funktion im Neuroblastom spielen könnte. Mittels einer Kaplan-Meier Analyse konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Tumoren mit hoher AKAP2 Expression eine

signifikant niedrige Wahrscheinlichkeit für ein Ereignis-freies Überleben aufwiesen, als Patienten mit Tumoren mit niedriger *AKAP2* Expression. Dies galt auch für die Analyse des Gesamtüberlebens (Abb. 64). Des Weiteren korrelierte eine erhöhte Expression von *AKAP2* im Tumor signifikant mit *MYCN* Amplifikation (Daten nicht gezeigt).

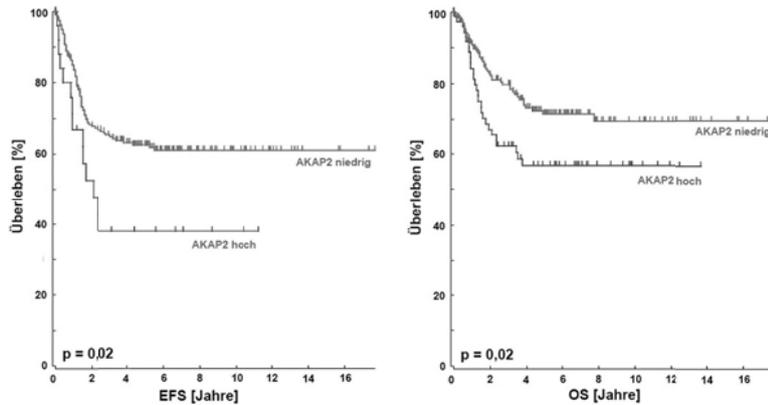


Abb. 64: Korrelation der Expression von *AKAP2* mit Überleben von Neuroblastompatienten Kaplan-Meier-Analyse des Ereignis-freien (EFS) und des Gesamtüberlebens (OS) von Neuroblastompatienten mit Tumoren mit hoher gegen niedriger *AKAP2* Expression. Wilcoxon-Test.

Im Folgenden sollte die Funktion einer *AKAP2* Herunterregulation mittels RNA Interferenz in SHEP Zellen näher untersucht werden. Die Viabilität der Zellen, die mit siAKAP2 behandelt wurden, war im Vergleich zu mit Negativkontroll-siRNA transfizierten reduziert (Abb. 65a). Weiterhin induzierte siAKAP2 in SHEP Zellen sowohl Apoptose als auch eine Reduktion der Zellproliferation, gemessen anhand des *Cell death* ELISA und der ELISA-basierten BrdU Inkorporation (Abb. 65b/c).

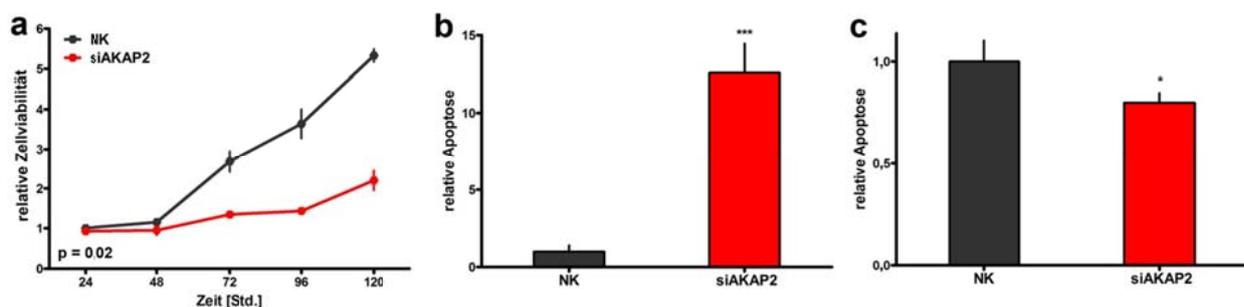


Abb. 65: Reduktion der Zellviabilität und Proliferation und Induktion von Apoptose in mit siRNA gegen *AKAP2* transfizierten SHEP Zellen Transiente Transfektion von SHEP Zellen mit Negativkontroll-siRNA (NK) oder einer siRNA gegen *AKAP2* (siAKAP2). **(a)** Verlauf der Zellviabilität über die Zeit relativ zum Wert nach 24 Std. Angegebene p-Werte für die Signifikanz von siAKAP2 gegen NK berechnet anhand eines Permutationstests. **(b)** Balkendiagramm der apoptotischen Zellen 96 Std. nach Transfektion relativ zu NK. Student's t-Test: * = $p < 0,001$. **(c)** Balkendiagramm der Zahl proliferierender Zellen relativ zu NK 96 Std. nach Transfektion. Student's t-Test: * = $p < 0,05$.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit umfasst die Charakterisierung eines neuen Cre-konditionalem *MYCN*-vermittelten Neuroblastom-Mausmodells. Anhand dieses Modells sowie aus weiteren vorhandenen Daten wurden zwei Kandidaten-miRNAs mit tumormodulierender Funktion identifiziert, deren Funktionen in humanen Neuroblastomen und Zelllinien weiter analysiert wurden.

5.1 Das LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre* Mausmodell

5.1.1 Tumore des LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre* Mausmodells lassen sich als murine Neuroblastome beschreiben

Eine Überexpression oder Amplifikation von Wildtyp *MYCN* geht mit einem hohen Stadium und einer schlechten Prognose humaner Neuroblastome einher¹²⁴. Während die Heilungschancen eines Neuroblastoms mit niedrigerem Stadium bei jüngeren Kindern sehr gut sind, ist die Sterberate von Patienten mit Stadium 4 Neuroblastomen mit *MYCN*-Amplifikation noch immer hoch¹. Besonders für die Erforschung der Signalwege in diesen bösartigen Tumoren sind Mausmodelle, die den genetischen Status dieser Erkrankungen widerspiegeln, von großer Bedeutung. Weiterhin sind vorklinische Untersuchungen von potentiell wirksamen spezifischen Medikamenten möglich. Im hier analysierten LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre* Mausmodell wurde untersucht, inwieweit es Charakteristika des humanen Neuroblastoms in sich vereinigt, um Aufschlüsse über neue Therapien dieser beim Kind fatal verlaufenden Erkrankungsform zu geben.

Die vom *Dbh*-Promotor getriebene Expression der Cre-Rekombinase findet hauptsächlich im sympathischen Grenzstrang statt⁴⁰. In LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre* Mäusen führte die Expression der Cre-Rekombinase zur gewebspezifischen Expression von *MYCN*, was anhand der Untersuchungen der Tumore auf mRNA- und Proteinebene gezeigt wurde. Die anatomischen Lokalisationen dieser *MYCN*-vermittelten Tumore an Nebennieren, oberen Zervikalganglien und dem *Ganglion coeliacum* ähnelten der Lage humaner Neuroblastome, die sich aus abdominalen Ganglien, dem sympathischen Grenzstrang und den Nebennieren entwickeln⁴.

Im histologischen Bild bestanden Tumore aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen aus kleinen, blauen, runden Zellen. In der pathologischen Untersuchung von humanen pädiatrischen Tumoren wird ebenfalls zuerst eine Hämatoxylin und Eosin Färbung durchgeführt. Die Unterscheidung zwischen den Entitäten der klein-, blau- und rundzelligen Tumore erfolgt hauptsächlich anhand des Nachweises spezifischer Marker in immunozytochemischen und genetischen Analysen. Sind diese Untersuchungen nicht eindeutig, werden elektronenmikroskopische Aufnahmen zu Rate gezogen. Als spezifische ultrastrukturelle Kennzeichen des Neuroblastoms innerhalb der klein-, blau- und rundzelligen Tumore gelten Neuriten, neurosekretorische Vesikel, Synapsen-ähnliche Strukturen und zwischenzelluläre Anschlüsse¹. Neurosekretorische Vesikel, die neurale Differenzierung anzeigen, waren auch in Tumoren aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen detektierbar.

Tumore des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells exprimierten sowohl das Oberflächenantigen CD56, als auch die Neuroblastommarker *Dbh*, *Th* und *Phox2b*. Die Expression von CD56 gilt als Marker für neuroendokrine Tumore. *Th* katalysiert die Biosynthese der Katecholamine und wird vor allem in noradrenergen Zellen exprimiert¹²⁵. Bei der Unterscheidung von Neuroblastomen zu anderen klein-, blau- und rundzelligen Tumoren gilt die Expression von *Th*, die spezifisch für das Neuroblastom ist, als Merkmal¹²⁶. *Phox2b* wird bei der Entwicklung von sympathischen, parasymphatischen und enterischen Ganglien exprimiert, die sich von der Neuralleiste ableiten¹²⁷. Hartomo *et al.* beschreiben elf Marker, anhand derer sich eine minimale Resterkrankung des Neuroblastoms detektieren lässt, unter denen sich sowohl *Dbh* und *Th* als auch *Phox2b* befinden¹²⁸.

Anhand der Lokalisation, der histologischen Eigenschaften und der Expression von spezifischen Neuroblastommarkern wurde die Hypothese bestätigt, dass es sich bei in dieser Arbeit analysierten Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodells um murine Neuroblastome handelte.

5.1.2 Gegenüberstellung der beiden Neuroblastom-Mausmodelle LSL-MYCN;Dbh-iCre und TH-MYCN

Das *TH-MYCN* Mausmodell³⁷ stellt ein exzellentes, weltweit anerkanntes Neuroblastommodell dar, das in verschiedenen Arbeitsgruppen, die sich mit der Erforschung des Neuroblastoms beschäftigen, zu über 200 Publikationen geführt hat. Es gibt jedoch Einschränkungen des Modells, die die Forschung an diesem erschweren. In diesem Teil der Arbeit sollen verschiedene Eigenschaften des *TH-MYCN* und des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodells einander gegenübergestellt werden, um abzuschätzen, ob das neue Mausmodell Vorteile gegenüber dem etablierten aufweist.

Das *TH-MYCN* Modell wurde 1997 durch Pronukleusinjektion der cDNA von humanem *MYCN* in murine Blastozysten generiert³⁷. Die Definition der genauen Integrationsstelle in der distalen Region des Chromosoms 18 im Genom der Maus erfolgte erst 2003¹²⁹. Es ist nicht bekannt, ob der entsprechende Locus ubiquitär exprimiert oder epigenetisch inaktiviert wird, was zu einer instabilen Expression von *MYCN* führen könnte. Das *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modell wurde mittels eines Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch in einen genau definierten Genlokus generiert, was zur Folge hatte, dass der Genlokus, in den das *MYCN* Transgen integriert wurde, genau bekannt war. Der *ROSA26* Genlokus stellt bei der Generierung transgener Mausmodelle den am häufigsten verwendeten genetischen Locus dar, da eine Unterbrechung dieses ubiquitär exprimierten Gens bekanntermaßen keinen Phänotyp hervorruft¹³⁰⁻¹³³.

Vorteile des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells gegenüber dem *TH-MYCN* Modell, die Integrationsstelle des Transgens betreffend, sind demnach zum einen die Gewissheit, dass jede phänotypische Veränderung doppelt-transgener Tiere auf das Vorhandensein des integrierten Transgens, nicht aber auf die Unterbrechung eines endogenen Locus zurückzuführen ist und zum anderen die Kenntnis, dass der Locus ubiquitär exprimiert und nicht in irgendeiner Weise reprimiert wird.

Die Vermehrung und Erhaltung der transgenen Mausstämme *LSL-MYCN* und *Dbh-iCre* erfolgt durch die Verkreuzung mit Wildtyp-Tieren oder mit Tieren des gleichen Stammes. Da die getrennte Zucht beider Stämme zu keinem Phänotyp führt ist diese unkomplizierter als die des *TH-MYCN*-Modells, das im 129x1/SvJ Hintergrund potentiell Tumore entwickelt. Die Ausbildung eines tödlichen Tumors in einem transgenen Muttertier führt dabei häufig zum Verlust des ganzen Wurfes oder zur Notwendigkeit

einer Amme. Infolgedessen werden häufig heterozygote *TH-MYCN*-Männchen und Wildtyp-Weibchen für die Erhaltungszucht benutzt, die stets verfügbar sein sollten. Es ist unabdingbar jedes transgene *TH-MYCN* Tier nach Tumoren abzutasten, was einen enormen Zeitaufwand mit sich bringt. Weiterhin besteht innerhalb einer Population aus *TH-MYCN* Tieren ein Selektionsvorteil für die Tiere, die keinen Tumor entwickeln, da sich diese mit größerer Wahrscheinlichkeit fortpflanzen. Dass dies auf Dauer zu einer Abnahme der Tumorinzidenz führen kann, wurde auch in unserer Arbeitsgruppe festgestellt.

Tumore des *TH-MYCN* Modells entstammen unifokal aus dem *Ganglion coeliacum*³⁷. Die Lokalisation von Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells, die vor allem an den Nebennieren, aber auch an den oberen Zervikalganglien auftraten, spiegelte die humaner Neuroblastome⁴ demnach besser wider als die des *TH-MYCN* Modells.

Möglicherweise ist der genetische Hintergrund 129x1/SvJ sensibler für die Entwicklung bösartiger Neuroblastome als andere Mausstämme, wie z. B. C57Bl/6N, weil sie sich in der Expression nicht-identifizierter Stamm-spezifischer Modifizierer unterscheiden¹³⁴. Trotz des unsensibleren Hintergrundes zeigte die Kaplan-Meier-Analyse der beiden Mausmodelle eine signifikant gesteigerte Tumor-Inzidenz des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells.

Aufgrund der Expression von Luziferase in Cre-Rekombinase exprimierenden Zellen des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells sind Tumore dieser Mäuse mittels *in vivo* Biolumineszenz-Bildgebungsverfahren detektierbar. Diese Eigenschaft der Tumore kann eingesetzt werden, um Tumolvolumenveränderungen im Vergleich mit anderen Individuen des gleichen Stammes, z. B. während einer Behandlungssimulation, zu untersuchen (hier nicht durchgeführt). Tumore aus *TH-MYCN* Mäusen exprimieren dahingegen kein Reportergen, weshalb diese Methode der schnellen und unkomplizierten Bildgebung nicht anwendbar ist.

Die Kombination von Tumormodellen mit anderen transgenen Mausmodellen, die ein für die Entwicklung der Tumorentität potentiell funktionelles Gen herunter- oder überexprimieren ist eine interessante Strategie, für die Erkrankung relevante Signalwege zu finden und zu untersuchen. Das *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modell entwickelte im nicht-sensi-

tiven genetischen Hintergrund (75% C57Bl/6N und 25% 129x1/SvJ) Tumore, während *TH-MYCN* Mäuse nur im sensitiven 129x1/SvJ Hintergrund Tumore ausbilden. Eine Kombination von *TH-MYCN* mit anderen Mausmodellen ist demnach nur möglich, wenn diese weitestgehend auf den 129x1/SvJ Hintergrund zurückgekreuzt wurden. Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass mindestens fünf Rückkreuzungen (96,9% 129x1/SvJ) erforderlich waren, damit Mäuse im gemischten genetischen Hintergrund eine ähnliche Tumorzinzidenz erreichten, wie reine 129x1/SvJ Tiere. Der zeitliche Aufwand der Rückkreuzungen von mehreren Monaten, der bei einer Kombination mit dem *TH-MYCN* Modell aufgewendet werden muss, ist bei Verwendung des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modell nicht erforderlich. Darüber hinaus sind tumorspezifische Regulationen von Genen bei Kombination des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* mit anderen Cre-konditionalen Modellen ohne großen Aufwand möglich.

