

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg



**Genexpressionsanalysen in Neuroblastomen:
Verlust des *FYN*-Signalwegs in Stadium 4**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

(Dr. med.)

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dirk Nielsen

aus Limburg

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
24.11.2005.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. M. Eilers

Korreferent: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

<i>1 Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1 Das Neuroblastom	1
1.1.1 Inzidenz	1
1.1.2 Stadieneinteilung nach INSS	2
1.1.3 Diagnose	3
1.1.4 Therapie	5
1.1.5 Prognose	5
1.2 Auswahl molekulargenetischer Faktoren mit Einfluß auf die Onkogenese des Neuroblastoms	6
1.2.1 Loss of Heterozygosity (LOH) im Neuroblastom	7
1.2.2 Die Rolle von trk und p75 im Neuroblastom	8
1.2.3 Der Einfluß von MYCN	10
1.2.4 Amplifikationen anderer Regionen	13
1.3 c-DNA Microarray	13
1.3.1 Anwendungsmöglichkeiten des Microarrays	14
<i>2 Fragestellung</i>	<i>16</i>
<i>3 Material</i>	<i>17</i>
3.1 Medium für die Bakterienkultur	17
3.2 Allgemeine Lösungen	17
3.3 Puffer	18
3.4 Chemikalien	20
3.5 Standards und Enzyme	21
3.6 Filme, Filter, Geräte und Software	21
3.7 Kit-Systeme	21
<i>4 Methoden</i>	<i>23</i>
4.1 Systematik der angewandten Methoden	23
4.2 Tumormaterial	24
4.3 Neuroblastomzelllinie (SHEP)	24
4.3.1 Ernten der SHEP-Zellen	24

4.4 Extraktion von RNA aus primären Tumorproben und SHEP	25
4.4.1 Quantifizieren, Aliquotieren, Fällern und Aufbewahren von RNA	25
4.4.2 Denaturierende Gelelektrophorese der extrahierten RNA	26
4.5 Genprofilanalyse	26
4.5.1 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	26
4.5.2 cDNA-Objektträger	28
4.5.3 Hybridisierung	28
4.5.4 Waschschrift/Einlesen der cDNA-Objektträger	28
4.5.5 Auswertung der Expressionsprofile	29
4.6 Validierung	30
4.6.1 cDNA-Synthese aus Tumor- und Zelllinien-RNA	30
4.6.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	30
4.6.3 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten	31
4.6.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)	32
4.6.4.1 Gelelektrophorese der PCR-Produkte	34
4.6.4.2 Real-time-RT-PCR	34
4.6.5 Northernblot	35
4.6.5.1 Gelelektrophorese für Northernblot	35
4.6.5.2 Kapillartransfer auf Nylonmembran	35
4.6.5.3 Inkubation der Northern-Membran mit radioaktiven DNA-Proben	36
4.6.6 Gensequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	36
5 Ergebnisse	38
5.1 Das Tumormaterial	38
5.2 Analyse der Genprofile von 19 Neuroblastomproben Stadium 1 und 21 Neuroblastomproben Stadium 4 mittels Microarray-Analysen	40
5.2.1 Stadienspezifisch signifikant unterschiedlich exprimierte Gene	40
5.2.2 Cluster Analyse	41
5.2.3 Stadienspezifische Expression von FYN, CTNNA1, NRCAM, und AFAP	41
5.3 Ergebnisse der Validierung	43

5.3.1 Real-time-RT-PCR zur Validierung der Expression von FYN und AFAP	44
5.3.2 Northernblot-Versuch zur Kontrolle der Expression von α -catenin (CTNNA1)	44
5.3.3 Validierung von CASP3, PLAGL1 und WBSCR14 durch Gensequenzierung	45
6 Diskussion	48
7 Zusammenfassung	57
8 Literaturverzeichnis	59
9 Anhang	74
9.1 Abkürzungen	74
9.2 Akademische Lehrer	76
9.3 Danksagung	77

1. Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist in der Kinderheilkunde der dritthäufigste maligne Tumor und für etwa 15 % aller Todesfälle durch Krebserkrankungen im Kindesalter verantwortlich. Es handelt sich um einen embryonalen Tumor, dessen Zellen ihren Ursprung vom sympathischen Grenzstrang entlang der thorakalen und abdominellen Wirbelsäule nehmen. Häufig entwickelt er sich auch aus paraganglionärem sympathischen Gewebe entlang der Bauchorta, aus dem später die Zellen des Nebennierenmarks entstehen.

Neuroblastome sind zwar derselben zellulären Herkunft, weisen jedoch zugleich zahlreiche Unterschiede auf (Brodeur et al., 1995). Es variieren nicht nur Lokalisation des Primärtumors und somit primäre Erscheinungsform und Klinik der Erkrankung, sondern auch Wachstumsverhalten, biologisches Verhalten und davon abhängig die klinische Prognose. Zum Beispiel zeigen Kinder, die im ersten Lebensjahr diagnostiziert werden, in der Mehrzahl lokalisierte Tumorstadien, die durch Tumorresektion und minimale adjuvante Therapie geheilt werden, während die Tumoren älterer Kinder häufig bereits bei Diagnosestellung metastasiert sind. Trotz intensiver multimodaler Therapie versterben diese Kinder an einer raschen Tumorprogression (Maris und Matthay, 1999).

1.1.1 Inzidenz

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle, maligne, solide Tumor des Kindesalters. In der Bundesrepublik Deutschland werden jährlich ca. 130 Neuerkrankungen diagnostiziert. Die Inzidenz, basierend auf Ereignissen aus den Jahren 1989 bis 1998, beträgt bei Kindern mit einem Alter unter 15 Jahren 1,2 Fälle per 100.000 pro Jahr. Das Geschlechterverhältnis ist mit 1:1,1 für Mädchen : Jungen annähernd gleich (Kaatsch et al., 1999).

Etwa 90 % aller Neuroblastome werden innerhalb der ersten 5 Lebensjahre diagnostiziert (NB-97-Studie).

1.1.2 Stadieneinteilung nach INSS

Das „International-Neuroblastoma-Staging-System“ (INSS) basiert auf klinischen, chirurgischen und radiologischen Beurteilungen von Kindern mit Neuroblastomen. Anhand des Ausdehnungsgrades der Tumoren sowie der Möglichkeit der operativen Entfernung und des Metastasierungsmusters werden Neuroblastome in fünf Stadien eingeteilt (Brodeur et al., 1993).

Bei Stadium 1 und 2 handelt es sich um lokalisierte Tumoren, die zum Teil komplett resezierbar sind. Stadium 3 und 4 hingegen zeigen ein bilaterales Wachstum oder weisen bei Diagnosestellung bereits Metastasen auf. Das Stadium 4s nimmt in der Stadieneinteilung eine Sonderstellung ein, da der Primärtumor den lokalisierten Stadien 1 und 2 entspricht, eine Metastasierung jedoch im Bereich der Haut, der Leber oder des Knochenmarks vorliegt. Stadium 4s ist per Definition nur auf Patienten mit einem Alter unter einem Jahr bei Diagnosestellung beschränkt (vgl. Tab.: 1.1).

Tab.: 1.1

Internationale Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INSS	
Stadium 1	Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter Entfernung (mit oder ohne mikroskopischem Resttumor); auffindbare ipsi- und kontralaterale Lymphknoten (LK) sind histologisch ohne Tumorbefall.
Stadium 2	Unilateraler Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung; auffindbare ipsi- und kontralaterale LK sind histologisch ohne Tumorbefall. Unilateraler Tumor; mit makroskopisch kompletter oder inkompletter Entfernung; mit positiven regionalen und ipsilateralen LK; auffindbare kontralaterale LK sind histologisch ohne Tumorbefall.
Stadium 3	Nichtresektabler unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie mit oder ohne regionalem LK-Befall

	<p>oder unilateraler Tumor mit kontralateralem regionalem LK-Befall</p> <p>oder nichtresektabler Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration oder durch LK-Befall (bis zur oder über die jeweilige Wirbelkante hinaus).</p>
Stadium 4	Disseminierung des Tumors in Knochenmark, Knochen, entfernten LK, Leber oder anderen Organen.
Stadium 4s	<p>Lokalisierter Primärtumor wie bei Stadium 1 oder 2 und limitierter Disseminierung in Leber, Haut oder Knochenmark.</p> <p>Nur Säuglinge im 1. Lebensjahr.</p>

1.1.3 Diagnose

Die Diagnostik setzt sich im Allgemeinen aus dem klinischen Befund, der Histologie und den molekulargenetischen Eigenschaften des Tumorgewebes zusammen.

Für den klinischen Befund stehen zur Verfügung:

- 1.) das klinische Bild des Patienten,
- 2.) der Befund der bildgebenden Diagnostik (Sonographie, MRT/CT),
- 3.) der Nachweis von Katecholaminmetaboliten in entsprechender Konzentration im Urin,
(Neuroblastomzellen können, ebenso wie die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, Katecholamine produzieren. So können bei über 80 % der Patienten mit Neuroblastom Katecholaminmetabolite (Homovanillinsäure, Vanillinmandelsäure, Dopamin) im Spontanurin oder Serum erhöht nachgewiesen und als Tumormarker bei Diagnose und Verlauf genutzt werden.)
- 4.) ein szintigraphischer Nachweis mittels Metajodbenzylguanidin-Aufnahme (Berthold und Hero, 2000).

(Das Noradrenalinanalogon Metajodbenzyerguanidin wird aktiv von neuroendokrinen Zellen aufgenommen und kann, markiert mit ^{123}Jod , zur szintigraphischen Darstellung des Neuroblastoms und etwaiger Metastasen genutzt werden.)

Histologisch ist für das Neuroblastom ein einförmiges, von kleinen, runden, zytoplasmaarmen und hyperchromaffinen Zellen geprägtes Zellbild charakteristisch. Die Zellen entsprechen den unreifen Neuroblasten. Neben ihnen ist nur wenig oder gar kein Schwann-Zell-Stroma mehr zu finden. Diese Zellen werden als Teil des Ausreifungsprozesses verstanden (Brodeur et al., 1993; Ambros et al., 1996).

Die molekulargenetischen Eigenschaften werden durch Marker (*MYCN*-Amplifikation und Verlust der Heterozygotie (LOH) des Chromosoms 1) zur Diagnosesicherung und weiteren Risikogruppeneinteilung, die das anschließende Therapieschema bestimmen, untersucht.

In der Hoffnung, die Erkrankung an einem Neuroblastom möglichst früh zu erkennen und somit ggf. die Mortalität zu senken, wurden international auf Urinuntersuchungen (Vanillin- und Homovanillinmandelsäure) basierende Früherkennungsprogramme entwickelt. Da die Screeninguntersuchungen im Säuglingsalter stattfanden, wurden vor allem Tumoren niedriger Stadien mit insgesamt guten Verlaufsprognosen diagnostiziert, die zum größten Teil spontan in Remission übergingen. Diese waren oft so klein, dass sie klinisch nicht auffällig geworden wären und daher häufig in Nebennieren obduzierter Säuglinge und Kleinkinder gefunden wurden (Beckwith et al., 1963). Daraus resultierte eine Überdiagnostizierung von Tumoren im ersten Lebensjahr mit wahrscheinlich unnötigen Untersuchungen, Operationen und ggf. Chemotherapien. Die allgemeine Mortalität jedoch konnte nicht gesenkt werden, da eine frühe Detektion von aggressiven Tumoren, die vor allem nach dem ersten Lebensjahr auftreten, nicht befriedigend erreicht wurde (Bessho et al., 1991). Diese Erkenntnisse der Screeninguntersuchungen deuten darauf hin, dass es mindestens zwei unterschiedliche Neuroblastom-Gruppen gibt: eine biologisch günstige Gruppe, die sich bei Säuglingen entwickelt und eine biologisch ungünstige Gruppe bei Patienten im Alter über einem Jahr. Die erste Gruppe geht sehr selten, wenn überhaupt, in die zweite Gruppe über, weshalb Früherkennungsuntersuchungen im Alter von 6 – 12 Monaten zu keinem Erfolg führen (Brodeur, 2003).

1.1.4 Therapie

Je nach Vorhandensein der diagnostischen Kriterien werden die Patienten in verschiedene Risikogruppen eingeteilt. Es werden Beobachtungs-, Standardrisiko- und Hochrisikopatienten definiert, die nach entsprechenden Therapieprotokollen behandelt werden (Neuroblastomstudie 1997).

Zu den Beobachtungspatienten zählen Säuglinge der Stadien 1, 2, 3 und 4s sowie Kinder im Alter von über einem Jahr der Stadien 1 und 2 mit Tumoren ohne Amplifikation von *MYCN*. Sie werden nach einer allen Therapien vorausgehenden initialen Operation oder Biopsie für 6 – 12 Monate lediglich beobachtet. Kommt es in diesem Zeitraum zu einer spontanen Involution, werden keine weiteren Maßnahmen ergriffen. Bleibt der Befund jedoch unverändert, oder findet gar eine Tumorprogression statt, so werden die Patienten in die Standardrisikogruppe überführt.

Die Standardrisikopatienten setzen sich aus Säuglingen der Stadien 2, 3 und 4s mit ernsthaften Tumor-induzierten Symptomen und Kindern im Alter von über einem Jahr der Stadien 2 und 3 mit Tumoren ohne Amplifikation von *MYCN* zusammen. Sie erhalten eine 3 – 4 Monate dauernde Chemotherapie und anschließend eine Zweitoperation, bei der eine radikale Tumoresektion angestrebt wird. Je nach Operationserfolg schließen sich eine Radiatio des Resttumorgebietes und ggf. weitere Chemotherapieblöcke an.

Patienten mit Stadium 4 oder Tumoren mit einer Amplifikation von *MYCN* werden zu den Hochrisikopatienten gezählt. Ihre Behandlung sieht 4 – 6 jeweils einen Monat dauernde Blöcke einer Hochdosischemotherapie, gefolgt von einer Konsolidierungstherapie vor. Die Konsolidierungstherapie besteht entweder aus einer Reinduktionstherapie oder einer Knochenmark-ablativen so genannten Megatherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation. Nach erfolgreicher Konsolidierungstherapie schließt sich für die Patienten der Hochrisikogruppe eine Immuntherapie oder eine Behandlung mit Retinolsäure an (Berthold, 1999).

1.1.5 Prognose

In einem Kollektiv, bestehend aus 2151 nicht selektierten Neuroblastom-Patienten der deutschen Neuroblastomstudie, betrug die 10-Jahres-Überlebensrate 61 % (Berthold

und Hero, 2000). Die Prognose der Einzelstadien lässt sich der Neuroblastomstudie '97 entnehmen und basiert auf 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten. Sie beträgt 99 % für Stadium 1 und 93 % für Stadium 2. Für Stadium 3 liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit bei 83 %, während sie für Stadium 4 drastisch auf 31 % sinkt. Patienten mit einem Tumor des Stadiums 4s haben trotz initial oft großer Primärtumoren eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 77 %.

Einzel betrachtet sind das Stadium der Erkrankung und das Alter des Patienten bei Diagnose die zwei wichtigsten klinischen Prognosefaktoren für das Neuroblastom (Castleberry, 1997). Aktuelle klinische Therapie-Protokolle verwenden Tumor-Stadium und Alter des Patienten zusammen mit der *MYCN*-Amplifikation zur Ermittlung der Prognose und für Therapieentscheidungen (Berthold et al., 1997). Säuglinge haben sowohl bei lokalisierten (Stadium 1 – 3) als auch bei metastasierten (Stadium 4) Erkrankungen eine bessere Überlebenschance als Kinder im Alter von über einem Jahr (Beckwith und Perrin, 1963; Brodeur, 1994).

Eine Amplifikation des *MYCN*-Genlocus auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 tritt in etwa 22 % aller primären Neuroblastome un behandelter Patienten auf. Die Amplifikation ist konstant mit fortgeschrittenen Tumorstadien, schneller Tumorprogression und schlechter Prognose assoziiert (Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1985).

Prognostisch ungünstige Tumoren lassen sich molekulargenetisch außerdem durch 1p-Deletion, DNA-Euploidie und fehlende Expression von CD44, trkA, p75 und Nras definieren (Brodeur, 1995; Christiansen et al., 1992; Ambros et al., 1996).

1.2 Auswahl molekulargenetischer Faktoren mit Einfluß auf die Onkogenese des Neuroblastoms

Krebs ist eine Erkrankung, bei der die Regulation der normalen Zellproliferation und des Zelltodes gestört ist. Krebszellteilung ist unkontrolliert, und die Zellen sind letztendlich in der Lage, in umliegendes Gewebe einzudringen. Die Entstehung von Krebs ist ein mehrstufiger Prozess, der eine Serie von genetischen Veränderungen involviert. Tumoren sind charakterisiert durch Abweichungen in Chromosomen und verschiedenen Genen. Sowohl Mutationen von Onkogenen und

Tumorsuppressorgenen als auch zunehmende genetische Instabilität sind nach dem heutigen Forschungsstand maßgeblich an der Onkogenese beteiligt (Strachan und Read, 1999).

1.2.1 Loss of Heterozygosity (LOH) im Neuroblastom

Eine Besonderheit, die regelmäßig in neoplastischen Geweben beobachtet wird, ist der „Verlust der Heterozygotie“ (Loss of Heterozygosity (LOH)), wobei ein Allel eines Gens in den meisten Fällen durch Mutation inaktiviert, und das funktionsfähige Allel deletiert ist. Der Allelverlust an einer bestimmten Region eines Chromosoms deutet in der Regel auf das Vorhandensein eines Tumorsuppressorgens hin. Durch seine hohe Spezifität ist der „Verlust der Heterozygotie“ ein häufig unverzichtbarer Marker für die Diagnose und Prognose von Tumoren (Thiagalingam et al., 2002).

Deletionen des kurzen Armes des Chromosoms 1 (1p) sind eine bekannte Anomalität, deren Prävalenz in Neuroblastomen ca 35 % beträgt (White et al., 1995, 2001; Gehring et al., 1995; Martinsson et al., 1995). Deletionen des Chromosoms 1 werden am häufigsten bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien gefunden. Der Allelverlust in 1p ist darüber hinaus sehr stark mit einer Amplifikation von *MYCN* assoziiert. Die unabhängige prognostische Relevanz wurde kontrovers diskutiert. Aktuelle Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass Allelverluste von 1p36 für die Prognose der Tumorprogression, jedoch nicht für das Gesamtüberleben, relevant sind (Gehring et al., 1995; Caron et al., 1996; Maris et al., 2000).

Zur Zeit herrscht keine Einigkeit darüber, ob es sich um eine einzelne Deletion im distalen Bereich von 1p36 handelt oder um mindestens drei diskrete deletierte Regionen, wie von einigen Studien belegt (Martinsson et al., 1995; Ejeskar et al., 2001; Hogarty et al., 2000; Maris et al., 2001). Diese Regionen wurden intensiv untersucht, um mögliche Kandidatengene für das vermutete Tumorsuppressorgen dieser Region zu identifizieren (Ohira et al., 2000; Chen et al., 2001).

Ein weiterer Allelverlust ist bei 11q beschrieben worden (Srivatsan et al., 1993; Plantaz et al., 2001). Er wurde bei 43 % der untersuchten Patienten nachgewiesen und ist somit bis heute die am häufigsten gefundene Deletion bei Neuroblastomen (Guo et al., 1999). 11q Deletionen stehen in direktem Zusammenhang mit 14q Deletionen, sind

jedoch umgekehrt proportional zu 1p Deletionen und *MYCN*-Amplifikationen. Darüber hinaus sind 11q Deletionen mit herabgesetztem ereignisfreiem Überleben assoziiert, jedoch nur bei Patienten ohne *MYCN*-Amplifikation.

Eine Vielzahl weiterer Deletionen konnte an verschiedenen Stellen nachgewiesen werden, doch ihre biologische oder klinische Signifikanz ist bis heute unklar (Brodeur, 2003).

