

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



**Neue Zielgene des Transkriptionsfaktors E2F-1 und die
transkriptionelle Regulation des *MYCN* Onkogens im
humanen Neuroblastom**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Christoph Matthias Kramps
aus Bochum

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

am:18.10.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund
Referent: PD Dr. rer. nat. W. Lutz
Korreferent: Prof. Dr. med. E. Weihe

Teile dieser Arbeit wurden im „Journal of Biology and Chemistry“ und „Nucleic Acids Research“ publiziert.

Meiner Familie

„Es mag zwar paradox klingen, doch alle exakte Wissenschaft wird vom Gedanken der Annäherung beherrscht.“

Bertrand Russel

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	9
1.1 Der Zellzyklus	9
1.1.2 Zyklinabhängige Kinasen	10
1.1.3 Rb/E2F-abhängiger Restriktionspunkt	10
1.2 Die E2F-Transkriptionsfaktoren	12
1.2.1 Eigenschaften der E2F-Transkriptionsfaktoren	12
1.2.2 Funktion von E2F	13
1.3 Sp-Transkriptionsfaktoren	14
1.4 Myc	15
1.4.1 Funktionen	16
1.4.2 Zelluläre Funktionen und Zielgene von Myc	17
1.5 Das Neuroblastom	17
1.5.1 Klinik und Diagnostik	18
1.5.2 Histologie	19
1.5.3 Genetische Unterschiede	19
1.5.4 Stadieneinteilung	21
1.5.5 Therapie	22
1.5.6 Prognose	22
1.6 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit	23
2 Materialien	24
2.1 Materialien für die Zellkultur	24
2.1.1 Zelllinien	25
2.2 Materialien für die Molekularbiologie	25
2.2.1 RNA-Isolierung	25
2.2.2 DNase-Verdau nach RNA-Isolierung	25
2.2.3 Agarosegel	26
2.2.4 Gelextraktion bzw. Aufreinigung eines PCR-Produktes	26
2.2.5 Bakterienstämme	27
2.2.6 DNA-Vektoren	27
2.2.7 Medium für die Bakterienkultur	27
2.2.7 Medium für die Bakterienkultur	27

2.2.9 Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipröp)	28
2.2.10 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi-Pröp)	28
2.2.11 c-DNA Synthese mit Random Primern	29
2.2.12 Oligodeoxynucleotide	29
2.2.13 PCR	31
2.2.14 Real-Time	32
2.2.15 Materialien für die Micro-Array Analyse	32
2.3 Materialien für die Biochemie	33
2.3.1 Lysepuffer für die Herstellung von Kernextrakten	33
2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford	34
2.3.3 Materialien für die DNA-Affinitätsaufreinigung	34
2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.3.5 Reagenzien für Western-Blot-Analyse	36
2.3.6 Materialien für die Silberfärbung	37
3 Methoden	38
3.1 Zellkultur	38
3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen	38
3.1.2 Passagieren von Zellen	38
3.1.3 Induktion von E2F-1 durch das E2F-1-ER-System	38
3.2 Molekularbiologische Methoden	39
3.2.1 RNA-Isolierung mit dem TRIzol [®] -Reagenz	39
3.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	39
3.2.3 DNase-Verdau nach RNA-Extraktion	39
3.2.4 Erzeugung einer Punktmutation	40
3.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	40
3.2.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	40
3.2.6.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
3.2.6.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten direkt nach Verdau bzw. nach Amplifikation	41
3.2.7 Restriktionsverdau von dsDNA	41
3.2.8 Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipröp)	41

3.2.9 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi-Präp)	42
3.2.10 RT-PCR	42
3.2.11 Standard-PCR	42
3.2.12 Quantitative-Real-Time-PCR	43
3.2.13 cDNA-Hybridisierung von DNA-CHIPs (Microarray-Analyse)	44
3.3 Biochemische Methoden	45
3.3.1 Herstellung von Kernextrakt aus kultivierten Zellen	45
3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford	45
3.3.3 DNA-Affinitätsaufreinigung von Kernproteinen im analytischen Maßstab	46
3.3.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
3.3.5 Western-Blotting	47
3.3.6 Silberfärbung der Polyacrylamidgele (SDS-PAGE)	49
4 Ergebnisse	50
4.1 Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors E2F-1 in Neuroblastomzellen	50
4.1.1 Aktivierung von E2F-1 durch 4-Hydroxitamoxifen in Neuroblastomzellen	50
4.1.2 Direkte Induktion ausgewählter Gene durch E2F-1	55
4.2 Identifizierung von Regulatoren des <i>MYCN</i> -Gens durch Affinitäts- Chromatographie	59
4.2.1 Prinzip der biochemischen Aufreinigung	59
4.2.2 Herstellung einer DNA-Affinitätsmatrix	60
4.2.3 DNA-Affinitätsaufreinigung im analytischen Maßstab	61
4.2.4 Aufreinigung im präparativen Maßstab und Identifizierung der aufgereinigten Proteine mittels Massenspektrometrie	63
4.3 Eine Mutation der CT1-Box beeinträchtigt nicht die Aktivierung von <i>MYCN</i> durch E2F-1	65
5 Diskussion	68
5.1 E2F-1 aktiviert <i>BMII</i> direkt im humanen Neuroblastom	68
5.2 Mittels Affinitätschromatographie lassen sich an die <i>MYCN</i> - Promotorsequenz bindende Proteine aufreinigen	71
5.3 Ausblick	73

6 Zusammenfassung	74
7 Literaturverzeichnis	75
Abkürzungsverzeichnis	92
Verzeichnis der akademischen Lehrer	96

1 Einleitung

1.1 Der Zellzyklus

Die Vermehrung von Zellen geschieht durch Duplikation der Chromosomen mit ihrer anschliessenden Verteilung auf zwei voneinander unabhängige Tochterzellen, wobei sie ein festgelegtes Programm durchlaufen, den Zellzyklus. Der Zellzyklus eukaryontischer Zellen besteht aus fünf Phasen, der G_0 -, G_1 -, S-, G_2 - und M-Phase. Die beiden Phasen G_1 und G_2 bilden die Intervalle zwischen der S-Phase (S = Synthese), in der die genetische Replikation stattfindet, und der M-Phase, auch Mitose-Phase genannt, mit der eigentlichen Teilung in zwei Tochterzellen, die sich dann beide in der G_1 -Phase befinden. Aus der G_1 -Phase können Zellen aus dem Zellzyklus in die sog. G_0 -Phase übergehen und in dieser, z.T. sehr lange, verharren, aber auch wieder in die G_1 -Phase und damit in den Zellzyklus zurückkehren. Besondere Bedeutung erhält die G_1 -Phase auch dadurch, dass hier der sogenannte Restriktions-Punkt (R-Punkt) (s.1.1.3) überschritten werden muss. Ist dieser Schritt getan, gibt es für die Zelle kein zurück mehr, sie durchläuft den Zellzyklus.

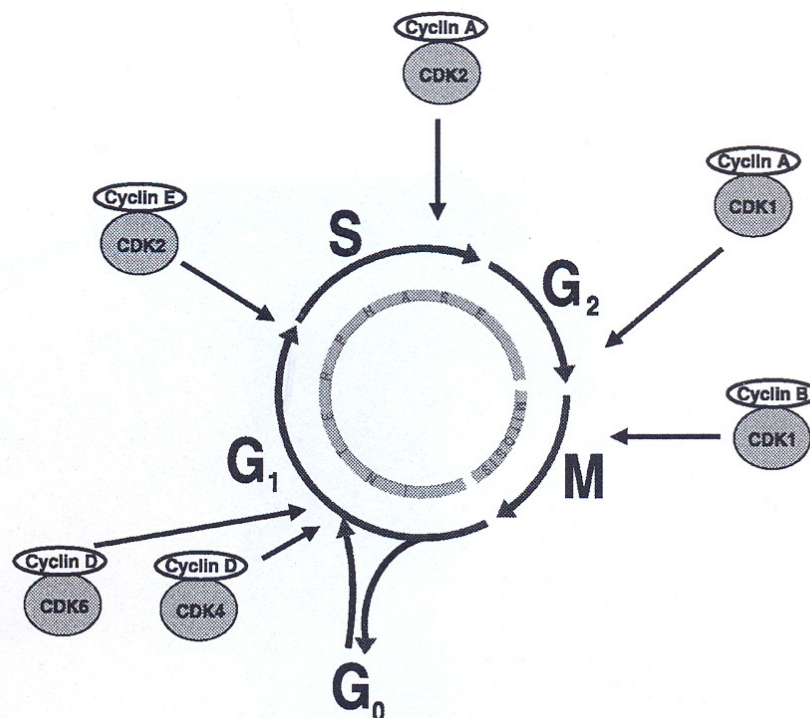


Abb. 1 Der Zellzyklus und die Aktivität regulatorischer CDK/Zyclin-Komplexe.

1.1.2 Zyklinabhängige Kinasen

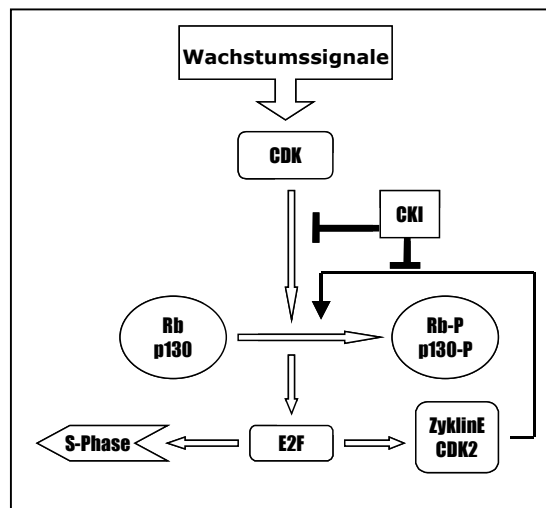
Die Übergänge zwischen den Einzelnen Phasen des Zellzyklus (G_1 -, S-, G_2 -, M-Phase) werden durch verschiedene Faktoren kontrolliert. Eine besonders wichtige Gruppe sind die Zyklinabhängigen-Protein-Kinasen (*cyclin dependent kinases* = CDK) (Pines, 1993), eine Gruppe von Serin/Threonin Proteinkinasen, von denen bisher 9 verschiedene beschrieben wurden, wovon vier während des Zellzyklus aktiv sind. Dies sind während der G_1 - CDK4, CDK6 und CDK2, in der S- CDK2 und in der M-Phase CDK1 (Vermeulen et al., 2003). Der Aktivitätszustand der CDKs wird durch die Zykline D, E und A reguliert. Die Zykline E und A werden während des Zellzyklus periodisch exprimiert, wobei Zyklin E mit CDK2 und Zyklin A, während der S-Phase mit CDK2 und in der späten S-/ G_2 -Phase mit CDC2 (=CDK1), komplexiert. Dagegen werden D-Zykline (D1, D2, D3) abhängig von mitogener Stimulation gebildet und bilden Komplexe mit CDK4 und CDK6 (Sherr, 1994).