Aus der Gegenüberstellung der beiden murinen Neuroblastommodelle *TH-MYCN* und *LSL-MYCN;Dbh-iCre* ergaben sich diverse Vorteile für die *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Maus, wie die Kenntnisse über den Genloкус der Transgenintegration, die Kosten- und Zeitersparnis bei der Erhaltungszucht, die anatomischen Lokalisationen der entstehenden Tumore sowie deren Inzidenz, die Opportunität der Lumineszenz-Bildgebung sowie die unkomplizierte und schnelle Möglichkeit der Kombination mit anderen transgenen Tiermodellen. Das *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodell überkommt somit die in dieser Arbeit diskutierten Limitationen des etablierten *TH-MYCN* Modells.

5.1.3 Identifikation neuer Ziele einer Neuroblastomtherapie anhand des LSL-MYCN;Dbh-iCre Mausmodells

In diesem Teil der Arbeit sollen genomische Aberrationen und regulierte mRNAs sowie miRNAs aus Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells mit denen humaner Erkrankungen und mit denen anderer muriner Neuroblastome verglichen werden, um festzustellen, ob das LSL-MYCN;Dbh-iCre Modell genutzt werden könnte, um neue potentiell funktionelle Ziele einer Neuroblastomtherapie zu detektieren.

5.1.3.1 Vergleich genomischer Aberrationen von Tumoren aus LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen mit denen humaner und anderer muriner Neuroblastome

Genomische Aberrationen von 13 LSL-MYCN;Dbh-iCre Tumoren wurden relativ zu Gewebe aus dem Schwanz der jeweils gleichen Maus detektiert.

Eine teilweise Zunahme des Chromosoms 1 wurde in einem der Tumore aus LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen gefunden. Die Zunahme des humanen Chromosoms 2q, das ortholog zum murinen Chromosom 1 ist, wird für 12% der humanen Neuroblastome beschrieben¹³⁵. Teile der humanen Chromosomen 1q, 2q, 5q, 6p, 8q, 13q und 18q sind ebenfalls ortholog zu Teilen des murinen Chromosom 1, jedoch ist deren Funktion bisher nicht bekannt. Im TH-MYCN Modell ist eine Zunahme des Chromosoms 1 in 5% bis 30% der Tumoren gefunden worden^{37,129,136}.

Die Tumore des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells weisen in 69% der Fälle eine Zunahme des kompletten Chromosoms 3 auf, welches ortholog zu Teilen der humanen Chromosomen 1, 3q, 4, 8q und 13q ist¹³⁷. Das humane Chromosom 1q, eine Region, die häufig in humanen Neuroblastomen mehrfach auftritt, ist ebenfalls ortholog¹³⁸. Das publizierte murine Neuroblastommodell, das von der Überexpression von mutiertem *ALK^{F1174L}* getrieben wird, weist in 100% der Fälle eine Zunahme des Chromosoms 3 auf⁴².

Das murine Chromosom 6, dessen Zunahme in fünf Tumoren auftrat, ist teilweise ortholog zu den humanen Chromosomen 2p, 3, 4q, 7, 10q und 12p. In humanen Neuroblastomen kommt eine Zunahme des kompletten Chromosoms 7 in 40% der Tumore verschiedener Stadien vor, wobei eine Zunahme von 7q in 12% auftritt und mit hoch-Risiko Tumoren assoziiert ist¹³⁹. Interessanterweise weisen zwei Tumore eine lokale Amplifikation des Chromosoms 6 auf, die den *ROSA26*-Genlocus einschließt, in den das

humane *MYCN* Transgen kloniert wurde. Infolgedessen wurde untersucht, ob beide Tumore, die über diese Aberration verfügen, im Vergleich zu denen ohne Aberration auch eine höhere Expression des Transgens aufweisen und es konnte gezeigt werden, dass dies der Fall war (Daten nicht gezeigt). Schon im *TH-MYCN* Mausmodell wurde gezeigt, dass homozygote Mäuse dieser Linie schneller Tumore entwickelten und dass diese schneller zum Tod führten als bei heterozygote Tiere. Mit der höheren Expression von *MYCN* wurde dies begründet¹³⁷. So wird vermutet, dass die Zunahme des *ROSA26*-Lokus im neuen *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modell das Tumorstadium beschleunigen könnte.

Die Zunahme der distalen Hälfte des Chromosoms 11 in 30% der *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumore ist ortholog zum humanen Chromosomenarm 17q, der in 50% aller humaner Neuroblastome mehrfach vorkommt und mit ungünstigem Verlauf der Erkrankung sowie mit *MYCN* Amplifikation korreliert⁴². Ein bekanntes, potentiell funktionelles Onkogen auf diesem Locus ist *Survivin*, das in der Region 17q25 liegt^{140,141}. *TH-MYCN* Tumore weisen ebenfalls häufig (20-30%) eine Zunahme der Region auf Chromosom 11 auf^{129,136,137}.

Die Zunahme des Chromosoms 12 ist ortholog zu Teilen des humanen Chromosoms 2p, das den endogenen *Mycn* Locus enthält, sowie 14q und Teilen von 7p und 7q. Die Zunahme von 7q tritt, wie schon erwähnt, in 12% humaner Neuroblastome auf ist mit hohem Risiko korreliert¹³⁹.

Der Verlust der Heterogenität von Chromosom 1p36 korreliert in humanen Neuroblastomen mit der Amplifikation von *MYCN* und einer ungünstigen Prognose¹⁴²⁻¹⁴⁴. Auf diesem Locus liegt miR-34a, der in verschiedenen Tumorentitäten eine tumorsuppressive Funktion zugeschrieben wird^{145,146}. Die Expression von miR-34a induziert in Neuroblastomzellen Apoptose⁶³ und reguliert direkt die Expression von *MYCN*⁶⁴. Weitere potentiell funktionelle Kandidaten auf diesem Locus sind *CHD5*¹⁴⁷ und *KIF1B β* ¹⁴⁸. Ein Verlust des murinen Chromosoms 4, das das Ortholog zum humanen Locus 1p36 enthält, ist weder im *TH-MYCN* Modell¹³⁶, noch in Tumoren von *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen vorhanden. Jedoch weisen 50% der Tumore des *ALK^{F1174L}* Modells einen Verlust dieses Locus auf⁴². Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass das Transgen in beiden *MYCN*-vermittelten Mausmodellen in Form von cDNA vorliegt und damit keine Bindestelle für miR-34a aufweist. Dementsprechend wäre ein Verlust dieses Locus für

die *MYCN*-getriebenen Modelle kein Vorteil für die Entstehung von Tumoren. Weiterhin wird damit die Hypothese unterstützt, dass in humanen Neuroblastomen durch die Repression von miR-34a die Tumorentwicklung angetrieben wird, wodurch die Funktionalität des Verlustes des Chromosoms 1p36 erklärt werden könnte.

Im Vergleich zu dem *ALK^{F1174L};Dbh-iCre* Neuroblastommodell sind chromosomale Aberrationen in Tumoren aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* und *TH-MYCN* Mäusen seltener^{37,42,129}. Eine Überexpression von Wildtyp *MYCN* benötigt demnach, um einen Tumor zu treiben, weniger bis keine weiteren spontanen Aberrationen als die Überexpression der *ALK^{F1174L}* Mutation. Heukamp *et al.* beschreiben in einem von drei Tumoren von dreifach-transgenen *TH-MYCN;ALK^{F1174L};Dbh-iCre* eine Zunahme des Chromosoms 3. Des Weiteren werden nur wenige Verluste einzelner Regionen von Chromosomen detektiert⁴². Demnach sind bei gleichzeitiger Überexpression von Wildtyp *MYCN* und mutiertem *ALK^{F1174L}* weniger chromosomale Aberrationen nötig, als bei den beiden *MYCN*-getriebenen Modellen.

Aus dem Vergleich der chromosomalen Aberrationen des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells mit publizierten humanen und anderen murinen Neuroblastomen ergibt sich, dass sich die Spektren der chromosomalen Aberrationen sehr ähnlich sind.

5.1.3.2 Vergleich der Genregulationen von Tumoren aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen mit humanen und anderen murinen Neuroblastomen auf mRNA Ebene

Mittels mRNA Profiling drei nicht-maligner Nebennieren und acht Tumoren aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen wurden im Modell regulierte mRNAs identifiziert.

Anhand der GSEA wurden diverse Gensets, die von MYC(N) regulierte Ziele enthalten, als signifikant angereichert in Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells detektiert, wodurch die Hypothese bestätigt wird, dass *MYCN* im murinen System ähnliche Signalwege reguliert wie im humanen. Weitere Gensets, die in Tumoren von *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen als signifikant angereichert detektiert wurden, beinhalteten Gene, die sowohl die DNA Replikation als auch den Zellzyklus betrafen. Dementsprechend regulierten diese Tumore Gene, die für die Kennzeichen von Tumorzellen, wie die Stimulation ihres eigenen Wachstums, Resistenzen gegen Wachstumsstopp sowie

Apoptose und unendliche Vervielfältigung¹⁴⁹, von Bedeutung sind. Die Anreicherung von Gensets, die neuronale Differenzierung herunterregulieren, bestätigte, dass sich Tumore aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen in einem undifferenzierten Status befinden, ein weiteres bekanntes Merkmal von Tumorzellen¹⁵⁰.

Mittels einer Clusteranalyse der Gene, die in einer publizierten MYCN Signatur aufgedeckt wurden⁷⁸, konnten Tumore des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells eindeutig von nicht-malignen Nebennieren separiert werden, ein deutlicher Hinweis auf die Ähnlichkeit der MYCN regulierten mRNAs in murinen und humanen Tumoren.

Die Regulation einzelner mRNAs der MYCN Signatur⁷⁸ und weiterer bekannter Ziele von MYCN in Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells wurden im Folgenden mit humanen Neuroblastomen verglichen:

Cyclin-abhängige Kinase 4 (*Cdk4*) wird während der G1-Phase des Zellzyklus von Cyclinen des Types D aktiviert. Molenaar *et al.* zeigen, dass die hohe Expression von *CDK4* mit schlechterem Überleben von Neuroblastompatienten korreliert. Außerdem ist *CDK4* sowohl in Tumoren als auch Zelllinien im Vergleich zu verschiedenen nicht-malignen Geweben hoch exprimiert. Die Herunterregulation von *CDK4* in humanen Zelllinien führt sowohl zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus als auch zur Induktion neuraler Differenzierung^{151,152}. Die erhöhte Expression von *Cdk4* in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren könnte malignen Zellen den Durchgang durch die G1-Phase erleichtern.

Das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2C (*Ube2c*) spielt bei der Degradation von mitotischen Cyclinen und dem Ablauf des Zellzyklus eine Rolle¹⁵³. In Gliomzellen führt eine Herunterregulation von *UBE2C* zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M Phase und zu Apoptose¹⁵⁴. In den humanen Neuroblastomzellen SHEP und SK-N-BE(2)-C wird *UBE2C* eine wichtige Rolle in der Mitose zugeschrieben, wie ein siRNA Screening aufdeckte¹⁰¹. *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumore zeigten eine Hochregulation von *Ube2c*.

MYCN-amplifizierte humane Neuroblastome exprimieren signifikant höhere Mengen an Laktat-Dehydrogenase (*LDH*) im Vergleich zu Tumoren mit nur einer MYCN Kopie. Die Herunterregulation von *LDH* in den beiden MYCN-amplifizierten Neuroblastomzelllinien LAN5 und Kelly reduziert deren Proliferation. Außerdem verlieren Kelly Zellen bei komplettem Verlust von *LDH* ihre Tumorigenität *in vivo*¹⁵⁵. *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumore exprimierten *LDH* im Vergleich zu nicht-malignen Nebennieren über.

Eine Überexpression von *Nme1* korreliert mit ungünstigem Stadium von Neuroblastompatienten. Eine Zunahme des *Nme1* Gens, das auf Chromosom 17q lokalisiert ist, tritt häufig in Neuroblastomen mit hohem Risiko auf¹⁵⁶. Außerdem ist das Expressionslevel von *Nme1* stark mit der Aggressivität MYCN-amplifizierter Neuroblastome assoziiert¹⁰². Die Hochregulation von *Nme1* mRNA in LSL-MYCN;*Dbh-iCre* Tumoren wurde parallel zur Zunahme des Chromosoms 11, das ortholog zu humanem 17q ist, festgestellt.

Der Familie der RAS-Gene werden in verschiedenen Tumorentitäten onkogene Funktionen zugeschrieben¹⁵⁷. Einer der drei Hauptvertreter dieser Familie ist NRAS, das ursprünglich aus einem humanen Neuroblastom isoliert wurde¹⁵⁸. In Neuroblastomzellen mit hoher Malignität wird *NRAS* höher exprimiert als in denen mit niedrigerer Malignität¹⁰⁰. In Tumoren des LSL-MYCN;*Dbh-iCre* Modells war *Nras* ebenfalls erhöht.

Schulte *et al.* beschreiben, dass *KDM1A* in undifferenzierten Neuroblastomen hochreguliert ist. Außerdem regulieren differenzierende Neuroblastomzelllinien *KDM1A* herunter und die Herunterregulation von *KDM1A* mittels siRNA führt zur Wachstumsinhibition *in vitro*³⁵. Sowohl LSL-MYCN;*Dbh-iCre* als auch *TH-MYCN* Tumore weisen im Vergleich zu nicht-malignen Nebennieren eine signifikante Überexpression von *Kdm1a* mRNA auf.

LSL-MYCN;*Dbh-iCre* Tumoren exprimieren Spermidin Synthase (SRM) über. Die Expression dieses Enzyms korreliert stark mit der Expression von MYCN in humanen Neuroblastomen¹⁰³.

Weitere Gene, die im LSL-MYCN;*Dbh-iCre* Modell reguliert wurden, wurden mit einer Internet-Datenbank Myc-regulierter Gene verglichen (www.myc-cancer-gene.org), wobei validiert werden konnte, dass diverse Ziele von MYC, die im humanen Organismus reguliert werden, auch im murinen einer Regulation unterliegen.

Einzelne mRNAs, die im murinen System anders reguliert waren, als im humanen Neuroblastom, wurden ebenfalls detektiert, wodurch der Unterschied zwischen den beiden Spezies deutlich wird. Verschiedene epigenetische Regulationsmechanismen und verschiedene Signalwege könnten hier eine Begründung sein.

5.1.3.3 Vergleich der Genregulationen von Tumoren aus LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen mit humanen und anderen murinen Neuroblastomen auf miRNA Ebene

Mittels miRNA Profiling von fünf nicht-malignen Nebennieren und elf Tumoren aus LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen wurden im Modell regulierte miRNAs identifiziert.

Anhand einer Clusteranalyse der Gene, die in einer publizierten MYCN miRNA Signatur aufgedeckt wurden⁸⁰, konnten Tumore des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells eindeutig von nicht-malignen Nebennieren separiert werden, ein deutlicher Hinweis auf die Ähnlichkeit der MYCN regulierten miRNAs in murinen und humanen Tumoren.

Die Regulation einzelner mRNAs der MYCN miRNA Signatur⁸⁰ und weiterer bekannter miRNA Ziele von MYCN in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells wurden im Folgenden mit humanen Neuroblastomen verglichen:

Tumore aus LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen wiesen eine erhöhte Expression des miR-17-92 Clusters auf. Für das humane Neuroblastom ist bekannt, dass dieses von c-MYC und MYCN induzierte, onkogene Cluster, Targets mit Schlüsselrollen in der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose reguliert¹⁵⁹, wie zum Beispiel Bim⁵⁹, E2F1¹⁵⁹, p21⁵⁹ und TGFβ⁶¹. Für TH-MYCN Tumore ist die Hochregulation verschiedener miRNAs des miR-17-92 Clusters ebenfalls beschrieben¹⁶⁰.