Zugewinne des langen Arms von Chromosom 17 wurden in Neuroblastomen beschrieben (17q gain). Es handelt sich um die häufigste zytogenetische Abnormalität in Neuroblastomzellen. Zugewinne des langen Arms von Chromosom 17 gelten als charakteristisch für fortgeschrittene Tumorstadien und Tumoren von Kindern, die ein Jahr und älter sind. Sie korrelieren außerdem stark mit 1p Deletionen und Amplifikationen von *MYCN* (Bown et al., 1999). Obwohl Zugewinne von Chromosom 17 mit aggressiveren Tumoren assoziiert sind, bedarf die Einordnung der prognostischen Relevanz im Vergleich zu anderen biologischen Markern weiterer großer prospektiver Studien und multivarianter Datenanalysen.

1.2.2 Die Rolle von *trk* und *p75* im Neuroblastom

Produkte des *trk*-Onkogens sind hochaffine Rezeptoren für neurotrophe Faktoren der Tyrosinkinasefamilie. Zu den Rezeptoren der Tyrosinkinasefamilie gehören neben *trkA* auch *trkB* und *trkC*. Die verschiedenen neurotrophen Faktoren binden selektiv an verschiedene Unterformen der *trk*-Rezeptorfamilie: NGF (Nerve Growth Factor) bindet an *trkA*, BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) und NT-4 und 5 (neurotrophic factor) interagieren mit *trkB* und NT-3 mit *trkC* (Barbacid et al., 1995). Neben einer Aktivierung durch einen Liganden kann die Aktivierung eines *trk*-Rezeptors auch durch alleinige Überexpression stattfinden (Hempstead et al., 1992).

Die durch die Rezeptoren der *trk*-Familie induzierten Signalketten führen zu einer Vermittlung von zellulärer Proliferation und wirken entgegen Apoptose, aber auch zu Differenzierung und Zellzyklusarrest. Die Faktoren, die letztendlich entscheiden, welche zelluläre Antwort auf eine Aktivierung des entsprechenden *trk*-Rezeptors folgt, sind zur Zeit unklar. Diese Faktoren sind unter anderem vom jeweiligen Zelltyp, dem

Entwicklungsstatus und von der Beeinflussung durch andere Wachstums-, Differenzierungs- oder Apoptosesignale der Zelle abhängig.

Zwei Signalwege sind notwendig für das zelluläre Überleben: Der Signalweg über die PI3-Kinase ist hauptsächlich für das basale neurotrophinvermittelte Überleben der Zelle notwendig, während der Signalweg über die MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) vor allem für den Apoptoseschutz der Zelle nach mechanischen oder toxischen Schäden wichtig zu sein scheint (Hetman et al., 1999).

Auf der einen Seite wird die *trkA*-vermittelte Aktivierung des MAPK-Signalweges als ausreichend zur Induktion von Differenzierung und NGF-abhängiger Proliferation in Neuroblastomzellen beschrieben (Eggert et al., 2000). Auf der anderen Seite kann zum Beispiel in Medulloblastomzellen über *trkA*-Aktivierung Apoptose ausgelöst werden. Die Apoptose wird über den Ras/Raf-Signalweg vermittelt und benötigt das Vorhandensein von Caspasen als Effektoren, ist jedoch unabhängig von der Intaktheit des MEK/MAPK-Signalweges (Chou et al., 2000).

Die Expression von *trkA* korreliert bei Neuroblastompatienten mit guter Prognose, niedrigem Stadium und jungem Alter (Nakagawara et al., 1993; Suzuki et al., 1993; Kogner et al., 1993; Tanaka et al., 1995; Svensson et al., 1997). Eine inverse Korrelation wird hingegen für die Expression von *trkA* und die Amplifikation von *MYCN* in Neuroblastomen beschrieben (Nakagawara et al., 1992).

TrkB wird in einer gekürzten Form, der die Tyrosinkinase-Domäne fehlt, vor allem in differenzierten Neuroblastomen exprimiert. Die Expression der vollständigen und funktionsfähigen Form mit BDNF findet sich hingegen in *MYCN*-amplifizierten Tumoren (Nakagawara et al., 1994). Sie wird in diesem Fall als möglicher auto- und parakriner Apoptoseschutz dieser Zellen diskutiert, die durch Verlust von *trkA* keine geregelten Wachstums- und Differenzierungssignale mehr aufnehmen können.

Eine Expression von *trkC* findet man überwiegend in Neuroblastomen mit guter Prognose (Yamashiro et al., 1996). Weitere Untersuchungen zeigen, dass eine Expression der vollständigen mRNA von *trkC* und Koexpression von *trkA* eine gut-prognostische Patientengruppe identifizieren kann (Svensson et al., 1997). In Zellkulturexperimenten kann gezeigt werden, dass die Aktivierung von *trkA* das

Wachstum von Neuroblastomzellen inhibiert, während eine Aktivierung von *trkB* keinen Einfluss hat (Lucarelli et al., 1997).

Ein weiterer transmembraner Rezeptor namens *p75* bindet an die gesamte NGF-Familie der Neurotropine mit niedriger Affinität. Er ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-(TNFR)/Tod-Rezeptor-Familie. Theoretisch könnte *p75* als Antwort auf einen Liganden entweder zum Zelltod oder zur Differenzierung führen, je nachdem, ob *Trk*-Rezeptoren koexprimiert werden oder nicht (Casaccia-Bonofil et al., 1999; Hempstead et al., 2002). Die Expression von *p75* im Neuroblastom ist grundsätzlich mit einer guten Prognose assoziiert (Nakagawara et al., 1993). Seine von einer gleichzeitigen *Trk*-Expression unabhängige biologische und prognostische Signifikanz ist jedoch weiterhin unklar.

1.2.3 Der Einfluß von *MYCN*

Myc ist ein basisches HLH/LZ-Protein und wirkt als Transkriptionsfaktor. Es gehört zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper (Henriksson und Luscher et al., 1996; Prendergast, 1997). *Myc* läßt sich nach seiner Struktur und Funktion in drei Teile unterteilen. Die C-terminale Domäne beinhaltet das b/HLH/LZ-Motiv, das sowohl die Oligomerisation als auch die DNA-Bindung vermittelt (Blackwell et al., 1990). Die N-terminale Domäne enthält zwei hochkonservierte, jeweils etwa 20 Aminosäuren umfassende Strukturen, die so genannten *Myc*-Boxen I und II, die für alle biologischen Funktionen von *Myc* notwendig sind.

Drei eng verwandte *Myc* Proteine (*c-MYC*, *MYCN*, *MYCL*) sind bekannt, jedes mit dokumentiertem onkogenen Potential (Birrer et al., 1988; Schwab et al., 1983; Yancopoulos et al., 1985) und ähnlichen DNA-Bindeeigenschaften (Mukherjee et al., 1992). Regulationsstörungen des *MYC*-Gens oder veränderte Expressionslevel seines Produktes sind die häufigsten Veränderungen in malignen Tumoren überhaupt (Cole, 1986; Henriksson und Lüscher, 1996; Marcu et al., 1992).

Zu den Erkrankungen, bei denen *MYC* in die Karzinogenese involviert ist, zählen unter anderem das Burkitt-Lymphom, Mamma-Karzinome, Prostata-Karzinome, gastrointestinale Karzinome und Melanome. Neben erhöhter Expression des *MYC*-Gens kommt es auch zu genomischen Veränderungen in Form einer intra- oder

extrachromosomalen Amplifikation des Genlocus sowie zu Translokationen (zur Übersicht siehe Nesbit et al., 1999). Neben einer Rolle in einem Teil der kleinzelligen Lungentumoren, Schilddrüsenkarzinome, dem Retinoblastom und vereinzelt in Mamma-Karzinomen hat *MYCN* insbesondere für das Neuroblastom eine entscheidende biologische wie prognostische Bedeutung (Brodeur et al., 1984).

Verschiedenste biologische Funktionen des *MYC*-Gens konnten durch ektopische Expressionsstudien definiert werden, unter anderem maligne Transformation von Zellen, Immortalisierung, Blockade der Zelldifferenzierung und Induktion von Apoptose (Askew et al., 1991; Cole, 1986; Evan et al., 1993; Freytag et al., 1990; Marcu et al., 1992). Weiterhin ist Myc für eine effiziente Progression des Zellzyklus ausreichend (Eilers et al., 1989). Zusammen mit einem weiteren Oncogenprodukt, Max, weist das Myc-Protein eine sequenzspezifische DNA-Bindungs Kapazität auf, die durch eine ca 90bp lange, C-terminal gelegene basische Region vermittelt wird (Blackwood und Eisenmann, 1991; Prendergast et al., 1991). Eine Zerstörung der DNA-Binde-Domäne führt zum Verlust aller biologischen Eigenschaften von Myc (Stone et al., 1987). *MYC* kann in Kooperation mit einem zweiten Onkogen, beispielsweise activated RAS, etablierte Zelllinien transformieren (Land et al., 1983; Ruley, 1990). Dazu sind hoch konservative Domänen notwendig, die so genannten myc-Boxen I und II (MBI bzw. MBII) sowie die basische Region, die Helix-loop-Helix-Struktur, der leucin-zipper und der carboxy terminus (Stone et al., 1987; Sarid et al., 1987). Ein für die transformierende Wirkung von myc wahrscheinlich wesentlicher Mechanismus ist die transkriptionelle Repression von Genen. Beispiele für Gene, deren Transkription von Myc reprimiert werden und die für die maligne Transformation von Zellen eine wichtige Rolle spielen, sind Zell-Adhäsionsgene (LFA-1, alfa 3 β 1) (Inghirami et al., 1990), Differenzierungs-spezifische Gene (C/EBP α , mim-1, lysozyme) (Li et al., 1994; Mink et al., 1996) oder Zellzyklus/Wachstums-arrest-Gene (gadd34, gadd45, gadd 153, gas1, p27KIP1) (Chen et al., 1996; Amundson et al., 1998; Staller et al., 2001).

Apoptose ist definiert als ein intrinsisches Selbsttötungsprogramm der Zelle. Morphologisch ist sie charakterisiert durch ein Schrumpfen der Zelle, Blebbing der Plasmamembran und Chromatinkondensation (Wyllie, 1993). Myc ist unter bestimmten Umständen hinreichend und notwendig zur Induktion von Apoptose

(Askew et al., 1991; Evan et al., 1992) und limitiert dadurch zum Teil die von ihm vermittelten proliferationsfördernden Prozesse (Eilers et al., 1989). Neben einer direkten Apoptose-Auslösung wirkt Myc für unterschiedliche, die Zellintegrität schädigende Stimuli als Apoptose-sensibilisierend (Evan und Littlewood, 1998). Direkt in die Apoptose-Induktion ist Myc über die transkriptionelle Aktivierung des Gens p19^{ARF} involviert (Zindy et al., 1998; Dang, 1999). p19^{ARF} interagiert und reguliert den Komplex aus p53 und dessen E3-Ligase mdm-2 und führt hierüber zu einer Stabilisierung von p53 (Sherr, 1998). Die ektope Expression von *MYC* im Zellkultursystem kann in quieszenten Zellen einen Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus bewirken (Eilers et al., 1991; Kaczmarek et al., 1985; Steiner et al., 1995). Überexpression in wachsenden Zellen führt zu einer Verkürzung der G1-Phase und somit zu einem verfrühten Eintritt in die S-Phase (Karn et al., 1989; Lutz et al., 1996).

Das *MYCN*-Gen ist für das Neuroblastom von besonderer Bedeutung, da dessen Homologie zu *c-MYC* und sein Vorkommen in amplifizierten Genomabschnitten in Neuroblastomzellen beschrieben wurde (Schwab et al., 1983). Diese Amplifikation des *MYCN*-Gens korreliert mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Prognose (Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1985). Die *MYCN*-Prävalenz in Neuroblastomen beträgt insgesamt ca. 22% (Brodeur et al., 1997; Brodeur und Maris, 2002).

Die Deregulation zellulärer Kontrollpunkte der Proliferation und des Zellwachstums sowie die Interaktion mit antiproliferativen Signalen stellen eine wesentliche Möglichkeit für die Wirkungsweise von *MYCN* in humanen Neuroblastomen dar. In *MYCN* amplifizierten Tumorproben findet man vor allem solche Gene hochreguliert, die Proteine für die Proteinsynthese, den Metabolismus und den Zellzyklus kodieren. Eine große Anzahl von Genen, die in *MYCN* amplifizierten Tumorproben größtenteils herunterreguliert sind, kodiert Proteine, die in multiple Signalwege involviert sind (Berwanger et al., 2002). Dies lässt vermuten, dass Myc Proteine ein negatives Feedback auf Signalwege unterstützen (Oster et al., 2000).

Nur wenige Zielgene für *MYCN* sind bekannt. Zu ihnen zählen unter anderem: *MAD2*, *HSP75*, *FACL2*, *ODC*, *MCM7* und *MRP1* (Berwanger et al., 2002; Norris et al., 1997; Shohet et al., 2002). Eine Aktivierung von *ODC*, *MCM7* und *MRP1* führt zu einer Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus. Es wird angenommen, dass *MYCN* in

amplifizierten Tumorzellen das Eintreten in die G₀-Phase verhindert und somit die Zelle im aktiven Zyklus hält (Nakagawara et al., 1992).

1.2.4 Amplifikationen anderer Regionen

Amplifikationen an mindestens sechs weiteren Regionen, die nicht mit der *MYCN* Region an 2p24 identisch sind, konnten in Neuroblastomzelllinien oder Primärtumoren nachgewiesen werden. Dazu zählen Amplifikationen der DNA an den Chromosomen 2p22 und 2p13, das *MDM2* Gen in 12q13 und das *MYCL* Gen in 1p32 (Brodeur et al., 1997; Jinbo et al., 1989; Corvi et al., 1995; Van Roy et al., 1995). Bis heute ist es nicht gelungen in einem Neuroblastom ein amplifiziertes Gen ohne gleichzeitige Amplifikation von *MYCN* zu finden. Dies hat zur Folge, dass die biologische und klinische Signifikanz anderer amplifizierter Regionen bis heute unklar ist (Brodeur, 2003).

Neben der oben aufgeführten Auswahl an molekulargenetischen Modellen zur Onkogenese ist eine Vielzahl weiterer molekulargenetischer Faktoren mit Einfluss auf die Biologie des Neuroblastoms bekannt.

Trotz der Vielfalt an verschiedenen molekulargenetischen Modellen konnte bis heute noch nicht abschließend geklärt werden, durch welche molekulargenetischen Mechanismen sich zum Beispiel gut- und schlechtprognostische Neuroblastome unterscheiden, oder warum einige Tumoren therapieresistent sind und andere nicht. Aus diesem Grund bietet es sich an, neue und bereits bekannte molekulargenetische Signalwege mit sich ständig weiterentwickelnden, leistungsfähigeren Methoden zu untersuchen.

1.3 c-DNA Microarray

Wegbereiter für den heutigen Einsatz von so genannten Genchips (Microarrays) sind die rasanten Fortschritte innerhalb der Molekulargenetik in den letzten Jahren, insbesondere die Möglichkeit der systematischen Sequenzierung ganzer Genome.

Bisher stand im Vordergrund der Forschung das Bestreben, die Funktion von Genen zu verstehen, wozu einzelne Gene selektiv betrachtet wurden. Einen anderen Ansatzpunkt bietet die Microarray-Technik, welche die gleichzeitige Untersuchung vieler Gene eines Organismus in relativ kurzer Zeit erlaubt. Damit sind Rückschlüsse auf Beziehungen zwischen Genen, deren „Zusammenarbeit“ in Abhängigkeit von verschiedenen Umgebungsbedingungen, Stoffwechselsituationen oder Entwicklungsphasen (Tumorstadien) möglich.

Als cDNA-Microarray bezeichnet man eine systematische Anordnung von mehreren Tausend Gen-spezifischen cDNA Sequenzen, welche auf einer Matrix (spezielle Objektträger) immobilisiert sind (Schena et al., 1995). Diese Matrix kann simultan mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Targets hybridisiert werden (Shalon et al., 1996). Targets repräsentieren die m-RNA, die zuvor aus Test- und Referenz-Zellen oder -Gewebe isoliert wurden. Das durch Hybridisierung auf den cDNA-Microarray erhaltene Signal ermöglicht eine Aussage über die relative Quantität eines bestimmten Transkripts.

Das Ziel der cDNA-Microarrayanalyse ist also eine Kartierung des im Moment der Präparation vorliegenden mRNA-Pools eines Gewebes oder einer Zellkultur.

1.3.1 Anwendungsmöglichkeiten des Microarrays

Bis zum heutigen Tag sind in vielen neuen Anwendungsgebieten die Möglichkeiten des cDNA-Microarrays zum Einsatz gekommen. Dabei haben sich unterschiedliche Versuchsaufbauten etabliert. Beispiele sind:

1. Vergleich der Genexpressionsmuster von pathologischem und gesundem Gewebe als Referenz zur Identifikation von „krankheitsauslösenden“ Genen. Beispielsweise wurden die unterschiedlichen Genexpressionen von Zellen gesunder humaner Gehirne und Medulloblastomen miteinander verglichen (Boon et al., 2003).
2. Vergleich der Genexpression pathologischer Gewebe gleicher Art zur Diagnosesicherung und Bestimmung von Prognosen. Mit Hilfe von „artifiziellen neuronalen Netzwerken“ wurden Tumoren anhand ihrer Genexpressionsmuster in spezielle diagnostische Kategorien eingeteilt (Khan et al., 2001).

3. Bestimmung der Genexpression von Zelllinien oder Geweben nach deren Stimulation oder Zugabe bestimmter Faktoren, Medikamente, Toxine, Inhibitoren etc., wobei unstimulierte Zellen als Referenz dienen. Mit dem Microarray wurde unter anderem untersucht, welche molekularen Auswirkungen Nikotin auf eine Neuroblastomzelllinie hat (Dunckley und Lukas, 2003).
4. Bestimmung der Genexpressionsmuster in Zeitverläufen unter verschiedenen Bedingungen. Beispielsweise hat man in bestimmten Zeitintervallen systematisch die Veränderungen der Genexpression von Neuroblastom-Zelllinien nach Erwärmung und Chemotherapie untersucht (Schulte et al., 2003).

2. Fragestellung

Klinisch ist das Neuroblastom in allen Altersgruppen mindestens in zwei Typen mit sehr unterschiedlichen Prognosen unterteilbar. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um lokalisierte Tumoren (Stadium 1 – 3), die eine gute Prognose aufweisen, während die zweite Gruppe aus metastasierten Neuroblastomen (Stadium 4) besteht, die trotz intensiver Therapie häufig zum Tode des Patienten führen. Beide Neuroblastom-Typen sind histologisch und biochemisch nicht zu unterscheiden (NB-Studie 97).

Trotz der großen Zahl von Ansätzen, die Biologie des Neuroblastoms zu verstehen, ist bis heute nicht klar, ob die unterschiedlichen Tumorstadien auf eindeutige genetische Unterschiede zurückzuführen sind und ob mögliche genetische Unterschiede Änderungen in Signalwegen widerspiegeln, die Proliferation und Differenzierung des Neuroblastoms kontrollieren (Berwanger et al., 2002). Ausbleibende Erfolge der Screeninguntersuchungen lassen des Weiteren vermuten, dass der prognostisch ungünstigere Typ nicht, wie von vielen anderen Malignomen bekannt, aus der Gruppe mit besserer Prognose hervorgeht, sondern einen individuellen Pathomechanismus besitzt (Brodeur, 2003).

In dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob die klinischen Stadien 1 und 4 sich durch ihre Expressionsprofile unterscheiden lassen. Dazu werden im Rahmen umfassender cDNA-Microarray-Analysen die Expressionen von 4608 Genen beider Stadien miteinander verglichen. Das Ziel ist, Gene zu finden, die in der Lage sind, eindeutig zwischen beiden Stadien zu diskriminieren und die wahrscheinlich stadienabhängigen Pathomechanismen besser zu verstehen. Durch die gleichzeitige Analyse einer großen Anzahl von Genen wird es gegebenenfalls möglich sein, auf neue Signalwege zu schließen.

Anschließend werden die Ergebnisse der cDNA-Microarray-Analysen durch Northernblots und Real-time-RT-PCRs validiert. Bedeutende Gene sollen durch eine zweite Sequenzierung bestätigt werden.