Die Aktivität der CDKs kann durch inhibitorische Zellzyklus-Proteine gehemmt werden, die sogenannten CKI (*CDK inhibitors*), die entweder an CDK alleine oder an CDK-Cyclin-Komplexe binden und regulieren. Bei den CKI werden die INK4- und die Cip/Kip-Familie unterschieden (Sherr und Roberts, 1995). Die INK4-Familie beinhaltet die Proteine p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}, welche spezifisch CDK4 und CDK6 (G_1 -CDK) inaktivieren. Die zweite Familie Cip/Kip besteht aus p21^{Waf1,Cip1}, p27^{Cip2} und p57^{Kip2}. Diese CKI inaktivieren die CDK-Cyclin-Komplexe der CDK4 und CDK6 (G_1 -CDK) (Polyak et al., 1994; Harper et al., 1995; Lee et al., 1995) und etwas schwächer den CDK1-Zyklin B-Komplex (Hengst et Reed, 1998). p21 bindet und inhibiert auch PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Pan et al., 1995) und wird selber transkriptionell von p53 reguliert. p15 und p27 werden dagegen durch TGF- β (*transforming growth factor β*) aktiviert, was zu einem Wachstumsstop führt (Hannon et al., 1994; Reynisdottir et al., 1995).

1.1.3 Rb/E2F-abhängiger Restriktionspunkt

Während der G_1 -Phase reagieren Zellen auf extrazelluläre Signale, indem sie sich teilen oder aus dem Zyklus in die G_0 -Phase austreten (Pardee, 1989; Sherr, 1994). Überschreitet die Zelle aber einen bestimmten Punkt in der späten G_1 -Phase, so spricht sie auf keinerlei Signale mehr an und tritt in die S-Phase ein und durchläuft den Zellzyklus. Dieser kritische Punkt wird Restriktionspunkt (R-Punkt) genannt und ist im Wesentlichen vom Zusammenspiel zwischen dem Tumorsuppressor RB und den

E2F-Transkriptionsfaktoren abhängig. Das Retino-blastom(*RB*)-Gen wurde als erstes Tumorsupressorgen im Zusammenhang mit einem hauptsächlich pädiatrischen Augentumor, dem Retinoblastom, identifiziert (Friend et al., 1986). Es handelt sich hierbei um ein Gen, das ein Phosphoprotein, das pRb, bestehend aus 928 Aminosäuren, codiert, welches, als Substrat der CDKs, den Zellzyklus in der G1-Phase arretiert (Weinberg, 1995). Mutationen, die das RB-Gen betreffen, werden aber nicht nur beim Retinoblastom gefunden, sondern zeigen sich auch bei anderen Tumoren, wie dem Osteosarkom, bei kleinzelligen Lungen-Carcinomen, sowie Prostata- und Mamma-Carcinomen (Friend et al., 1986; Fung, 1987; Harbour, 1988).



Die Aktivität des pRB hängt vom Grad seiner Phosphorylierung durch die CDKs ab und schwankt, während des Zellzyklus, zwischen hyper-(inaktiv) bzw. hypo-(aktiv)phosphorylierung der 16 möglichen Phosphorylierungsstellen (Harbour et al, 2000). Nach Hyperphosphorylierung durch CDK4 bzw. 6 im Komplex mit Zyklin E werden die Repressorkomplexe aufgelöst, welche die Transkription von E2F-Zielgenen reprimieren. Anschliessend können für die Transkription und DNA-Synthese wichtige Faktoren durch E2F1-3 aktiviert werden (s.unten). Die Aktivierung von Zyklin E/CDK2 führt zu weiterer Phosphorylierung und Inaktivierung von pRb, wodurch die Aktivität von aktivierenden E2Fs weiter verstärkt wird und es zu einer Akkumulation von Zyklin E/CDK2 kommt (Lundberg et al., 1998; Harbour et al., 1999). Diese Rückkopplungsschleife führt zur andauernden Hyperphosphorylierung und damit

Inaktivierung von pRb unabhängig von der Aktion von Zyklin D/CDK4. Sie repräsentiert den bereits erwähnten Restriktionspunkt. Hierdurch wird die Bedeutung von unter anderem pRb für die Zellsynthese deutlich, was dadurch bestätigt werden konnte, dass Rb-knock-out Mäuse bereits präpartal verstarben.

1.2 Die E2F-Transkriptionsfaktoren

Die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie wurden zuerst als zellulärer Bestandteil des E2-Promotors von Adenoviren beschrieben (Kovesdi et al., 1986). Bisher sind acht Mitglieder der E2F-Familie bekannt, E2F1-8, wobei das E2F-3-Gen für zwei Produkte kodiert, E2F-3a bzw. E2F-3b, die durch zwei alternative Promotoren im Gen entstehen (Leone et al., 2000). Die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie übernehmen eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle von Zellentwicklungs- und Differenzierungsprozessen und beeinflussen wesentlich die Transkription, den Zellzyklus und die Apoptose.

1.2.1 Eigenschaften der E2F-Transkriptionsfaktoren

E2F-1-6 bilden Komplexe mit den heterodimeren Partnern der DP-Familie (*Differentiation regulated transcription factor Protein*), bestehend aus DP1, DP2/3 und DP4. Die Faktoren E2F-7-8 binden und beeinflussen dagegen bestimmte DNA-Abschnitte unabhängig von einer DP-Bindung. Der Einfluß, den die DP-Untereinheiten auf die Funktion des jeweiligen E2F-Protein ausübt ist allerdings noch weitestgehend unbekannt.

Das erste Mitglied der E2F-Familie, E2F-1, sowie seine beiden Verwandten E2F-2 und E2F-3a sind hauptsächlich mit dem Retinoblastomprotein pRB assoziiert, wenn dieses im hypophosphoryliertem Zustand vorliegt. Ihre Expression schwankt stark während des Zellzyklus, erreicht seinen Höhepunkt in der späten G1-Phase und korreliert mit der Aktivierung von G1-/S-Phase spezifischen Genen (Leone et al., 1998). Im aktivierten Zustand sind sie potente transkriptionelle Aktivatoren (Dyson, 1998), wie zum Beispiel die transkriptionelle Aktivierung von Zyklin E zeigt, und sind in der Lage ruhende Zellen in den Zellzyklus zu überführen. E2F-3b, E2F-4 und E2F-5 werden hauptsächlich repressive Wirkung auf ihre jeweiligen Zielgene zugeschrieben (Dyson, 1998), die in ruhenden Zellen und der frühen G1-Phase zu finden ist. E2F-3b ist dabei ebenfalls mit pRB assoziiert, während E2F-4 und -5 sowohl mit pRB, als auch mit dessen verwandten Taschenproteinen p107 und p130 eine Verbindung eingehen können. Dabei werden die E2F-DP-Heterodimere durch die zugehörigen

Taschenproteine in ihrer Aktivität blockiert, was durch eine Blockade des Zusammenspiels der E2F-Transkriptionsfaktoren mit den transkriptionellen Ko-Faktoren, wie p300/CBP, TRAPP, TIP60 und anderen Faktoren geschieht. E2F-1 kann auch direkt durch RB an einer DNA-Bindung gehemmt werden (Dick und Dyson, 2003).

Auf Promotorebene können RB und die Taschenproteine Faktoren, wie BRM/BRG1, HDAC's (*histone deacetylases*), u.a., beeinflussen, die reprimierende Eigenschaften auf den jeweiligen E2F-Transkriptionsfaktor haben. Welcher Ko-Repressor dabei eine Rolle spielt hängt vom jeweiligen Gen-Promotor und dem zellulären Status, d.h. ob es sich um eine ruhende oder eine sich differenzierende Zelle handelt, ab (zur Übersicht siehe DeGregori und Johnson, 2006).

Die verleibenden Faktoren E2F-6, E2F-7 und E2F-8 haben hauptsächlich einen negativen Einfluß auf ihre Zielgene, ihre Wirkung ist aber unabhängig von RB oder anderen Taschenproteinen. E2F-1 funktioniert als Negativregulator, indem es direkt an Proteine der Polycomb-Gruppe bindet oder grosse multimere Komplexe mit Mga- und Max-Proteinen bildet (Trimarchi et al., 1998; Trimarchi et al., 2001; Ogawa et al., 2002). Eine Überexpression von E2F-7 in MEFs (*mouse embryo fibroblasts*) führte zur Inhibition des Zellwachstums (de Bruin et al., 2003).

1.2.2 Funktion von E2F

Die transkriptionelle Wirkung der E2F-Faktoren ist vielseitig. So werden entweder Gene der Zellzyklusprogression oder der DNA-Synthese reguliert. Dazu gehören unter anderem die DNA-Polymerase α (Pearson et al., 1991), die Dihydrofolatreduktase (Blake et al., 1989), CDC25A (Vigo et al., 1999), die Zykline A und E (Schulze et al., 1995; Ohtani et al., 1995), *MYCN* (Strieder und Lutz, 2003) oder E2F-1 und E2F-2 selbst (Hsiao et al., 1994; Sears et al., 1997). Eine frühere Einteilung, nach der die E2F-Transkriptionsfaktoren in zwei Gruppen aufgeteilt wurden, in „Aktivatoren“ – E2F-1, E2F-2, E2F3a – und „Repressoren“ – E2F-3b, E2F-4, E2F-5, E2F-6, E2F-7 und E2F-8 –, ist nicht vollständig. Denn E2F-1 ist einerseits in der Lage die S-Phase, und somit die Zellvermehrung, einer Zelle zu induzieren und kann andererseits die Apoptose mit Hilfe des Tumorsuppressors p14ARF, über Aktivierung von p53, einleiten (Wu et al., 1994). Auch in Zellen ohne p53-Expression, wie zum Beispiel Saos-2 Osteosarkomzellen, ist E2F-1 ein effektiver Apoptoseinduktor (Irwin et al., 2000; Lissy et al., 2000). Es aktiviert direkt den p53-Verwandten p73, der, wie p53 auch,

Caspase 9 aktiviert, was über die Aktivierung weiterer Caspasen zum programmierten Zelltod, der Apoptose, führt. Ein weiterer Weg ist die Unterdrückung von antiapoptotischen Signalen, wie NF- κ B, das in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli, die Apoptose reguliert (Barkett et al., 1999), oder die direkte Aktivierung von Apaf-1 (*apoptosis protein-activating factor*), das über caspase9 vermittelt ebenfalls zum programmierten Zelltod führen kann (Moroni et al., 2001; Furukuwa et al., 2002; Cain et al., 2002) (Abb.3). E2F-1 hat somit sowohl die Eigenschaften eines Onkogens, als auch eines Tumorsuppressors.