Im Vergleich zu Neuroblastomen mit günstigem Verlauf, überexprimieren sowohl Tumore mit ungünstigem Verlauf als auch Tumore mit MYCN Amplifikation das onkogene miR-181 Cluster^{80,110,112}. Mestdagh *et al.* zeigen, dass miR-181a zwar in MYCN-amplifizierten, aber nicht in Tumoren mit einzelner MYCN Kopie hochreguliert ist und dass MYCN direkt an den Promotor von miR-181a bindet⁸⁰. Auch in LSL-MYCN;Dbh-iCre Tumoren war miR-181a überexprimiert.

Die miR-184 ist herunterreguliert in MYCN-amplifizierten Tumoren im Vergleich zu Tumoren mit nur einer Kopie von MYCN¹¹². In den humanen Neuroblastomzelllinien Kelly und SK-N-AS korreliert eine ektopische Expression von miR-184 mit der Inhibition des Überlebens und der Herunterregulation von AKT2, einem Mitglied des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweges, das eine wichtige Rolle für das Überleben von verschiedenen Tumorzellen spielt. Eine Überexpression von MYCN führt zur Herunterregulation der tumorsuppressiven miR-184^{112,113,161}. Auch Tumore des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells wiesen eine Herunterregulation von miR-184 auf, die vermutlich auf die Überexpression von MYCN zurückzuführen ist.

Eine niedrige Expression von miR-340 ist signifikant mit *MYCN* Amplifikation, schlechtem Ereignis-freiem und Gesamtüberleben korreliert. Außerdem führt die Expression von miR-340 in den humanen Neuroblastomzelllinien SK-N-BE, SH-SY5Y und Kelly zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität^{80,115}. Tumore aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen zeigten ebenfalls eine gesteigerte Expression von miR-340.

Schulte *et al.* beschreiben eine signifikante Korrelation von niedriger miR-542-5p Expression und hohem Stadium in primären Neuroblastomen. Des Weiteren zeigen sie eine Assoziation von Patienten, die einen Rückfall erleiden oder eine *MYCN* Amplifikation haben und niedrigerer Expression dieser miRNA⁶⁷. Sowohl miR-542-5p als auch miR-542-3p waren in *LSL-MYCN;Dbh-iCre* und *TH-MYCN* Tumoren signifikant herunterreguliert.

Sowohl miR-26a und miR-26b als auch miR-30a, miR-30d und miR-30e und miR-328 waren in Tumoren aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen niedriger exprimiert als in nicht-malignen Nebennieren. Eine Funktion dieser miRNAs in humanen oder *TH-MYCN* Tumoren ist zwar noch nicht beschrieben worden, aber sowohl in *MYCN*-amplifizierten humanen Neuroblastomen als auch in murinen Tumoren sind sie herunterreguliert^{80,160}.

Weitere miRNAs, die sowohl in humanen Neuroblastomen mit *MYCN* Amplifikation als auch in Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells gleich reguliert werden, sind miR-15b, miR-30c, miR-103, miR-140, miR-148a, miR-326, miR-491, miR-500 und miR-615⁸⁰. Funktionen dieser miRNAs im Neuroblastom sind bisher jedoch nicht bekannt.

Sowohl miR-149, miR-214 und miR-324-5p als auch miR-331 und miR-488 sind in Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells und humanen Neuroblastomen verschieden reguliert. Während humane Neuroblastome mit ungünstiger Prognose eine niedrigere miR-149 und miR-324-5p Expression aufweisen als die mit günstiger Prognose^{110,112}, exprimieren Tumore des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells diese miRNAs über. Tumore mit *MYCN* Amplifikation bzw. ungünstiger Prognose exprimieren miR-214 über, was vermutlich auf die direkte Bindung von *MYCN* an den Promotor der miRNA beruht⁸⁰, während Tumore der *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Maus eine Herunterregulation dieser miRNA aufweisen. Humane Neuroblastome mit ungünstigem Verlauf exprimieren im Vergleich zu denen mit günstigem Verlauf niedrige Level der miRNAs miR-331-3p und miR-488-p¹¹⁰, während Tumore aus *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mäusen beide miRNAs überexprimieren.

Aus der Analyse der in Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells regulierten mRNA und miRNA lässt sich zusammenfassen, dass ein großer Teil der im Modell regulierten mRNAs und miRNAs Targets von MYC(N) sind und dass diverse mRNAs und miRNAs im *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modell ähnlich reguliert sind wie im humanen Neuroblastom. Jedoch wurden auch mRNAs und miRNAs gefunden, die im murinen System anders reguliert waren, als im humanen Neuroblastom, woran der Unterschied zwischen den Spezies erkennbar wird. Eine weiter mögliche Begründung dafür könnte sein, dass sich die miRNA-Bindestellen mancher mRNAs zwischen den Spezies unterscheiden (www.targets.org), was zu verschiedenen Regulationen führt.

Eine vollständige Übertragung von Erkenntnissen sowohl auf der Ebene chromosomaler Aberrationen als auch auf mRNA und miRNA Level, die im *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modell gewonnen werden, auf das humane Neuroblastom ist demnach, wie in jedem anderen Mausmodell auch, nicht möglich. Jedoch kann das *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodell genutzt werden, um neue potentiell tumormodulierende mRNAs und miRNAs zu identifizieren. Ob diese auch bei der humanen Erkrankung eine Rolle spielen, muss dann weiter analysiert werden.

5.1.4 Mögliche Weiterentwicklungen des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells, die neue Erkenntnisse für die Forschung am humanen Neuroblastom geben könnten

Eine interessante Fragestellung betreffend der Neuroblastomentwicklung des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells, ist die nach der Zeitspanne, in der das Transgen exprimiert werden muss, damit es die Entstehung eines Tumors vermittelt. Dazu soll in späteren Versuchen die Verpaarung der *LSL-MYCN* Maus mit einer induzierbaren *Dbh-iCre* Maus durchgeführt werden. Stubbusch *et al.* generierten 2011 das Mausmodell *Dbh-CT*, dessen Cre-Rekombinase-Aktivität abhängig von einer Behandlung mit Tamoxifen ist. Wie bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modell von Stanke *et al.*⁴⁰ steht die Cre-Rekombinase-Expression unter Kontrolle des *Dbh*-Promotors, jedoch handelt es sich um eine inaktive Form der Rekombinase, die nur in Anwesenheit von Tamoxifen aktiviert wird¹⁶². Mittels einer Tamoxifen-Behandlung doppelt-transgener *LSL-MYCN;Dbh-CT* Mäuse während ihrer Entwicklung und zu verschiedenen Zeitpunkten ihres Lebens soll die Zeitspanne detektiert werden, während der eine *MYCN* Überexpression die Entwicklung eines Neuroblastoms vermittelt. Eine Übertragung auf den menschlichen

Organismus könnte weitere Einblicke in die Entstehung des humanen Neuroblastoms gewähren.

Anhand des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodells, dessen Tumore sich sowohl in ihren chromosomalen Aberrationen als auch ihren miRNA und mRNA Regulationen humanen Neuroblastomen ähneln, können neue potentielle Targets einer medikamentösen Therapie gefunden und getestet werden. Die Reaktion der Tumore auf die Behandlung mit noch nicht etablierten Medikamenten kann wichtige Aufschlüsse auf die humane Therapierelevanz der Mittel geben.

Ein weiterer interessanter Versuchsansatz ist die Verkreuzung mit anderen transgenen Mausmodellen, die potentiell für die Neuroblastomgenese relevante Gene regulieren. Unsere Arbeitsgruppe publizierte 2012 das shLsd1-Mausmodell, das Doxycyclin-abhängig eine shRNA gegen *Lsd1* (*Kdm1a*) exprimiert, die *Kdm1a* spezifisch herunterreguliert¹⁶³. Die Verpaarung dieses Modells mit der *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Maus und die Induktion des *Kdm1a* Knockdowns könnte ein interessanter Ansatz zur Untersuchung der Rolle von *Kdm1a* bei der Tumorgenese des Neuroblastoms sein. Es wird vermutet, dass der Knockdown von *Kdm1a*, aufgrund seiner onkogenen Funktion^{35,118}, das Wachstum der *MYCN*-vermittelten murinen Neuroblastome verlangsamt. Weiterhin könnte der Vergleich der molekularen Eigenschaften von Doxycyclin-behandelten und nicht-behandelten Tumoren neue Einblicke in den Signalweg von *Kdm1a* geben.

Auch die Verkreuzung mit Mausmodellen, die miRNAs regulieren, ist ein interessanter Versuchsansatz. Eine miR-17-92-Maus, die die miRNAs dieses Clusters Cre-abhängig deletiert¹⁶⁴, steht unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung. Eine Herunterregulation dieses Clusters in den Zellen des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells, die humanes *MYCN* exprimieren, könnte die Tumorgenese verlangsamen oder sogar unterbinden, schließlich wird diesen onkogenen miRNAs eine wichtige Funktion im Neuroblastom zugeschrieben^{59,61}. Weiterhin könnten unbekannte Targets der miRNAs dieses Clusters anhand von Exon-Arrays entdeckt werden, die nicht nur im Mausmodell sondern auch im humanen Neuroblastom eine Rolle bei der Funktion dieser miRNAs spielen könnten.

Die Etablierung einer Zelllinie aus Tumoren des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells kann von großer Bedeutung für die Arbeit mit diesem Modell sein. Potentiell wirksame Medikamente könnten vor dem *in vivo* Experiment an den Zellen *in vitro* getestet werden, wodurch Tierexperimente eingeschränkt würden. Im Verlauf dieser Arbeit ist es nicht gelungen eine Zelllinie des *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Modells zu etablieren.

5.1.5 Die Relevanz des *LSL-MYCN* Mausmodells für die Genese anderer Tumorentitäten

Neben der Verpaarung mit der *Dbh-iCre* Maus, wurden *LSL-MYCN* Tiere mit *Alb-iCre* Mäusen gekreuzt. Doppelt-transgene Nachkommen entwickelten im Alter von 246-286 Tagen mit einer Inzidenz von 86% Tumore, die pathologisch als Leberzellkarzinome beschrieben wurden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression von humanem *MYCN* in spezifischen Geweben die Entwicklung von weiteren Tumormodellen treiben kann. Besonders für Tumorentitäten, für die noch keine passenden Mausmodelle existieren, wäre dies ein interessanter Aspekt für die Forschung.

5.2 Tumorsuppressive miRNAs im Neuroblastom

In verschiedenen Krebsformen wurden sowohl miRNAs entdeckt, die überexprimiert sind und als onkogene Regulatoren fungieren als auch miRNAs, die herunterreguliert sind und als Tumorsuppressoren agieren^{53,57,165,166}. Auch im Neuroblastom sind miRNAs beschrieben, die onkogene oder tumorsuppressive Funktionen aufweisen^{65,167}. Die Expression einiger miRNAs ist in verschiedenen Neuroblastom Subtypen unterschiedlich reguliert und auf Basis der Expressionsmuster dieser miRNAs ist es möglich die verschiedenen Subgruppen zu identifizieren^{67,112,116}. Demnach könnten miRNAs sowohl als prognostische Marker eingesetzt werden, als auch ist eine miRNA gerichtete Therapie, die, im Fall von tumorsuppressiven miRNAs, deren Expression erhöht oder, im Fall von onkogenen miRNAs, deren Expression hemmt, denkbar¹¹⁶.

Im Vergleich zur klassischen Chemotherapie, kann eine zielgerichtete Therapie die Möglichkeit geben spezifisch gegen Subpopulationen von Zellen vorzugehen und damit die toxischen Wirkungen gegen den Gesamtorganismus einzuschränken¹⁶⁸. Demnach sind Wirkstoffe mit hoher Affinität und Spezifität von großer Bedeutung¹⁶⁹. Wirkstoffe mit derartig spezifischer Wirkung bringen jedoch häufig Rückfälle und Resistenzen mit sich, da alternative Signalwege aktiviert werden¹⁷⁰. MiRNA-basierte Therapien reduzieren mit großer Wahrscheinlichkeit im Vergleich zu konventionalen und zielgerichteten Medikamenten die Entwicklung von Resistenzen¹⁷¹. Verschiedene Publikationen beschreiben die Möglichkeit einer *in vivo* Behandlung mit miRNA-Inhibitoren oder -Imitationen. Die intratumorale Injektion von miR-17-5p-Inhibitoren führt zu einer signifikanten Verzögerung des Wachstums eines Xenografts aus LAN-5 Zellen⁵⁹. Tivnan *et al.* demonstrieren, dass eine zielgerichtete Einbringung von miR-34a in Xenografts aus Neuroblastomzellen mittels GD2-konjugierten Nanopartikeln Apoptose einleitet und Angiogenese vermindert¹⁷². Aufgrund dieser Erkenntnisse kann es von großer Bedeutung sein, neue miRNAs zu identifizieren, die onkogene oder tumorsuppressive Funktionen für verschiedene Tumorentitäten haben.

5.2.1 Die tumorsuppressive Funktion von miR-542 im Neuroblastom

Aufgrund der niedrigen Expression von miR-542-3p in murinen Neuroblastomen des neuen *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Mausmodells wurde vermutet, dass miR-542-3p eine tumorsuppressive Funktion im Neuroblastom haben könnte. Eine signifikante Herunterregulation von miR-542-3p in humanen Neuroblastomen mit schlechter Prognose im Vergleich zu Tumoren mit guter Prognose bestätigte diese These.

Anhand von *in vitro* Analysen in etablierten Neuroblastomzelllinien wurde der Nachweis erbracht, dass eine exogene Expression von miR-542-3p sowohl Apoptose induziert als auch die Viabilität und Proliferation der Zellen reduziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser miRNA einen Arrest der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus mit sich bringt. Dahingegen resultierte die exogene Expression der 5p-Isoform der miR-542 nur bei einer der analysierten Zelllinien in einer Reduktion der Zellviabilität und -proliferation. Weder Apoptose noch ein Arrest im Zellzyklus wurde in den Zelllinien ausgelöst. Dieses Resultat unterstützt die Publikation von Bray *et al.*, dass miR-542-5p keinen Effekt auf die Proliferation der Neuroblastomzelllinien Kelly, NB1691 und SK-N-AS hat, aber sowohl in Kelly als auch in SK-N-AS Zellen zu einer verringerten Invasivität durch eine Matrigel-Matrix führt⁶⁸. Entgegen der allgemeinen Annahme, dass die 5p-Isoform von miRNAs diejenige ist, die den biologischen Effekt ausmacht, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass im Fall der miR-542 die 3p-Form als tumorsuppressiv fungiert, während die 5p-Form keinen eindeutigen Effekt zeigt^{51,52}.