3. Material

3.1 Medium für die Bakterienkultur

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g Glucose ad 1000 ml H ₂ O, pH 7,0
-----------	---

3.2 Allgemeine Lösungen

Blocklösung (Microarray)	1 % Bovines Serum Albumin 5x SSC 0,1 % SDS
cot1-DNA	Gibco
5x Denhardt's	0,1 % Ficoll 0,1 % Polyvinylpyrrolidon 0,1 % BSA
DEPC- H ₂ O	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in H ₂ O 12 h bei 37 °C, dann autoklavieren
Desoxynukleosid- Triphosphat (dNTP)	Perkin Elmer GeneAmp® (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Ethidiumbromid	Roth (Stammlösung 10 mg/ml in H ₂ O)
Farbstoffe (Microarray)	Cy3-dCTP, Cy5-dCTP (Amersham)

Material

Farbstoff (Realtime-PCR)	SYBR Green I (Eurogentec)
Formamid loading dye (Sequenzierung)	Formamid EDTA Methylviolett
Hybridisierungslösung (Northern-Blot)	50 % Formamid 1x Denhardt's 5x SSC 50 mM NaHPO ₄ pH 6,5 0,1 % SDS 10 % Dextransulfat 100 µg/ml Lachssperma-DNA in DEPC-H ₂ O
Oligo (dT)15	Roche (1 µg/µl)
Prähybridisierungslösung (Northern-Blot)	50 % Formamid, 5x Denhardt's 5x SSC 50 mM NaHPO ₄ pH 6,5 0,1 % SDS 100 µg/ml Lachssperma-DNA in DEPC-H ₂ O
RNAse-Inhibitor	RNAasin® (Promega)
3.3 Puffer	
Complete-Buffer (Sequenzierung)	(Biozym)
DNA-Ladepuffer	2,5 g Ficoll Type 400 Spatelspitze Bromphenolblau

Material

	Spatelspitze Xylencyanol 10 ml H ₂ O
PBS-Puffer pH 7,4	130 mM NaCl 3 mM KCl 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit HCl einstellen
Reaktionspuffer (Microarray)	5× First-Strand-Buffer (Gibco)
Reaktionspuffer (PCR)	10x Reaction-buffer (Mobi Tec GmbH)
10x RNA-Ladepuffer	50 % Glycerin 1 mM EDTA pH 8,0 0,25 % Bromphenolblau
10x RNA-Laufpuffer	20 mM MOPS 80 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0
RNA-Probenpuffer	50 % deionisiertes Dimethylformamid 20 % DEPC- H ₂ O 10 % 10x RNA-Laufpuffer 20 % Formaldehyd-Lösung (37 % in H ₂ O)
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat pH 7,0
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat

	1 mM EDTA pH 8,0
TBE-Puffer (0,5x)	45 mM Tris-Borat 2 mM EDTA pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0
Verdünnungspuffer	10x Dilution-buffer (Mobi Tec GmbH)

3.4 Chemikalien

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

Amersham	Poly (dA) Redivue [α - ³² P] dCTP, 250 μ Ci, 10mCi/ml
Biozym	Sequa-Gel-6 % TM
Invitrogen	Agarose
Riedel de Haen	Ethanol, NaCl, Formaldehyd 37 %
Roth	Tris pH 6,8

3.5 Standards und Enzyme

Molekulargewicht	Smart ladder SF (Eurogentec)
Superscript II	Gibco (200 U/μl)
Taq-Polymerase	MobiTec GmbH

3.6 Filme, Filter, Geräte und Software

Filme	BIOMAX MR Scientific Imaging Film (Kodak)
Blotting-Membran für RNA	Zetaprobe GT Nylonmembran (Biorad)
Whatman-Filterpapiere	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)

Biofuge, Heraeus Fresco

Einlesegerät, Model GMS 418 fluorescent scanner, Affimetrix

I-Cycler, Biorad

Megafuge 1.OR, Heraeus

Primus Thermocycler, MWG

Sequencer ALF[®]-Express, Pharmacia Biotech

Schüttelinkubatoren Model G25, New Brunswick Scientific Co.INC

Szintillationszähler LS1701, Beckman

UV-Quervernetzer, Model GS Gene Linker, Biorad

AM V3.0 Software, Pharmacia Biotech

IMAGENE 3.0, Bio Discovery, Inc

3.7 Kit-Systeme

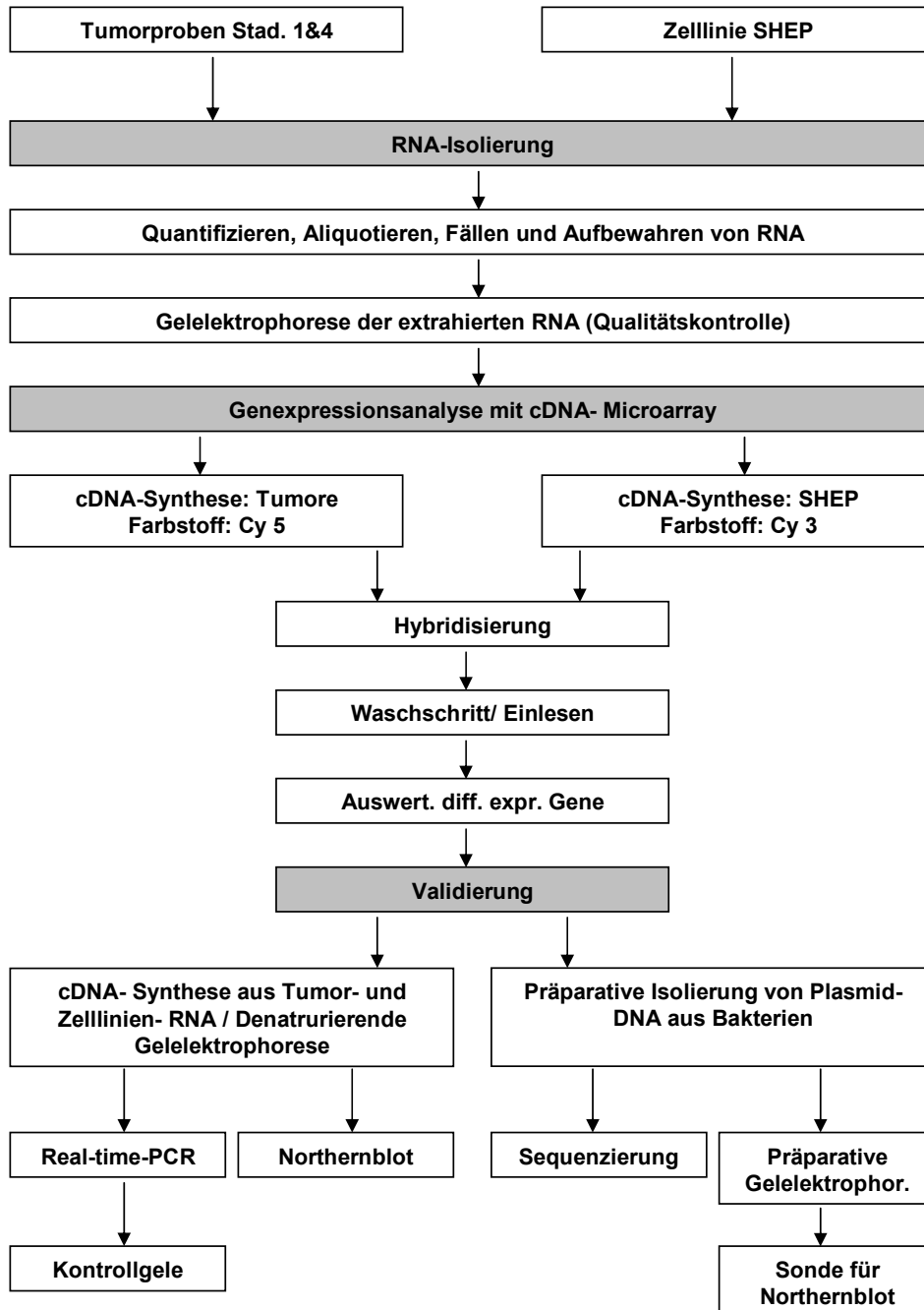
DNA-Markierung	Prime-It II Random Primer Labeling Kit (Stratagene)
----------------	--

Material

Gelfiltrationssäulen	ProbeQuant G-50 Micro Columns (Pharmacia)
PCR-Aufreinigungskit	PCR-purification-kit (Qiagen)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen-tip 500 (Qiagen)
RNA-Isolationskit	Qiagen Rneasy (Qiagen)
Sequenzier-Kit	Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza- dGTP (Amersham life Science)
Reagenz-A:	ddATP, Tris-HCL pH 9,5, Magnesiumchlorid, Tween 20, Nonidet P- 40, 2 Mercaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo-Sequenase- DNA-Polymerase
Reagenz-C:	ddCTP, Rest wie Reagenz A
Reagenz-G:	ddGTP, Rest wie Reagenz A
Reagenz-T:	ddTTP, Rest wie Reagenz A

4. Methoden

4.1 Systematik der angewandten Methoden



4.2 Tumormaterial

Das gesamte in dieser Arbeit verwendete Tumormaterial wurde von Prof. Dr. med. Christiansen, Medizinisches Zentrum für Kinderheilkunde der Universität Marburg, zur Verfügung gestellt. Es wird von den Mitgliedern der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) nach seiner Entnahme umgehend auf dem Postweg in das Medizinische Zentrum für Kinderheilkunde der Universität Marburg gesandt. Das durch Operationen, Biopsien oder Punktionen gewonnene Tumormaterial wird im Neuroblastomlabor der Kinderklinik Marburg sofort aufgearbeitet. Die MYCN-Amplifikation wird routinemäßig bestimmt, und die Proben werden anschließend bei -80 °C aufbewahrt. Die Stadieneinteilungen und weitere klinische Daten stammen aus den jeweils einsendenden Kliniken.

Aus der Tumorbank von Prof. Dr. Christiansen wurden 100 zufällig ausgewählte Tumorproben von Herrn Dr. Bergmann histologisch untersucht. Die Untersuchung ergab, dass ca. 95 % der eingesendeten Biopsien weniger als 5 % Nicht-Tumorzellen beinhalteten (Bergmann et al., 2001). Dieses Ergebnis führte zu der Entscheidung, von weiteren histologischen Untersuchungen der in dieser Arbeit verwendeten Proben abzusehen.

Die 40 hier untersuchten Tumorproben sind insgesamt nicht MYCN-amplifiziert und setzen sich aus 19 Stadium 1- und 21 Stadium 4-Proben zusammen.

4.3 Neuroblastomzelllinie (SHEP)

Bei den hier verwendeten SHEP-Zellen handelt es sich um Subklone der Zelllinie SK-N-SH. Sie entstammen klonierten humanen Neuroblastomzelllinien, die aus einem einzigen Primärtumor hervorgegangen sind. SHEP-Zellen werden im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, permanent gezüchtet.

4.3.1 Ernten der SHEP-Zellen

Die Kulturschalen wurden zunächst auf Eis gelagert, und das Medium wurde vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 ml kühlem PBS gewaschen. Mit einem Schaber wurden die Zellen nun vollständig abgelöst und mit einer Pipette in 1,5 ml große Eppendorf-Gefäße überführt. Nun wurden die Zellen bei

3000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Der zurückbleibende Niederschlag wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

4.4 Extraktion von RNA aus primären Tumorproben und SHEP

Sowohl die Gesamt-RNA der Tumorproben als auch die Gesamt-RNA der Zelllinie wurde mit Hilfe des RNeasy Midi Kit (50) der Firma QIAGEN isoliert. Die Durchführung erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers „Rneasy Midi/Maxi Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues“. Die Methode beruht auf der Zelllyse durch Guanidinium-Isothiocyanat in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol und der selektiven Adsorption von RNA an eine Membran auf Basis von Silica-Gel.

4.4.1 Quantifizieren, Aliquotieren, Fällen und Aufbewahren von RNA

5 µl des im RNeasy Midi Kit gewonnenen RNA Eluats wurden in 95 µl H₂O verdünnt und in einem Spektrometer bei 260 nm Wellenlänge gegen einen Leerwert vermessen. Aus Ergebnissen der Doppelmessungen wurden Mittelwerte gebildet und die so ermittelte RNA-Ausbeute in µg/µl umgerechnet. Die Reinheit der RNA wurde anschließend durch denaturierende Gel-Elektrophoresen überprüft.

Die RNA wurde in 55 µg und 12 µg Aliquots aufgeteilt. Ihre Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C in gefälltem Zustand. Die Fällung wurde mit 1 Volumen RNA, 1 Volumen 5 molarem Ammoniumacetat und 4 Volumina Ethanol absolut durchgeführt. Die gut durchmischte Probe wurde mindestens 2 Stunden bei -80 °C aufbewahrt und anschließend für 20 Minuten bei 4 °C und 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 500 µl 80 % Ethanol wurden vorsichtig auf den Niederschlag gegeben.

Zur späteren Weiterverarbeitung der Proben wurden diese 5 Minuten zentrifugiert und das 80 % Ethanol verworfen. Der anschließend im Konzentrator getrocknete Niederschlag konnte nun in dem gewünschten Volumen aufgenommen werden.

4.4.2 Denaturierende Gelelektrophorese der extrahierten RNA

Um einer Kontamination mit RNAsen vorzubeugen, wurden alle verwendeten Lösungen mit H₂O angesetzt, das mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) für 12 h bei 37 °C behandelt und anschließend autoklaviert worden war. Alle Materialien wurden autoklaviert oder hitzesterilisiert. Die Gelkammer wurde über Nacht mit 3 % (v/v) H₂O₂ behandelt.

1,5 g Agarose wurden in 108 ml DEPC-H₂O aufgekocht und unter Rühren auf ca. 60 °C abgekühlt. Anschließend wurden zur Agaroselösung 25 ml Formaldehydlösung (37 %, v/v) und 15 ml 10x RNA-Laufpuffer (20 mM MOPS pH 7,0; 80 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA) gegeben. Das Gel wurde auf einen gereinigten Gelträger (14 x 14 cm) gegossen. 10 µg Total-RNA wurden in einem Eppendorf-Gefäß lyophilisiert und in 15 µl Probenpuffer (50 % deionisiertes Dimethylformamid; 20 % DEPC-H₂O; 10 % 10x Laufpuffer; 20 % Formaldehyd-Lösung (37 % in H₂O)) aufgenommen. Nach dem Denaturieren für 10 min bei 65 °C wurden die Proben auf Eis abgekühlt und mit 2 µl Ethidiumbromidlösung (400 µg/ml in DEPC-H₂O) und 2 µl 10x Ladepuffer (50 % Glycerin, 1 mM EDTA pH 8,0; 0,25 % Bromphenolblau) gemischt. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 50 – 65 Volt in 1x Laufpuffer für 5-7 h aufgetrennt.

4.5 Genprofilanalyse

4.5.1 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Superscript II in cDNA transkribiert, wobei gleichzeitig fluoreszierende Farbstoffe in die neuen Produkte eingebaut wurden. Anschließend wurden die so markierten Proben aufgereinigt und standen zur Hybridisierung bereit.

Der Versuchsaufbau erfolgte in Anlehnung an bereits publizierte Protokolle (<http://brownlab.stanford.edu>).

50 µg total-RNA wurden in 33 µl H₂O gelöst und mit 4 µl Oligo (dT)₁₅ auf ein Gesamtvolumen von 37 µl gebracht. Anschließend wurde der Ansatz für 3 Minuten bei 65 °C inkubiert. Während dieser Zeit wurde ein Mastermix, bestehend aus 12 µl first

strand buffer, 5 μ l 10 \times DTT, 0,75 μ l RNAsin und je 1 μ l dNTP, vorbereitet. dCTP wurde in 5 mM Konzentration verwendet, während die restlichen Nucleotide in 10 mM Konzentration eingesetzt wurden. Zu jeder Probe wurden 21,75 μ l dieses Mastermixes pipettiert und anschließend mit 1 μ l der Farbstoffe Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP vermischt. RNA der Neuroblastomzelllinie wurde Cy3-dCTP zugeteilt, während die primäre Tumor RNA mit Cy5-dCTP gemischt wurde. Zur Einleitung der reversen Transkription wurden 2 μ l Superscript II zu jeder Probe dazu gegeben und diese zunächst für 10 Minuten bei 25 °C und anschließend für 120 Minuten bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert.

Es folgte ein Aufreinigungsschritt der mRNA-cDNA-Hybride mit Hilfe des PCR-purification-kits von QIAGEN unter Verwendung des mitgelieferten Protokolls: „QIAquick PCR Purification Kit Protocol – using a microcentrifuge“. Die aus dem Aufreinigungsschritt erhaltenen 50 μ l Eluat wurden mit 10 μ l humaner cot1-DNA vermischt und anschließend mit 6 μ l 2,5 M Natrium-Acetat und 120 μ l Ethanol absolut gefällt. Die Proben wurden 15 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag mit 500 μ l 80 % Ethanol gewaschen. Nach 2 Minuten Zentrifugieren wurde auch dieser Überstand verworfen und der Niederschlag im Konzentrator (Speed-Vac) getrocknet. Der Niederschlag wurde nun vorsichtig in 10 μ l 1 \times TE, pH 8,0 resuspendiert, für 3 Minuten bei 100 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach dem Dazugeben von 2,5 μ l 1 N NaOH wurden die Proben für 15 Minuten bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert und anschließend folgende Stoffe der Reihenfolge nach dazugegeben: 2,5 μ l 1 M Tris-HCL, pH 6,8, 2 μ l 1 M HCL, 1,7 μ l 2,5 M Natrium-Acetat und 37 μ l Ethanol absolut. Die Ansätze wurden erneut 15 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert, der Niederschlag wurde mit 500 μ l 80 % Ethanol gewaschen und anschließend im Konzentrator getrocknet. Anschließend wurde er in 13 μ l H₂O resuspendiert und 5 μ l 20 \times SSC, 2 μ l 2 % SDS und 2 μ l Poly(dA) dazugegeben. Zu diesem Zeitpunkt wurde jeder Tumorprobe eine Probe der Zelllinie zugeordnet und diese jeweils zusammengebracht. Vor dem Auftragen auf die prähybridisierten cDNA-Objektträger wurden die Proben für 2 Minuten bei 95 °C inkubiert.

4.5.2 cDNA-Objektträger

Die 4608 Gene tragenden cDNA-Objektträger sind 76 x 26 mm groß und bestehen aus Glas. Sie wurden von der Microarray Unit, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, mit Hilfe von sequenzverifizierten humanen cDNA IMAGE Klonen (ResGen; Cat# 97001. V. gf200; <http://www.resgen.com>) hergestellt. Zusätzlich wurden 90 weitere cDNA-Klone verwendet, die zuvor als mit dem Zellzyklus in Zusammenhang stehend beschrieben worden waren (Details: <http://imt.uni-marburg.de>). Jedes der 4608 Gene wurde mit Hilfe eines Roboters (GMS 417 Arrayer der Firma Affimetrix), wie in Hegde et al., (2000) beschrieben, zweifach auf den cDNA-Objektträger platziert und anschließend fixiert.

4.5.3 Hybridisierung

Die mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Proben und ihre Referenzen wurden zusammen auf einen cDNA-Objektträger gegeben, wo sie kompetitiv an 4608 fixierten komplementären cDNA-Sequenzen binden konnten.

Die von der Microarray Unit, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, hergestellten cDNA-Objektträger wurden 30 Minuten in einer Prähybridisierungslösung bei 55 °C inkubiert. Anschließend folgten ein ca. 3-minütiger Waschriff mit deionisiertem Wasser und das Trockenzentrifugieren der cDNA-Objektträger bei 1500 g für 3 Minuten. Die 40 µl großen Proben wurden auf die cDNA-Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Falcon Röhrchen wurden mit einem halben, in 1 ml 3× SSC und 0,1 % SDS getränkten Kimwipe-Lite-Tuch, bestückt. In diesen feuchten und angewärmten Falcon Röhrchen wurden die cDNA-Objektträger bei 55 °C für ca. 24 Stunden lichtgeschützt inkubiert.