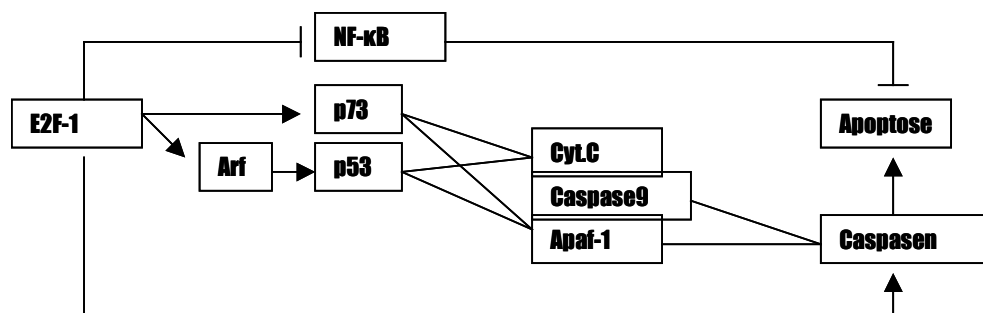


Abb. 3 E2F-1 kann auf verschiedenen Wegen die Apoptose induzieren. E2F-1 kann den programmierten Zelltod durch den p53-Verwandten p73 oder durch Stabilisierung von p53 mit Hilfe des Tumorsuppressor Arf aktivieren. Beide Wege führen zur Aktivierung von Caspase 9. Ebenso kann E2F-1 die antiapoptotischen Signale von NF- κ B blockieren und die Apoptose direkt über Aktivierung von Effektorcaspasen einleiten.

1.3 Sp-Transkriptionsfaktoren

Die Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie binden an G-reiche Elemente, wie die GC-Boxen (GGGGCGGGG) und den verwandten GT-Boxen (GGTGTGGGG) und üben wichtige Funktionen in TATA-Box freien Promotoren aus. Als einer der ersten Transkriptionsfaktoren in Säugerzellen überhaupt wurde Sp1 beschrieben (Dyan und Tjian, 1983). Bei dem es sich um einen an verschiedenen GC-Boxen im Promotor von SV40 (simian virus 40) bindenden und transkriptionell aktivierenden Faktor handelt. Die in ihrer Struktur ähnlichen Sp-Transkriptionsfaktoren gehören zu der funktionellen Gruppe der Zink-Finger-Proteine. Die C-terminal liegende C2H2-Typ (2 Cystin und 2 Histidin) Zink-Finger-Region, die jeweils 3 Zink-Finger bildet, repräsentiert die DNA-Bindedomäne. Sie besteht aus 81 Aminosäuren (AS) und ist hochkonserviert. N-terminal findet sich die Aktivierungsdomäne der Transkriptionsfaktoren. Mittlerweile sind mindestens fünf weitere sog. Zink-Finger-Proteine beschrieben worden, die eine

dem Sp1 verwandte Zink-Finger-Region aufweisen. Weitere Subtypen, die sich sowohl in Sequenz und Funktion ähneln, lassen sich noch von diesen unterscheiden (zur Übersicht siehe Kaczynski et al., 2003).

Nähere Studien der AS-Sequenzen ergaben eine große Übereinstimmung der Faktoren Sp1, Sp3 und Sp4, die alle die „klassische“ Sp1-Bindestelle mit gleicher Affinität besetzen (Hagen et al., 1992, 1994). In Sp2 ist im ersten Zink-Finger Histidin durch Lysin ersetzt, wodurch dieser Faktor andere Bindeeigenschaften erhält und anstatt an die GC-Box an ein GT-reiches Element innerhalb des TCR α -(*T-cell antigen receptor* α) Promotors bindet (Kingsley und Winoto, 1992). Darüber hinaus ist über die eigentliche Funktion von Sp2 nicht viel bekannt, nur lässt eine glutaminreiche Aktivierungsdomäne ein aktivierendes Potential vermuten (Kingsley und Winoto, 1992). Ebenso finden sich glutaminreiche Regionen in der Aktivierungsdomäne von Sp1, die als starke Aktivatoren dienen (Courey und Tjian, 1988). Dabei interagiert Sp1 mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie TBP (TATA-Box-Bindeprotein) (Emili et al., 1994) und den TBP assoziierten Faktoren dTAF110, hTAFII130 und hTAFI55 (Hoey et al., 1993; Tanese et al., 1996; Chiang und Roeder, 1995). Weitere Partner sind das zellzyklusregulierende Protein p107 (Datta et al., 1995) und die Transkriptionsfaktoren E2F (Karlseder et al., 1996) und MYC (Lutz und Schwab, 1997). Sp1 und Sp3, die beide ubiquitär vorkommen, sind die hauptsächlichen Aktivatoren an GC-Boxen, wobei sie eng miteinander arbeiten und Sp3, abhängig von intrazellulären Umständen, als Repressor oder Aktivator von Sp1-vermittelter Transkription fungiert. Sp4 kommt, im Gegensatz zu den beiden vorangehenden Faktoren, nur in einigen wenigen Geweben vor. Hohe Konzentrationen finden sich hauptsächlich im Gehirn, aber auch in Epithelien, Testes und Zähnen während der Entwicklung (Hagen et al., 1992; Supp et al., 1996). Mausexperimente zeigten, dass rund ein Drittel aller Sp4 $-/-$ Mäuse innerhalb weniger Tage postpartum verstarben, wobei die Ursache der frühen Sterblichkeit nicht geklärt ist. Mäuse die weiter überlebten, zeigten ein retardiertes Wachstum und starke Verhaltensveränderungen.

1.4 Myc

Als zelluläres Homolog zu dem transformierenden Onkogen v-Myc des Vogel-Myelocytomatose-Retrovirus wurde c-Myc identifiziert (Vennstrom et al., 1982). Weitere Mitglieder der Myc-Onkogene sind neben c-Myc, N-Myc und L-myc, die alle neoplastisches Potential aufweisen (Dang et al., 1999). So spielt es unter anderem in

der Karzinogenese des Burkitt-Lymphoms, von Mamma-Karzinomen, Prostata-Karzinomen, gastrointestinalen Karzinomen und Melanomen eine Rolle. Die Myc-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die aus einem basischen HLH/LZ-Protein (*helix-loop-helix/leucin-zipper*) bestehen. Der im C-terminalen Bereich liegende basische Bereich vermittelt als DNA-Bindedomäne den Kontakt mit spezifischen 5'-CACGTG-3'-Elementen der DNA, die zur Gruppe der E-Boxen (5'-CAN NTG-3') gehört (Blackwell et al., 1990; Prendergast und Ziff, 1991). Daneben fungiert die LZ-Domäne als Dimerisierungsdomäne, wodurch die im Inneren liegenden hydrophoben Aminosäuren des HLH-Motives stabilisiert werden. Der N-terminale Teil der MYC-Transkriptionsfaktoren enthält in den ersten 143 Aminosäuren (AS) die hochkonservierten MYC-Boxen I und II (MBI (AS 45-63) und MBII (AS 128-143)), die als transkriptionelle Aktivierungsdomänen fungieren (Kato et al., 1990). MBI wird für die Regulation einiger Zielgene von Myc benötigt, während MBII eine essentielle Effektor-domäne darstellt (Bouchard et al., 2001).

1.4.1 Funktionen

Neben der transkriptionsaktivierenden Funktion vermitteln die MYC-Faktoren transkriptionell auch reprimierende Eigenschaften. Wichtig für die Funktionalität von Myc ist die Heterodimerisierung mit Max, einem weiteren bHLH/LZ-Protein, das ubiquitär exprimiert wird und, gegenüber Myc mit einer Halbwertszeit von 20-30 min (Hann und Eisenmann, 1984), wesentlich stabiler ist. Max hat neben Myc noch weitere Partner, wie Mad, Mga oder Mnt (auch Rox genannt), die alle das bHLH/LZ-Motiv enthalten. Daneben bildet Max selber auch Homodimere, die allerdings transkriptionell inert erscheinen (Kretzner et al., 1992). Mad-Max-Heterodimere binden, wie Myc-Max-Komplexe, an E-Boxen, wirken hier allerdings repressiv, indem Mad mit dem mSin3-Korepressor, der eine Histondeacetylase (HDAC)-Aktivität besitzt, komplexiert. Myc komplexiert dagegen mit TRRAP (*transformation transcription domain-associated protein*), einer Histonacetyltransferase (HAT) (McMahon et al., 2000), dabei bedarf es zusätzlich der MBII (McMahon et al., 1998), ohne die Myc nicht in der Lage ist, seine Zielgene zu beeinflussen. Ähnlich wie Mad, rekrutiert Mnt den mSin3-Korepressorkomplex und reprimiert in einigen Zelltypen die Transkription. Mag interagiert mit Max und bindet an T-Box Domänen und hat wohl ebenfalls repressive Eigenschaften (Hurlin et al., 1997).