Yoon *et al.* publizierten, dass miR-542-3p das vorhergesagte Target Survivin in A549 und MCF7 Zellen direkt herunterreguliert⁶⁹. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in primären humanen Neuroblastomen eine niedrige Expression von Survivin zum einen mit einer gesteigerten Expression von miR-542-3p und zum anderen einer besseren Prognose für den Patienten einhergeht, wobei die Korrelation mit der Prognose bekannt ist^{173,174}. Weiterhin war eine exogene Expression von miR-542-3p in Neuroblastomzelllinien mit einer Herunterregulation von Survivin korreliert. Außerdem führte dieser miR-542-3p-vermittelte Knockdown von Survivin zu einer Verminderung der Expression von AURKB, dem Komplexpartner von Survivin. Es ist bekannt, dass die Entfernung von Survivin mit Fehllokalisation und verminderter Aktivität von AURKB in Zusammenhang steht. Außerdem führt der Knockdown von Survivin zu Fehlern bei der Zytokinese, die auf die verminderte Aktivität von AURKB zurückgeführt werden¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Interessanterweise wird bei der durch die *Polo-like-Kinase 1*-vermittelten Phosphorylierung von Survivin zuerst Survivin und dann AURKB aktiviert¹⁷⁸. Wie schon für A549

Zellen publiziert⁶⁹, wurde anhand von Luziferase Reporter Assays eine direkte Bindung der miR-542-3p an die Wildtyp 3'UTR von *Survivin*, sowohl in für diesen Assay etablierten HEK-293 als auch in SHEP Zellen, nachgewiesen, während dieser Effekt mit einer mutierten Bindestelle nicht erreicht wurde.

In Neuroblastomzelllinien führte ein Knockdown von *Survivin* zu einer verminderten Zellviabilität und -proliferation, ein Effekt, der auch durch Expression von miR-542-3p erreicht wurde. Bei der Untersuchung des Zellzyklus reagierten drei von vier Zelllinien bei Knockdown von *Survivin* mit einem Arrest in der Phase S, während eine Zelllinie mit einem Arrest in der G2/M-Phase antwortete.

Die herausragende Bedeutung von *Survivin* für die tumorsuppressive Funktion der miR-542-3p im Neuroblastomzelllinien, konnte anhand eines Rettungsexperimentes bewiesen werden. Die Überexpression von *Survivin* cDNA ohne miR-542-3p-Bindestelle rettete die Neuroblastomzelllinie SHEP größtenteils vor dem Phänotyp der miR-542-3p Expression. Daraus lässt sich schließen, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Phänotyp der miR-542-3p Expression und der *Survivin* Regulation gibt. Jedoch ist es möglich, dass die Regulation von anderen Zielen dieser miRNA ebenfalls eine funktionelle Auswirkung auf den Phänotyp humaner Neuroblastomzellen haben könnte. In zusätzlichen Experimenten, die beim Verfassen dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen waren, sollten weitere von miR-542-3p regulierte Targets gefunden werden. Dazu werden mRNA-Expressionsprofile von mit Negativkontroll-miRNA oder miR-542-3p transfizierten Neuroblastomzelllinien miteinander verglichen. Weitere potentiell funktionelle Targets der miRNA, die dabei evtl. gefunden werden, sollen dann anhand von weiteren *in vitro* Studien validiert werden.

Transfektionsreagenzien werden benutzt, um miRNAs *in vitro* in Zellen einzubringen. Für eine Behandlung *in vivo* müssen miRNAs vor ihrem Abbau durch Nukleasen geschützt werden. Die Arbeitsgruppe Epple an der Universität Duisburg-Essen entwickelte Calcium-Phosphat-Nanopartikel, mit deren Hilfe sie siRNAs *in vitro* in Zellen einbringen konnten, was zu einer Herunterregulation des siRNA Targets führte⁸⁴. Dabei werden mit siRNA-beladene Calcium-Phosphat-Nanopartikel durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Im Zytoplasma schützt der Nanopartikel die Nukleinsäure vor ihrem Abbau. Es ist bekannt, dass das Eindringen der Nukleinsäure in den Zellkern über Kernporenkomplexe vermittelt wird, aber es ist noch unklar, ob der Nanopartikel diesen Weg ebenfalls nimmt oder im Zytoplasma verbleibt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit miRNA-beladene Calcium-Phosphat-Nanopartikel für die Untersuchung der tumorsuppressiven

Funktion von miR-542-3p *in vivo* verwendet werden. Zuerst wurde deren Funktionalität *in vitro* an WACII Zellen validiert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reagierten mit Negativkontroll-miRNA beladenen Nanopartikeln behandelte Zellen mit einer tendenziellen, aber nicht signifikanten Reduktion von Zellviabilität sowie -proliferation und mit einer signifikanten Induktion von Apoptose. Demnach schienen die verwendeten Calcium-Phosphat-Nanopartikel allgemein einen toxischen Effekt auf WACII Zellen zu induzieren. Eine Toxizität auf die Zellviabilität ist in HeLa Zellen nicht bekannt¹⁷⁹. Aufgrund der apoptotischen Wirkung von PEI auf verschiedene humane Zelllinien^{180,181}, wurde vermutet, dass auch in WACII Zellen das in den Nanopartikeln vorhandene PEI deren Toxizität ausmacht. Trotzdem induzierte eine Behandlung von WACII Zellen mit miR-542-3p beladenen Nanopartikeln im Vergleich zu unbehandelten und mit Negativkontroll-miRNA behandelten Zellen signifikant sowohl eine Reduktion der Zellviabilität und -proliferation als auch eine Steigerung der Apoptose. Auf Basis dieser Tatsache und des Nachweises, dass miR-542-3p-beladene Nanopartikel die Survivin Protein Expression in WACII Zellen reduzieren, wurde die Spezifität der mit miR-542-3p-beladenen Nanopartikel bestätigt. Weiterhin wurden Neuroblastom-Xenografts-tragende Mäuse mit miR-542-3p beladenen Nanopartikeln über zwei Tage behandelt. Sowohl eine erhöhte Expression von miR-542-3p als auch eine Reduktion von Survivin Protein konnte in den Tumoren aus mit miR-542-3p behandelten Mäusen im Vergleich zu den mit Negativkontroll-miRNA behandelten validiert werden, was die Spezifität der Nanopartikel auch *in vivo* bestätigte. Die signifikante Reduktion von Proliferation und Induktion von Apoptose in diesen Tumoren wies darauf hin, dass der miR-542-3p-vermittelte Knockdown von Survivin auch *in vivo* funktionell war. Die Produktion von miRNA-beladenen Nanopartikeln ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch ineffektiv, weshalb eine Langzeitstudie zum Effekt der Behandlung auf die Volumenveränderung der Tumore im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnte.

Aufgrund der hohen Überexpression von Survivin in verschiedenen Tumorentitäten und der niedrigen Expression in normalen Geweben wird Survivin sowohl als Tumormarker als auch als Target für die Neuroblastomtherapie diskutiert^{182,183}. Verschiedene Gruppen beschreiben Medikamente, die die Expression von Survivin in Neuroblastomzellen reduzieren. Demnach ist die proapoptotische Antwort der Neuroblastomzelllinien SK-SY5Y und LA1-5S auf Noscipine vermittelt durch die Unterdrückung der Survivin Protein Expression¹⁸⁴. Interessanterweise potenziert ein Survivin Knockdown in SK-N-BE2 und SH-SY5Y Zellen den Effekt von Epigallocatechingallat¹⁸⁵, einem

Carbonsäureester der Gallussäure, der in grünem Tee vorkommt und dem apoptotische Wirkung in verschiedenen neuroektodermalen Tumoren nachgewiesen wurde¹⁸⁶. Da ein direkter Knockdown von Survivin *in vivo* nicht ausführbar ist, könnte hier eine Kombination aus miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln und Epigallocatechingallat getestet werden. YM155, ein nieder-molekulares Präparat zur Repression von Survivin, wurde 2007 von Nakahara *et al.* beschrieben. Die Substanz supprimiert die Expression von Survivin, induziert Apoptose von Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und PPC-1 *in vitro* und induziert Tumor-Regression von Xenografts aus PC-3 Zellen¹⁸⁷. Lamers *et al.* untersuchten die Effizienz von YM155 in 23 Neuroblastomzelllinien, die auf einen shRNA-vermittelten Knockdown von *Survivin* mit massiver Apoptose reagierten. Neun Zelllinien wiesen eine Resistenz gegen YM155 auf, die mit hoher Expression des *Multidrug-Resistance* Protein 1 (MDR1) korrelierte⁷⁴. Unter den resistenten Zelllinien befindet sich unter anderen SK-N-BE, die wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, auf die miR-542-3p-vermittelte Repression von Survivin sehr effizient reagiert. In weiteren Studien sollte die Effektivität der miR-542-3p Expression auf weitere Neuroblastomzelllinien getestet werden, da vermutet wird, dass der tumorsuppressive Effekt der miRNA nicht durch Resistenzentwicklung aufgehoben werden kann.

Sobald die Effizienz der Nanopartikelherstellung erweitert und damit effektiver ist, könnte eine Nanopartikel-basierte Therapie mit ausgewählten miRNAs, wie der miR-542-3p, in Zukunft ein neuer Ansatz für die Behandlung humaner Neuroblastome und anderer Tumorentitäten sein.

5.2.2 Die tumorsuppressive Funktion von miR-137 im humanen Neuroblastom¹¹⁸

Sowohl im neuen *LSL-MYCN;Dbh-iCre* als auch im etablierten *TH-MYCN* Mausmodell für das Neuroblastom war *Kdm1a* im Vergleich zu nicht-malignen Nebennieren signifikant hochreguliert. Auf Basis dieser Erkenntnis wurde *KDM1A* als potentiell Ziel einer Neuroblastomtherapie gehandelt. In verschiedenen Tumorentitäten wie Brustkrebs³³, kleinzelligem Lungenkarzinom, Kolorektal-, Blasen- und Prostatakrebs¹⁸⁸ ist *KDM1A* überexprimiert. Auch im humanen Neuroblastom ist eine erhöhte Expression im Vergleich von undifferenzierten zu differenzierten Tumoren bekannt³⁵. Weiterhin ist *KDM1A* innerhalb der neuroblastischen Tumore im Neuroblastom höher exprimiert als im gutartigen Glanglioneuroblastom¹⁸⁹. Die Effektivität verschiedener nieder-molekularer Inhibitoren gegen Monoaminoxidasen wurden auf ihre Wirkung gegen *KDM1A* in Neuroblastomzelllinien SHEP, SH-SY5Y und LAN-1 getestet, jedoch war ein Effekt auf die Viabilität der Zellen nur *in vitro*, nicht aber im *in vivo* Xenograft-Modell nachweisbar³⁵. Die Entwicklung von neuen spezifischen *KDM1A* Inhibitoren wird als *KDM1A*-gerichtete Therapie gegen das Neuroblastom diskutiert^{35,190}.

Eine mögliche Verminderung der *KDM1A* Expression könnte auch durch die Expression einer miRNA erreicht werden, die direkt an die 3'UTR von *KDM1A* bindet. Eine potentiell tumorsuppressive Funktion, die eine Bindestelle in der 3'UTR von humanem *KDM1A* aufweist, war miR-137. In murinen *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Tumoren war diese miRNA hochreguliert, was die These einer tumorsuppressiven miRNA nicht unterstützte. Am murinen *Kdm1a* befindet sich jedoch keine Bindestelle für diese miRNA (www.targetscan.org), weshalb diese Regulationsachse im murinen System keine Rolle spielt. Im humanen Neuroblastom wurde die Funktion von miR-137 im weiteren Verlauf der Analysen untersucht.

Eine niedrige Expression von miR-137 ging sowohl mit ungünstigem Verlauf als auch mit niedrigerem Überleben von Neuroblastompatienten einher. *In vitro* reduzierte die exogene Expression der miRNA sowohl Zellviabilität und -proliferation als auch induzierte sie Apoptose, Caspase 9 Aktivität sowie neuronale Differenzierung der Neuroblastomzelllinien IMR-32, SHEP und SK-N-BE. Weiterhin wurde *KDM1A* direkt durch die Expression miR-137 herunterreguliert, wodurch das *KDM1A* Ziel *TFPI2* ebenfalls reguliert wurde. Für miR-137 sind verschiedene mRNA Ziele vorhergesagt, weshalb sich die Frage stellte, welcher Teil des Effektes von miR-137 auf die Regulation von *KDM1A* zurück ging und welcher auf den Knockdown anderer miR-137 Ziele. Ein Rettungsexperiment zeigte, dass der Effekt der miR-137 Expression teilweise auf die Regulation von

KDM1A zurückzuführen war, jedoch andere Ziele der miRNA ebenfalls eine funktionelle Rolle spielen mussten. Weiterhin erklärte das Modell die phänotypischen Unterschiede zwischen der Expression von miR-137 und des Knockdown von KDM1A mittels siRNA, wie zum Beispiel die Einleitung von Apoptose oder der Block der Proliferation in IMR-32 Zellen.

Anhand der durchgeführten Proteomanalyse wurde AKAP2 als weiteres potentiell funktionelles Target der miR-137 gefunden. Dieses Protein, welches vier Bindestellen für miR-137 aufweist, separiert die Prognose von Neuroblastompatienten anhand seiner Expression in den Tumoren, was eine onkogene Funktion vermutet lässt. Der Knockdown von AKAP2 mittels siRNA kopierte den Phänotyp der miR-137 Expression. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der miR-137-vermittelten Regulation von AKAP2 nicht weiter untersucht und die direkte Bindung der miRNA an die vorhergesagten Bindestellen bisher nicht validiert. In weiteren Experimenten sollte AKAP2 als potentiell funktionelles Target der miR-137 näher untersucht werden. Bis zu diesem Zeitpunkt ist noch keine Funktion von AKAP2 in Krebserkrankungen beschrieben.

Interessanterweise ist KDM1A auch in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und interagiert hier mit dem Transkriptionsfaktor NR2E1. Dieser nukleare Rezeptor wird ausschließlich im embryonalen Neuroepithelium exprimiert und reguliert hier die Expression von miR-137. KDM1A gilt als transkriptionaler Ko-Repressor von NR2E1 und eine erhöhte Expression von miR-137 in neuronalen Stammzellen führt zu reduzierter Proliferation und induziert neuronale Differenzierung¹⁹¹. Die Expression von miR-137 ist im Glioblastom signifikant niedriger als im Gehirn und in neuronalen Stammzellen. Weiterhin unterstützt eine Überexpression der miRNA neuronale Differenzierung in Glioblastomzellen. In diesen Zellen wird ein weiteres Zielgen der miR-137, nämlich *RTVP-1*, beschrieben, das direkt von miR-137 gebunden wird und dessen Herunterregulation tumorsuppressive Wirkung hat¹⁹². Li *et al.* demonstrierten, dass die Expression von miR-137 das Zellwachstum sowie die Invasion der Glioblastomzellen U87 und U373 inhibiert und die Expression von CSE1L, einem weiteren vorhergesagten Target dieser miRNA, reguliert¹⁹³. Weiterhin supprimiert miR-137 die Invasion von Kolorektalkarzinomzellen durch die direkte Bindung an *FMNL2*¹²⁰. Andersrum führt die Suppression von miR-137 in Kolorektalkarzinomzellen zu einer Überexpression von Paxillin (*PXN*) und zur Inhibition der Proliferation, Migration und Invasion der Zellen¹¹⁹. In Brustkrebszellen ist die

Expression von miR-137 invers mit der von YB-1 korreliert, einem weiteren Target dieser miRNA¹⁹⁴. Sowohl *CDC42* als auch *CDK6* sind beschriebene Targets von miR-137 in Lungenkrebszellen, deren Proliferation durch die Expression von miR-137 inhibiert wird¹²¹. Diese und weitere Publikationen unterstützen die These einer tumorsuppressiven Funktion von miR-137 in verschiedenen Tumorentitäten, die in dieser Arbeit anhand des Neuroblastoms gezeigt wurde. Die beschriebenen Targets der miRNA könnten auch im humanen Neuroblastom die tumorsuppressive Funktion von miR-137 weiter erklären.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Neuroblastom ist der häufigste solide Tumor des Kindesalters und verantwortlich für ca. 15% aller pädiatrisch-onkologischen Todesfälle. Eine Amplifikation des Onkogens *MYCN*, durch welche die prognostisch ungünstigste Patientengruppe definiert ist, liegt in 20% aller Neuroblastome vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Cre-konditionales *MYCN*-vermitteltes Mausmodell (LSL-*MYCN*) entwickelt. Durch die Kreuzung mit *Dbh-iCre* Mäusen wurde die Expression des *MYCN* Transgens auf Dopamin- β -Hydroxylase exprimierende Zellen beschränkt, was zur Entwicklung von Tumoren der Nebennieren, der oberen Zervikalganglien und des *Ganglion coeliacum* führte. Die Tumore wiesen sowohl die für das Neuroblastom spezifischen kleinen, blauen und runden Zellen als auch neurosekretorische Vesikel auf. Weiterhin konnte eine signifikante Überexpression von humanem *MYCN* und spezifischer Neuroblastommarker detektiert werden. Genomische Aberrationen sowie mRNA und mikroRNA (miRNA) Expressions-Profile entsprachen denen humaner Neuroblastome.