4.5.4 Waschriff/Einlesen der cDNA-Objektträger

Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die cDNA-Objektträger stringent in unterschiedlichen Waschlösungen gewaschen. Ziel war es, nicht gebundene Reagenzien zu entfernen, um anschließend eine eindeutige Auswertung mittels eines Laser-Einlesegerätes zu ermöglichen.

Waschlösung A setzte sich aus $0,1\times$ SSC und 0,1 % SDS zusammen und wurde dreimal vorbereitet. Waschlösung B bestand aus $0,1\times$ SSC und wurde zweimal angesetzt. Zunächst wurden die Deckgläschen der cDNA-Objektträger in Waschlösung A heruntergewaschen und anschließend nochmals für jeweils 10 und 5 Minuten auf einem Schüttler in Waschlösung A gewaschen. Anschließend wurden die cDNA-Objektträger zweimal für jeweils 5 Minuten auf einem Schüttler in Waschlösung B gewaschen, bevor sie für 5 Minuten in Wasser gereinigt wurden. Zum gleichmäßigen Trocknen der cDNA-Objektträger wurden diese für 3 Minuten bei 1500 U zentrifugiert.

Das Einlesen der cDNA-Objektträger erfolgte mit Hilfe eines Laser-Einlesegerätes (GMS 418 Fluorescent Scanners des Herstellers Affimetrix). Nacheinander wurden die cDNA-Objektträger auf dem roten Kanal (Cy 3) und auf dem grünen Kanal (Cy 5) mit verschiedenen Laser-Stärken- und Verstärker-Einstellungen (Laserpower und Gain) eingelesen. Dabei regte der Laser den jeweiligen Farbstoff mit einer spezifischen Wellenlänge zum Leuchten an. Die Intensitäten der beiden Farbstoffe auf den einzelnen Genpunkten (Spots) wurden durch einen Computer in Falschfarben umgewandelt und als Abbildungen dargestellt. Anschließend wurden die Abbildungen beider Kanäle mit ähnlich starker Gesamtintensität und Hintergrund gewählt und im Verarbeitungsprogramm „IMAGENE 3.0“ weiterverwendet.

4.5.5 Auswertung der Expressionsprofile

Mit dem Programm „IMAGENE 3.0“, der Firma Bio Discovery, Inc., wurden die Abbildungen der beiden Kanäle nahezu deckungsgleich übereinander gelegt und der Messbereich jedes einzelnen Genpunktes festgelegt. Das Programm war nun in der Lage im festgelegten Messbereich Verhältnisse zwischen den Intensitäten des roten und grünen Kanals einerseits und dem Hintergrund andererseits zu bilden.

Die Rohdaten wurden an Herrn Oliver Hartmann vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, Marburg, weitergereicht. Dort wurden die Daten einzelnen Genen zugeordnet, die Ergebnisse standardisiert und Qualitätskontrollen durchgeführt. Nach statistischen Analysen mit bereits publizierten Methoden (Westfall und Young, 1993; algorithm 4.1; Callow et al., 2000) wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt (vgl.: Berwanger et al.; 2002).

4.6 Validierung

Die durch Microarray-Experimente ermittelten Expressions-Daten wurden durch Real-time-RT-PCR Experimente oder Northernblot-Analysen validiert. Ausgesuchte Gene, die für weitere Experimente verwendet werden sollten, wurden resequenziert, um ihre Identität zu bestätigen.

4.6.1 cDNA-Synthese aus Tumor- und Zelllinien-RNA

Die Gesamt-RNA wurde nach folgendem Protokoll mit Hilfe einer PCR-Maschine (Thermocycler) umgeschrieben.

Zunächst wurden 10 µg Gesamt-RNA in 8 µl DEPC aufgenommen und 4 µl Oligo-Primer-p(dT) hinzupipettiert. Anschließend wurden 23 µl Aqua-dest. dazugegeben und zur Einleitung der RNA-Entfaltung für 5 min. bei 65 °C inkubiert. Um die Oligo-Primer-Anlagerung zu fördern, wurden die Proben nun wieder auf 4 °C abgekühlt. Im nächsten Schritt folgte die Zugabe von 12 µl 5 x-First-Strand-Buffer, 6 µl DTT, 1 µl von jedem dNTP und 0,7 µl RNAsin® zu einem Gesamtvolumen von 58 µl, das für 3 Minuten bei 42 °C inkubiert wurde. 2 µl Super-Script-II(MMLV)-Reverse-Transcriptase wurden als letztes dazugegeben und der gesamte Ansatz nochmals für 2 Stunden bei 42 °C in der PCR-Maschine inkubiert. Nach Beendigung der reversen Transkription wurde die Probe abschließend zur Deaktivierung der Reversen-Transcriptase für 15 Minuten auf 75 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C abgekühlt.

4.6.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli Bakterien erfolgte mit Hilfe des Plasmid-Purification-Systems der Firma Qiagen und dem dazugehörigen Protokoll. Das System beruht auf einem säulenchromatographischen Trennverfahren und erlaubt die Aufreinigung von bis zu 500 µg Plasmid-DNA pro Ansatz. Hierfür wurden zunächst 400 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie aus der Microarray-Bibliothek angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (150 rpm). Am folgenden Tag wurde die Kultur mit 6000 rpm bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde der Bakterienniederschlag in 10 ml Puffer 1 (4 °C) resuspendiert und mit 10 ml Puffer 2 für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Nach

Zugabe von 10 ml Puffer 3 (4 °C) wurde das Lysat leicht geschüttelt und für 20 min bei 4 °C stehen gelassen. Das Lysat wurde in eine mit Glaswolle präparierte Einwegspritze gegeben und vorsichtig in die bereits mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-Tip-500-Säule gespritzt. Vorhandene Zelltrümmer mit anhaftender bakterieller DNA konnten so abgetrennt werden. Nun wurde die Säule mit 2 x 30 ml QC-Puffer gewaschen und mit 15 ml 60 °C warmem QF-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in einem Correxröhrchen aufgefangen. 10,5 ml Isopropanol wurden hinzupipettiert und nach gutem Mischen bei 9000 U/min. und 4 °C wurde das Eluat für 30 min. zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands wurde vorsichtig 70 % EtOH hinzupipettiert und erneut bei 9000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach erneutem vorsichtigem Abgießen des Überstands konnten die Röhrchen zum Trocknen für 10 min. verkehrt herum auf ein Tuch gestellt werden. Anschließend wurden 500 µl 1x TE pH 8 hinzugegeben und die DNA bei 4 °C über Nacht gelöst.

Es folgte die Plasmid-DNA-Amplifikation mittels PCR. Das Vorgehen, die verwendeten Primer (M 13) und die PCR-Bedingungen sind dem Abschnitt 4.6.4 zu entnehmen.

4.6.3 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente zu reinigen, wurden präparative 1,5 % Agarose-Gele mit breiten Geltaschen verwendet. Die Gele wurden mit jeweils 10 µl Ethidiumbromidlösung versetzt. Als Laufpuffer diente TAE. 380 µl DNA-Lösung (PCR-Produkt) wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90 V für 90 min. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Fragmente zur Vermeidung von Strahlenschäden mit UV-Licht geringer Intensität sichtbar gemacht und die Gelstücke, welche die gewünschten DNA-Fragmente enthielten, mit einem Skalpell ausgeschnitten.

In sterile 0,5 ml Eppendorf-Gefäße wurde in Boden und Deckel ein kleines Loch gebohrt. Anschließend wurden die Gefäße mit geringen Mengen Glaswolle gestopft und die ausgeschnittene Gelbande in kleinen Stücken oben draufgegeben. Nach kurzer Zeit in flüssigem Stickstoff wurden die Proben nun in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße

gestellt und für 15 min. zentrifugiert. Das Eluat mit der aufgereinigten DNA konnte nun für die Herstellung von Northernblot-Sonden verwendet werden.

4.6.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur in vitro Amplifikation von spezifischen DNA- bzw. cDNA-Sequenzen. Die Taq-Polymerase ist in der Lage, aus freien Desoxynukleosidtriphosphaten einen DNA Strang zu synthetisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR eingesetzt, um die erforderlichen Bedingungen für nachfolgende Real-time-RT-PCR-Experimente zu erarbeiten (FYN, AFAP, β -actin) und geringe DNA-Mengen im Rahmen von Vorbereitungen für einen Northernblot zu amplifizieren (α -catenin).

Pro Reaktionsansatz wurden 1 μ l cDNA zu einem zuvor kombinierten Mix aus 5 μ l Reaktionspuffer, je 1 μ l dNTP, 0,1 μ l Taq-Polymerase, jeweils 1 μ l eines jeden Primers und je nach Erfordernis 1 μ l der jeweiligen PCR-Zusätze gegeben. Das resultierende Volumen einer Probe wurde anschließend mit Aqua-dest. zu einem Gesamtvolumen von 50 μ l ergänzt, gut durchgemischt und nach den unten aufgeführten PCR-Bedingungen (Tab. 4.1.) in einer PCR-Maschine (Thermocycler) inkubiert.

Die Primer wurden von der Firma Roth synthetisiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde vor Gebrauch in H₂O aufgenommen und auf eine Konzentration von 50 pmol/ μ l eingestellt.

Name	Primer	Sequenz	Temperaturschritte
			Einmalig vor jeder PCR: 95 °C 2:00 min.
FYN Real-time 451 bp.	Fwd. 1:2 verd.	5'- GGG CAG TTT GGG GAA GTA TGG ATG -3'	95 °C 0:30 min. 66 °C 0:45 min. 72 °C 1:00 min. Zyklen: 30 Zusatz: 1 µl Formamid 4 µl DMSO 5 µl Sybr.
	Rev. 1:2 verd.	5'- TGG GGA ACT TTG CAC CTT GTC TTG -3'	
AFAP Real-time 442 bp.	Fwd.	5'- GAA CAG CGC GGC CGT CTT GAA - 3'	95 °C 0:30 min. 62 °C 0:45 min. 72 °C 1:00 min. Zyklen: 33 Zusatz: 1 µl Formamid 2,5 µl DMSO 5 µl Sybr.
	Rev.	5'- AGG GCT GGG TTG GAA TCG GTG AAA -3'	
β- actin Real-time 626 bp.	Fwd. 1:2 verd.	5'- CCTCGCCTTTGCCGAT -3'	95 °C 0:45 min. 60 °C 0:30 min. 72 °C 1:30 min. Zyklen: 36 Zusatz: 0,9 µl Formamid 4 µl DMSO 5 µl Sybr.
	Rev. 1:2 verd.	5'- GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCA -3'	
α-catenin 723 bp.	Fwd. M 13	5'- GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG-3'	94 °C 0:30 min. 52 °C 0:30 min. 72 °C 2:30 min. Zyklen: 35
	Rev. M 13	5'- TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG-3'	
			zum Abschluß einmalig 72 °C 7:00 min.

Tab.: 4.1 PCR-Bedingungen

4.6.4.1 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Zur Analyse der amplifizierten DNA kamen horizontale Agarosegele zum Einsatz. Sie bestanden aus 1 g Agarose, die in 50 ml 1x TBE gelöst wurde. Nach kurzem Aufkochen und anschließender Abkühlung wurde die Agaroselösung in eine Gelkammer mit Kamm gegossen und bis zur vollständigen Aushärtung bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Gele in den mit 1x TBE-Puffer gefüllten Laufkammern platziert. Jede Probe wurde mit 5 µl des 10x DNA-Ladepuffers versetzt. Jeweils 15 µl dieses Gemisches wurden in eine Geltasche pipettiert. Es folgte die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren bei einer Spannung von 80 V für ca. 90 Minuten. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele 10 Minuten in einer 1 prozentigen Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und anschließend für 15 Minuten in H₂O gewaschen. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten nun im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

4.6.4.2 Real-time-RT-PCR

10 µg totaler RNA wurden unter Verwendung von Superscript II Reverse Transkriptase und einem oligo dT15 Primer transkribiert. Anschließend wurden mit Hilfe einer Real-time-PCR-Maschine (I-Cycler der Firma Bio-Rad) quantitative RT-PCRs gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Farbstoff wurde Sybr Green verwendet. Die Produkte wurden mit Hilfe eines 490 nm Filters detektiert. Die verwendeten PCR-Bedingungen (s. Tab. 4.1) wurden zuvor empirisch erarbeitet. Nach erfolgreicher Etablierung von Verdünnungsreihen wurde jede Messung der Tumorproben an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt. Im Anschluß an jede PCR wurde die Spezifität der Reaktion durch eine Schmelzkurve sowie durch Nachweis der amplifizierten Produkte in einem Agarosegel überprüft.

Um quantitative RT-PCRs durchzuführen, wird zum PCR-Ansatz ein fluoreszierender Farbstoff gegeben, der nur dann fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA bindet. Diese Fluoreszenz kann mit Hilfe einer Kamera gemessen werden. Dabei korreliert die Menge des doppelsträngigen PCR-Produkts mit der Intensität der emittierten Fluoreszenz. Es entstehen Amplifikationskurven, die Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA zulassen. Dabei gibt der CT-Wert ("threshold cycle") die Anzahl der Zyklen an, bei der die Signale des betrachteten

Amplifikationsprodukts sich vom Signalhintergrund abheben. Je kleiner der CT-Wert, desto mehr spezifische cDNA lag in der einzelnen Probe vor.

Bei einer Schmelzkurve wird die Temperatur, beginnend bei 96 °C, alle 10 Sekunden um 1 °C gesenkt. Parallel dazu wird die Intensität der Sybr Green Fluoreszenz gemessen. Bei hohen Temperaturen sind alle PCR-Produkte denaturiert. Je nach Höhe der Schmelzpunkte der PCR-Produkte liegen diese bei abnehmenden Temperaturen in doppelsträngiger Form vor, wodurch die Fluoreszenz schlagartig ansteigt. Von dieser Schmelzkurve wird mathematisch die erste Ableitung erstellt, so dass jede schlagartige Intensitätsänderung als Scheitelpunkt dargestellt wird. Scheitelpunkte, die nicht an dem Schmelzpunkt des erwarteten PCR-Produkts liegen, deuten auf unspezifische PCR-Produkte hin.

4.6.5 Northernblot

Alle verwendeten Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, das mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) für 12 h bei 37 °C vorbehandelt und autoklaviert wurde. Alle Materialien wurden autoklaviert und die Gelkammern mit 10 % SDS und DEPC vorbehandelt.

4.6.5.1 Gelelektrophorese für Northernblot

Die Gelelektrophorese für den Northernblot wurde wie in Abschnitt „4.4.2 Denaturierende Gelelektrophorese der extrahierten RNA“ beschrieben durchgeführt.

4.6.5.2 Kapillartransfer auf Nylonmembran

Das Gel wurde zweimal für 20 Minuten in DEPC-Wasser inkubiert. Für die Analyse von RNA, deren Länge 2,5 kb überschritt, wurde eine partielle Hydrolyse in 50 mM NaOH durchgeführt. Anschließend wurde zweimal mit DEPC-Wasser gewaschen. Das Gel wurde zweimal für 20 Minuten in 20× SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat) inkubiert. Der Kapillartransfer auf eine Zetaprobe GT Nylonmembran (Biorad) erfolgte in 20× SSC über Nacht. Die transferierte RNA wurde durch UV-Quervernetzung mit 150 mJoule (GS Gene Linker, Biorad) fixiert.

4.6.5.3 Inkubation der Northern-Membran mit radioaktiv markierten DNA-Proben

DNA-Fragmente für die Hybridisierung wurden durch die „random-prime“-Methode unter Verwendung des „Prime-It II“-Systems (Stratagen) und 25 μCi α -[^{32}P]-dCTP (Redivue 3000 Ci/mmol, Amersham) radioaktiv markiert. Es wurde nach der Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Die markierte DNA wurde über eine Sephadex G-50 Gelfiltrationssäule aufgereinigt (ProbeQuant G-50, Pharmacia).

Die Membran wurde in einer Prähybridisierungslösung (1,5 ml DEPC-Wasser, 7,5 ml Formamid, 1,5 ml 50 \times Denhardt's, 3,75 ml 20 \times SSC, 0,75 ml NaH_2PO_4 pH 6.5, 150 μl 10 % SDS) und 100 $\mu\text{g/ml}$ Lachssperma-DNA für 4-8 h bei 42 $^\circ\text{C}$ vorinkubiert. Die Hybridisierung mit der denaturierten, radioaktiv markierten DNA (mindestens 2×10^6 cpm/ml) erfolgte in 15 ml Hybridisierungslösung (7,5 ml Formamid, 0,3 ml 50 \times Denhardt's, 3,75 ml 20 \times SSC, 0,75 ml 1 M NaH_2PO_4 pH 6.5, 150 μl 10 % SDS, 3 ml 50 % Dextransulfat und 100 $\mu\text{g/ml}$ Lachssperma-DNA) über Nacht bei 42 $^\circ\text{C}$. Die Membran wurde nacheinander für jeweils 30 Minuten in 1.) 1 \times SSC, 1 % SDS bei 65 $^\circ\text{C}$ und 2.) 0,1 \times SSC, 1 % SDS bei 65 $^\circ\text{C}$ gewaschen. Bei unzureichendem Waschergebnis wurde der letzte Schritt wiederholt. Der Nachweis der hybridisierten RNA erfolgte über einen Phosphorimager und Kodak Biomax Filme.

4.6.6 Gensequenzierung nach der Kettenabbruchmethode

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode während einer Thermocycler-PCR-Reaktion. Durch den Einsatz eines bestimmten Anteils der entsprechenden Dideoxynukleotide (ddXTP) wurden mit einer gleichmäßigen Häufigkeit Kettenabbrüche am jeweils gleichen Nukleotid der zu sequenzierenden DNA Sequenz erzwungen. Die entstehenden Teilfragmente endeten an dem 3' Ende immer mit dem gleichen Nukleotid. In einer elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Detektion der Fragmente mit Hilfe eines Rotlicht-LASERS, der in der Lage ist, die 5' Cy5-Markierungen zu detektieren. Anschließend erfolgte in der durch Computerprogramme unterstützten Auswertung die Zusammensetzung der 4 Einzelansätze zu einer Sequenz.

Für jedes zu sequenzierende DNA-Fragment benötigte man 4 Ansätze für den Vorwärtsstrang und 4 Ansätze für den Rückwärtsstrang (A-,C-,G-,T-Ansatz). In jedem Ansatz wurde nur ein Primer verwendet, um die Reaktion in nur eine Richtung ablaufen zu lassen. Jeder Ansatz enthielt je 1 µl DNA, 4,5 µl Aqua dest., 0,5 µl 5'-Cy5 gelabelten Primer und 2 µl der Reagenz-A, -C, -G oder -T. Die Ansätze wurden unter den jeweiligen PCR-Bedingungen im Thermocycler inkubiert. Im Anschluß an die Sequenzierungsreaktion wurden zu jedem Ansatz 4 µl Formamid loading dye pipettiert.

Die Herstellung des Gels erfolgte mit 48 ml SequaGel-6 %™, 12 ml Complete-Buffer und 490 µl APS (Ammoniumpersulfat) zur Initiierung der Polymerisation. Die Gellösung wurde auf eine Dicke von 0,5 mm zwischen zwei Glasplatten gegossen. Anschließend wurde die Glasplatteneinheit in den ALF®-Express-Sequencer eingehängt und angeschlossen. Der TBE-Puffer wurde in die Pufferbehältnisse gefüllt. Es folgte die Beladung von links nach rechts in der Reihenfolge A, C, G, T. Bei 1500 V, 38 mA und 34 W dauerte die elektrophoretische Auftrennung 720 min.

Anschließend erfolgte die Auswertung mit Hilfe der AM V3.0 Software (Pharmacia Biotech), mit der die Rohdaten erfaßt, analysiert und prozessiert wurden, um aus den einzelnen A-, C-, G- und T-Fragmenten die endgültige, fortlaufende Sequenz zu erhalten.