1.4.2 Zelluläre Funktionen und Zielgene von Myc

Im Zellkultursystem verkürzt überexprimiertes Myc die G1-Phase und beschleunigt damit den Eintritt in die S-Phase. Eine ektope Expression vermag ruhende Zellen in den Zellzyklus überzuführen (Eilers et al., 1989; Karn et al., 1989). Mit jüngeren Verfahren, wie cDNA- oder Oligonucleotid-Microarrays, konnte eine grosse Anzahl von Myc-Zielgenen dargestellt werden, deren Funktion sich meist noch erschliessen muss. Bekannte Zielgene sind während der Zellzyklusprogression beispielsweise CDK4 (Hermeking et al., 2000), CyclinD2 (Bouchard et al., 1999) und cdc25A (Galaktionov et al., 1996), die direkt durch Myc aktiviert werden. In seiner zellzyklusprogressiven Funktion ist Myc auch ein Positivregulator der G1-spezifischen zyklinabhängigen Kinasen (CDKs), besonders des Zyklin E/CDK2-Komplexes (Amati et al., 1998), wodurch die G1-Phase verkürzt wird. Dagegen werden Zielgene, wie GADD45 (Marhin et al., 1997), die CDK-Inhibitoren p15^{INK4b} (Staller et al., 2000) und p21^{CIP1} (Coller et al., 2000) reprimiert, wodurch Funktionen im Zellzyklusarrest ausgeübt werden. Dagegen kann Myc aber auch den programmierten Zelltod einer Zelle aktivieren, aber sie andererseits auch immortalisieren. Myc aktiviert p19^{Arf} (Zindy et al., 1998) und führt damit, in Abwesenheit von Überlebensfaktoren, über die Interaktion mit p53 und Mdm2 zur Apoptose. Eine Immortalisierung einiger Zelltypen erreicht Myc über eine verstärkte Telomeraseaktivität, durch die Überexpression von hTert einem Bestandteil der Telomerase (Wang et al., 1998). Andere Zellen benötigen darüber hinaus die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie p53 und pRb, für eine Transformation (Kiyono et al., 1998). Jones et al. (1996) fanden für den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF4E funktionelle Bindestellen für den Myc-Max-Komplex. Tatsächlich führt ein Verlust von Myc zu einer verminderten Protein- und rRNA-Synthese, was ein reduziertes Zellwachstum zur Folge hat.

1.5 Das Neuroblastom

Virchow beschrieb zum ersten mal 1864 eine Vergrößerung der Nebennieren, die heute unter dem vom amerikanischen Pathologen Homer Wright (1910) geprägten Begriff Neuroblastom bekannt ist. Dabei handelt es sich um den häufigsten extrakraniellen soliden pädiatrischen Tumor, der, ausgehend vom peripheren sympathischen Nervensystem, für etwa 15% der Todesfälle durch Krebserkrankungen bei Kindern verantwortlich ist. Er macht rund 8% aller Krebsarten im Kindesalter aus und hat bei Kindern unter dem 15. Lebensjahr eine Inzidenz von 1,3 pro 100.000 Kindern pro Jahr.

Das entspricht ungefähr 140 Neuerkrankungen pro Jahr in der Bundesrepublik Deutschland, wobei das Durchschnittsalter bei 2 Jahren liegt. Dabei sind Jungen etwas häufiger betroffen als Mädchen, was besonders auf höhere Stadien des Neuroblastoms zutrifft. Seine Ätiologie ist unbekannt, doch werden durch Umweltbelastung hervorgerufene und genetisch prädisponierende Faktoren vermutet. Ein Prädispositionslocus liegt auf Chromosom 16p12-13 (Maris et al., 2002). Ebenso ist bekannt das besonders aggressive Formen eine vermehrte Amplifikation des Onkogens *MYCN*, aus der Familie der *MYC*-Onkogene (s.1.4), aufweisen (Schwab et al., 1983). Zusätzlich finden sich Assoziationen zu anderen neuronalen Erkrankungen, wie der Neurofibromatose Typ I (Morbus von Recklinghausen) und der Aganglionose (Morbus Hirschsprung), bei der sich aber keine Verbindungen zu Genen, die mit dieser Erkrankung vergesellschaftet sind, finden lassen konnten (Maris et al., 1996; Weiss et al., 2000).

1.5.1 Klinik und Diagnostik

Bei zweidrittel aller Patienten findet sich ein Primärtumor intraabdominell. Dieser manifestiert sich durch eine abdominelle Größenzunahme und durch einen festen tastbaren Tumor. Eine plötzliche und schnelle Größenzunahme ist verdächtig auf eine Tumorruptur oder eine Einblutung in den Tumor. Intrathorakale Primärtumoren oder im Bereich des zervikalen Rückenmarks sind meist symptomlos. Intrapelvine Tumoren können durch Kompression der Harnblase zu Miktionsstörungen führen.

Bei Diagnosestellung finden sich bei den meisten Patienten bereits Lymphknotenmetastasen. Häufig liegt auch eine hämatogene Metastasierung in das Knochenmark vor, wobei sich Lungen- und Hirnmetastasen erst in weit fortgeschrittenen Stadien finden lassen. Mason entdeckte 1957 eine Adrenalinsekretion bei Patienten mit Neuroblastom. Heute kann als Screeningverfahren die Messung von Homovanillinsäure und Vanillinmandelsäure, die als Abbauprodukte von Adrenalin entstehen und renal eliminiert werden, herangezogen werden. Erhöhte Werte im Urin finden sich bei bis zu 90% aller Patienten mit Neuroblastom.

Jedoch ist das Screening nicht von prognostischem Wert und die heterogene Gruppe der Neuroblastome, was ihre Aggressivität betrifft, lässt sich mit diesem Verfahren nicht unterscheiden. Wichtige bildgebende Verfahren sind neben der Sonographie, die Computertomographie (CT) und die Kernspintomographie (MRT, NMR). Als weiteres

Verfahren gilt der szintigraphische Nachweise mittels Metajodbenzylguanidin, das sich im Tumorgebiet und in Metastasen anreichert (Berthold und Hero, 2000). Die endgültige Sicherung eines Neuroblastoms geschieht jedoch mittels Biopsie, anschliessender Histologie und dem immunhistochemischen Nachweis des neuronalen Ursprungs des Tumors.

1.5.2 Histologie

Die meisten Neuroblastome sind undifferenzierte Tumore, die aus kleinen, runden und basophilen Neuroblasten bestehen, die Kern-Plasma-Relation ist verschoben. Eine spezifische Färbemethode für Neuroblastome ist die für neuronspezifische Enolase (NSE). Ganglioneuroblastome werden teilweise differenzierte Tumore genannt, während man bei am meisten differenzierten Tumoren von Ganglioneuromen spricht. Diese bestehen aus einzelnen Neuronengruppen umgeben von einem dichten Schwannzellgewebe, was als Teil des Ausreifungsprozesses verstanden wird. Hierbei handelt es sich um völlig gutartige Tumore.

1.5.3 Genetische Unterschiede

DNA-Gehalt

Look et al (1984) konnten zum ersten mal zeigen, dass der Flusszytometrisch bestimmte DNA-Gehalt, der eine Aussagekraft über den Karyotyp einer Zelle zulässt und wesentlich einfacher durchzuführen ist, als eine Karyotypisierung, einen prognostischen Wert zu einem Neuroblastom bei Kindern hat. Allerdings geht diese Aussagekraft bei Patienten, die älter als 1 bis 2 Jahre sind, verloren (Look et al., 1991). Tumoren von Patienten mit niedrigerem Stadium haben oft einen hyperdiploiden oder fast triploiden Chromosomensatz. Tumoren mit einem diploiden Chromosomensatz korrelieren mit einem fortgeschrittenen Stadium, einer schlechteren Prognose und einem eingeschränkten Ansprechen auf eine zytostatische Therapie.

Tumor-Karyotyp

Die mit der Karyotypisierung mögliche Aussage über Verluste oder Zugewinne von genetischem Material an bestimmten Chromosomen, lässt eine weitere Charakterisierung des Neuroblastoms zu. So ist eine Deletion des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p LOH = *loss of heterozygosity*) eine Eigenschaft des Neuroblastoms (Brodeur et al., 1981), die sich bei rund 35% der Tumore finden lässt (zum Beispiel

White et al., 2001). Diese Veränderung findet sich bei höheren Stadien und ist häufig mit einer *MYCN*-Amplifikation assoziiert. Im Bereich der Region 1p36.2 – 36.3 werden mehrere Tumorsuppressorgene vermutet, die durch die Deletion verloren gehen (Christiansen et al., 1992; Takeda et al., 1994; White et al., 1995). Weitere LOHs finden sich in den Bereichen 3p, 4p, 9p und 9q, 11q und 14q. Der Verlust im Bereich des langen Arms des Chromosoms 11 in der Region 23 (11q23) fand sich in einer Studie mit 267 Tumoren in 43% der Fälle und ist somit die häufigste Deletion, die in Neuroblastomen gefunden werden konnte (Guo et al., 1999). Er ist korreliert mit einer Deletion im Bereich des langen Arms von Chromosom 14 (14q), aber verhält sich invers zur Deletion im Bereich 1p und der Amplifikation von *MYCN*. Eine LOH von 11q ist ein Indikator für eine verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit, jedoch nur bei Patienten ohne *MYCN*-Amplifikation. Es stellt somit einen Vorhersagefaktor für Tumoren ohne *MYCN*-Amplifikation dar. Das Auftreten der Deletion im Bereich des Chromosoms 14q ist zwar mit einem LOH des Chromosoms 11q korreliert und verhält sich invers zur *MYCN*-Amplifikation, findet sich aber weder im Zusammenhang mit anderen biologischen oder klinischen Veränderungen oder der Überlebenswahrscheinlichkeit von Neuroblastom-patienten.

Im Gegensatz zu einer Deletion konnte durch CGH-Analysen (*comparative genetic hybridization*) eine Trisomie im Bereich des langen Arms von Chromosom 17 (17q) nachgewiesen werden (Caron, 1995; Bown et al., 1999). Dieser Zugewinn von genetischem Material, der sich in mehr als der Hälfte aller Tumore nachweisen lässt, geht mit einer höheren Aggressivität der Tumore einher.

Amplifikation von *MYCN*

MYCN gehört zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die überexprimiert zu ungezieltem Zellwachstum führen, den MYC-Onkoproteinen, und ist dabei normalerweise auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p24) lokalisiert. Als Zeichen einer hohen Genamplifikation, war schon lange bekannt, dass einige Neuroblastome eine Art Mini-Chromosomen (DM = *double-minute chromatin bodies*) und HSR (*homogeneously staining regions*) beinhalten. Später konnte gezeigt werden, dass rund ein Viertel aller Neuroblastome *MYCN* amplifizieren, dass mit unterschiedlichen benachbarten Sequenzen extrachromosomal amplifiziert wird und die als DM bezeichneten Strukturen bildet. Diese DNA-Abschnitte werden schliesslich an HSR-Integrationsseiten in die chromosomale DNA reintegriert (Schwab et al., 1984; Corvi et

al., 1994). Die hohe *MYCN*-Amplifikation findet sich besonders bei Tumoren höheren Stadiums und ist signifikant für eine rasche Tumorprogression mit schlechter Prognose (Schwab et al., 1983; Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1985; s. Tabelle 1).