MiRNAs sind kurze, nicht-kodierende RNA Moleküle, die durch Bindung an mRNAs deren Stabilität und Translation regulieren. Die Bedeutung von miRNAs in der Tumorbologie ergibt sich aus der Regulation von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. In humanen primären Neuroblastomen war die niedrige Expression der miRNAs miR-542-3p und miR-137 mit ungünstiger Prognose assoziiert und eine Herunterregulation von miR-542-3p konnte auch in Tumoren des LSL-*MYCN*; *Dbh-iCre* Modells beobachtet werden. Die Funktion beider miRNAs wurde *in vitro* in präklinischen Modellsystemen des humanen Neuroblastoms detailliert untersucht. Die ektope Expression der miRNAs reduzierte die Zellviabilität und Proliferation, erhöhte die Apoptoserate und induzierte einen Zellzyklusarrest. Weiterhin wurde die direkte Bindung der vorhergesagten Ziel-mRNAs *KDM1A* (miR-137) und *Survivin* (miR-542-3p) mittels Luziferase Reporter Analysen validiert und die Regulation sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene verifiziert. Die Herunterregulation der Zielgene in Neuroblastomzellen stellte eine Phänokopie der Effekte einer exogenen Expression der jeweiligen miRNA dar. Die Spezifität der miRNA-vermittelten Regulation wurde durch ektope Expression des Zielgens mit mutierter miRNA-Bindestelle nachgewiesen. Eine Therapiesimulation in Neuroblastom-Xenografts mit miR-542-3p-beladenen Nanopartikeln zeigte sowohl eine Herunterre-

gulation des Zielproteins Survivin als auch eine Reduktion der Proliferation und Erhöhung der Apoptoserate in den Tumorzellen.

Die Etablierung des neuen *LSL-MYCN;Dbh-iCre* Neuroblastom-Mausmodells kann dabei helfen sowohl die Pathogenese des Neuroblastoms besser zu verstehen als auch potentiell Neuroblastom-relevante Gene und miRNAs zu identifizieren. Eine Weiterentwicklung dieses Modells durch Kombination mit anderen Mausmodellen, die potentiell Neuroblastom-relevante Gene regulieren, könnte im Zusammenspiel mit neuen Behandlungsstrategien Einblicke in die Wirksamkeit von künftigen Neuroblastomtherapien geben. Die Behandlung humaner Neuroblastompatienten mit tumorsuppressiven miRNAs, wie miR-542-3p und miR-137, könnte ein möglicher Ansatz sein den aggressiven Verlauf dieser Erkrankung zu reduzieren.

7 Abstract

Neuroblastoma is a common solid tumor of infancy and accounts for more than 15% of pediatric cancer deaths. Amplification of *MYCN* oncogene defines the most aggressive subtype of neuroblastoma with poor prognosis. In the present study, a new Cre-conditional *MYCN*-driven transgenic mouse model was generated to analyse tumorigenesis *in vivo*. When targeting *MYCN* expression to the neural crest in transgenic LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre* mice, palpable tumors developed, which arose predominantly from both adrenals, but also from superior cervical ganglia and *ganglion coeliacum*. LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre*-induced tumors consisted of small round blue cells and possessed neurosecretory vesicles. Expression of human *MYCN* and specific neuroblastoma marker genes was high in tumors. Furthermore, murine neuroblastomas recapitulated genomic aberrations and *MYCN* mRNA as well as microRNA (miRNA) signatures described for human neuroblastoma. MiRNAs are small noncoding RNA molecules that bind target mRNAs resulting in translational repression or degradation of the mRNA. In cancer, they can act as tumor suppressors or oncogenes. In human primary neuroblastomas, low expression of miR-542-p and miR-137 was highly correlated with unfavourable prognosis and miR-542-3p was upregulated in murine LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre* tumors. Exogenous expression of these miRNAs in established neuroblastoma cell lines reduced viability and proliferation, increased apoptosis and induced cell cycle arrest. Furthermore, direct interaction between the predicted targets *survivin* (miR-542-3p) and *KDM1A* (miR-137) was validated by luciferase reporter assays and regulation was demonstrated on mRNA as well as protein level. Ectopic expression of miR-542-3p or miR-137 phenocopied the knock-down of respective targets. In addition, we were able to validate a direct interaction between miRNAs and their targets by performing rescue experiments. Treatment of mice bearing neuroblastoma xenografts with miR-542-3p-loaded nanoparticles resulted in downregulation of *survivin* and induced reduced tumor cell proliferation as well as increased apoptosis.

In conclusion, the novel LSL-*MYCN*;*Dbh-iCre* neuroblastoma mouse model contribute to a better understanding of *MYCN*-driven neuroblastoma and to identification of relevant genes and miRNAs. Combination with other transgenic models, regulating potential relevant genes, could provide new insights into neuroblastoma tumorigenesis. Restoring function of tumor suppressive miRNAs, such as miR-542-3p or miR-137, could represent a feasible approach to reduce neuroblastoma aggressiveness.

8 Literatur

- 1 Pizzo, P. & Poplack, D. *Principles and practice of pediatric oncology*. 6th ed. edn, (Lippincott Williams & Wilkins, 2011).
- 2 Schwab, M., Westermann, F., Hero, B. & Berthold, F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The lancet oncology* **4**, 472-480 (2003).
- 3 Matthay, K. K., George, R. E. & Yu, A. L. Promising therapeutic targets in neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 2740-2753, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1939 (2012).
- 4 Maris, J. M. Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **362**, 2202-2211, doi:10.1056/NEJMra0804577 (2010).
- 5 Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Barrett, A., Berthold, F., Castleberry, R. P. *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 Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V. *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).
- 7 (2004).
- 8 Spix, C., Pastore, G., Sankila, R., Stiller, C. A. & Steliarova-Foucher, E. Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European journal of cancer* **42**, 2081-2091, doi:10.1016/j.ejca.2006.05.008 (2006).
- 9 Ceschel, S., Casotto, V., Valsecchi, M. G., Tamaro, P., Jankovic, M. *et al.* Survival after relapse in children with solid tumors: a follow-up study from the Italian off-therapy registry. *Pediatric blood & cancer* **47**, 560-566, doi:10.1002/pbc.20726 (2006).
- 10 Simon, T., Berthold, F., Borkhardt, A., Kremens, B., De Carolis, B. *et al.* Treatment and outcomes of patients with relapsed, high-risk neuroblastoma: results of German trials. *Pediatric blood & cancer* **56**, 578-583, doi:10.1002/pbc.22693 (2011).
- 11 Cotterill, S. J., Pearson, A. D., Pritchard, J., Foot, A. B., Roald, B. *et al.* Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982-1992. *European journal of cancer* **36**, 901-908 (2000).
- 12 Hann, H. W., Evans, A. E., Siegel, S. E., Wong, K. Y., Sather, H. *et al.* Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. *Cancer research* **45**, 2843-2848 (1985).
- 13 Shuster, J. J., McWilliams, N. B., Castleberry, R., Nitschke, R., Smith, E. I. *et al.* Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive partitioning study. *American journal of clinical oncology* **15**, 295-303 (1992).
- 14 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).

- 15 Canete, A., Gerrard, M., Rubie, H., Castel, V., Di Cataldo, 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).
- 16 Pugh, T. J., Morozova, O., Attiyeh, E. F., Asgharzadeh, S., Wei, J. S. *et al.* The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nature genetics* **45**, 279-284, doi:10.1038/ng.2529 (2013).
- 17 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).
- 18 Shimada, H., Nakagawa, A., Peters, J., Wang, H., Wakamatsu, P. K. *et al.* TrkA expression in peripheral neuroblastic tumors: prognostic significance and biological relevance. *Cancer* **101**, 1873-1881, doi:10.1002/cncr.20557 (2004).
- 19 Nakagawara, A., Azar, C. G., Scavarda, N. J. & Brodeur, G. M. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Molecular and cellular biology* **14**, 759-767 (1994).
- 20 Chen, Y., Takita, J., Choi, Y. L., Kato, M., Ohira, M. *et al.* Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* **455**, 971-974, doi:10.1038/nature07399 (2008).
- 21 De Brouwer, S., De Preter, K., Kumps, C., Zabrocki, P., Porcu, M. *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).
- 22 Mosse, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A. *et al.* Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* **455**, 930-935, doi:10.1038/nature07261 (2008).
- 23 Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M., O'Neill, S., Pearson, A. D. *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).
- 24 Combaret, V., Brejon, S., Iacono, I., Schleiermacher, G., Pierron, G. *et al.* Determination of 17q gain in patients with neuroblastoma by analysis of circulating DNA. *Pediatric blood & cancer*, doi:10.1002/pbc.22816 (2011).
- 25 Islam, A., Handley, S. L., Thompson, K. S. & Akhtar, S. Studies on uptake, sub-cellular trafficking and efflux of antisense oligodeoxynucleotides in glioma cells using self-assembling cationic lipoplexes as delivery systems. *Journal of drug targeting* **7**, 373-382 (2000).
- 26 Lamers, F., van der Ploeg, I., Schild, L., Ebus, M. E., Koster, J. *et al.* Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. *Endocrine-related cancer* **18**, 657-668, doi:10.1530/ERC-11-0207 (2011).
- 27 Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H. & Earnshaw, W. C. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 789-803, doi:10.1038/nrm3474 (2012).
- 28 Altieri, D. C. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Current opinion in cell biology* **18**, 609-615, doi:10.1016/j.ceb.2006.08.015 (2006).

- 29 Xu, J. & Andreassi, M. Reversible histone methylation regulates brain gene expression and behavior. *Hormones and behavior* **59**, 383-392, doi:10.1016/j.yhbeh.2010.08.019 (2011).
- 30 Hu, X., Ybarra, R., Qiu, Y., Bungert, J. & Huang, S. Transcriptional regulation by TAL1: a link between epigenetic modifications and erythropoiesis. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* **4**, 357-361 (2009).
- 31 Huang, J., Sengupta, R., Espejo, A. B., Lee, M. G., Dorsey, J. A. *et al.* p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature* **449**, 105-108, doi:10.1038/nature06092 (2007).
- 32 Kontaki, H. & Talianidis, I. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Molecular cell* **39**, 152-160, doi:10.1016/j.molcel.2010.06.006 (2010).
- 33 Lim, S., Janzer, A., Becker, A., Zimmer, A., Schule, R. *et al.* Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis* **31**, 512-520, doi:10.1093/carcin/bgp324 (2010).
- 34 Magerl, C., Ellinger, J., Braunschweig, T., Kremmer, E., Koch, L. K. *et al.* H3K4 dimethylation in hepatocellular carcinoma is rare compared with other hepatobiliary and gastrointestinal carcinomas and correlates with expression of the methylase Ash2 and the demethylase LSD1. *Human pathology* **41**, 181-189, doi:10.1016/j.humpath.2009.08.007 (2010).
- 35 Schulte, J. H., Lim, S., Schramm, A., Friedrichs, N., Koster, J. *et al.* Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer research* **69**, 2065-2071, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1735 (2009).
- 36 Frese, K. K. & Tuveson, D. A. Maximizing mouse cancer models. *Nature reviews. Cancer* **7**, 645-658, doi:10.1038/nrc2192 (2007).
- 37 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).
- 38 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).
- 39 Berry, T., Luther, W., Bhatnagar, N., Jamin, Y., Poon, E. *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).
- 40 Stanke, M., Duong, C. V., Pape, M., Geissen, M., Burbach, G. *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).
- 41 Molenaar, J. J., Domingo-Fernandez, R., Ebus, M. E., Lindner, S., Koster, 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).
- 42 Heukamp, L. C., Thor, T., Schramm, A., De Preter, K., Kumps, C. *et al.* Targeted expression of mutated ALK induces neuroblastoma in transgenic mice. *Science translational medicine* **4**, 141ra191, doi:10.1126/scitranslmed.3003967 (2012).
- 43 Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004).
- 44 Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* **23**, 4051-4060, doi:10.1038/sj.emboj.7600385 (2004).

- 45 Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* **10**, 1957-1966, doi:10.1261/rna.7135204 (2004).
- 46 Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-419, doi:10.1038/nature01957 (2003).
- 47 Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* **18**, 3016-3027, doi:10.1101/gad.1262504 (2004).
- 48 Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* **10**, 185-191 (2004).
- 49 Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T. *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834-838, doi:10.1126/science.1062961 (2001).
- 50 Salzman, D. W., Shubert-Coleman, J. & Furneaux, H. P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *The Journal of biological chemistry* **282**, 32773-32779, doi:10.1074/jbc.M705054200 (2007).
- 51 Khvorovova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-216 (2003).
- 52 Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208 (2003).
- 53 Garzon, R., Calin, G. A. & Croce, C. M. MicroRNAs in Cancer. *Annual review of medicine* **60**, 167-179, doi:10.1146/annurev.med.59.053006.104707 (2009).
- 54 Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787-798 (2003).
- 55 Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P. *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell* **27**, 91-105, doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017 (2007).
- 56 Kedde, M., Strasser, M. J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J. A., Slanchev, K. *et al.* RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* **131**, 1273-1286, doi:10.1016/j.cell.2007.11.034 (2007).
- 57 Garzon, R. & Croce, C. M. MicroRNAs and cancer: introduction. *Seminars in oncology* **38**, 721-723, doi:10.1053/j.seminoncol.2011.08.008 (2011).
- 58 Miska, E. A. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Current opinion in genetics & development* **15**, 563-568, doi:10.1016/j.gde.2005.08.005 (2005).
- 59 Fontana, L., Fiori, M. E., Albini, S., Cifaldi, L., Giovinazzi, S. *et al.* Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PloS one* **3**, e2236, doi:10.1371/journal.pone.0002236 (2008).
- 60 De Preter, K., Mestdagh, P., Vermeulen, J., Zeka, F., Naranjo, A. *et al.* miRNA expression profiling enables risk stratification in archived and fresh neuroblastoma tumor samples. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 7684-7692, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0610 (2011).
- 61 Mestdagh, P., Bostrom, A. K., Impens, F., Fredlund, E., Van Peer, G. *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).