5. Ergebnisse

5.1 *Das Tumormaterial*

Die primären Tumorproben wurden zunächst nach verschiedenen Kriterien selektiert. Ziel war es, zwei Gruppen zu bilden, die möglichst große Unterschiede in Bezug auf ihre Prognose aufweisen. Das *MYCN*-Gen durfte in beiden Gruppen nicht amplifiziert sein, da es in der Lage ist, andere Prognosefaktoren wie Stadium und Alter bei Erkrankung zu durchbrechen. Die Patienten der Gruppe mit Neuroblastomen des Stadiums 1 waren bei der Diagnose ihrer Erkrankung nahezu vollständig unter 1 Jahr alt. Sie fallen somit in die Beobachtungsgruppe mit sehr guten Aussichten auf eine Spontanheilung. Bei 19 aus 28 Tumorproben gelang es, ausreichende Mengen an RNA zu isolieren und diese erfolgreich in cDNA umzuschreiben. Die Patienten der Gruppe mit Neuroblastomen des Stadiums 4 waren bei Diagnose ihrer Erkrankung weitestgehend über 1 Jahr alt. Sie stellen somit Hochrisikopatienten mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 31 % dar. Die hohe Mortalität in dieser Gruppe wird durch die ständig aktualisierten Nachbeobachtungen bestätigt. Von 46 Tumorproben konnten letztendlich 21 in die Auswertung einbezogen werden (vgl. Tab.: 5.1).

Die RNA-Extraktion aus den Tumorproben erfolgte mittels eines Qiagen Kits als Vorbereitung auf die Microarray-Versuche. Zur Qualitäts- und Mengenüberprüfung der so gewonnenen RNA wurden Elektrophoresen mittels denaturierender Formaldehyd-Agarosegele durchgeführt. Klar abgrenzbare Banden bei 28 S und 18 S bestätigten die angestrebte Reinheit der extrahierten RNA (Fig.: 5.1).

Nr.	Identif.	Stad.	Alter (Mon.)	Status	Nr.	Identif.	Stad.	Alter (Mon.)	Status
1	49	1	6,2	überl.	20	83	4	7,0	überl.
2	14	1	13,4	überl.	21	64	4	71,0	überl.
3	43	1	8,2	überl.	22	93	4	0,7	überl.
4	50	1	0,6	überl.	23	62	4	40,2	verst.
5	48	1	1,7	überl.	24	65	4	34,3	überl.
6	13	1	2,9	überl.	25	45	4	74,3	überl.
7	15	1	5,4	überl.	26	51	4	75,1	verst.
8	55	1	3,5	überl.	27	39	4	34,7	verst.
9	47	1	2,5	überl.	28	57	4	47,6	verst.
10	66	1	2,0	überl.	29	42	4	72,5	überl.
11	61	1	0,3	überl.	30	76	4	16,5	überl.
12	54	1	1,9	überl.	31	53	4	65,5	verst.
13	44	1	1,4	überl.	32	69	4	3,7	verst.
14	41	1	0,2	überl.	33	63	4	36,6	überl.
15	12	1	9,6	überl.	34	46	4	60,2	überl.
16	59	1	3,1	überl.	35	85	4	36,9	verst.
17	60	1	1,4	überl.	36	56	4	14,4	überl.
18	52	1	4,7	überl.	37	20	4	159,5	überl.
19	58	1	1,4	überl.	38	40	4	61,1	verst.
					39	77	4	8,7	überl.
					40	26	4	19,4	überl.

Tab.: 5.1

Vergleich der klinischen Parameter der 40 Patienten. Jedem Patienten wurde eine Identifikationsnummer (Identif.) zugewiesen, die zur besseren Übersicht konstant weiter verwendet wird. Das Alter bezieht sich auf den Zeitpunkt der Diagnose. Der Status wurde in der Nachbeobachtungszeit bis zum 01.09.2004 erhoben. Das *MYCN*-Gen ist in allen Proben nicht amplifiziert.

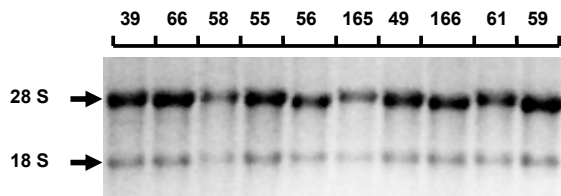


Fig.: 5.1

Denaturierendes Formaldehyd-Gel zur Qualitätsprüfung der extrahierten RNA aus Tumormustern Stad. 1 und 4. Die Zahlen (oben) kennzeichnen die einzelnen Tumoren.

5.2 Analyse der Genprofile von 19 Neuroblastomproben Stadium 1 und 21 Neuroblastomproben Stadium 4 mittels Microarray-Analysen

Die Expressionsprofile der insgesamt 40 verschiedenen Tumorproben wurden mit Hilfe von 4608-cDNA-Objektträgern (human unigene chips) erzeugt. Jeder cDNA-Objektträger wurde zusätzlich mit cDNA einer humanen Neuroblastomzelllinie (SHEP) als Referenz hybridisiert.

Ursachen, die bereits vor der statistischen Auswertung zum Ausschluss einer Probe führten, waren unter anderem nicht ausreichendes RNA-Ausgangsprodukt, zu hohe Hintergrundartefakte in der Auswertung der Microarray-Versuche, fehlerhafte cDNA-Objektträger sowie zu schwach fluoreszierende oder während der Umschreibung nicht ausreichend eingebaute Farbstoffe.

Um Vergleiche zwischen einzelnen Genpunkten und einzelnen cDNA-Objektträgern durchführen zu können, wurde durch Herrn O. Hartmann vom Institut für Biomathematik und Epidemiologie der Universität Marburg jedes Signal in Bezug zu seinem Hintergrund korrigiert. \log_2 transformierte, rot/grüne-Intensitätsunterschiede wurden errechnet und standardisiert. Zwei-Proben T-Tests und angepasste p-Werte wurden benutzt, um unterschiedliche Genexpressionen zu identifizieren (Callow et al., 2000). Der angepasste p-Wert korrigiert bei gleichzeitiger Testung von 4608 Genen und gibt die gesamte Wahrscheinlichkeit wieder, ein falsches Gen zu identifizieren (vgl.: Berwanger et al.; 2002).

5.2.1 Stadienspezifisch signifikant unterschiedlich exprimierte Gene

Die durchgeführten Microarray-Versuche zeigten unterschiedliche Expressionsprofile zwischen den insgesamt nicht *MYCN* amplifizierten Tumoren der Stadien 1 (n= 19) und 4 (n= 21). Dabei stellten sich zwischen beiden Stadien 24 Gene als signifikant unterschiedlich exprimiert dar (angepasster p-Wert < 0,05). Weitere 12 Gene hatten einen angepassten p-Wert zwischen p= 0,05 und 0,2. Sie sind unter anderem beteiligt am Zellzyklus und an Kontrollpunkten, dem Metabolismus, der Proteinsynthese und der Signaltransduktion (Fig.: 5.2). Im Rahmen erster Auswertungen waren zahlreiche Sequenzen lediglich als EST (expressed sequence tags) bekannt. Im Zuge der vollständigen Entschlüsselung des Genoms können einige dieser Sequenzen

inzwischen Genen zugeordnet werden. Soweit möglich werden diese Gene in Tab.: 5.2 aufgeführt.

5.2.2 Cluster Analyse

Die Cluster-Analyse ist ein Verfahren zur Klassifikation von Objekten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch das Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Marburg Tumorproben und ihre Expression einzelner Gene in Gruppen zusammengefasst. In ihren Expressionsprofilen ähnliche Tumorproben stehen in der Cluster-Analyse nah beieinander und lassen sich vom Rest der Objekte abgrenzen (Fig.: 5.2).

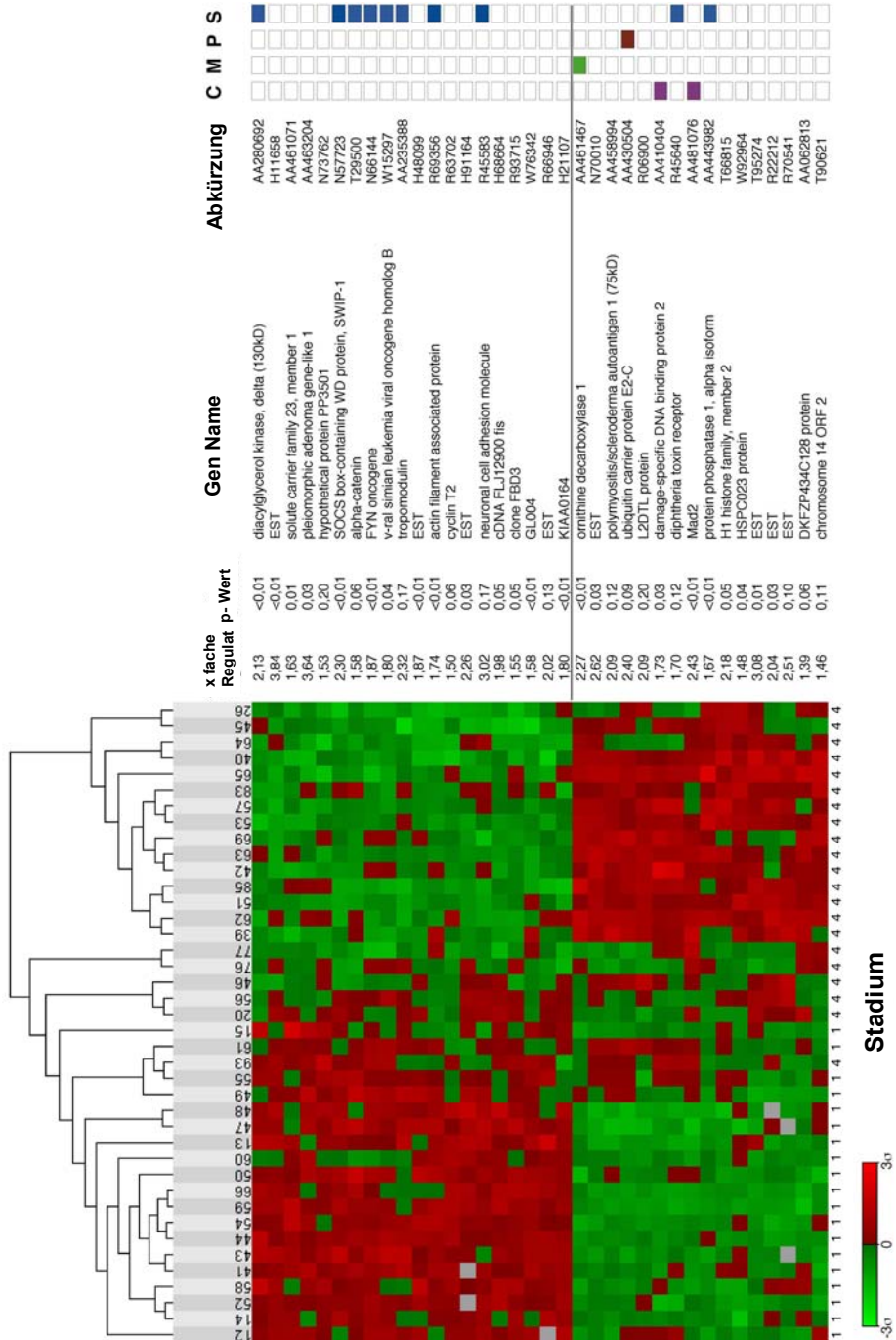
Es war weiterhin möglich, mit Hilfe der bisher unveröffentlichten Cluster-Analyse bis auf 3 Proben alle untersuchten Tumoren anhand ihres Expressionsprofils ihrem jeweiligen Stadium zuzuordnen.

5.2.3 Stadienspezifische Expression von *FYN*, *CTNNA1*, *NRCAM* und *AFAP*

Ein signifikanter Prozentsatz der unterschiedlich exprimierten Gene ist durch die Non-Rezeptor Tyrosin Kinase Fyn und das Aktin-Zytoskelett in einen gemeinsamen Signalweg involviert. Die Gene *FYN*, α -catenin (*CTNNA1*), Neuronales Zell Adhäsionsprotein (*NRCAM*) und Aktin-Filament bindendes Protein (*AFAP*) waren im fortgeschrittenen Tumorstadium 4 kollektiv herunterreguliert und daher von besonderem Interesse. Die Expressionen der einzelnen Gene wurden für Stadium 1 und 4 im Vergleich als Balkendiagramme aufgetragen (Fig.: 5.3).

Fig.: 5.2

Identifikation eines Tumor-Stadium-spezifischen Genexpressions-Musters. Hierarchische Cluster Analyse von 21 Stadium 4 und 19 Stadium 1, nicht-MYCn-amplifizierten Tumoren. 36 Gene (angepasster p-Wert < 0,2) sind zwischen Stadium 4 und 1 Tumoren unterschiedlich exprimiert. Beides, die Gene und einzelnen Tumoren wurden in diesem Diagramm geclustert. Grün bedeutet "Herunterregulation" eines Gens in einem bestimmten Tumor; Rot bedeutet "Hoch-Regulation" im Vergleich zum Mittelwert. Die Standard-abweichung (σ) vom Mittelwert ist aufgeführt. Graue Stellen stehen für fehlende Daten. Die Tabelle rechts zeigt die x fache Regulation, angepasste p-Werte, und eine funktionelle Benennung jedes Gens. Die „Abkürzung“ dient dem Auffinden der Gene in der NCBI-Datenbank. Die Zahlen (oben) kennzeichnen die einzelnen Tumoren. C, Gene die in den Zellzyklus und Kontrollpunkte involviert sind; M, Gene die in den Metabolismus involviert sind; P, Proteinsynthese; S, Signaltransduktion. (vgl. Tab.: 5.2).



Abkürzung	Gen Name
H11658	Ephrin Receptor EphA5
H48099	EST
H91164	Histone 1, H2AC
R66946	EST
N70010	cell division cycle associated 5
T95274	EST
R22212	ankyrin repeat and BTB
R70541	EST

Tab.: 5.2

Aktualisierung der in den Microarray-Experimenten signifikant unterschiedlich exprimierten, noch nicht näher charakterisierten DNA-Sequenzen (EST) (vgl. Fig.: 5.2). (15.03.2005)

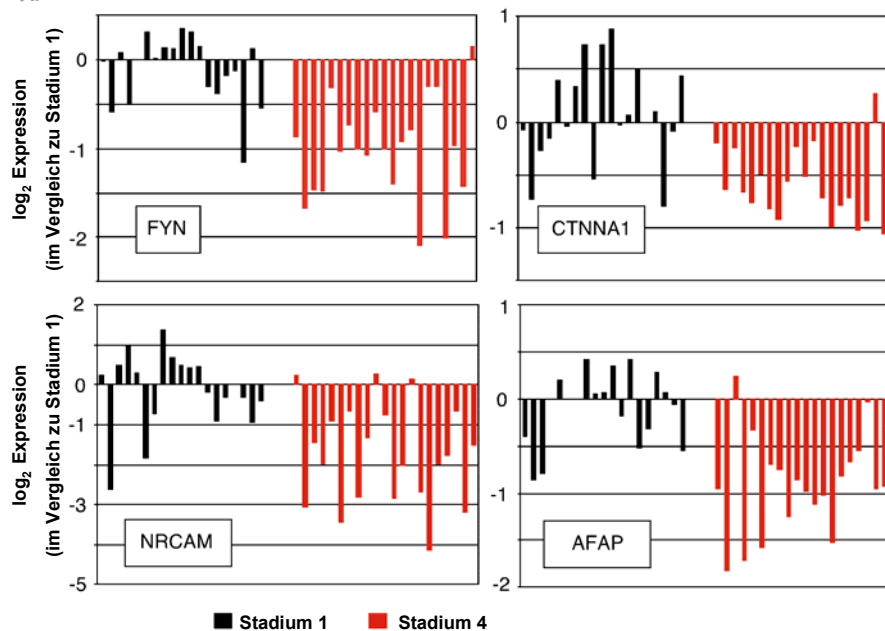


Fig.: 5.3

Stadium-spezifische Expression von *FYN*, *CTNNA1*, *NRCAM*, und *AFAP*. Expressionsprofile der genannten Gene in Stadium 1 und Stadium 4 nicht-*MYCN*-amplifizierter Tumoren. Alle Balken zeigen log₂ Expressions-Ergebnisse im Vergleich zu Stadium 1.

5.3 Ergebnisse der Validierung

Die durch Microarray-Versuche gewonnenen Genexpressionsdaten bedürfen grundsätzlich der Validierung, da eine Vielzahl von Möglichkeiten bekannt ist, wie es zu Verfälschungen der Ergebnisse kommen kann. Eine heterogene Qualität der kommerziell erworbenen Genbibliotheken mit bis zu 30 % falschen Gen-Klonen ist

zuvor beschrieben worden. Da bei jedem Microarray-Versuch zwei verschiedene Proben (z. B. Primärtumor und Zelllinie) auf dem cDNA-Objektträger hybridisiert werden, kann bei unterschiedlicher Qualität des Ausgangsmaterials die Hybridisierungseffizienz der einzelnen Proben erheblich schwanken. Eine weitere potentielle, nicht auszuschließende Fehlerquelle ist der Bearbeiter. Die zahlreichen Arbeitsschritte für jeden Microarray-Versuch erstreckten sich auf zwei Tage und machten eine Validierung der Ergebnisse ebenfalls empfehlenswert. Aufgrund der oben genannten Gründe wurden bedeutende Gene durch Real-time-RT-PCRs, Northernblot und Gen-Sequenzierungen validiert.

5.3.1 Real-time-RT-PCR zur Validierung der Expression von *FYN* und *AFAP*

Im vorausgegangenen Microarray-Experiment konnten für das *FYN*-Gen unterschiedliche mRNA-Expressionen in Stadium 1 und Stadium 4 gemessen werden. Diese Erkenntnis wurde durch eine quantitative PCR bestätigt.

Verwendet wurden 16 Stadium 1- und Stadium 4- Proben. Sie wurden nach dem Zufallsprinzip aus den bereits im Microarray-Experiment eingesetzten Proben ermittelt. Als Referenz wurde die Expression von β -actin, einem Haushaltsgen, gemessen. Zur Kontrolle wurde sowohl die Messung von β -actin als auch *FYN* an einem weiteren Tag wiederholt (Fig.: 5.4).

Analog zu den Real-time-RT-PCR Experimenten für das *FYN*-Gen wurde mit dem *AFAP*-Gen verfahren. Auch hier ist in den vorausgegangenen Microarray-Experimenten eine erhöhte Expression in Stadium 4 gemessen worden, die durch quantitative PCR-Experimente bestätigt werden konnte (Fig.5.4).

5.3.2 Northernblot-Versuch zur Kontrolle der Expression von α -catenin (*CTNNA1*)

α -catenin stellt ein weiteres Gen dar, welches durch die Non-Rezeptor Tyrosin Kinase Fyn und das Aktin-Zytoskelett in einen gemeinsamen Signalweg involviert ist. Die in Microarray-Versuchen beobachtete Herunterregulation von α -catenin in Stadium 4 sollte mit Hilfe eines Northernblots bestätigt werden. Dazu wurde eine Northern-

Membran mit nach dem Zufallsprinzip ausgesuchten 5 Stadium 1- und 5 Stadium 4-Proben angefertigt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten α -catenin-Sonde hybridisiert. Nach 4 Tagen Inkubation der Membran auf einem Röntgenbild traten bei den Tumoren des Stadiums 1 im Vergleich zu den Tumoren des Stadiums 4 deutlichere Banden hervor (Fig.: 5.5).

5.3.3 Validierung von *CASP3*, *PLAGL1* und *WBSCR14* durch Gensequenzierung

Zur Gruppe der aus den Microarray-Versuchen signifikant unterschiedlich exprimierten Gene gehörten: *CASP3*, *PLAGL1* und *WBSCR14*. Sie sollten sequenziert werden, um Fehler in den für die Herstellung der cDNA-Objektträger erworbenen Genbibliotheken auszuschließen. Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode mit dem ALF-Express[©] (Fig.: 5.6). Die sequenzierten Basenfolgen wurden anschließend mit der NCBI-Datenbank abgeglichen. Das als *CASP3* notierte Gen erwies sich als α -catenin. Die sequenzierte Basenfolge war zu 100 % identisch mit den Ergebnissen der NCBI-Datenbank. Das als *PLAGL1* notierte Gen konnte durch seine Basensequenz bestätigt werden. *WBSCR14* stellte sich als eine noch nicht näher identifizierte humane cDNA Sequenz heraus. Die Liste der in den Microarray-Versuchen gefundenen differenziert exprimierten Gene wurde anschließend aktualisiert.