Stadium bei Diagnose	<i>MYCN</i>-Amplifikation	3-Jahresüberlebensrate
benigne Ganglioneurome	0%	100%
Stadium 1/2	4%	90%
Stadium 4s	8%	80%
Stadium 3/4	31%	30%
Total	22%	50%

Tabell
e 1:
Korral

Sie verändert sich auch nicht bei Fortschreiten der Erkrankung und kann als charakteristisch für den jeweiligen Tumor angesehen werden (Brodeur et al., 1987). Gilt die Amplifikation von *MYCN* als sehr genauer prognostischer Marker für das Neuroblastom, so ist dagegen die Überexpression von *MYCN* nicht zwangsläufig mit einer geringeren Überlebens-wahrscheinlichkeit korreliert (Bordow et al., 1998; Cohn et al., 2000). Und der Grund, warum eine erhöhte *MYCN*-Amplifikation mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert ist, ist weiterhin unsicher.

1.5.4 Stadieneinteilung

Die von Evans 1971 aus einer retrospektiven Studie entwickelte Stadieneinteilung erlaubte erstmalig einen allgemeinen Überblick der Krankheitsstadien des Neuroblastoms. In dieser Einteilung war bereits das Stadium IV S (Sonderstadium) enthalten. Diese Stadieneinteilung wurde 1987 von einer internationalen Gruppe zu den heute gültigen INSS-Kriterien (*international neuroblastoma staging system*) erweitert bzw. 1993 revidiert und liegt in fünf Stadien vor. Stadium I ist der vollständig operativ entfernbare Tumor. Stadium II wird in zwei Unterstadien unterteilt, wobei in Stadium 2a der Tumor nicht komplett resezierbar ist, jedoch nicht die Wirbelsäule überschreitet und sich keine positiven Lymphknoten in der Umgebung des Tumors befinden. Dagegen sind in Stadium 2b die Lymphknoten der gleichen Seite befallen. In Stadium III wird nun die Mittellinie überschritten. Stadium IV-S, das Sonderstadium, ist mit Knochenmark- und/oder Leber- und/oder Hautbefall. Dieses Stadium kommt meist bei

Säuglingen im ersten Lebensjahr vor und hat dann eine relativ gute Prognose. Stadium IV ist das Stadium der Generalisation bzw. der Metastasierung.

1.5.5 Therapie

Die Behandlung des Neuroblastoms erfolgt in der Regel im Rahmen der Behandlungsstudie für Säuglinge, Kinder und Jugendliche mit Neuroblastom (NB2004).

Im Stadium I steht die radikale Operation als kurativer Ansatz im Vordergrund. In den Stadien II-IV wird eine stadienabhängige zytostatische Behandlung durchgeführt. Die Prognose ist ungünstig, wenn die Kinder älter als 1 Jahr sind. Ältere Kinder erhalten deshalb eine intensivere Chemotherapie. Bei den angewandten Zytostatika handelt es sich um Cisplatin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Etoposid und Vincristin. Das Neuroblastom ist grundsätzlich radiosensibel, weshalb in den höheren Stadien III und IV eine Radiotherapie angewendet werden kann, was allerdings meist unter palliativen Gesichtspunkten geschieht.

Wurde bei disseminierten Erkrankungen durch Zytostatika eine Remission erreicht, so ist evtl. eine Knochenmark- oder Stammzellretransplantation durchzuführen.

1.5.6 Prognose

Wichtige Kriterien für eine Prognose zum Überleben der Neuroblastompatienten sind neben dem Tumorstadium, das Patientenalter und der *MYCN*-Amplifikationstatus. Die Prognose von Säuglingen ist mit einer dauerhaften Heilung von 80% wesentlich besser, als bei Kindern über 12 Monaten. Bei Säuglingen liegt häufiger ein günstigeres Stadium (Stadium I oder IVs) vor, wobei auch die *MYCN*-Amplifikation geringer ist. Insgesamt liegt die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) in der BRD im Stadium I bei 99% gegenüber 93% im Stadium II. Im Stadium III liegt sie bei 80%, sinkt im Stadium IV auf 31% ab und liegt bei Kindern über 1 Jahr bei weniger als 20%. Die 5-JÜR für das Stadium IVs liegt für alle Patienten bei 77%. Eine *MYCN*-Amplifikation findet sich in rund einem viertel aller Neuroblastome (s.Tafel 1) und ist mit einer raschen Tumorprogression und schlechter Prognose vergesellschaftet (Schwab et al., 1983; Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1985).

1.6 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Der Transkriptionsfaktor E2F-1 bzw. die Mitglieder der E2F-Familie regulieren den Übergang von Zellen in die S-Phase und Apoptose. Viele Gene, zum Beispiel solche, die für die Synthese von DNA in der S-Phase benötigt werden, werden von E2F in allen teilenden Zellen aktiviert. Einzelne Beobachtungen der letzten Jahre zeigen aber, dass es darüberhinaus Gene gibt, die nur in bestimmten Zelltypen, also in gewebespezifischer Weise, von E2F reguliert werden.

So konnten Strieder und Lutz zeigen, dass die E2F-Transkriptionfaktoren im humanen Neuroblastom die Regulation des Onkogens *MYCN* beeinflussen. Das *MYCN*, das während der Embryonalentwicklung fast ubiquitär transkribiert wird, ist nach der Geburt in fast keinem proliferierenden Zelltyp mehr exprimiert, obwohl in diesen Zellen E2F-1 aktiv ist. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche weiteren neuroblastomspezifischen Gene durch den Transkriptionsfaktor E2F-1 aktiviert werden. Im Neuroblastom ist *MYCN* ein wichtiger Parameter zur Bestimmung von Aggressivität und Prognose des Tumors.

In verschiedenen Mausmodellen MYC-induzierter Tumorigenese zeigte sich, dass ein kontinuierlicher Einfluss des Onkoproteins für das Tumorwachstum von grundlegender Bedeutung ist und die Repression des *MYCN*-Gens zur Tumorregression führt. (Pellengaris et al., 1999 ; Felsher und Bishop, 1999). Aufgrund dieser Eigenschaften und wegen der eingeschränkten Expression von *MYCN* nach der Geburt ist eine systematische Blockierung der *MYCN*-Expression ein vielversprechender Ansatz für eine Tumorthherapie mit nur geringem Nebenwirkungspotenzial. Allerdings ist zurzeit nur wenig über die Regulation dieses Onkogens bekannt. Deswegen sollte in einem zweiten Teil dieser Arbeit untersucht werden, welche Transkriptionsfaktoren, neben dem bekannten E2F-1, an der Regulation von *MYCN* in humanen Neuroblastomen beteiligt sind.

2 Materialien

2.1 Materialien für die Zellkultur

Zellkulturschalen (Nunc Brand Products); 6cm, 10cm, 15cm Schalen

Vollmedium	RPMI 1640 (Biowhittaker) 10% FCS (Fötale Kälberserum, Sigma), wärmeinaktiviert (30min, 56°C) 1% Penicillin/Streptomycin(Biowhittaker), (Stock: 10.000 u/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin
------------	--

Hungermedium	s. Vollmedium, aber 0,1% FCS
--------------	------------------------------

Trypsin/EDTA <u>EDTA</u> (Biowhittaker)	<u>1x Trypsin-EDTA</u>	<u>1x Trypsin-</u>
	89% kaltes 1x TBS 10% 10x Trypsin 1% 0,5 M steriles EDTA	

PBS, pH 7,4	137nM NaCl 3mM KCl 6,4mM Na ₂ HPO ₄ 1,5mM KH ₂ PO ₄
-------------	--

Hormon

4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT)	Stock: 10mM in EtOH
-----------------------------	---------------------

Endkonzentration: 200nM

Selektionsantibiotika

G-418

Stock: 200mg/ml

Endkonzentration : 200µg/ml

2.1.1 Zelllinien

SHEP-1A3

Zellklon 1A3, der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SHEP, der ein durch 4-Hydroxy-Tamoxifen regulierbares E2F-1-ER-Konstrukt (G-418-Resistenz; V. Strieder et al, 2002) exprimiert.

IMR-32

Humane Neuroblastomzelllinie mit *MYCN*-Amplifikation.

2.2 Materialien für die Molekularbiologie

Beim verwendeten H₂O handelt es sich, wenn nicht anders erwähnt, um 18megohm/cm³ Millipore[®]-Wasser.

2.2.1 RNA-Isolierung

TRIzol[®]-Reagent (Invitrogen)

Chloroform

2.2.2 DNase-Verdau nach RNA-Isolierung

DNase (Promega) (RQ1RNase-frei) (1U/µl)

10x DNase-Puffer (Promega)

Roti-Phenol für DNA/RNA-Isolierung

3M NaAcetat, pH 5 in DEPC-H₂O

DEPC-H₂O

2.2.5 Bakterienstämme

XL1-Blue lac	E.coli recAI end AI gyrA96 thi-I hsdR17 supE44 relAI [F'proAB lacI ^q ZM15 Tn10 (Tet ^r)] ^c
DH5α	E.coli F'/end A1 hsd R17 (r _k ⁻ m _k ⁺) g In V44 thi-1 rec A1gyrA (Nal ^r)relA1Δ (lacIZYA-argF)U169deoR(φ80dlac Δ(lacZ)M15)

2.2.6 DNA-Vektoren

pGL3-Basic Vector	Vektor (Promega); EMBL Accession Number: U47295
-------------------	---

2.2.7 Medium für die Bakterienkultur

LB- Medium (Luria-Bertani)	50g Trypto-Peptide (Becton Dickinson) 25g Hefe-Extrakt (Becton Dickinson) 50g NaCl auf 5 Liter mit destilliertem Wasser auffüllen autoklavieren; im Kühlraum lagern
LB-Agar	400ml LB-Medium 6g bakteriologischer Agar (Becton Dickinson) autoklavieren; im Kühlraum lagern
LB-Agar-Platten	
Ampicillin	Stock: 1mg/ml; Endkonzentration: 1μg/ml

2.2.7 Medium für die Bakterienkultur

Restriktionsendonukleasen	Amersham Biosciences, Freiburg
mit zugehörigem 10x Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
	New England Biolabs, Frankfurt
	Stock: 10u/µl; eine Einheit schneidet 1µg DNA.