- 62 Cole, K. A., Attiyeh, E. F., Mosse, Y. P., Laquaglia, M. J., Diskin, S. J. *et al.* A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. *Molecular cancer research : MCR* **6**, 735-742, doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2102 (2008).
- 63 Welch, C., Chen, Y. & Stallings, R. L. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* **26**, 5017-5022, doi:10.1038/sj.onc.1210293 (2007).
- 64 Wei, J. S., Song, Y. K., Durinck, S., Chen, Q. R., Cheuk, A. T. *et al.* The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene* **27**, 5204-5213, doi:10.1038/onc.2008.154 (2008).
- 65 Stallings, R. L. MicroRNA involvement in the pathogenesis of neuroblastoma: potential for microRNA mediated therapeutics. *Current pharmaceutical design* **15**, 456-462 (2009).
- 66 Chen, Y., Tsai, Y. H. & Tseng, S. H. Inhibition of cyclin-dependent kinase 1-induced cell death in neuroblastoma cells through the microRNA-34a-MYCN-survivin pathway. *Surgery* **153**, 4-16, doi:10.1016/j.surg.2012.03.030 (2013).
- 67 Schulte, J. H., Schowe, B., Mestdagh, P., Kaderali, L., Kalaghatgi, P. *et al.* Accurate prediction of neuroblastoma outcome based on miRNA expression profiles. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **127**, 2374-2385, doi:10.1002/ijc.25436 (2010).
- 68 Bray, I., Tivnan, A., Bryan, K., Foley, N. H., Watters, K. M. *et al.* MicroRNA-542-5p as a novel tumor suppressor in neuroblastoma. *Cancer letters* **303**, 56-64, doi:10.1016/j.canlet.2011.01.016 (2011).
- 69 Yoon, S., Choi, Y. C., Lee, S., Jeong, Y., Yoon, J. *et al.* Induction of growth arrest by miR-542-3p that targets survivin. *FEBS letters* **584**, 4048-4052, doi:10.1016/j.febslet.2010.08.025 (2010).
- 70 Silber, J., Lim, D. A., Petritsch, C., Persson, A. I., Maunakea, A. K. *et al.* miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC medicine* **6**, 14, doi:10.1186/1741-7015-6-14 (2008).
- 71 Balaguer, F., Link, A., Lozano, J. J., Cuatrecasas, M., Nagasaka, T. *et al.* Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer research* **70**, 6609-6618, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0622 (2010).
- 72 Kozaki, K., Imoto, I., Mogi, S., Omura, K. & Inazawa, J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer research* **68**, 2094-2105, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5194 (2008).
- 73 Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
- 74 Lamers, F., Schild, L., Koster, J., Versteeg, R., Caron, H. N. *et al.* Targeted BIRC5 silencing using YM155 causes cell death in neuroblastoma cells with low ABCB1 expression. *European journal of cancer* **48**, 763-771, doi:10.1016/j.ejca.2011.10.012 (2012).
- 75 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
- 76 Menten, B., Pattyn, F., De Preter, K., Robbrecht, P., Michels, E. *et al.* arrayCGHbase: an analysis platform for comparative genomic hybridization microarrays. *BMC bioinformatics* **6**, 124, doi:10.1186/1471-2105-6-124 (2005).

- 77 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).
- 78 Fredlund, E., Ringner, M., Maris, J. M. & Pahlman, S. High Myc pathway activity and low stage of neuronal differentiation associate with poor outcome in neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14094-14099, doi:10.1073/pnas.0804455105 (2008).
- 79 Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F. *et al.* A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome biology* **10**, R64, doi:10.1186/gb-2009-10-6-r64 (2009).
- 80 Mestdagh, P., Fredlund, E., Pattyn, F., Schulte, J. H., Muth, D. *et al.* MYCN/c-MYC-induced microRNAs repress coding gene networks associated with poor outcome in MYCN/c-MYC-activated tumors. *Oncogene* **29**, 1394-1404, doi:10.1038/onc.2009.429 (2010).
- 81 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254 (1976).
- 82 Schagger, H. & von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* **166**, 368-379 (1987).
- 83 Burnette, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* **112**, 195-203 (1981).
- 84 Sokolova, V. V., Radtke, I., Heumann, R. & Epple, M. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. *Biomaterials* **27**, 3147-3153, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.12.030 (2006).
- 85 Sokolova, V., Knuschke, T., Kovtun, A., Buer, J., Epple, M. *et al.* The use of calcium phosphate nanoparticles encapsulating Toll-like receptor ligands and the antigen hemagglutinin to induce dendritic cell maturation and T cell activation. *Biomaterials* **31**, 5627-5633, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.067 (2010).
- 86 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55-63 (1983).
- 87 Liberzon, A., Subramanian, A., Pinchback, R., Thorvaldsdottir, H., Tamayo, P. *et al.* Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics* **27**, 1739-1740, doi:10.1093/bioinformatics/btr260 (2011).
- 88 Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Murray, B. A., Prediger, E. A., Brackenbury, R. *et al.* Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* **236**, 799-806 (1987).
- 89 Whiteford, C. C., Bilke, S., Greer, B. T., Chen, Q., Braunschweig, T. A. *et al.* Credentialing preclinical pediatric xenograft models using gene expression and tissue microarray analysis. *Cancer research* **67**, 32-40, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0610 (2007).
- 90 Yu, D., Cozma, D., Park, A. & Thomas-Tikhonenko, A. Functional validation of genes implicated in lymphomagenesis: an in vivo selection assay using a Myc-induced B-cell tumor. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1059**, 145-159, doi:10.1196/annals.1339.047 (2005).
- 91 Cairo, S., De Falco, F., Pizzo, M., Salomoni, P., Pandolfi, P. P. *et al.* PML interacts with Myc, and Myc target gene expression is altered in PML-null fibroblasts. *Oncogene* **24**, 2195-2203, doi:10.1038/sj.onc.1208338 (2005).

- 92 Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H. *et al.* The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic acids research* **29**, 397-406 (2001).
- 93 Zeller, K. I., Jegga, A. G., Aronow, B. J., O'Donnell, K. A. & Dang, C. V. An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome biology* **4**, R69, doi:10.1186/gb-2003-4-10-r69 (2003).
- 94 Lee, J. S., Chu, I. S., Mikaelyan, A., Calvisi, D. F., Heo, J. *et al.* Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nature genetics* **36**, 1306-1311, doi:10.1038/ng1481 (2004).
- 95 Kauffmann, A., Rosselli, F., Lazar, V., Winnepeninckx, V., Mansuet-Lupo, A. *et al.* High expression of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients. *Oncogene* **27**, 565-573, doi:10.1038/sj.onc.1210700 (2008).
- 96 Whitfield, M. L., Sherlock, G., Saldanha, A. J., Murray, J. I., Ball, C. A. *et al.* Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Molecular biology of the cell* **13**, 1977-2000, doi:10.1091/mbc.02-02-0030. (2002).
- 97 Eguchi, T., Takaki, T., Itadani, H. & Kotani, H. RB silencing compromises the DNA damage-induced G2/M checkpoint and causes deregulated expression of the ECT2 oncogene. *Oncogene* **26**, 509-520, doi:10.1038/sj.onc.1209810 (2007).
- 98 Georges, S. A., Biery, M. C., Kim, S. Y., Schelter, J. M., Guo, J. *et al.* Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215. *Cancer research* **68**, 10105-10112, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1846 (2008).
- 99 Le, M. T., Xie, H., Zhou, B., Chia, P. H., Rizk, P. *et al.* MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets. *Molecular and cellular biology* **29**, 5290-5305, doi:10.1128/MCB.01694-08 (2009).
- 100 Han, D., Spengler, B. A. & Ross, R. A. Increased wild-type N-ras activation by neurofibromin down-regulation increases human neuroblastoma stem cell malignancy. *Genes & cancer* **2**, 1034-1043, doi:10.1177/1947601912443127 (2011).
- 101 Batra, R., Harder, N., Gogolin, S., Diessl, N., Soons, Z. *et al.* Time-lapse imaging of neuroblastoma cells to determine cell fate upon gene knockdown. *PloS one* **7**, e50988, doi:10.1371/journal.pone.0050988 (2012).
- 102 Carotenuto, M., Pedone, E., Diana, D., de Antonellis, P., Dzeroski, S. *et al.* Neuroblastoma tumorigenesis is regulated through the Nm23-H1/h-Prune C-terminal interaction. *Scientific reports* **3**, 1351, doi:10.1038/srep01351 (2013).
- 103 Hogarty, M. D., Norris, M. D., Davis, K., Liu, X., Evageliou, N. F. *et al.* ODC1 is a critical determinant of MYCN oncogenesis and a therapeutic target in neuroblastoma. *Cancer research* **68**, 9735-9745, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6866 (2008).
- 104 Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S. *et al.* Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes & development* **17**, 1115-1129, doi:10.1101/gad.1067003 (2003).
- 105 Li, Z., Van Calcar, S., Qu, C., Cavenee, W. K., Zhang, M. Q. *et al.* A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8164-8169, doi:10.1073/pnas.1332764100 (2003).

- 106 Dauphinot, L., De Oliveira, C., Melot, T., Sevenet, N., Thomas, V. *et al.* Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* **20**, 3258-3265, doi:10.1038/sj.onc.1204437 (2001).
- 107 Gogolin, S., Ehemann, V., Becker, G., Brueckner, L. M., Dreidax, D. *et al.* CDK4 inhibition restores G(1)-S arrest in MYCN-amplified neuroblastoma cells in the context of doxorubicin-induced DNA damage. *Cell cycle* **12**, 1091-1104, doi:10.4161/cc.24091 (2013).
- 108 De Brouwer, S., Mestdagh, P., Lambertz, I., Pattyn, F., De Paepe, A. *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).
- 109 Haug, B. H., Henriksen, J. R., Buechner, J., Geerts, D., Tomte, E. *et al.* MYCN-regulated miRNA-92 inhibits secretion of the tumor suppressor DICKKOPF-3 (DKK3) in neuroblastoma. *Carcinogenesis* **32**, 1005-1012, doi:10.1093/carcin/bgr073 (2011).
- 110 Schulte, J. H., Marschall, T., Martin, M., Rosenstiel, P., Mestdagh, P. *et al.* Deep sequencing reveals differential expression of microRNAs in favorable versus unfavorable neuroblastoma. *Nucleic acids research* **38**, 5919-5928, doi:10.1093/nar/gkq342 (2010).
- 111 Annibali, D., Gioia, U., Savino, M., Laneve, P., Caffarelli, E. *et al.* A new module in neural differentiation control: two microRNAs upregulated by retinoic acid, miR-9 and -103, target the differentiation inhibitor ID2. *PloS one* **7**, e40269, doi:10.1371/journal.pone.0040269 (2012).
- 112 Chen, Y. & Stallings, R. L. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer research* **67**, 976-983, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3667 (2007).
- 113 Foley, N. H., Bray, I. M., Tivnan, A., Bryan, K., Murphy, D. M. *et al.* MicroRNA-184 inhibits neuroblastoma cell survival through targeting the serine/threonine kinase AKT2. *Molecular cancer* **9**, 83, doi:10.1186/1476-4598-9-83 (2010).
- 114 Chen, H., Shalom-Feuerstein, R., Riley, J., Zhang, S. D., Tucci, P. *et al.* miR-7 and miR-214 are specifically expressed during neuroblastoma differentiation, cortical development and embryonic stem cells differentiation, and control neurite outgrowth in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* **394**, 921-927, doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.076 (2010).
- 115 Das, S., Bryan, K., Buckley, P. G., Piskareva, O., Bray, I. M. *et al.* Modulation of neuroblastoma disease pathogenesis by an extensive network of epigenetically regulated microRNAs. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2012.311 (2012).
- 116 Bray, I., Bryan, K., Prenter, S., Buckley, P. G., Foley, N. H. *et al.* Widespread dysregulation of MiRNAs by MYCN amplification and chromosomal imbalances in neuroblastoma: association of miRNA expression with survival. *PloS one* **4**, e7850, doi:10.1371/journal.pone.0007850 (2009).
- 117 Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P. *et al.* miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature cell biology* **12**, 247-256, doi:10.1038/ncb2024 (2010).
- 118 Althoff, K., Beckers, A., Odersky, A., Mestdagh, P., Koster, J. *et al.* MiR-137 functions as a tumor suppressor in neuroblastoma by downregulating KDM1A. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, doi:10.1002/ijc.28091 (2013).

- 119 Chen, D. L., Wang, D. S., Wu, W. J., Zeng, Z. L., Luo, H. Y. *et al.* Overexpression of paxillin induced by miR-137 suppression promotes tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Carcinogenesis* **34**, 803-811, doi:10.1093/carcin/bgs400 (2013).
- 120 Liang, L., Li, X., Zhang, X., Lv, Z., He, G. *et al.* MicroRNA-137, an HMGA1 target, suppresses colorectal cancer cell invasion and metastasis in mice by directly targeting FMNL2. *Gastroenterology* **144**, 624-635 e624, doi:10.1053/j.gastro.2012.11.033 (2013).
- 121 Zhu, X., Li, Y., Shen, H., Li, H., Long, L. *et al.* miR-137 inhibits the proliferation of lung cancer cells by targeting Cdc42 and Cdk6. *FEBS letters* **587**, 73-81, doi:10.1016/j.febslet.2012.11.004 (2013).
- 122 Luo, C., Tetteh, P. W., Merz, P. R., Dickes, E., Abukiwan, A. *et al.* miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes. *The Journal of investigative dermatology* **133**, 768-775, doi:10.1038/jid.2012.357 (2013).
- 123 Zhao, Y., Li, Y., Lou, G., Zhao, L., Xu, Z. *et al.* MiR-137 targets estrogen-related receptor alpha and impairs the proliferative and migratory capacity of breast cancer cells. *PLoS one* **7**, e39102, doi:10.1371/journal.pone.0039102 (2012).
- 124 Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S. E. *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).
- 125 Hoyle, G. W., Mercer, E. H., Palmiter, R. D. & Brinster, R. L. Cell-specific expression from the human dopamine beta-hydroxylase promoter in transgenic mice is controlled via a combination of positive and negative regulatory elements. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **14**, 2455-2463 (1994).
- 126 Gilbert, J., Haber, M., Bordow, S. B., Marshall, G. M. & Norris, M. D. Use of tumor-specific gene expression for the differential diagnosis of neuroblastoma from other pediatric small round-cell malignancies. *The American journal of pathology* **155**, 17-21, doi:10.1016/S0002-9440(10)65093-6 (1999).
- 127 Tiveron, M. C., Hirsch, M. R. & Brunet, J. F. The expression pattern of the transcription factor Phox2 delineates synaptic pathways of the autonomic nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 7649-7660 (1996).
- 128 Hartomo, T. B., Kozaki, A., Hasegawa, D., Pham, T. V., Yamamoto, N. *et al.* Minimal residual disease monitoring in neuroblastoma patients based on the expression of a set of real-time RT-PCR markers in tumor-initiating cells. *Oncology reports* **29**, 1629-1636, doi:10.3892/or.2013.2286 (2013).
- 129 Hackett, C. S., Hodgson, J. G., Law, M. E., Fridlyand, J., Osoegawa, K. *et al.* Genome-wide array CGH analysis of murine neuroblastoma reveals distinct genomic aberrations which parallel those in human tumors. *Cancer research* **63**, 5266-5273 (2003).
- 130 Casola, S. Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus. *Methods in molecular biology* **667**, 145-163, doi:10.1007/978-1-60761-811-9_10 (2010).
- 131 Tchorz, J. S., Suply, T., Ksiazek, I., Giachino, C., Cloetta, D. *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).
- 132 Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics* **21**, 70-71, doi:10.1038/5007 (1999).