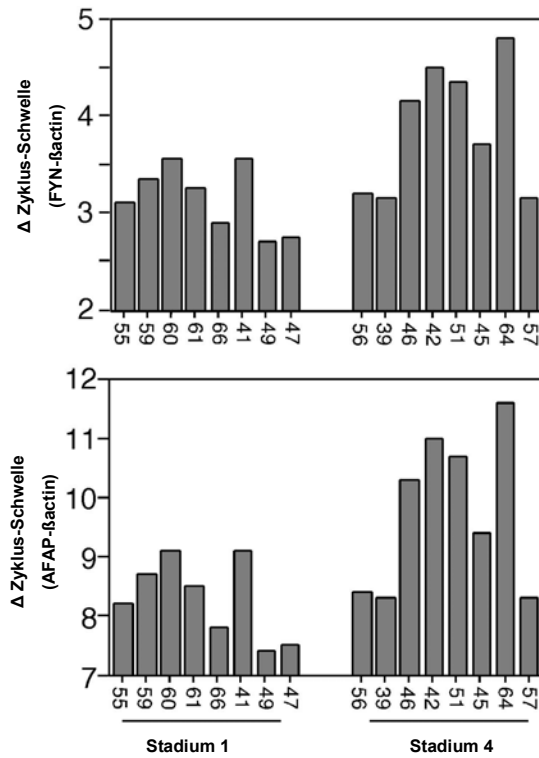


Fig.: 5.4

Stadienspezifische Validierung der Expressionen von *FYN* und *AFAP* durch Real-time RT-PCR Versuche. Alle Balken zeigen die gemessene Anzahl der Zyklen im Vergleich zu β -actin. Die Δ Zyklus-Schwelle (Δ CT) ergibt sich aus der Subtraktion von CT *FYN* – CT β -actin. Der CT-Wert gibt die Anzahl der Zyklen an, bei der sich die Signale des betrachteten Amplifikationsprodukts vom Hintergrund abheben. Je kleiner der CT-Wert, desto mehr spezifische cDNA lag in der einzelnen Probe vor. Die Zahlen (unten) kennzeichnen die einzelnen Tumoren.

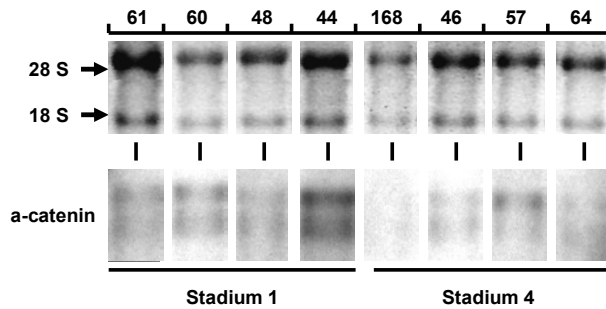


Fig.: 5.5

Die obere Reihe zeigt eine Northernblot-Membran mit 8 Tumoren der Stadien 1 und 4. Auf der unteren Reihe sind die gleichen Tumoren nach der Hybridisierung mit α -catenin zu sehen. Die Zahlen (oben) kennzeichnen die jeweils verwendeten Tumoren.

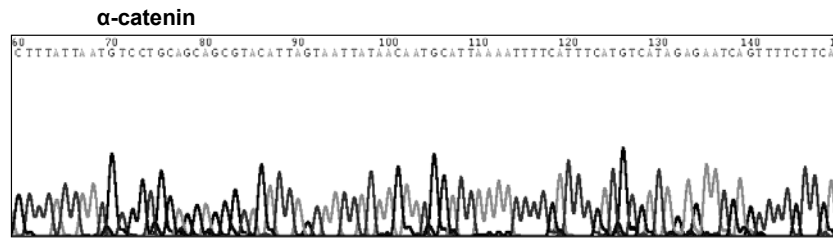


Fig.: 5.6

Sequenzierte Basenfolge des Gens α -catenin. Nicht gezeigt werden die Ergebnisse der Sequenzierungen von *PLAGL1* und einer noch nicht endgültig identifizierten humanen cDNA Sequenz. Die Basenfolgen wurden mit den Sequenzen der NCBI-Datenbank abgeglichen.

6. Diskussion

Das Neuroblastom ist ein in der Regel frühkindlicher embryonaler Tumor, dessen Zellen dem postganglionären sympathischen Nervensystem zugeordnet werden. Ein bedeutendes Merkmal dieses Tumors ist seine ausgeprägte klinische Heterogenität. Im Hinblick auf seine Prognose ist das Neuroblastom in zwei Gruppen unterteilbar. Zum einen in eine Gruppe mit vorwiegend lokalisierten, in einer Vielzahl von Fällen spontan regredierenden Tumoren. Zum anderen in eine Gruppe mit primär ausgedehnten, rasch progredierenden Tumoren und häufig bereits bei Diagnosestellung metastasierten Neuroblastomen. Während Patienten der ersten Gruppe nach einer initialen Operation sehr zurückhaltend therapiert werden, erhalten Patienten der zweiten Gruppe nach Therapieprotokoll postoperativ unter anderem mehrere Blöcke einer aggressiven Hochdosischemotherapie, autologe Stammzelltransplantationen oder Radiotherapien. Trotz intensiver Behandlung beträgt die Überlebenschance dieser Patienten lediglich 31 % (Neuroblastomstudie, NB'97).

Mit Hilfe von cDNA-Microarray-Analysen konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Expressionen von 4608 Genen der Neuroblastomstadien 1 und 4 gleichzeitig miteinander verglichen werden. Durch die Anwendung dieser leistungsfähigen Technik war es möglich, anstelle einzelner Gene ganze Genexpressionsprofile einzelner Tumoren zu untersuchen. Ziel der Arbeit war es Genprofile zu identifizieren, die eindeutig zwischen beiden Stadien diskriminieren und wahrscheinlich stadienabhängige Pathomechanismen aufzuzeigen.

Durch cDNA-Microarray-Analysen ist man auf der einen Seite in der Lage, in kurzer Zeit zahlreiche Ergebnisse zu erhalten, auf der anderen Seite unterliegen diese Ergebnisse bekannten methodischen Einflüssen. Das Wissen um diese möglichen Einflüsse macht eine anschließende Validierung der durch cDNA-Microarray-Analysen gewonnenen Daten notwendig. Zu den möglichen Fehlerquellen zählt eine bekannte heterogene Qualität der zur Herstellung der cDNA-Objektträger verwendeten kommerziellen cDNA-Bibliotheken und ihre zum Teil falsch ausgewiesenen Gene. Des Weiteren besteht eine zum Teil unterschiedliche Qualität der verwendeten Tumor-cDNA, die unter anderem auf das Alter der Proben und ihre RNA zurückzuführen ist. Auch mögliche Fehler durch den Bearbeiter sollten durch eine Validierung

ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Microarray-Analysen konnten größtenteils durch Real-time-RT-PCRs, Northernblot und erneute Gensequenzierungen bestätigt werden. Lediglich ein durchschnittlicher Prozentsatz von 5-10 % der validierten Gene erwies sich danach als andere Gene oder als noch nicht näher charakterisierte DNA-Sequenzen (ESTs).

Bei den cDNA-Microarray-Analysen wurden 24 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene zwischen den Tumoren des Stadiums 1 (n= 19) und des Stadiums 4 (n= 21) (angepasster p-Wert <0,05) identifiziert. 12 weitere Gene hatten einen angepassten p-Wert zwischen p= 0,05 und 0,2 (Fig.: 5.2). Unter diesen Genen befanden sich zahlreiche, noch nicht näher charakterisierte DNA-Sequenzen (ESTs), aber auch einige bekannte Gene, die zuvor bereits auf verschiedene Art und Weise mit Tumorentstehung in Zusammenhang gebracht werden konnten. Zu ihnen gehört das überwiegend in Stadium 1 hoch- und Stadium 4 herunterregulierte Tumorsuppressorgen „Pleomorphic adenoma gene-like1“ (*PLAGL1*), für das gezeigt werden konnte, dass es einer Tumorzell-Proliferation durch Zellzyklus-Stopp und Apoptose vorbeugt (Hensen et al., 2002). Ebenfalls überwiegend in Stadium 1 hoch- und Stadium 4 herunterreguliert war das Gen „suppressor of cytokine signaling“ (*SOCS*), welches in die Regulierung von Zellwachstum und Differenzierung durch Zytokine involviert ist (Krebs und Hilton, 2001). Die Gene „Ornithine Decarboxylase (*ODC*) und „mitotic arrest deficiency protein 2“ (*MAD2*) hingegen waren größtenteils in Stadium 4 hoch- und Stadium 1 herunterreguliert. Odc ist ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von Polyamin, das wiederum für Wachstum, Differenzierung und Transformation von Zellen benötigt wird (Schipper und Verhofstad, 2002). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Überexpression von *ODC* zusammen mit anderen zellulären Ereignissen wie einer Aktivierung von Onkogenen zu einer Zelltransformation führen kann, was wiederum zu der Vermutung führte, dass es sich um ein Protoonkogen handeln könnte (Auvinen et al., 1992, 1997). Mad2 wird als ein Effektorprotein des Metaphase-Anaphase-Checkpoints der Zelle beschrieben und ist somit wichtig für eine Trennung der Chromosomen während der Mitose (Iwanaga et al., 2002). Eine erhöhte Expression von *MAD2* in Neuroblastomen des Stadiums 4 könnte somit ein Hinweis auf eine gesteigerte Mitoserate in diesen Tumoren darstellen. Neben diesen einzeln genannten Genen erwies sich eine Gruppe von Genen als besonders interessant. Gene dieser Gruppe gehören möglicherweise zu einem

gemeinsamen, im Neuroblastom bisher nicht beschriebenen Signalweg und sind darüber hinaus ausnahmslos und signifikant in Stadium 4 herunterreguliert. Die Gruppe umfasst die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Fyn selbst und ein Aktinfilament-bindendes Protein (*AFAP*). Afap ist ein Protein, das an Src und Fynkinase bindet und sie aktiviert (Baisden et al., 2001). Weitere Gene sind α -catenin (*CTNNA1*), dessen Bindung an β - und γ -catenin durch die Fyn-abhängige Phosphorylierung reguliert wird (Calautti et al., 1998) und Neuralzellen- Adhäsions-Protein (*NRCAM*) mit Signalwirkung durch die Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase (Ignelzi et al., 1994). Zuletzt sind die Aktin bindenden Proteine Tropomodulin (Gregorio et al., 1995) und myristolierte alanine-rich C kinase Substrat (*MARCKS*) zu nennen (Brouns et al., 2000; Yarmola et al., 2001).

Nach Abschluß dieser Arbeit wurden durch die Arbeitsgruppe Eilers (AG Eilers) des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, weiterführende Experimente durchgeführt. Ziel war es, die durch Microarray-Analysen ermittelten, signifikant unterschiedlich exprimierten Gene durch weitere Experimente zu bestätigen und ihre Funktionen besser zu verstehen (vgl. Berwanger et al., 2002). Im Rahmen dieser Experimente wurde mit Hilfe von Westernblots die Menge des Fyn-Proteins in einer Gruppe von 70 Tumoren untersucht, wobei nur 5 dieser Tumoren bereits zuvor in den Microarray-Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendet worden waren. Dabei konnten die Ergebnisse der Microarray-Experimente bestätigt werden. Die Expression von Fyn korrelierte streng mit dem Tumorstadium. Fyn wurde in den meisten Tumoren des Stadiums 1 entdeckt und war in der Mehrzahl der Tumoren des Stadiums 4 nicht vorhanden. Weiterhin wurden 22 Tumoren der Stadien 1 und 4 aus der zuvor verwendeten Gruppe von 70 Tumoren gewählt und ihre Fynkinase-Aktivität untersucht. Verwendet wurden Immun-Komplex-Kinase-Experimente, durch die sowohl eine Autophosphorylierung von Fyn als auch eine Phosphorylierung des exogenen Substrates Enolase untersucht werden konnten. Dabei wurden in Übereinstimmung mit den Westernblot-Ergebnissen hohe Fynkinase-Aktivitäten in Tumorproben des Stadiums 1 beobachtet. Im Gegensatz dazu war die Fynkinase-Aktivität in Tumoren des Stadiums 4 im Durchschnitt niedriger. Der Unterschied war sowohl für die Phosphorylierung der Enolase als auch für die Autophosphorylierung von Fyn signifikant ($p < 0,001$).

Zwischen der Fynkinase-Aktivität und -Expression der Tumorproben konnte eine Korrelation beobachtet werden, die zu der Vermutung führte, dass die Regulation der Fyn-Expression der bestimmende Hauptfaktor für die Fyn-Aktivität in diesen Proben war. Daraus wurde wiederum geschlossen, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Expression von Fyn und den Tumorstadien in humanen Neuroblastomen besteht.

Die Tumorproben, die bei den Westernblot-Analysen zum Einsatz kamen, stammten von Patienten mit einer mittleren Beobachtungszeit von 94,1 Monaten, wodurch sich die Möglichkeit bot, den Prognose-Wert der Fyn-Expression zu evaluieren. In einer Kaplan-Meier-Analyse betrug der p-Wert der Überlebensvorhersage der Expression von Fyn für Nicht-*MYCN*-amplifizierte Tumoren (n= 58) $p= 0,00133$. Darüber hinaus erwies sich Fyn als ein besserer Indikator für Prognose als das Alter des Patienten. Wie nach den Microarray-Analysen erwartet, war die Expression von Fyn streng mit dem Tumorstadium korreliert und leistete unabhängig davon keine Überlebensvorhersage.

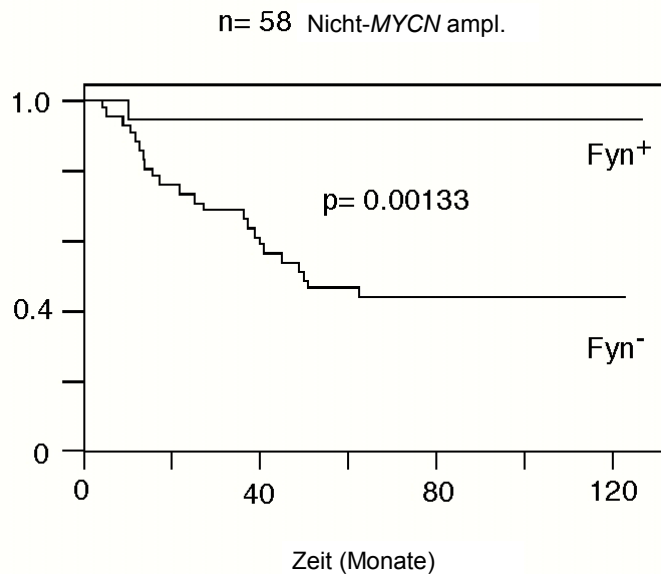


Fig.: 6.1

Eine Expression von Fyn ist prognostisch relevant für das Langzeitüberleben von Patienten mit Neuroblastomen.

Das Kaplan-Meier Diagramm zeigt eine erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit Tumoren, die eine nachweisbare Menge an Fyn (Fyn⁺) haben im Gegensatz zu Patienten mit Tumoren in denen Fyn nicht nachweisbar ist (Fyn⁻). Das Diagramm zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeit von 58 Patienten deren Tumoren nicht *MYCN* amplifiziert sind (Berwanger et al., 2002).

Um zu beweisen, dass *FYN* eine kausale Rolle in der Differenzierung und Regulation der Zellproliferation von Neuroblastomzellen spielt, führte die AG Eilers transiente Transfektionen zur Expression von Fyn in SH-SY5Y Zellen durch. Es handelt sich dabei um eine humane Neuroblastom-Zelllinie, die von einem Tumor des Stadiums 4 abstammt (Pahlman et al., 1981). Die Überexpression von Fyn induzierte das Wachstum von multiplen Neuriten und eröffnete eine morphologische, charakteristische Differenzierung. Im Gegensatz dazu induzierte die Expression eines Kinase-negativen Allels (FynK299M) keine morphologische Differenzierung. Die Koexpression von Fyn zusammen mit einem membranständigen, grün fluoreszierenden Protein (EGFPF; Jiang und Hunter, 1998) stellte sicher, dass die identifizierten unterschiedlichen Zellmorphologien nicht lediglich auf unterschiedliche Lokalisationen von Fyn und FynK299M zurückzuführen sind.

Um zu zeigen, dass die zuvor beobachteten Vorgänge tatsächlich eine neuronale Differenzierung widerspiegeln, wurden durch B. Berwanger transfizierte Zellen mit einem Antikörper gegen GAP43 inkubiert. Es handelt sich dabei um ein Protein, das reichlich in Neuronen vorhanden ist, welche sich in der Entwicklung befinden und das bereits zuvor ursächlich mit der Differenzierung von Neuroblastomzellen in Verbindung gebracht worden ist (z.B.: Morton und Buss, 1992). Die Expression des Fyn Wildtyps regulierte deutlich die Expression von GAP43 herauf, wohingegen alle Zellen, die FynK299M exprimierten, sich als negativ für GAP43 erwiesen. Ein Markieren der Zellen mit BrdU oder Antikörpern gegen Zyklin A als Hinweis für Zellproliferation führte zu der Erkenntnis, dass Zellen, die aktiv Fyn exprimierten, nicht mehr proliferierten. Anschließend, durch Herrn Dr. B. Berwanger durchgeführte FACSscan Analysen zeigten, dass Fyn exprimierende Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus akkumulierten. Daraus konnte der Schluß gezogen werden, dass Fyn einen Stopp in der G1 Phase und neuronale Differenzierung induzierte. Übereinstimmend mit der Rolle von *AFAP* bei der Aktivierung von Fyn führte die Expression eines aktiven Allels von *AFAP* zu morphologischen Veränderungen, die stark an die Veränderungen durch aktives Fyn erinnerten. Andererseits führte ein dominant negatives Allel von *AFAP* zu keinerlei Differenzierung. Die Experimente wurden in IMR-32 Zellen wiederholt. Es handelt sich dabei um eine humane Neuroblastom-Zelllinie, die ein amplifiziertes *MYCN*-Gen trägt (Clementi et al., 1986). Ähnlich den Resultaten, die mit den SH-SY5Y Zellen erzielt wurden, führte auch hier die

Expression der aktiven Fynkinase zur Induktion von Neuritenwachstum und zum Stopp der Proliferation. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Induktion der Differenzierung durch Fyn auch in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen stattfindet.

Parallel zu den Microarray-Experimenten dieser Arbeit wurden weiterführende Microarray-Analysen zu weiteren Tumorstadien und *MYCN*-amplifizierten Tumorproben durch die AG Eilers durchgeführt. Dabei stammten die meisten *MYCN*-amplifizierten Proben von Tumoren der Stadien 3 und 4 ab. Es konnte beobachtet werden, dass Fyn auch in *MYCN*-amplifizierten Tumoren exprimiert wurde, was zu der Vermutung führte, dass *FYN* unabhängig von *MYCN* in fortgeschrittenen Tumorstadien herunterreguliert ist.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden multivarianten Analysen mit zwei Parametern unterzogen mit dem Ergebnis, dass die Expression von Fyn unabhängig von einer *MYCN*-Amplifikation Überleben vorhersagen kann. Beim Vergleich der Microarray-Ergebnisse dieser Arbeit mit weiterführenden Analysen durch die AG Eilers konnte festgestellt werden, dass die Expression von Fyn nicht zu unterscheiden vermochte, ob Tumoren *MYCN*-amplifiziert waren oder nicht. Zusammenfassend deuten diese beiden Feststellungen stark darauf hin, dass die Amplifikation von *MYCN* keine Tumorprogression durch Regulierung der *FYN*-Expression fördert.