2.2.9 Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräp)

STET-Puffer	8% Sucrose (Saccharose)
	50mM EDTA
	50mM Tris, pH 8,0
	mit dH ₂ O auffüllen, autoklavieren
	0,5% Triton-X hinzugeben

Lysozym	0,5mg/ml (Stock: 50mg/ml)
---------	---------------------------

Isopropanol,
70% (v/v) Ethanol

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

RNase A	0,5µg/µl (Stock:10mg/ml) (Roche)
---------	----------------------------------

2.2.10 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi-Präp)

Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen-tip 500 (Qiagen, Hilden)
	Puffer A
	Puffer EB

2.2.11 c-DNA Synthese mit Random Primern

DEPC-H₂O

Superscriptpuffer (5x first strand buffer)

dNTPs

RNasin (Promega)

Reverse Transkriptase Superscript II

2.2.12 Oligodeoxynucleotide

Alle verwendeten Oligodeoxynucleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bzw. Thermo BioSciences (Ulm) erworben.

Primer

Stock: 10µM (0,4µM)

Endkonzentration)

BMI1 fwd (24-mer)

5'- ACA TAA GCA TTG GGC CAT AGT TTG -'3

BMI1 rev (23-mer)

5'- TAC CCG CTT TTA GGC ATA CAG AT-'3

Caspase3new fwd (23-mer)

5'- CTG AGC CAT GGT GAA GAA GGA AT -'3

Caspase3new rev (24-mer)

5'- CAT GGC ACA AAG CGA CTG GAT -'3

Caspase7 fwd (21-mer)

5'- TTC CGA AGC CTG GGT TTT GAC -'3

Caspase7 rev (23-mer)

5'- AAG CCT GAA TGA AGA AGA GTT TG -'3

CyclinE fwd (20-mer)

5'- AGA CGG GGA GCT CAA AAC TG -'3

CyclinE rev (22-mer)

5'- CGG CCC GCT GCT CTG CTT CTT A -'3

DYRK2 fwd (21-mer)

5'- CGC CGC CTA CCC GAC CGA TTG G -'3

DYRK2 rev (24-mer)

5'- GGT GGA GCT CCC CTG CCG TCT ATG -'3

EED 15 fwd (21-mer)

5'- TGC GCC GGC GGG AAC AGA CAT -'3

EED13 rev (24-mer)

5'- TTT CCC TTT CCC CAA CTT TTC CTT -'3

EZH 15 fwd (24-mer)

5'- ACG GGG ATA GAG AAT GTG GGT TTA -'3

EZH 13 rev (24-mer)

5'- AGG TGG GCG GCT TTC TTT ATC ATC -'3

S14 fwd (22-mer)

5'- GGC AGA CCG AGA TGA ATC CTC A -'3

S14 REV (21-mer)

5'- CAG GTC CAG GGG TCT TGG TCC -'3

TACC1 fwd (18-mer)

5'- GAA CTC CCC ACC CCT CTC -'3

TACC1 rev (19-mer)

5'- AGC ATG GCC ATC CCT ATT A -'3

Für Chromatin-Immunpräzipitations-Assays:

bmichip54 fwd (20-mer)

5'- CCG AGG CGC CGG AGC AGG AG -'3

bmichip34 rev (24-mer)

5'- CGA AGC GGG CGG AAA AGA CAA TGA-'3

Für PCR zur Herstellung der Affinitätsäulen zur Aufreinigung von Transkriptionsfaktoren des *MYCN*-Gens:

bioNM4 fwd (24-mer; am 3'-Ende biotinylierter Primer)

5'- GCT TCC CAG CTT TGC AGC CTT CTC -'3

NM4 fwd (24-mer)

5'- GCT TCC CAG CTT TGC AGC CTT CTC -'3

NM63 rev (23-mer)

5'- GAC TGT CAC AGC CTG CGC TTT GA -'3

(Die Primer NM4fwd und NM63 rev ergeben ein Produkt von 225 bp Länge innerhalb der *MYCN*-Promotorsequenz)

controlNM4 fwd (46-mer)

5'- GCT TCC CAG CTT TGC AGC CTT CTC CGC ATT CAT GGG CCT CTT CCT A -'3

controlNM63 rev (43-mer)

5'- GAC TGT CAC AGC CTG CGC TTT GAA TCG CCC CCA CCT CTT CAC C -'3

(Die Primer controlNM4 fwd und controlNM63 rev ergeben ein Produkt von 168 bp Länge, das sich 1,4 kb vor dem *MYCN*-Promotor befindet)

Für PCR zur Herstellung einer Punktmutation

WT1-mutant #1 (38-mer)

5'- CCT CTC CTT TCT AGA GCC CCC TTG TCT GCG CCA CAG CC -'3

WT1-mutant #2 (38-mer)

5'- GG CTG TGG CGC AGA CAA GGG GGC TCT AGA AAG GAG AGG -'3

2.2.13 PCR

Enzyme

Red Taq-Polymerase 1u/μl (1,5u/30μl Reaktionsansatz)

10x Reaktionspuffer

Pfu Turbo-Polymerase (Stratagene) 2,5u/μl (1,25u/ 30μl Reaktionsansatz)

10x Reaktionspuffer

2.2.14 Real-Time

qPCR™ Core Kit for Sybr™ Green I (Eurogentec, Belgien)	10x Reaction Puffer 50mM MgCl ₂ -Lösung 5mM dNTP-Lösung Hot GoldStar Enzym 0.025 U/μl Sybr™ Green I (Eurogentec, Belgien) 3`/5` - Primer je 10pmol/μl H ₂ O
PCR-Reaktionsröhrchen und optische Deckel	

ABI Prism® 7000	Cycler und Software
-----------------	---------------------

2.2.15 Materialien für die Micro-Array Analyse

CyScribe cDNA Post Labeling Kit RPN5660 (Amersham Biosciences)	5x CyScript puffer 0.1M DTT 20x dNTP Mix aa-dUTP CyScript reverse Transkriptase
--	---

QIAquick Säulen (Quiagen)

2.5M NaOH

HEPES

0.1M NaHCO₃ pH 9

4M Hydroxylamin

20x SSC

SDS

1% BSA

Glas-cDNA-Chips

Abdeckplättchen

Scanner
Software

2.3 Materialien für die Biochemie

2.3.1 Lysepuffer für die Herstellung von Kernextrakten

Zellysepuffer 10mM HEPES-KOH pH 7.9
 10mM KCl
 1.5mM MgCl₂
 0.5mM DTT
 0.5% NP-40 (=IGEPAL CA-630) (Sigma, St. Louis)
 Proteaseinhibitor

Kernlysepuffer 20mM HEPES-KOH pH 7.4
 400mM NaCl
 1mM MgCl₂
 10µM ZnCl₂
 0.5mM DTT
 0.2mM EDTA
 15% Glyzerol (Roth, Karlsruhe)
 Proteaseinhibitor

Proteaseinhibitoren 80µM Aprotinin
 (PI-Cocktail) 2mM Leupeptin
 1,5mM Pepstatin A
 4mM Bestatin
 104mM AEBSF
 1,4mM E-64
 in DMSO, -20°C

Der Proteinaseinhibitorcocktail wird 1:1000 in Lysepuffer verdünnt eingesetzt.

2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Reagenz	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 4,75% (v/v) Ethanol Inkubation ü.N. lichtgeschützt 10% (v/v) Ortho-Phosphorsäure in dH ₂ O filtrieren; lichtgeschützt lagern
Referenz-Stocklösung	BSA (Albumin Fraktion V, pH 7,0; AppliChem) 1mg/ml in Lysepuffer
Sonstiges	150mM Natriumchlorid-Lösung

2.3.3 Materialien für die DNA-Affinitätsaufreinigung

<u>Bindepuffer (BB)</u>	20mM Hepes-KOH pH 7.4 125mM KCl 1mM MgCl ₂ 0.5mM DTT 0.2mM EDTA 10µM ZnCl ₂ 5% Glycerol Proteaseinhibitor (1:1000)
<u>Dilutions Puffer (DB)</u>	20mM Hepes-KOH pH 7.4 1mM MgCl ₂ 10µM ZnCl ₂ 0.5mM DTT 0.2mM EDTA 0.3% NP-40 (=IGEPAL CA-630) (Sigma,St.Louis) Proteaseinhibitor
Sepharose Beads	(Amersham Biosciences)

Ziegeneserum	(Sigma, St.Louis)
Lachssperma-DNA	(Sigma, St.Louis)

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4x Sammelgelpuffer	0,5M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
4x Trenngelpuffer	1,5M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS 8mM EDTA
Laufpuffer pH 8,3	25mM Tris 0,2M Glycin 0,1% (w/v) SDS
Acrylamidstammlösung	30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in H ₂ O 2% lineares Polyacrylamid in H ₂ O
4x SDS Probenpuffer	1x Sammelgelpuffer 3% SDS 3% β-Mercaptoethanol 20% Glycerol 0,02% Bromphenolblau
APS	Ammoniumpersulfat 10% (w/v) in H ₂ O, 4°C; lichtgeschützt lagern
TEMED	Tetramethylethyldiamin, 4°C; lichtgeschützt lagern
Isopropanol	100%

Molekulargewichtsmarker Full Range Rainbowmarker RPN 800 (Amersham)

2.3.5 Reagenzien für Western-Blot-Analyse

1x Blotpuffer	10% (v/v) Methanol 20mM Tris-base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) 150mM Glycin dH ₂ O
20x TBS, pH 7,4 (37% HCl)	1M Tris/HCl 3M NaCl
Waschpuffer TBS-T, pH 7,4	20% (v/v) 20x TBS, pH 7,4 0,2% Tween-20
Blocklösung	5% (w/v) Magermilchpulver, 1x TBS-Puffer
Methanol	100% (zur Behandlung der PVDF-Membran)
PVDF-Membran	Immobilon-P, Transfer Membran (Millipore)
Entwicklerlösungen (Amersham)	ECL Western-Blot Detektionsreagenzien 1 und 2 ECL Western-Blot Detektionssystem Lösung A und B
Film	ECL Hyperfilm (Amersham)
<u>Antikörper</u>	
1. E2F-1 AB 227	im Western-Blot 1:1000 verdünnt eingesetzt
2. N-Myc AB 167	im Western-Blot 1:2000 verdünnt eingesetzt
3. α-Maus AB 8	"Horseradish peroxidase conjugated anti-mouse-antibody" Meerrettich Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG

- Antikörper (Amersham)
im Western-Blot 1:3000 verdünnt eingesetzt
4. α -Kaninchen AB 9 "Horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit-antibody"
Meerrettich Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen-
IgG-Antikörper (Amersham)
im Western-Blot 1:3000 verdünnt eingesetzt

2.3.6 Materialien für die Silberfärbung

- | | |
|---------------------------|-------------------|
| SilverQuest TM | Sensitizer |
| Silver Staining Kit | Staining Lösung |
| (Invitrogen) | Entwickler Lösung |
| | Ethanol 30%/100% |
| | H ₂ O |

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Bei den verwendeten Zelllinien, Shep-1A3 und IMR-32, handelt es sich um adhärenz Zellen. Shep-1A3 wurden im Vollmedium RPMI1640, 10% FCS (v/v), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v), G418 (200µg/µl) kultiviert. IMR-32 wurden im Vollmedium RPMI1640, 10% FCS (v/v), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) kultiviert.