- 133 Luche, H., Weber, O., Nageswara Rao, T., Blum, C. & Fehling, H. J. Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in "knock-in" Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *European journal of immunology* **37**, 43-53, doi:10.1002/eji.200636745 (2007).
- 134 Rasmuson, A., Kock, A., Fuskevag, O. M., Kruspig, B., Simon-Santamaria, J. *et al.* Autocrine prostaglandin E2 signaling promotes tumor cell survival and proliferation in childhood neuroblastoma. *PloS one* **7**, e29331, doi:10.1371/journal.pone.0029331 (2012).
- 135 Vandesompele, J., Speleman, F., Van Roy, N., Laureys, G., Brinskchmidt, C. *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).
- 136 Weiss, W. A., Godfrey, T., Francisco, C. & Bishop, J. M. Genome-wide screen for allelic imbalance in a mouse model for neuroblastoma. *Cancer research* **60**, 2483-2487 (2000).
- 137 Rasmuson, A., Segerstrom, L., Nethander, M., Finnman, J., Elfman, L. H. *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).
- 138 Schleiermacher, G., Janoueix-Lerosey, I., Ribeiro, A., Klijanienko, J., Couturier, J. *et al.* Accumulation of segmental alterations determines progression in neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 3122-3130, doi:10.1200/JCO.2009.26.7955 (2010).
- 139 Stallings, R. L., Howard, J., Dunlop, A., Mullarkey, M., McDermott, M. *et al.* Are gains of chromosomal regions 7q and 11p important abnormalities in neuroblastoma? *Cancer genetics and cytogenetics* **140**, 133-137 (2003).
- 140 Miller, M. A., Ohashi, K., Zhu, X., McGrady, P., London, W. B. *et al.* Survivin mRNA levels are associated with biology of disease and patient survival in neuroblastoma: a report from the children's oncology group. *Journal of pediatric hematology/oncology* **28**, 412-417, doi:10.1097/01.mph.0000212937.00287.e5 (2006).
- 141 Ito, R., Asami, S., Motohashi, S., Ootsuka, S., Yamaguchi, Y. *et al.* Significance of survivin mRNA expression in prognosis of neuroblastoma. *Biological & pharmaceutical bulletin* **28**, 565-568 (2005).
- 142 Attiyeh, E. F., London, W. B., Mosse, Y. P., Wang, Q., Winter, C. *et al.* Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **353**, 2243-2253, doi:10.1056/NEJMoa052399 (2005).
- 143 Maris, J. M., Weiss, M. J., Guo, C., Gerbing, R. B., Stram, D. O. *et al.* Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **18**, 1888-1899 (2000).
- 144 White, P. S., Thompson, P. M., Gotoh, T., Okawa, E. R., Igarashi, J. *et al.* Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* **24**, 2684-2694, doi:10.1038/sj.onc.1208306 (2005).
- 145 Chim, C. S., Wong, K. Y., Qi, Y., Loong, F., Lam, W. L. *et al.* Epigenetic inactivation of the miR-34a in hematological malignancies. *Carcinogenesis* **31**, 745-750, doi:10.1093/carcin/bgq033 (2010).

- 146 Li, N., Fu, H., Tie, Y., Hu, Z., Kong, W. *et al.* miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer letters* **275**, 44-53, doi:10.1016/j.canlet.2008.09.035 (2009).
- 147 Fujita, T., Igarashi, J., Okawa, E. R., Gotoh, T., Manne, J. *et al.* CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute* **100**, 940-949, doi:10.1093/jnci/djn176 (2008).
- 148 Schlisio, S., Kenchappa, R. S., Vredeveld, L. C., George, R. E., Stewart, R. *et al.* The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes & development* **22**, 884-893, doi:10.1101/gad.1648608 (2008).
- 149 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
- 150 He, S., Nakada, D. & Morrison, S. J. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual review of cell and developmental biology* **25**, 377-406, doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113248 (2009).
- 151 Molenaar, J. J., Ebus, M. E., Koster, J., van Sluis, P., van Noesel, C. J. *et al.* Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer research* **68**, 2599-2609, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5032 (2008).
- 152 Molenaar, J. J., Koster, J., Ebus, M. E., van Sluis, P., Westerhout, E. M. *et al.* Copy number defects of G1-cell cycle genes in neuroblastoma are frequent and correlate with high expression of E2F target genes and a poor prognosis. *Genes, chromosomes & cancer* **51**, 10-19, doi:10.1002/gcc.20926 (2012).
- 153 Yamanaka, A., Hatakeyama, S., Kominami, K., Kitagawa, M., Matsumoto, M. *et al.* Cell cycle-dependent expression of mammalian E2-C regulated by the anaphase-promoting complex/cyclosome. *Molecular biology of the cell* **11**, 2821-2831 (2000).
- 154 Jiang, L., Bao, Y., Luo, C., Hu, G., Huang, C. *et al.* Knockdown of ubiquitin-conjugating enzyme E2C/UbcH10 expression by RNA interference inhibits glioma cell proliferation and enhances cell apoptosis in vitro. *Journal of cancer research and clinical oncology* **136**, 211-217, doi:10.1007/s00432-009-0651-z (2010).
- 155 Qing, G., Skuli, N., Mayes, P. A., Pawel, B., Martinez, D. *et al.* Combinatorial regulation of neuroblastoma tumor progression by N-Myc and hypoxia inducible factor HIF-1alpha. *Cancer research* **70**, 10351-10361, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0740 (2010).
- 156 Garcia, I., Mayol, G., Rios, J., Domenech, G., Cheung, N. K. *et al.* A three-gene expression signature model for risk stratification of patients with neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 2012-2023, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2483 (2012).
- 157 Schubbert, S., Shannon, K. & Bollag, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature reviews. Cancer* **7**, 295-308, doi:10.1038/nrc2109 (2007).
- 158 Shimizu, K., Goldfarb, M., Suard, Y., Perucho, M., Li, Y. *et al.* Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 2112-2116 (1983).
- 159 O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V. & Mendell, J. T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* **435**, 839-843, doi:10.1038/nature03677 (2005).

- 160 Terrile, M., Bryan, K., Vaughan, L., Hallsworth, A., Webber, H. *et al.* miRNA expression profiling of the murine TH-MYCN neuroblastoma model reveals similarities with human tumors and identifies novel candidate miRNAs. *PloS one* **6**, e28356, doi:10.1371/journal.pone.0028356 (2011).
- 161 Testa, J. R. & Bellacosa, A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10983-10985, doi:10.1073/pnas.211430998 (2001).
- 162 Stubbusch, J., Majdazari, A., Schmidt, M., Schutz, G., Deller, T. *et al.* Generation of the tamoxifen-inducible DBH-Cre transgenic mouse line DBH-CT. *Genesis* **49**, 935-941, doi:10.1002/dvg.20773 (2011).
- 163 Sprussel, A., Schulte, J. H., Weber, S., Necke, M., Handschke, K. *et al.* Lysine-specific demethylase 1 restricts hematopoietic progenitor proliferation and is essential for terminal differentiation. *Leukemia* **26**, 2039-2051, doi:10.1038/leu.2012.157 (2012).
- 164 Ventura, A., Young, A. G., Winslow, M. M., Lintault, L., Meissner, A. *et al.* Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* **132**, 875-886, doi:10.1016/j.cell.2008.02.019 (2008).
- 165 Carleton, M., Cleary, M. A. & Linsley, P. S. MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell cycle* **6**, 2127-2132 (2007).
- 166 Wiemer, E. A. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *European journal of cancer* **43**, 1529-1544, doi:10.1016/j.ejca.2007.04.002 (2007).
- 167 Shohet, J. M., Ghosh, R., Coarfa, C., Ludwig, A., Benham, A. L. *et al.* A genome-wide search for promoters that respond to increased MYCN reveals both new oncogenic and tumor suppressor microRNAs associated with aggressive neuroblastoma. *Cancer research* **71**, 3841-3851, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4391 (2011).
- 168 Petrelli, A. & Giordano, S. From single- to multi-target drugs in cancer therapy: when aspecificity becomes an advantage. *Current medicinal chemistry* **15**, 422-432 (2008).
- 169 Schratzenholz, A., Groebe, K. & Soskic, V. Systems biology approaches and tools for analysis of interactomes and multi-target drugs. *Methods in molecular biology* **662**, 29-58, doi:10.1007/978-1-60761-800-3_2 (2010).
- 170 Modak, S. & Cheung, N. K. Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma. *Cancer treatment reviews* **36**, 307-317, doi:10.1016/j.ctrv.2010.02.006 (2010).
- 171 Iorio, M. V. & Croce, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine* **4**, 143-159, doi:10.1002/emmm.201100209 (2012).
- 172 Tivnan, A., Orr, W. S., Gubala, V., Nooney, R., Williams, D. E. *et al.* Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-disialoganglioside GD2 coated nanoparticles. *PloS one* **7**, e38129, doi:10.1371/journal.pone.0038129 (2012).
- 173 Adida, C., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Reyes-Mugica, M. & Altieri, D. C. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* **351**, 882-883, doi:10.1016/S0140-6736(05)70294-4 (1998).
- 174 Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H. *et al.* High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* **19**, 617-623, doi:10.1038/sj.onc.1203358 (2000).

- 175 Adams, R. R., Carmena, M. & Earnshaw, W. C. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends in cell biology* **11**, 49-54 (2001).
- 176 Chen, J., Jin, S., Tahir, S. K., Zhang, H., Liu, X. *et al.* Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells. *The Journal of biological chemistry* **278**, 486-490, doi:10.1074/jbc.M211119200 (2003).
- 177 Giodini, A., Kallio, M. J., Wall, N. R., Gorbsky, G. J., Tognin, S. *et al.* Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer research* **62**, 2462-2467 (2002).
- 178 Chu, Y., Yao, P. Y., Wang, W., Wang, D., Wang, Z. *et al.* Aurora B kinase activation requires survivin priming phosphorylation by PLK1. *Journal of molecular cell biology* **3**, 260-267, doi:10.1093/jmcb/mjq037 (2011).
- 179 Sokolova, V., Kozlova, D., Knuschke, T., Buer, J., Westendorf, A. M. *et al.* Mechanism of the uptake of cationic and anionic calcium phosphate nanoparticles by cells. *Acta biomaterialia* **9**, 7527-7535, doi:10.1016/j.actbio.2013.02.034 (2013).
- 180 Florea, B. I., Meaney, C., Junginger, H. E. & Borchard, G. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS pharmSci* **4**, E12, doi:10.1208/ps040312 (2002).
- 181 Neu, M., Fischer, D. & Kissel, T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *The journal of gene medicine* **7**, 992-1009, doi:10.1002/jgm.773 (2005).
- 182 Verissimo, C. S., Molenaar, J. J., Fitzsimons, C. P. & Vreugdenhil, E. Neuroblastoma therapy: what is in the pipeline? *Endocrine-related cancer* **18**, R213-231, doi:10.1530/ERC-11-0251 (2011).
- 183 Duffy, M. J., O'Donovan, N., Brennan, D. J., Gallagher, W. M. & Ryan, B. M. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer letters* **249**, 49-60, doi:10.1016/j.canlet.2006.12.020 (2007).
- 184 Li, S., He, J., Li, S., Cao, G., Tang, S. *et al.* Noscapine induced apoptosis via downregulation of survivin in human neuroblastoma cells having wild type or null p53. *PloS one* **7**, e40076, doi:10.1371/journal.pone.0040076 (2012).
- 185 Hossain, M. M., Banik, N. L. & Ray, S. K. Survivin knockdown increased anti-cancer effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate in human malignant neuroblastoma SK-N-BE2 and SH-SY5Y cells. *Experimental cell research* **318**, 1597-1610, doi:10.1016/j.yexcr.2012.03.033 (2012).
- 186 Martin, S., Lamb, H. K., Brady, C., Lefkove, B., Bonner, M. Y. *et al.* Inducing apoptosis of cancer cells using small-molecule plant compounds that bind to GRP78. *British journal of cancer*, doi:10.1038/bjc.2013.325 (2013).
- 187 Nakahara, T., Kita, A., Yamanaka, K., Mori, M., Amino, N. *et al.* YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer research* **67**, 8014-8021, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1343 (2007).
- 188 Hayami, S., Kelly, J. D., Cho, H. S., Yoshimatsu, M., Unoki, M. *et al.* Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **128**, 574-586, doi:10.1002/ijc.25349 (2011).
- 189 Xu, G., Xiao, Y., Hu, J., Xing, L., Zhao, O. *et al.* The Combined Effect of Retinoic Acid and LSD1 siRNA Inhibition on Cell Death in the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **31**, 854-862, doi:10.1159/000350103 (2013).

-
- 190 Stavropoulos, P. & Hoelz, A. Lysine-specific demethylase 1 as a potential therapeutic target. *Expert opinion on therapeutic targets* **11**, 809-820, doi:10.1517/14728222.11.6.809 (2007).
- 191 Sun, G., Ye, P., Murai, K., Lang, M. F., Li, S. *et al.* miR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells. *Nature communications* **2**, 529, doi:10.1038/ncomms1532 (2011).
- 192 Bier, A., Giladi, N., Kronfeld, N., Lee, H. K., Cazacu, S. *et al.* MicroRNA-137 is downregulated in glioblastoma and inhibits the stemness of glioma stem cells by targeting RTVP-1. *Oncotarget* **4**, 665-676 (2013).
- 193 Li, K. K., Yang, L., Pang, J. C., Chan, A. K., Zhou, L. *et al.* MIR-137 Suppresses Growth and Invasion, is Downregulated in Oligodendroglial Tumors and Targets CSE1L. *Brain pathology* **23**, 426-439, doi:10.1111/bpa.12015 (2013).
- 194 Zhu, X., Li, Y., Shen, H., Li, H., Long, L. *et al.* miR-137 restoration sensitizes multidrug-resistant MCF-7/ADM cells to anticancer agents by targeting YB-1. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **45**, 80-86, doi:10.1093/abbs/gms099 (2013).