Die genetischen Faktoren, die zur Herunterregulation der *FYN*-Expression in fortgeschrittenen Neuroblastomstadien führen, sind bis heute unklar. Nicht endgültig auszuschließen ist unter anderem eine mögliche Mutation von *FYN*. In der Einleitung wurde auf bereits bekannte relevante Verluste der Heterotypie in Neuroblastomen eingegangen. Ein Verlust der Heterotypie im Bereich 6q21, in dem *FYN* lokalisiert ist, wurde bisher nicht beschrieben. Nähere Untersuchungen von *FYN* auf mögliche Deletionen stehen bis heute aus. Eine weitere, bisher ungeklärte mögliche Ursache für die Herunterregulation der *FYN*-Expression in fortgeschrittenen Neuroblastomstadien ist eine Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotoren von *FYN*. CpG-Inseln beschreiben bestimmte DNA-Abschnitte, die sich vor zu regulierenden Genen befinden und in denen DNA-Methyltransferasen jeweils eine Methylgruppe an das Cytosin hängen. Es handelt sich dabei um einen bekannten Mechanismus zur Inaktivierung von Genen, der für verschiedene Gene – auch in Neuroblastomen –

beschrieben worden ist (Van Noesel et al., 2003). In Zukunft könnte mit spezifischen Polymerase-Ketten-Reaktionen untersucht werden, ob *FYN* in Neuroblastomen durch Deletionen oder Methylierungen herunterreguliert wird. Eine weitere mögliche Ursache für eine herabgesetzte Fyn-Wirkung in fortgeschrittenen Neuroblastomen ist die Inaktivierung des Proteins. Beispielsweise wird Fyn in vivo durch Csk phosphoryliert und damit die Fynkinase-Aktivität herabgesetzt (Imamoto und Soriano, 1993).

Fynkinase ist bereits durch andere Arbeitsgruppen ursächlich mit der Differenzierung von Oligodendrozyten und Keratinozyten in Verbindung gebracht worden. So konnte zum Beispiel in Zellkultur-Versuchen mit Oligodendrozyten-Vorläuferzellen aus dem ZNS neonataler Ratten gezeigt werden, dass eine Aktivierung von *FYN* eine morphologische Differenzierung zur Folge hat (Wolf et al., 2001). Versuchsreihen mit *FYN*-null-Keratinozyten führten zu der Annahme, dass die Fynkinase für eine normale Keratinozytendifferenzierung notwendig ist (Calautti et al., 1995). Durch weiterführende Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Fyn-Aktivität, nicht aber eine erhöhte Expression von Kinase-inaktivem Fyn-Protein ausreichend ist, um das Wachstum von Keratinozyten zu unterdrücken und einen spezifischen Marker der Keratinozyten-Differenzierung zu induzieren, epidermale Transglutaminase. Weiterhin wurde beschrieben, dass eine erhöhte Fyn-Aktivität Keratinozyten in der G1 Phase des Zellzyklus stoppte und eine Inhibierung der *CDK2* und *CDK4* Aktivität verursachte, was regelmäßig nach einer Induktion von Differenzierung beobachtet wird (Cabodi et al., 2000; Missero et al., 1995, 1996). Eine Herunterregulation von *FYN* in fortgeschrittenen Tumorstadien könnte daher möglicherweise zu einem Verlust von Differenzierungseigenschaften und einer allgemeinen Zellproliferation in fortgeschrittenen Tumorstadien beitragen. Des Weiteren konnte in Zellkulturen und transgenen Mäusen die Signalwirkung von fyn mit Neuriten-Extensionen und Zelladhäsionen in Zusammenhang gebracht werden (Brouns et al. 2000, 2001). Fortgeschrittene Tumorstadien sind unter anderem dadurch charakterisiert, dass sie die Fähigkeit haben, in Lymphknoten einzudringen und Metastasen zu bilden. Es könnte daher möglich sein, dass eine Herunterregulation von *FYN* und die in diesem Zusammenhang veränderte Zelladhäsion zu den invasiven Eigenschaften der fortgeschrittenen Neuroblastomstadien beitragen.

Es existieren mehrere Möglichkeiten, wie aktives Fyn seine Wirkung in nervalen Zellen entfaltet. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass die Fynkinase während der Differenzierung von Oligodendrozyten hochreguliert ist und mehrere Proteine phosphoryliert (Osterhout et al., 1999; Scarlato et al., 2000). Hervorzuheben ist das Fyn-Substrat p190 Rho-GAP, dessen Phosphorylierung durch Fyn während der Differenzierung von primären Oligodendrozyten 3-fach erhöht ist (Wolf et al., 2001). p190 Rho-GAP wiederum besitzt eine inhibierende Signalwirkung auf Rho. Es wurde beschrieben, dass eine Inhibition von Rho oder Expression von dominant negativem Rho zu einer Neuriten-Extension führt (Lehmann et al., 1999). Die Bedeutung von p190 Rho-GAP wurde nochmals durch eine Studie mit p190 Knockout-Mäusen unterstrichen. Sie entwickelten schwere Defekte während der Entwicklung der Augen, der Entstehung des Corpus callosum und des Verschlusses des Neuralrohrs, was zu einem bereits im Embryonalstadium letalen Phänotyp führte (Brouns et al., 2000). In Melanozyten der Maus konnte gezeigt werden, dass aktive Fynkinase durch Inhibierung der MAPkinase-Phosphatase 1 eine dauerhafte Aktivierung des MAPkinase-Signalwegs induziert (Wellbrock et al., 2002). Anhaltende Aktivierung von MAPkinase wiederum induziert neuronale Differenzierung in Zellkulturen (Qui und Green, 1992).

Aktives *FYN* scheint einen positiven Krankheitsverlauf von Neuroblastomen zu fördern. Generell ist ein therapeutisches Ausschalten von Kinasen einfacher, als die Imitation ihrer Wirkung. Für zukünftige therapeutische Interventionen in Neuroblastomen scheint es daher sinnvoll, Faktoren auszuschalten, die ansonsten von Fyn direkt oder indirekt inhibiert werden. Zum Beispiel entfaltet Rho seine biologische Funktion teilweise durch Aktivierung von Rho-Kinase (z. B. Sahai und Marshall, 2002). Da in Neuroblastomen beide Faktoren indirekt durch Fyn inhibiert werden könnten, wäre es möglich, dass eine therapeutische Inhibierung der Rho-Kinase eine den Zell-Zyklus stoppende und Differenzierung induzierende Wirkung von Fyn nachahmt. Mit ähnlichem Resultat könnte eine Inhibierung von Csk zu einer Aktivierung von endogener Fynkinase, selbst bei niedrigen Expressionsleveln, führen (Imamoto und Soriano, 1993).

Seit vielen Jahren werden die meisten Neuroblastome mit konventionellen Therapieansätzen wie Resektion, externer Radiotherapie und unspezifischer,

zytotoxischer Chemotherapie behandelt. Trotz optimierter, national standardisierter Therapieprotokolle ist die Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit Neuroblastomen im Stadium 4 schlecht. Die Nebenwirkungen der in diesem Stadium unter anderem eingesetzten Hochdosischemotherapie sind vielfältig und zwingen nicht selten zum vorzeitigen Abbruch der Behandlung. Mit einem besseren Verständnis der molekularen Pathomechanismen im Neuroblastom könnte es in Zukunft gegebenenfalls möglich sein, gezieltere und nebenwirkungsärmere Therapieansätze zu entwickeln. Ein positives Beispiel stellt das seit dem Jahr 2001 zur Verfügung stehende „Imatinib Mesylate“ (STI571 oder Gleevec®) dar. Ein künstlich hergestelltes, molekular-spezifisches orales Anti-Krebs-Medikament, das sehr erfolgreich vor allem gegen Chronische Myeloische Leukämien (CML) und einige gastrointestinale Tumoren eingesetzt wird. Im Fall der CML ist Imatinib in der Lage, die für die Pathogenese der Erkrankung verantwortliche Tyrosinkinase Bcr-Abl zu hemmen und zeigt dabei eine hohe Effizienz bei guter Verträglichkeit und geringen Nebenwirkungen in allen Stadien der CML (Guilhot, 2004). In dieser Hinsicht trägt vielleicht auch der *FYN*-Signalweg in Zukunft dazu bei, Patienten mit fortgeschrittenen Neuroblastomstadien effizientere Therapien anbieten zu können.

7. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der dritthäufigste pädiatrische maligne Tumor und für etwa 15 % der Todesfälle durch Krebserkrankungen im Kindesalter verantwortlich. Klinisch imponiert das Neuroblastom in erster Linie durch seine ausgeprägte Heterogenität, die sich auch in einer unterschiedlich raschen Tumorprogression widerspiegelt. Patienten mit Tumoren des Stadiums 4 werden im Vergleich zu Patienten mit Tumoren des Stadiums 1 unter anderem mit aggressiven Hochdosismethoden behandelt und haben dennoch eine drastisch reduzierte Überlebenschance. Mit Hilfe von Microarray-Analysen wurden in 40 primären, nicht *MYCN* amplifizierten Tumorproben der Stadien 1 und 4 jeweils die Expressionen von 4608 Genen miteinander verglichen. Ziel war es, unterschiedlich exprimierte Gene zu diskriminieren und die molekularbiologische Pathologie des Neuroblastoms besser zu verstehen.

Es konnte gezeigt werden, dass zwischen beiden Stadien 24 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert werden (angepasster p-Wert < 0,05). 12 weitere Gene hatten einen angepassten p-Wert zwischen p=0,05 und 0,2. Unter diesen Genen befand sich eine Gruppe von Genen, denen gemeinsam ist, dass sie durch die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Fyn und das Aktin-Zytoskelett in einen gemeinsamen Signalweg involviert sind. Die Gene *FYN*, α -catenin (*CTNNA1*), Neuronales Zell-Adhäsionsprotein (*NRCAM*) und Aktinfilament-bindendes Protein (*AFAP*) waren im fortgeschrittenen Tumorstadium 4 kollektiv herunterreguliert. Die Expression und Identität bedeutender Gene wurden durch Real-time-RT-PCRs, Northernblot und Gen-Sequenzierungen validiert.

In weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe Eilers aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, konnten die Ergebnisse dieser Arbeit durch weiterführende Westernblot-Analysen und transiente Transfektionen in humanen Neuroblastomzelllinien bestätigt und näher beleuchtet werden. In humanen Neuroblastom-Zelllinien konnte die AG Eilers unter anderem zeigen, dass die Expression aktiver Fynkinase zur Induktion von Neuritenwachstum und zum Ausstieg aus dem Zellzyklus führt. Die genetischen Faktoren, die zur Herunterregulation der *FYN*-Expression in fortgeschrittenen Neuroblastomstadien führen, sind bis heute

unklar. Fynkinase wurde jedoch bereits zuvor durch andere Arbeitsgruppen ursächlich mit Differenzierung, Neuritenextension und Zelladhäsion in Verbindung gebracht. Da aktives Fyn einen positiven Krankheitsverlauf von Neuroblastomen zu fördern scheint, könnte es für zukünftige therapeutische Interventionen gegebenenfalls sinnvoll sein, Faktoren auszuschalten, die ansonsten von Fyn direkt oder indirekt inhibiert werden.

8. Literaturverzeichnis

Ambros, I. M., Zellner, A., Roald, B., Amann, G., Ladenstein, R., Printz, D., Gadner, H., Ambros, P. F. (1996). Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med.* Jun 6; 334(23): 1505-11.

Amundson, S. A., Zhan, Q., Penn, L. Z., Fornace, A. J. Jr. (1998). Myc suppresses induction of the growth arrest genes gadd34, gadd45, and gadd153 by DNA-damaging agents. *Oncogene.* Oct 29; 17(17): 2149-54.

Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C., Cleveland, J. L. (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene.* Oct; 6(10): 1915-22.

Auvinen, M., Laine, A., Paasinen, S. A., Kangas, A., Kangas, L., Saksela, O., Andersson, L. C., Hölttä, E. (1997). Human ornithine decarboxylase-overproducing NIH3T3 cells induce rapidly growing, highly vascularized tumors in nude mice. *Cancer Res.* 57: 3016-3025.

Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson L. C., Hölttä, E. (1992). Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature.* 360: 355-358.

Baisden, J. M., Gatesman, A. S., Cherezova, L., Jiang, B. H., and Flynn D. C. (2001). The intrinsic ability of AFAP-110 to alter actin filament integrity is linked with its ability to also activate cellular tyrosine kinases. *Oncogene.* 20, 6607-6616.

Barbacid, M. (1995). Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol.* Apr; 7(2): 148-55.

Beckwith, J., Perrin, E. (1963). In situ neuroblastoma: A contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am. J. Pathol.* 43: 1089-1104.

Bergmann, E., Wanzel, M., Weber, A., Shin, I., Christiansen, H., and Eilers, M. (2001). Expression of P27 (KIP1) is prognostic and independent of MYCN amplification in human neuroblastoma. *Int. J. Cancer.* 95, 176-183.

Berthold, F. and Hero, B. (2000). Neuroblastoma – Current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs*. 59 (6):1261-77.

Berthold, F. (1999). Neuroblastoma. In: Schmoll, H. J., Hoeffken, K., Possinger, K. editors. *Kompendium internistische Onkologie*, Berlin: Springer. 2389-2402.

Berthold, F., Sahin, K., Hero, B., Christiansen, H., Gehring, M., Harms, D., Horz, S., Lampert, F., Schwab, M., Terpe, J. (1997). The current contribution of molecular factors in risk estimation in neuroblastoma patients. *Eur. J. Cancer*. 33:2092-97.

Berwanger, B., Hartmann, O., Bergmann, E., Bernard, S., Nielsen, D., Krause, M., Kartal, A., Flynn, D., Wiedemeyer, R., Schwab, M., Schäfer, H., Christiansen, H., and Eilers, M. (2002). Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2, 377-386.

Bessho, F., Hashizume, K., Nakajo, T., Kamoshita, S. (1991). Mass screening in Japan increased the detection of infants with neuroblastoma without a decrease in cases in older children. *J Pediatr*. Aug; 119(2): 237-41.

Birrer, M. J., Segal, S., DeGreve, J. S., Kaye, F., Sausville, E. A., Minna, J. D. (1988). L-myc cooperates with ras to transform primary rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol*. Jun; 8(6): 2668-73.

Blackwell, T. K., Kretzner, L., Blackwood, E. M., Eisenman, R. N., Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science*. Nov 23; 250(4984): 1149-51.

Blackwood, E. M., Eisenmann, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science*. 251: 1211-7.

Boon, K., Edwards, J. B., Siu, I. M., Olschner, D., Eberhart, C. G., Marra, M. A., Strausberger, R. L., Riggins, G. J. (2003). Comparison of medulloblastoma and normal neural transcriptomes identifies a restricted set of activated genes. *Oncogene*. 23; 22 (48): 7687-94.

Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M., O'Neill, S., Pearson, A. D., Plantaz, D., Meddeb, M., Danglot, G., Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Laureys, G., Speleman, F., Nicholson, J., Bernheim, A., Betts, D. R., Vandesompele, J., Van Roy, N. (1999). Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 24; 340 (25): 1954-61.

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

Brodeur, G. M. and Maris, J. M. (2002) In *principles and Practice of Pediatric Oncology* (eds Pizzo, P. and Polack, D.) 895-937.

Brodeur, G. M., Maris, J. M., Yamashiro, D. J., Hogarty, M. D., and White, P. S. (1997). Biology and genetics of human neuroblastomas. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 19, 93-101.

Brodeur, G. M. (1995). Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. *Eur J Cancer.* 31 A(4): 505-10.

Brodeur, G. M. (1994). Molecular pathology of human neuroblastomas. *Semin. Diagn. Pathol.* 11: 118-25.

Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castelberry, R.P., De Bernardi, B., Evans, A. E., Favrot, M., Hedborg, F., et al. (1993). Revisions in the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol.* 11: 1466-77.

Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop, J. M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science.* 224; 1121-24.

Brouns, M. R., Matheson, S. F., and Settleman, J. (2001). p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat. Cell Biol.* 3, 361-367.

Brouns, M. R., Matheson, S. F., Hu, K. Q., Delalle, I., Caviness, V. S., Silver, J., Bronson, R. T., and Settleman, J. (2000). The adhesion signalling molecule p190

RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development*. 127, 4891-4903.

Cabodi, S., Calautti, E., Talora, C., Kuroki, T., Stein, P. L., and Dotto, G. P. (2000). A PKC- η /Fyn-dependent pathway leading to keratinocyte growth arrest and differentiation. *Mol. Cell* 6, 1121-1129.

Calautti, E., Cabodi, S., Stein, P. L., Hatzfeld, M., Kedersha, N., and Paolo Dotto, D. (1998). Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. *L. Cell Biol.* 141, 1449-1465.

Calautti, E., Missero, C., Stein, P. L., Ezzell, R. M., and Dotto, G. P. (1995). Fyn tyrosine kinase is involved in keratinocyte differentiation control. *Genes Dev.* 9, 2279-2291.

Callow, M. J., Duboit, S., Gong, E. L., Speed, T. P., and Rubin, E. M. (2000). Microarray expression profiling identifies genes with altered expression in HDL-deficient mice. *Genome Res.* 10:2022-2029.

Caron, H., van Sluis, P., de Kraker, J., Bokkerink, J., Egeler, M., Laureys, G., Slater, R., Westerveld, A., Voute, P. A., Versteeg, R. (1996). Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* Jan 25; 334(4): 225-30.

Casaccia-Bonofil, P., Gu, C., Chao, M. V. (1999). Neurotrophins in cell survival/death decisions. *Adv Exp Med Biol.* 468: 275-82.

Castleberry, R. P. (1997). Pediatric update neuroblastoma. *European Journal of cancer.* 33; 9:1430-38.

Chen, C., Nussenzweig, A., Guo, M., Kim, D., Li, G. C., Ling, C. C. (1996). Down-regulation of gadd153 by c-myc in rat fibroblasts and its effect on cell growth and radiation-induced apoptosis. *Oncogene.* Oct 17; 13(8): 1659-65.

Chen, Y. Z., Soeda, E., Yang, H. W., Takita, J., Chai, L., Horii, A., Inazawa, J., Ohki, M., Hayashi, Y. (2001). Homozygous deletion in a neuroblastoma cell line defined by

a high-density STS map spanning human chromosome band 1p36. *Genes Chromosomes Cancer*. Aug; 31(4): 326-32.

Chou, T. T., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2000). A novel apoptotic pathway induced by nerve growth factor-mediated TrkA activation in medulloblastoma. *J Biol Chem*. Jan 7; 275(1): 565-70.

Christiansen, H., Schestag, J., Christiansen, N. M., Grzeschik, K. H., Lampert, F. (1992). Clinical impact of chromosome 1 aberrations in neuroblastoma: a metaphase and interphase cytogenetic study. *Genes Chromosomes Cancer*. Sep; 5(2): 141-9.

Clementi, F., Cabrini, D., Gotti, C., and Sher, E. (1986). Pharmacological characterization of cholinergic receptors in a human neuroblastoma cell line. *J. Neurochem*. 47, 291-297.

Cole, M. D. (1986). The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu. Rev. Genet*. 20: 361-84.

Corvi, R., Savelyeva, L., Breit, S., Wenzel, A., Handgretinger, R., Barak, J., Oren, M., Amler, L., Schwab, M. (1995). Non-syntenic amplification of MDM2 and MYCN in human neuroblastoma. *Oncogene*. Mar 16; 10(6): 1081-6.

Dang, C.V. (1999). C-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*. Jan; 19(1): 1-11.

Dunckley, T., Lukas, R. J. (2003). Nicotine modulates the expression of a diverse set of genes in the neuronal SH-SY5Y cell line. *J Biol Chem*. May 2; 278(18): 15633-40.

Eggert, A., Sieverts, H., Ikegaki, N., Brodeur, G. M. (2000). p75 mediated apoptosis in neuroblastoma cells is inhibited by expression of TrkA. *Med Pediatr Oncol*. Dec; 35(6): 573-6.

Eilers, M., Schirm, S., and Bishop, J. M. (1991). The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J*. 10: 133-41.

Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K. R., Bishop, J. M. (1989). Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature*. Jul 6; 340(6228): 66-8.