Für Zeitkursexperimente (s. 3.1.3) wurden Shep-1A3 in 0% FCS Hungermedium kultiviert. Die Zellen wurden in einem Heraeus-Brutschrank (B5060 EC-CO₂) bei 37°C, 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. Die Zellkulturarbeit wurde an einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus Instruments Sterile Hood) durchgeführt.

3.1.2 Passagieren von Zellen

Zellen mussten abhängig von ihrer Wachstumsrate alle 3 bis 4 Tage 1:10 bis 1:20 verdünnt und neu ausplattiert werden (Passagieren), um einen Wachstumsstopp durch Kontaktinhibition zu vermeiden und um die Zellen mit neuen Nährstoffen zu versorgen. Die Zellen mussten zum Passagieren von der Zellkulturschale durch Behandlung mit Trypsin-EDTA (Proteaseaktivität) abgelöst werden. Hierzu wurde der Zellüberstand abgesaugt, die Zellen mit 200 bis 500µl Trypsin-EDTA inkubiert, bis sie sich vollständig von der Zellkulturschale abgelöst hatten. Sie wurden anschließend in frischem Medium resuspendiert und auf neue mit Medium gefüllte Kulturschalen in der gewünschten Zelldichte ausplattiert. Vorhandenes Trypsin wurde durch den im Serum enthaltenen Trypsininhibitor inaktiviert.

3.1.3 Induktion von E2F-1 durch das E2F-1-ER-System

Zur Induktion des E2F-1-ER-Systems in 1A3-Shep Neuroblastomzellen wurden diese bei einer Konfluenz von ca. 80% mit 200nM 4-Hydroxytamoxifen für 0 (Kontrolle), 1, 4, 8 und 12 Stunden behandelt (37°C, 5% CO₂), was zu einer gezielten Aktivierung von E2F-1 im E2F-1-ER-Fusionsprotein führte. Anschließend wurden die Zellen geerntet, die RNA nach dem TRIzol[®]-Protokoll (s.3.2.1) aufgereinigt und unter Anwendung der RT-PCR (s.3.2.10) im Real-Time-Verfahren auf die Expression von *ZyklusE* (*CCNE1*) hin getestet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolierung mit dem TRIzol®-Reagenz

Das Zellpellet wurde in 1ml Trizol-Reagenz resuspendiert. Nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden zur Phasentrennung 0,2VT Chloroform zur Zellsuspension hinzugegeben, gevortext und nach 3min Inkubation bei RT für 15min bei 10.000rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, in der sich die RNA befand, entsprach 60% des anfänglich eingesetzten Trizol-Reagenz-Volumens und wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß transferiert. Die RNA wurde mit 0,5VT Isopropanol gefällt und mit 1VT 75% (v/v) Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 30µl **DEPC-H₂O** aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Photometer bei einer Absorption von 260nm, die RNA dann in 1:10 NaAcetat und 2½VT EtOH100% bei -80°C gelagert.

3.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde die Absorption bei 260nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1cm) bestimmt. Eine Absorptionseinheit entspricht hier 50µg/ml DNA. Durch Messung bei 280nm und der Bestimmung des Quotienten A_{260}/A_{280} kann die Reinheit einer DNA-Präparation abgeschätzt werden. Eine ausreichend reine Präparation sollte einen Quotienten A_{260}/A_{280} von $1,8 \pm 0,2$ aufweisen.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte ebenfalls bei einer Absorption von 260nm. Eine Absorptionseinheit entspricht hier 40µg/ml DNA.

3.2.3 DNase-Verdau nach RNA-Extraktion

Um Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, erfolgte im Anschluss an die RNA-Isolierung ein DNase-Verdau. Hierzu wurde das RNA-Pellet in 100µl DEPC-H₂O aufgenommen, 1µl (1/100VT) DNase und 10µl DNase-Puffer hinzugefügt und für 15min bei 37°C inkubiert. Um die RNA nun von DNase und Puffer zu reinigen, wurde anschließend eine Phenolfällung durchgeführt: Der RNA wurden 1/2VT Roti-Phenol für DNA/RNA-Isolierung und 1/2VT Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben. Das Gemisch wurde für 10sec gevortext (Homogenisieren), zur Phasentrennung für 5min auf Eis inkubiert und weitere 5min bei 14.000rpm bei 4°C zentrifugiert. Die sich in der oberen wässrigen Phase befindende RNA wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und in 1/10VT 3M NaAcetat, pH 5,0 (RNase-frei) und 2½VT

Ethanol 100% gefällt, hierzu für 5min auf Eis inkubiert und anschließend für 10min bei 14.000rpm und 4°C abzentrifugiert.

Anschließend wurde das RNA-Pellet in 1ml 75% Ethanol gewaschen, nach kurzem Abzentrifugieren für 5min luftgetrocknet und in 50-100µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am Photometer bei einer Absorption von 260nm.

3.2.4 Erzeugung einer Punktmutation

Das hier verwendete QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit diente zur Herstellung einer Punktmutation in einem bereits vorhandenen Plasmid-Konstrukt. Mittels der die Punktmutation enthaltenden Primern und der Pfu™ Turbo-DNA-Polymerase wurde die Mutation in das Konstrukt eingesetzt. Die Primer mussten dem Protokoll zufolge bestimmten Eigenschaften genügen; die Schmelztemperatur (T_M) musste ≥ 78 °C entsprechen (Berechnung: $T_M = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ Mutation}$; N entspricht der Primerlänge = 38mer) T_M WT1-mutant = 79,1 °C. Und der Prozentgehalt an GC bp musste mind. 40% sein; GC% WT1-mutant = 63%. Das sogewonnene Plasmidkonstrukt wurde in einer Minipräp (3.2.8) vervielfältigt und mit Restriktionsenzymen (3.2.5) überprüft.

Der Ansatz wurde aus 5µl 10x Reaktions-Puffer, 20ng dsDNA, je 125ng Primer1/Primer2, 1µl dNTP-Mix und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 30µl aufgefüllt. Zykluszeiten und deren Anzahl waren abhängig von der Länge der dsDNA und der Anzahl der Punktmutationen.

3.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Der Agarosegehalt der Gele lag bei 1% (w/v). Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgeköcht und nach Abkühlung auf 65°C zusammen mit Ethidiumbromid in die entsprechenden horizontalen Gelbetten gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele zur Dokumentation unter UV-Licht (320nm) photographiert.

3.2.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

3.2.6.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsfragmente wurden die gewünschten DNA-Banden unter langwelligem UV-Licht aus den Agarosegelen

geschnitten und extrahiert. Die Agarose wurde dazu grob zerkleinert und die DNA mit dem QIAquick Purification Kit isoliert: Die Agarose wurde mit Puffer QG (3VT Puffer QG auf 1VT Gel) für 10min bei 50°C inkubiert und hierbei geschmolzen. Die Suspension wurde auf eine Säule gegeben und für 1min bei 13.000rpm in einer Heraeus-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Hierbei band nur die DNA an die Säule, das Eluat wurde verworfen. Die Säule wurde mit 0,75ml Puffer PE gewaschen und 2-mal hintereinander für 1min bei 13.000rpm abzentrifugiert, um das in dem Puffer PE enthaltene Ethanol von der DNA zu entfernen. Die DNA wurde zuletzt in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß mit 30-50µl Puffer EB eluiert.

3.2.6.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten direkt nach Verdau bzw. nach Amplifikation

Alternativ wurden PCR-Produkte mit dem QIAquick-Extraktionskit aufgereinigt. Anstelle von Puffer QG wurde das Fragment mit 5 VT Puffer PB auf eine Säule gegeben. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 3.2.6.1 beschrieben. Auf diese Weise wurden auch PCR-Produkte vor dem Verdau mit Restriktionsenzymen aufgereinigt.

3.2.7 Restriktionsverdau von dsDNA

Restriktionansätze wurden für 60-90 min bei 37°C inkubiert und enthielten neben der benötigten Menge an Restriktionsenzymen (ca.1U/µg DNA) den vom Hersteller empfohlenen Puffer. Das zugesetzte Volumen Restriktionsenzym darf 1/10 des angesetzten Totalvolumens nicht überschreiten, da im Lagerungspuffer vorhandenes Glycerin die enzymatische Aktivität inhibiert. Die Produkte aller Restriktionsverdaue wurden stets auf Agarosegelen analysiert.

3.2.8 Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräp)

1ml einer Übernachtskultur von transformierten E. coli wurde für 1min bei 7.000rpm und RT in einer Heraeus-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 110µl STET-Puffer mit Lysozym (0,5mg/ml) aufgenommen, resuspendiert und für 5min bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension für 1min bei 95°C inkubiert und anschließend für 15min bei 13.000rpm und 4°C in einer Heraeus-Tischkühlzentrifuge abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA befand sich im Überstand. Das Pellet wurde entfernt, der Überstand mit 110µl Isopropanol versetzt und erneut für 15min bei 13.000rpm und

4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.9 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi-Präp)

Um größere Mengen eines Plasmides zu erhalten, wurden 400ml einer E. coli-Übernachtskultur gemäß den Angaben des Herstellers (Qiagen) für den DNA-Maxikit verarbeitet. Die Konzentration der DNA wurde nach photometrischer Bestimmung auf 1µg/µl eingestellt, die DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.10 RT-PCR

Die Methode der RT-PCR diente der Amplifikation von RNA. Für die Amplifikation war es notwendig, die RNA zunächst in DNA umzuschreiben, da die Ausgangs-RNA nicht direkt als Matrize von der Taq-Polymerase genutzt werden kann. Mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RTase) wurde von der RNA ein komplementärer DNA-Strang gebildet. Diese cDNA wurde dann in einem weiteren Schritt in einer normalen PCR amplifiziert.

Protokoll für die c-DNA Synthese mit SuperscriptII:

1µg RNA wurden in xµl RNase-freiem Wasser, 1µl Random Primer() und 1µl dNTPs (10mM) auf ein Gesamtvolumen von 12µl aufgefüllt.