9 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
aCGH	<i>Array-comparative genomic hybridization</i>
AURKB	Aurora B Kinase
<i>BIRC5</i>	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 5</i>
bp	Basenpaar
BrdU	5-bromo-2'-Deoxyuridin
CAG	Hühner-Aktin-Promotor
cDNA	komplementäre DNA
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase 4
CPC	<i>Chromosomal Passenger</i> Komplex
Ct-Wert	Schwellenwert-Zyklus
Dbh	Dopamin beta-Hydroxylase
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	<i>Enrichment Score</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	und andere
<i>FCS</i>	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FDR	falsch-positiv Rate
Fluc	Luziferase Gen
g	Erdbeschleunigung
G1-Phase	Postmitose
G2/M-Phase	Prämitose und Mitose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GOI	<i>gene of interest</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment</i> Analyse
H&E	Hematoxylin & Eosin
HCl	Chlorwasserstoff
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging</i> System
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
i.v.	intravenös
kb	kiloBasen
KDM1A	Lysin-spezifische Demethylase 1
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i>
LDH	Laktat-Dehydrogenase

LIN28B	LIN28 Homolog B
LSL	<i>loxP</i> -flankierte Polyadenyl-Stoppsequenz
miRNA	microRNA
MPL	<i>Molecular Proteomics Laboratory</i>
MSigDB	<i>Molecular Signatures</i> Datenbank
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid
MYCN	<i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogen</i> , <i>neuroblastoma derived</i>
NEFL	Neurofilament
NES	normalisierter <i>Enrichment Score</i>
NTRK1	neurotrophe Rezeptor-Tyrosinkinase 1
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Poly-Ethylenimin
pri-miRNA	primäre microRNA
pre-miRNA	Vorläufer-microRNA
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RCME	Rekombinase-vermittelte Kassettenaustauschstelle
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RISC	RNA-induzierter <i>silencing</i> Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
S-Phase	Synthese Phase des Zellzyklus
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>silencer</i> RNA
SRM	Spermidin Synthase
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TFPI2	<i>tissue factor pathway inhibitor 2</i>
TH	Tyrosin Hydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
UBE2C	Ubiquitin-konjugierende Enzym E2C
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
wt	Wildtyp

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Expression der Cre-Rekombinase im <i>Dbh-iCre</i> Mausmodell.....	6
Abb. 2:	Die Biogenese von miRNAs.....	8
Abb. 3:	Auftrennung von Neuroblastompatienten mit guter und schlechter Prognose anhand von miRNA Expressionsprofilen.....	10
Abb. 4:	Schema der Vektorkonstruktion zur Generierung transgener <i>LSL-MYCN</i> Mäuse.....	14
Abb. 5:	Struktur der verwendeten miRNA-beladenen Calcium-Phosphat- Nanopartikel.....	29
Abb. 6:	Vektorkarte von pcDNA™6/TR.....	33
Abb. 7:	Vektorkarte von pT-Rex-DEST30.....	34
Abb. 8:	Repräsentative Southern Blot Analyse eines ES-Zellklons.....	39
Abb. 9:	Repräsentative Genotypisierungs-PCRs der verwendeten Mauslinien <i>LSL-MYCN</i> und <i>Dbh-iCre</i>	40
Abb. 10:	Verteilung der auftretenden Genotypen aus Verpaarungen von heterozygoten <i>LSL-MYCN</i> und <i>Dbh-iCre</i> Mäusen.....	41
Abb. 11:	Entwicklung von Tumoren im <i>LSL-MYCN;Dbh-iCre</i> Mausmodell.....	42
Abb. 12:	Luziferase-Expression dreier repräsentativer Tumore aus <i>LSL-MYCN;Dbh-iCre</i> Mäusen.....	42
Abb. 13:	Ultraschall-Bildgebung von Tumoren aus <i>LSL-MYCN;Dbh-iCre</i> Mäusen.....	44
Abb. 14:	Makroskopische Aufnahmen repräsentativer Tumore des <i>LSL-MYCN;Dbh-iCre</i> Modells.....	45
Abb. 15:	PCR zur Validierung der ausgeschnittenen Polyadenyl-Stoppsequenz in vier repräsentativen Tumoren aus <i>LSL-MYCN;Dbh-iCre</i> Mäusen.....	46
Abb. 16:	Überexpression von MYCN in Tumoren des <i>LSL-MYCN;Dbh-iCre</i> Modells.....	46
Abb. 17:	mRNA Expression von Neuroblastommarkern in vier repräsentativen Tumoren aus <i>LSL-MYCN;Dbh-iCre</i> Mäusen.....	47
Abb. 18:	Histologische und molekulare Charakteristika von Tumoren des <i>LSL-MYCN;Dbh-iCre</i> Modells.....	48
Abb. 19:	Vergleich der Tumorinzidenz zwischen dem <i>LSL-MYCN;Dbh-iCre</i> Modell und dem <i>TH-MYCN</i> Modell.....	49

Abb. 20: Genomische Aberrationen von Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells.....	50
Abb. 21: Genset <i>Enrichment</i> Analyse.....	52
Abb. 22: Regulierte mRNAs in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Mausmodells	53
Abb. 23: Regulierte MYC Targets in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells.....	54
Abb. 24: Regulierte miRNAs in Tumoren von LSL-MYCN;Dbh-iCre Mäusen.....	55
Abb. 25: Regulierte MYCN miRNA Targets in Tumoren des LSL-MYCN;Dbh-iCre Modells.....	56
Abb. 26: Regulation von miR-542 in Tumoren der Mausmodelle LSL-MYCN;Dbh-iCre und TH-MYCN.....	57
Abb. 27: Korrelation von miR-542-5p und -3p Expression mit prognostischen Markern und Überleben in humanen Neuroblastomen	60
Abb. 28: Korrelation von miR-542-5p und -3p Expression mit günstigem Verlauf humaner Neuroblastome.....	61
Abb. 29: Korrelation von miR-542-3p und Survivin in humanen Neuroblastomen.....	62
Abb. 30: Reduktion der Viabilität von humanen Neuroblastomzelllinien mittels miR-542-3p Expression.....	63
Abb. 31: Reduzierte Konfluenz von Neuroblastomzellen nach miR-542-3p Expression.....	64
Abb. 32: Verschiebung des Zellzyklus durch gesteigerte S-Phase in Neuroblastomzellen nach miR-542-3p Expression.....	65
Abb. 33: Induktion von Apoptose und Reduktion von Proliferation in Neuroblastomzellen nach miR-542-3p Expression.....	65
Abb. 34: Herunterregulation von Survivin in Neuroblastomzellen nach miR-542-3p Expression.....	67
Abb. 35: Direkte Bindung von miR-542-3p an Survivin 3'UTR.....	68
Abb. 36: Spezifische Reduktion von Survivin Protein mittels siRNA.....	69
Abb. 37: Reduktion der Viabilität humaner Neuroblastomzelllinien durch Herunterregulation von Survivin.....	37
Abb. 38: Verschiebung des Zellzyklus durch gesteigerte S- bzw. G2/M-Phase in Neuroblastomzellen nach Herunterregulation von Survivin	70
Abb. 39: Reduktion der Proliferation humaner Neuroblastomzelllinien durch Herunterregulation von Survivin.....	70
Abb. 40: Survivin Überexpression in SHEP-Survivin nach Induktion mit Tetracyclin.....	71

Abb. 41: Partielle Wiederherstellung des miR-542-3p Phänotyps mittels Überexpression von Survivin ohne miR-542-3p Bindestelle.....	72
Abb. 42: Struktur von miRNA-beladenen Nanopartikeln.....	72
Abb. 43: Reduktion der Zellviabilität und der Proliferation, Induktion von Apoptose und Herunterregulation von Survivin mittels miR-542-3p-beladenen Nanopartikel in WACII Zellen <i>in vitro</i>	74
Abb. 44: Expression von miR-542-3p und Herunterregulation von Survivin mittels miRNA-beladenen Nanopartikeln in WACII-Xenografts <i>in vivo</i>	75
Abb. 45: Hemmung der Proliferation und Induktion von Apoptose in miR-542-3p- exprimierenden Neuroblastom-Xenografts.....	76
Abb. 46: Regulation von KDM1A mRNA in LSL-MYCN; <i>Dbh-iCre</i> und <i>TH-MYCN</i> Tumoren.....	77
Abb. 47: 3'UTR von KDM1A mit Bindestelle von miR-137.....	78
Abb. 48: Regulation von miR-137 in LSL-MYCN; <i>Dbh-iCre</i> Tumoren.....	78
Abb. 49: Korrelation der Expression von miR-137 mit prognostischen Markern und Überleben in humanen Primärtumoren.....	79
Abb. 50: Korrelation von miR-137 Expression mit günstigem Verlauf humaner Neuroblastome.....	80
Abb. 51: Reduktion der Viabilität humaner Neuroblastomzelllinien mittels exogener miR-137 Expression.....	81
Abb. 52: Reduktion der Konfluenz humaner Neuroblastomzelllinien nach exogener miR-137 Expression.....	81
Abb. 53: Induktion von Apoptose und Reduktion der Proliferation in miR-137 exprimierenden Zellen.....	82
Abb. 54: Einleitung neuronaler Differenzierung in miR-137-exprimierenden Zellen...	82
Abb. 55: Herunterregulation von KDM1A in miR-137-exprimierenden Zellen.....	83
Abb. 56: Direkte Bindung von miR-137 an die 3'UTR von KDM1A.....	84
Abb. 57: Reaktion von KDM1A Zielen auf miR-137-induzierte Herunter-regulation von KDM1A.....	84
Abb. 58: Spezifische Reduktion von KDM1A Protein mittels siRNA.....	85
Abb. 59: Reduktion der Zellviabilität durch Herunterregulation von KDM1A.....	85
Abb. 60: Induktion von Apoptose und Reduktion der Viabilität und Proliferation von Zellen durch Herunterregulation von KDM1A.....	86
Abb. 61: Induzierbare Expression von KDM1A in SHEP-KDM1A Zellen resistent gegen miR-137 Expression.....	88
Abb. 62: 3'UTR von AKAP2 mit Bindestellen von miR-137.....	89
Abb. 63: Herunterregulation von AKAP2 mittels Expression von miR-137.....	89

Abb. 64: Korrelation der Expression von AKAP2 mit Überleben von Neuroblastompatienten.....	90
Abb. 65: Reduktion der Zellviabilität und Proliferation und Induktion von Apoptose in mit siRNA gegen AKAP2 transfizierten SHEP Zellen.....	90

10.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: <i>International Neuroblastoma Staging System (INSS)</i>	2
Tab. 2: Sonden für die Southern Blot Analyse.....	15
Tab. 3: Oligonukleotidprimer für PCR.....	20
Tab. 4: Programme der qPCR.....	23
Tab. 5: Oligonukleotidprimer für qPCR.....	23
Tab. 6: Antikörper für den immunologischen Nachweis von Proteinen.....	28
Tab. 7: Antikörper für den immunhistochemischen Nachweis von Proteinen auf Gewebeschnitten.....	30
Tab. 8: Ausgesäte Zellzahlen der verwendeten Zelllinien.....	32
Tab. 9: Zusammensetzung der 69 Neuroblastompatienten der miRNA und mRNA Expressions-Kohorte.....	59
Tab. 10: Zusammensetzung der Patienten der <i>Next-Generation-Sequenzierungs-Kohorte</i>	60

11 Anhang

11.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johannes Schulte für die Überlassung des hochinteressanten Themas sowie die exzellente und engagierte wissenschaftliche Betreuung während meiner Promotion.

Bei Herrn PD Dr. Alexander Schramm und Frau Prof. Dr. Angelika Eggert möchte ich mich für interessante Diskussionen während der Bearbeitungsphase und die konstruktive Kritik bei der Anfertigung dieser Dissertationsschrift bedanken.

Allen Mitarbeitern des hämatologisch-onkologischen Labors der Kinderklinik III, besonders Dr. Kathy Astrahantseff, Sabine Dreesmann, Johannes Köster, Sven Lindner, Ellen Mahlow, Andrea Odersky, Anja Rieb, Simon Schäfers, Natalie Solomentsew, Dr. Annika Sprüssel, Dr. Harald Stephan und Dr. Theresa Thor, danke ich für die tatkräftige Unterstützung, die konstruktiven Diskussionen und das tolle Arbeitsklima.

Ebenfalls mein besonderer Dank für wichtige Beiträge zu den Projekten gilt unseren Kooperationspartnern:

- Prof. Dr. Frank Speleman und Anneleen Beckers
(*Center for Medical Genetics*, Universitätsklinikum Ghent, Belgien)
- PD Dr. Lukas Heukamp und Alexandra Florin
(Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Köln)
- PD Dr. Ludger Klein-Hitpass
(Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen)
- Prof. Dr. Shirley Knauer und Sarah Karczewski
(Zentrum für Medizinische Biotechnologie, Universität Duisburg-Essen)
- Prof. Dr. Matthias Epple und Diana Kozlova
(Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen)

Ich danke meinen Eltern und meinem Mann Christian für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt.

11.2 Publikationen und Kongressbeiträge

11.2.1 Publikationen

Althoff K, Beckers A, Odersky A, Mestdagh P, Köster J, Bray IM, Bryan K, Vandesompele J, Speleman F, Stallings RL, Schramm A, Eggert A, Sprüssel A, Schulte JH.

MiR-137 functions as a tumor suppressor in neuroblastoma by downregulating KDM1A

Int J Cancer. 2013 Feb 7. doi: 10.1002/ijc.28091. [Epub ahead of print]

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.

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

Nat Genet. 2012 Nov;44(11):1199-206. doi: 10.1038/ng.2436. Epub 2012 Oct 7.

Althoff K, Lindner S, Odersky A, Mestdagh P, Beckers A, Karczewski S, Molenaar JJ, Bohrer A, Knauer S, Speleman F, Epple M, Kozlova D, Yoon S, Baek K, Vandesompele J, Eggert A, Schramm A, Schulte JH

miR-542-3p exerts tumor suppressive functions in neuroblastoma by down-regulating survivin

Manuskript eingereicht

Althoff K, Beckers A, Sprüssel A, Lindner S, Thor T, de Preter K, Heukamp L, Klein-Hitpass L, Kumps C, Speleman F, Eggert A, Schramm A, Schulte JH

A new Cre-conditional MYCN-driven neuroblastoma mouse model overcomes limitations of the established TH-MYCN model

In Vorbereitung

11.2.2 Kongressbeiträge

Auszüge der Arbeit wurden auf folgenden Konferenzen für einen Vortrag oder eine Posterpräsentation ausgewählt:

11.2.2.1 Vorträge

Althoff K, Lindner S, Odersky A, Mestdagh P, Molenaar JJ, Knauer S, Speleman F, Baek K, Vandesompele J, Eggert A, Schramm A, Schulte JH. *MiR-542-3p exerts tumor suppressive functions in neuroblastoma by down-regulating survivin.*

- *Advanced Neuroblastom Research Conference*, 08.-21. Juni 2012,

Toronto, Kanada

- *4th International Tuebingen Symposium in Pediatric Solid Tumors – From Bench to Bedside in Neuroblastoma*, 16.-18. Februar 2012, Tübingen

11.2.2.2 Posterpräsentationen

Althoff K, Beckers A, Sprüssel A, Thor T, Heukamp L, de Preter K, Kumps C, Speleman F, Schramm A, Eggert A, Schulte JH. *A new MYCN-driven neuroblastoma mouse model using Cre-driven conditional expression of MYCN.*

- *Pediatric Cancer Research at the INTERFACE*, 06.-08. Juni 2013, Wien, Österreich

- *5th Annual Meeting of NGFN-Plus and NGFN-Transfer in the Program of Medical Genome Research*, 11.-13. Dezember 2012, Heidelberg, Deutschland

- 11. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, 23. November 2012

Althoff K, Lindner S, Odersky A, Mestdagh P, Molenaar JJ, Knauer S, Speleman F, Baek K, Vandesompele J, Eggert A, Schramm A, Schulte JH. *MiR-542-3p exerts tumor suppressive functions in neuroblastoma by down-regulating survivin.*

- *Pediatric Cancer Research at the INTERFACE*, 06.-08. Juni 2013, Wien, Österreich

- *5th Annual Meeting of NGFN-Plus and NGFN-Transfer in the Program of Medical Genome Research*, 11.-13. Dezember 2012, Heidelberg, Deutschland

Althoff K, Beckers A, Odersky A, Mestdagh P, Speleman F, Vandesompele J, Eggert A, Schramm A, Sprüssel A, Schulte JH. *MiR-137 functions as a tumor suppressor in neuroblastoma by downregulating KDM1A.*

- *Pediatric Cancer Research at the INTERFACE*, 06.-08. Juni 2013, Wien, Österreich
- *5th Annual Meeting of NGFN-Plus and NGFN-Transfer in the Program of Medical Genome Research*, 11.-13. Dezember 2012, Heidelberg, Deutschland
- *Advanced Neuroblastom Research Conference*, 08.-21. Juni 2012, Toronto, Kanada
- *4th International Tuebingen Symposium in Pediatric Solid Tumors – From Bench to Bedside in Neuroblastoma*, 16.-18. Februar 2012, Tübingen, Deutschland

11.3 Lebenslauf

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

11.4 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 „*Etablierung eines MYCN-vermittelten murinen Neuroblastomodells und Analyse tumorsuppressiver mikroRNAs*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Kristina Althoff befürworte.

Essen, den 08. August 2013

Prof. Dr. med. Johannes 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 08. August 2013

Kristina Althoff

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 08. August 2013

Kristina Althoff