- Ejeskar, K., Sjoberg, R. M., Abel, F., Kogner, P., Ambros, P. F., Martinsson, T. (2001). Fine mapping of a tumour suppressor candidate gene region in 1p36.2-3, commonly deleted in neuroblastomas and germ cell tumours. *Med Pediatr Oncol.* Jan; 36 (1): 61-6.
- Evan, G. I., Littlewood, T. D. (1998). A matter of life and cell death. *Science.* 281: 1317-22.
- Evan, G. I., Littlewood, T. D. (1993). The role of c-myc in cell growth. *Curr Opin Genet Dev.* Feb; 3(1): 44-9.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell.* Apr 3; 69(1): 119-28.
- Freytag, S. O., Dang, C. V., Lee, W. M. (1990). Definition of the activities and properties of c-myc required to inhibit cell differentiation. *Cell Growth Differ.* Jul; 1(7): 339-43.
- Gehring, M., Berthold, F., Edler, L., Schwab, M., Amler, L. C. (1995). The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma. *Cancer Res.* Nov 15; 55(22): 5366-9.
- Gregorio, C. C., Weber, A., Bondad, M., Pennise, C. R., and Fowler, V.M. (1995). Requirement of pointed-end capping by tropomodulin to maintain actin filament length in embryonic chick cardiac myocytes. *Nature.* 377, 83-86.
- Guilhot, F. (2004). Indications for Imatinib Mesylate Therapy and Clinical Management. *The Oncologist.* 9: 271-281.
- Guo, C., White, P. S., Weiss, M. J., Hogarty, M. D., Thompson, P. M., Stram, D. O., Gerbing, R., Matthay, K. K., Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Maris, J. M. (1999). Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene.* Sep 2; 18(35): 4948-57.

- Hegde, P., Qi, R., Abernathy, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Hughes, J. E., Snesrud, E., Lee, N., and Quackenbush, J. (2000). A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques*. 29, 548-550, 552-554, 556.
- Hempstead, B. L. (2002). The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol*. Jun; 12(3): 260-7.
- Hempstead, B. L., Rabin, S. J., Kaplan, L., Reid, S., Parada, L. F., Kaplan, D. R. (1992). Overexpression of the trk tyrosine kinase rapidly accelerates nerve growth factor-induced differentiation. *Neuron*. Nov; 9(5): 883-96.
- Henriksson, M., Luscher, B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*. 68: 109-82.
- Hensen, K., Van Valckenborgh, I. C. C., Kas, K., Van de Ven, W. J. M., and Voz, M. L. (2002). The tumorigenic diversity of the three PLAGL family members is associated with different DNA binding capacities. *Cancer Research*. 62, 1510-1517.
- Hetman, M., Kanning, K., Cavanaugh, J. E., Xia, Z. (1999). Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. Aug 6; 274(32): 22569-80.
- Hogarty, M. D., Liu, X., Guo, C., Thompson, P. M., Weiss, M. J., White, P. S., Sulman, E. P., Brodeur, G. M., Maris, J. M. (2000). Identification of a 1-megabase consensus region of deletion at 1p36.3 in primary neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol*. Dec; 35(6): 512-5.
- Ignelzi, M. A. Jr., Miller, D. R., Soriano, P., and Maness, P. F. (1994). Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron*. 12, 873-884.
- Imamoto, A., and Soriano, P. (1993). Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice. *Cell*. 73, 1117-1124.

- Inghirami, G., Grignani, F., Sternas, L., Lombardi, L., Knowles, D. M., Dalla-Favera, R. (1990). Down-regulation of LFA-1 adhesion receptors by C-myc oncogene in human B lymphoblastoid cells. *Science*. Nov 2; 250(4981): 682-6.
- Iwanaga, Y., Kasai, T., Kibler, K., and Jeang, K. (2002). Characterization of Regions in hsMAD1 Needed for Binding hsMAD2. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 34: 31005-31013.
- Jiang, W., and Hunter, T. (1998). Analysis of cell-cycle profiles in transfected cells using a membrane-targeted GFP. *Biotechniques*. 24, 349-350, 352, 354.
- Jinbo, T., Iwamura, Y., Kaneko, M., Sawaguchi, S. (1989). Coamplification of the L-myc and N-myc oncogenes in a neuroblastoma cell line. *Jpn J Cancer Res. Apr*; 80 (4): 299-301.
- Kaatsch, P., Kaletsch, U., Spix, C., et al. (1999). Annual report 1998, German Childhood Cancer registry, Mainz; 72-88.
- Kaczmarek, L., Hyland, J. K., Watt, R., Rosenberg, M., Baserga, R. (1985). Microinjected c-myc as a competence factor. *Science*. 228: 1313-15.
- Karn, J., Watson, J. V., Lowe, A. D., Green, S. M., Vedeckis, W. (1989). Regulation of cell cycle duration by c-myc levels. *Oncogene*. Jun; 4(6): 773-87.
- Khan, J., Wei, J. S., Ringner, M., Saal, L. H., Ladanyi, M., Westermann, F., Berthold, F., Schwab, M., Antonescu, C. R., Peterson, C., and Metzler, P. S. (2001). Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neuronal networks. *Nature Medicine*. 7; 6:673-679.
- Kogner, P., Barbany, G., Dominici, C., Castello, M. A., Raschella, G., Persson, H. (1993). Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res*. May 1; 53(9): 2044-50.
- Krebs, D. L., and Hilton, D. J. (2001). SOCS Proteins: Negative Regulators of Cytokine Signaling. *Stem Cells*. 19: 378-387.

Land, H., Parada, L. F., Weinberg, R. A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*. Aug 18-24; 304(5927): 596-602.

Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G., McKerracher, L. (1999). Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J. Neurosci.* 19: 7537-7547.

Li, L., Prendergast, G., MacGregor, D., Ziff, E. B. (1994). C-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J.* 13: 4070-79.

Lucarelli, E., Kaplan, D., Thiele, C. J. (1997). Activation of trk-A but not trk-B signal transduction pathway inhibits growth of neuroblastoma cells. *Eur J Cancer*. Oct; 33(12): 2068-70.

Lutz, W., Stohr, M., Schurmann, J., Wenzel, A., Lohr, A., Schwab, M. (1996). Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene*. Aug 15; 13(4): 803-12.

Marcu, K. B., Bossone, S. A., Patel, A. J. (1992). myc function and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 809-60.

Maris, J. M., Guo, C., Blake, D., White, P. S., Hogarty, M. D., Thompson, P. M., Rajalingam, V., Gerbing, R., Stram, D. O., Matthay, K. K., Seeger, R. C., Brodeur, G. M. (2001). Comprehensive analysis of chromosome 1p deletions in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. Jan; 36(1): 32-6.

Maris, J. M., Weiss, M. J., Guo, C., Gerbing, R. B., Stram, D. O., White, P. S., Hogarty, M. D., Sulman, E. P., Thompson, P. M., Lukens, J. N., Matthay, K. K., Seeger, R. C., Brodeur, G. M. (2000). Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol*. May; 18(9): 1888-99.

Maris, J. M. and Matthay, K. K. (1999). Molecular Biology of Neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* 17; 7:2264-79.

Martinsson, T., Sjoberg, R. M., Hedborg, F., Kogner, P. (1995). Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. *Cancer Res.* Dec 1; 55 (23): 5681-6.

Mink, S., Mutschler, B., Weiskirchen, R., Bister, K., Klempnauer, K. H. (1996). A novel function for Myc: inhibition of C/EBP-dependent gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 25; 93(13): 6635-40.

Missero, C., Di Cunto, F., Kiyokawa, H., Koff, A., and Dotto, G. P. (1996). The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev.* 10, 3065-3075.

Missero, C., Calautti, E., Eckner, R., Chin, J., Tsai, L., Livingston, D. M., and Dotto, G. P. (1995). Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5451-5455.

Morton, A. J., and Buss, T. N. (1992). Accelerated differentiation in response to retinoic acid after retrovirally mediated gene transfer of GAP-43 into mouse neuroblastoma cells. *Eur. J. Neurosci.* 4, 910-916.

Mukherjee, B., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A. (1992). Myc family oncoproteins function through a common pathway to transform normal cells in culture: cross-interference by Max and trans-acting dominant mutants. *Genes Dev.* Aug; 6(8): 1480-92.

Nakagawara, A., Azar, C. G., Scavarda, N. J., Brodeur, G. M. (1994). Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol.* Jan; 14(1): 759-67.

Nakagawara, A., Arima-Nakagawara, M., Scavarda, N. J., Azar, C. G., Cantor, A. B., Brodeur, G. M. (1993). Association between high levels of expression of the TRK gene and favourable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med.* Mar 25; 328(12): 847-54.

Nakagawara, A., Arima, M., Azar, C. G., Scavarda, N. J., Brodeur, G. M. (1992). Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res.* Mar 1; 52(5): 1364-8.

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

Norris, M. D., Bordow, S. B., Haber, P. S., Marshall, G. M., Kavallaris, M., Madafiglio, J., Cohn, S. L., Salwen, H., Schmidt, M. L., Hipfner, D. R., Cole, S. P., Deeley, R. G., Haber, M. (1997). Evidence that the MYCN oncogene regulates MRP gene expression in neuroblastoma. *Eur J Cancer.* Oct; 33 (12): 1911-6.

Ohira, M., Kageyama, H., Mihara, M., Furuta, S., Machida, T., Shishikura, T., Takayasu, H., Islam, A., Nakamura, Y., Takahashi, M., Tomioka, N., Sakiyama, S., Kaneko, Y., Toyoda, A., Hattori, M., Sakaki, Y., Ohki, M., Horii, A., Soeda, E., Inazawa, J., Seki, N., Kuma, H., Nozawa, I., Nakagawara, A. (2000). Identification and characterization of a 500-kb homozygously deleted region at 1p36.2-p36.3 in a neuroblastoma cell line. *Oncogene.* Aug 31; 19(37): 4302-7.

Oster, S. K., Marhin, W. W., Asker, C., Facchini, L. M., Dion, P. A., Funa, K., Post, M., Sedivy, J. M., and Penn, L. Z. (2000). Myc is an essential negative regulator of platelet-derived growth factor beta receptor expression. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6768-6778.

Osterhout, D. J., Wolven, A., Wolf, R. M., Resh, M. D., Chao, M. V. (1999). Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. *J. Cell Biol.* 145: 1209-1218.

Pahlman, S., Odelstad, L., Larsson, E., Grotte, G., and Nilsson, K. (1981). Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Int. J. Cancer* 28, 583-589.

Plantaz, D., Vandesompele, J., Van Roy, N., Lastowska, M., Bown, N., Combaret, V., Favrot, M. C., Delattre, O., Michon, J., Benard, J., Hartmann, O., Nicholson, J. C., Ross, F. M., Brinkschmidt, C., Laureys, G., Caron, H., Matthay, K. K., Feuerstein, B. G., Speleman, F. (2001). Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage

4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer*. Mar 1; 91(5): 680-6.

Prendergast, G. C. (1997). Myc structure and function. In: *Oncogenes as transcriptional regulators*. Birkhauser Verlag–Boston. 1-28.

Prendergast, G. C., Lawe, D., Ziff, E. B. (1991). Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell*. May 3; 65(3): 395-407.

Qui, M. S., and Green, S. H. (1992). PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21 ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron* 9, 705-717.

Ruley, H. E. (1990). Transforming collaborations between ras and nuclear oncogenes. *Cancer Cell*. 2: 258-68.

Sahai, E., and Marshall, C. J. (2002). ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat. Cell Biol.* 4, 408-415.

Sarid, J., Halazonetis, T. D., Murphy, W., Leder, P. (1987). Evolutionarily conserved regions of the human c-myc protein can be uncoupled from transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan; 84(1): 170-3.

Scarlato, M., Beesley, J., Pleasure, D. (2000). Analysis of oligodendroglial differentiation using cDNA arrays. *J. Neurosci Res.* 59: 430-435.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 20; 270(5235): 467-70.

Schipper, R. G., and Verhofstad, A. A. J. (2002). Distribution Patterns of Ornithine Decarboxylase in Cells and Tissues: Facts, Problems, and Postulates. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 50(9): 1143-1160.

Schulte, J. H., Schramm, A., Pressel, T., Klein-Hitpass, L., Kremens, B., Eils, J., Havers, W., Eggert, A. (2003). Microarray-analysis: A new approach to study the

molecular mechanisms of thermo-chemotherapy. *Klin Pediatr.* Nov-Dec; 215(6): 298-302.

Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K. H., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., Trent, J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature.* Sep 15-21; 305(5931): 245-8.

Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S. E., Wong, K. Y., Hammond, D. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med.* Oct 31; 313(18): 1111-6.

Shalon, D., Smith, S. J., Brown, P. O. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* 6(7): 639-45.

Sherr, C. J. (1998). Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.* 12: 2984-91.

Shohet, J. M., Hicks, M. J., Plon, S. E., Burlingame, S. M., Stuart, S., Chen, S. Y., Brenner, M. K., Nuchtern, J. G. (2002). Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma. *Cancer Res.* Feb 15; 62(4): 1123-8.

Srivatsan, E. S., Ying, K. L., Seeger, R. C. (1993). Deletion of chromosome 11 and of 14q sequences in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* May; 7(1): 32-7.

Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol.* Apr; 3(4): 392-9.

Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mitnacht, S., Bartek, J., Eilers, M. (1995). Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *EMBO J.* Oct 2; 14(19): 4814-26.

Stone, J., de Lange, T., Ramsay, G., Jakobovits, E., Bishop, J. M., Varmus, H., Lee, W. (1987). Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol Cell Biol.* May; 7(5): 1697-709.

Strachan, T. and Read, A. P. (1999). *Human Molecular Genetics*. 2nd edition. BIOS Scientific Publishers; Ltd, Oxford, UK.

Suzuki, T., Bogenmann, E., Shimada, H., Stram, D., Seeger, R. C. (1993). Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst.* Mar 3; 85(5): 377-84.

Svensson, T., Ryden, M., Schilling, F. H., Dominici, C., Sehgal, R., Ibanez, C. F., Kogner, P. (1997). Coexpression of mRNA for the full-length neurotrophin receptor trk-C and trk-A in favourable neuroblastoma. *Eur J Cancer.* Oct; 33(12): 2058-63.

Tanaka, T., Hiyama, E., Sugimoto, T., Sawada, T., Tanabe, M., Ida, N. (1995). trk a gene expression in neuroblastoma. The clinical significance of an immunohistochemical study. *Cancer.* Sep 15; 76(6): 1086-95.

Thiagalingam, S., Foy, R. L., Cheng, K. H., Lee, H. J., Thiagalingam, A., and Ponte, J. F. (2002). Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Curr. Opin. Oncol.* 14: 65-72.

Van Noesel, M. M., Bezouw van, S., Voute, P. A., Herman, J. G., Pieters, R., and Versteeg, R. (2003). Clustering of Hypermethylated Genes in Neuroblastoma. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 38: 226-233.

Van Roy, N., Forus, A., Myklebost, O., Cheng, N. C., Versteeg, R., Speleman, F. (1995). Identification of two distinct chromosome 12-derived amplification units in neuroblastoma cell line NGP. *Cancer Genet Cytogenet.* Jul 15; 82 (2): 151-4.

Wellbrock, C., Weisser, C., Geissinger, E., Troppmair, J., and Schartl, M. (2002). Activation of p59(Fyn) leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 6443-6454.

Westfall, P. H., and Young, S. S. (1993). *Resampling-Based Multiple Testing. Examples and Methods for p-Value Adjustment* (New York: Wiley).

White, P. S., Thompson, P. M., Seifried, B. A., Sulman, E. P., Jensen, S. J., Guo, C., Maris, J. M., Hogarty, M. D., Allen, C., Biegel, J. A., Matisse, T. C., Gregory, S. G., Reynolds, C. P., Brodeur, G. M. (2001). Detailed molecular analysis of 1p36 in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* Jan; 36(1): 37-41.

White, P. S., Maris, J. M., Beltinger, C., Sulman, E., Marshall, H. N., Fujimori, M., Kaufman, B. A., Biegel, J.A., Allen, C., Hilliard, C., et al. (1995). A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 6; 92(12): 5520-4.

Wolf, R. M., Wilkes, J. J., Chao, M. V., and Resh, M. D. (2001). Tyrosine phosphorylation of p190 RhoGAP by Fyn regulates oligodendrocyte differentiation. *J. Neurobiol.* 49, 62-78.

Wyllie, A. H. (1993). Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br. J. Cancer.* 67: 205-8.

Yamashiro, D. J., Nakagawara, A., Ikegaki, N., Liu, X. G., Brodeur, G. M. (1996). Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas. *Oncogene.* Jan 4; 12(1): 37-41.

Yancopoulos, G. D., Nisen, P. D., Tesfaye, A., Kohl, N. E., Goldfarb, M. P., Alt, F. W. (1985). N-myc can cooperate with ras to transform normal cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug; 82(16): 5455-9.

Yarmola, E. G., Edison, A. S., Lenox, R. H., and Bubb, M. R. (2001). Actin filament cross-linking by MARCKS: characterization of two actin-binding sites within the phosphorylation site domain. *J. Biol. Chem.* 276, 22351-22358.

Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* Aug 1; 12(15): 2424-33.

9. Anhang

9.1 Abkürzungen

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

A	Ampere
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cat#	Katalog-Nummer
Cdk	cyclin dependent kinase
cDNA	copy DNA
Ci	Curie
CT	Cycle treshold, Computertomographie
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	expressed sequence tags
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fig.	Figur
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
HLH	Helix-Loop-Helix-Domäne

kb	Kilobasenpaare
l	Liter
log	Logarithmus
LOH	Loss of Heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)
LZ	Leuzin-Zipper
m	milli
M	molar
min.	Minute
Miz-1	Myc interacting zinc finger protein
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
Myc	Myelocytomatose Protein
μ	mikro
N	Normal
n	Nano, Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
p	piko
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	saline-sodium citrate
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA (Puffer)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Umdrehung, Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
W	Watt

9.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt:

Aumüller, Basler, Cetin, Daut, Eilers, Feuser, Fruhsdorfer, Gemsa, Geus, Hasilik, Kern, Koolman, Lammel, Lang, Leppek, Löffler, Müller, Röhm, Seifert, Seitz, Steininger, Sundermeyer, Weihe, Westermann

Klinischer Studienabschnitt:

Arnold, Barth, Baum, Bien, Christiansen, Czubayko, Fuhrmann, Görg, Gotzen, Griss, Happel, Hesse, Junclas, Klenk, Klose, Krieg, Maisch, Moll, Moosdorf, Neubauer, Oertel, Renz, Rothmund, Schäfer, Schulz, Seybert, Schmidt, Vohland, von Wichert, Wagner, Werner

9.3 Danksagung

Ich möchte mich bei all denen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Martin Eilers und Prof. Dr. Holger Christiansen, die mir die Bearbeitung eines sehr interessanten Themas ermöglichten. Dr. Bernd Berwanger und Dr. Eckhard Bergmann danke ich für die intensive Betreuung und Unterstützung, sowie die zahlreichen Anregungen und die fortwährende Diskussionsbereitschaft. Sie haben maßgeblich zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt zudem Dr. Michael Krause, Axel Badouin, Sigrid Bischofsberger und Angelika Filmer für die Unterstützung und Hilfestellung bei den Microarray-Analysen, sowie Oliver Hartmann für die mathematische Beratung und Auswertung der durch den Microarray gewonnenen Rohdaten.

Für das angenehme Arbeitsklima, für die gute Zusammenarbeit und für die vielen Tipps und Hilfestellungen bei unzähligen Problemen möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG-Eilers bedanken: Sovana Adhikary, Sandra Bernard, Vincent Beuger, Caroline Bouchard, Antje Grzeschiczek, Steffi Herold, Bianca Jebavy, Daniela Kleine-Kohlbrecher, Werner Lutz, Inge Pelz, Jens-Peter Reese und Michael Wanzel. Darüber hinaus auch bei allen nicht namentlich genannten ehemaligen Mitarbeitern.

Einen großen Dank auch an meine Familie, meine Freundin Friederike, alle Freunde und Mitbewohner, die stets für mich da waren. Danke für die fortwährende Unterstützung.