Nach 5min Inkubation bei 65°C wurde das Gemisch auf Eis schnell abgekühlt und danach kurz runterzentrifugiert.

Dann wurden 4µl 5xFirst-Strand Buffer, 2µl (0.1m) DTT, 1µl RNase-Inhibitor und 1µl SUPERScript II hinzugegeben und 10min bei RT, 50min bei 42°C und 15min bei 70°C inkubiert.

3.2.11 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit definierten Eigenschaften, wie z.B. dem Anfügen bestimmter Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme oder von Biotin mit Hilfe biotinylierter Primer eingesetzt.

Das Prinzip beruht darauf, dass eine spezielle hitzebeständige DNA-Polymerase durch an spezifischen Stellen angelagerte Oligonukleotide (Primer) vorgegebene DNA-Abschnitte mit Hilfe der in dem Reaktionsgemisch beigefügten vier Desoxynukleosid-Triphosphate exponentiell amplifiziert.

Der PCR-Ansatz - bestehend aus 1µl DNA, 5µl 10x Puffer, 1µl dNTPs(10mM), 1µl 3' und 5'Primermix (je 10pmol/l), 1µl Red Taq-Polymerase und 41µl dH₂O (als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Matrizen-DNA) wurde hierzu zunächst für 5min auf 95°C erhitzt, um die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge zu zerlegen. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 50-60°C. Die Reaktionszeit hierfür richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA (Reaktionszeit der Polymerase ca. 1kb pro min). Die Reaktion der Polymerase erfolgte für 45s bei 72°C. Dieser Zyklus aus Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer und Reaktion der DNA-Polymerase wiederholte sich je nach eingesetzter DNA-Menge zwischen 30- und 38-mal. Nach Abschluß der Zyklen wurden die Proben für weitere 5 min bei 72°C inkubiert, um unvollständig synthetisierte Fragmente zu komplettieren.

3.2.12 Quantitative-Real-Time-PCR

Zusätzlich zur Standard-PCR wurden cDNAs im Real-Time Verfahren amplifiziert und gleichzeitig mit Hilfe eines Computerprogramms ausgewertet.

Je 1µl cDNA wurden dabei mit den Reagenzien des qPCR™Core Kit, bestehend aus einem Mastermix mit jeweils 2,5µl 10xReaction Buffer, 1,75µl MgCl₂ (50mM), 1µl dNTP (5mM), 0,5µl 3' und 5'Primermix (je 10pmol/l), 0,125µl Hot Goldstar Enzyme, 18µl H₂O gemischt und im ABI Prism® 7000-Cycler amplifiziert. Dabei wurde der Ansatz für 10 min auf 95°C erhitzt, anschliessend folgten 40 Zyklen bestehend aus 15 s bei 95°C und 1 min bei 60°C. Der Ansatz wurde anschliessend bei 25°C gelagert.

Der Unterschied zur Standard-PCR besteht darin, dass die Menge an dsDNA im Reaktionsansatz mittels einer Wolfram-Halogenlampe und einer CCD-Kamera, mit Hilfe von SYBR™GREEN I, einem Farbstoff, der unspezifisch an dsDNA bindet und gebunden stärker fluoresziert als im ungebundenen Zustand, gemessen und im Computer in Daten umgerechnet werden kann. Es handelt sich um eine relative Quantifizierung, die durch den Ct-Wert (cycle threshold) ausgedrückt wird. Der Ct-Wert ist der Zyklus, bei dem die Fluoreszenzintensität einen arbiträren Threshold übersteigt.

Ct ergibt sich aus der Formel:

$$X_n = X_m(1 + E_X)^{n-m}$$

X_n = Anzahl der Zielmoleküle in Zyklus n ($n \leq m$)

X_m = Anzahl der Zielmoleküle in Zyklus m

E_X = Effizienz der Amplifikation (0-1)

$n-m$ = Abgelaufene Zyklen zwischen Zyklus n und m

3.2.13 cDNA-Hybridisierung von DNA-CHIPs (Microarray-Analyse)

Durch Auftragen von cDNA-Proben auf einen Glasobjektträger in Tropfen von 10-100nl durch einen Druck-Roboter in langen Reihen entstehen sog. DNA-Chips, die durch mit Farbstoffen bestückte cDNA hybridisiert und anschliessend mit einem Laser gescannt werden.

Dabei wurden 50µg Total-RNA (s. 3.2.1) mit dem CyScribe cDNA Post labelling Kit RPN5660 erst in cDNA transkribiert und mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert, was nicht unter direktem Lichteinfluss geschehen darf, da sonst die Farbstoffe schnell zerfallen. Die cDNA-Synthese erfolgte analog zu 3.2.10 mit mitgelieferten Reagenzien, wurde mit QIAquick Säulen des PCR-Purification-Kit aufgereinigt und in der Speedvac auf insg. 15µl je Probe ankonzentriert. Die in je 15µl NaHCO_3 (0.1M) pH 9 gelösten Farbstoffe wurden mit der cDNA 1hr bei RT inkubiert und nach weiteren 15 min Inkubation mit 15µl Hydroxylamin (4M) erneut über die QIAquick Säulen aufgereinigt (s.o.), mit 20µl Cot1 (1mg/ml) und 4µl PolyA (5µg/µl) vermischt und in der SpeedVac auf 26µl ankonzentriert. Nachdem 10µl 20xSSC und 4µl SDS 2% hinzugefügt wurden, wurden die Proben erst 30 s auf 65°C, dann 2 min auf 95°C erhitzt und dann auf 55°C gelagert bis sie auf die Glas-Chips aufgetragen wurden.

Die mit cDNA bedruckten Glaschips wurden für 30 min bei 55°C mit Blocking-Reagenz inkubiert und nachdem sie in H_2O 3 min gewaschen und in einer Hereaus Zentrifuge getrocknet waren mit der markierten cDNA ü.N. bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die hybridisierten Chips mit H_2O , 0,1x SSC und SDS 0,1% in mehreren Schritten gewaschen, getrocknet und mit einem GMS 418 Fluoreszenz-Scanner gescannt. Die weitere Auswertung erfolgte mit der ImaGene 3.0 Software und die so erhaltenen Daten wurden im Institut für Biometrie und Statistik der Universität Marburg weiter analysiert und ausgewertet.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Kernextrakt aus kultivierten Zellen

Zur Proteinextraktion wurden die Zellen wie folgt geerntet:

Die Zellkulturschalen wurden auf Eis gelagert, um Proteindegradation durch Proteinase zu vermeiden. Der Zellüberstand wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, anschliessend durch mechanisches Entfernen von der Unterlage mit Hilfe eines Zellschabers in Suspension gebracht und in 1ml 1xPBS aufgenommen. Die Zellsuspensionen von 3x 15cm Kulturschalen wurde in ein 15ml Falcon®-Röhrchen überführt und nach Abzentrifugation in einer Heraeus-Kühlzentrifuge auf Eis gelagert und direkt aufgearbeitet.

Das Zellpellet (Herstellung s.3.3.1.1) wurde in 1ml 1x PBS resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionstube überführt und für 1 min bei 4000 rpm bei 4°C in einer Eppendorf Tischkühlzentrifuge zentrifugiert. Dann wurden die Zellen mit 1ml Zellysepuffer lysiert und für 10 min auf Eis gestellt. Zur weiteren Zellyse wurden die Zellen mittels eines 5ml Douncers 15x gedounct und in einem neuen 1,5ml Reaktionstube für 3 min bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (zytoplasmatisches Extrakt) wurde verworfen und das Kernpellet wurde in 180µl Kernpuffer resuspendiert. Die Suspension rotierte für 20 min auf einem Drehschüttler im Kühlraum bei 8°C und wurde dann für 7 min bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Kernextrakt) wurde in ein neues Reaktionsröhrchen überführt, vermessen (s.3.2.2) anschliessend schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Zellysat wurde die von Bradford (1976) beschriebene Methode verwendet. Jeweils 4µl Zellysat wurden zu 196µl dH₂O gegeben und mit 800µl Bradford-Lösung in Einmalplastikküvetten gemischt. Anschliessend wurde die Extinktion im Photometer bei 595nm bestimmt. Die Proteinkonzentration im Zellysat wurde durch Vergleich mit einer Eichgeraden, die jeweils neu mit Hilfe einer BSA-Lösung bekannter Konzentration aufgenommen wurde, bestimmt. Die Extinktionszunahme war der Zunahme der Proteinkonzentration annähernd proportional.

3.3.3 DNA-Affinitätsaufreinigung von Kernproteinen im analytischen Maßstab

Die Aufreinigung von Kernextrakt (KE; Herstellung s.3.3.1) erfolgte mittels an Streptavidin-Agarose gekoppelter biotinylierter DNA, die durch Standard-PCR mit Primern amplifiziert wurde. Unter bestimmten Pufferbedingungen wurden 100µl Sepharose-Beads mit 10% Ziegen Serum ü.N. im Überkopfschüttler bei 4°C geblockt und dann mit BB-Puffer gewaschen. Als nächstes folgte die Bindung von 2µl des PCR-Produkts an die Sepharose-Beads, die für 1 h bei 4°C inkubiert wurden. Um die DNA-Bindeeffizienz zu überprüfen, wurden entsprechend 100ng DNA Überstand entnommen und mit 100ng PCR-Produkt auf einem Agarosegel verglichen. Die Sepharose-Beads wurden erneut mit BB-Puffer gewaschen und für die spätere Aufreinigung auf Eis gelagert.

Der vorsichtig aufgetaute KE wurde nun mit 50µl geblockter Sepharose pro 1 mg KE für 4 h bei 4°C im Überkopfschüttler vorgereinigt, um unspezifisch an die Beads bindende Proteine zu entfernen. Die Beads wurden entfernt und entsprechend 100µg des KE als Input für einen späteren Western-Blot (s. 3.3.5) aufbewahrt. Der vorgereinigte KE wurde mit 8µl geschertem Lachssperma (10µg/µl), geblockten Sepharose-Beads und BB-Puffer ü.N. bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert.

Nach mehreren Waschschritten mit BB-Puffer wurden die aufgereinigten Proteine durch Erhitzen auf 95°C für 1 min von den Sepharose-Beads in 3x SDS-Ladepuffer eluiert und anschließend im SDS-PAGE analysiert (s. 3.3.4; 3.3.5; 3.3.6).

3.3.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter denaturierenden Bedingungen. SDS denaturiert Proteine und geht nicht-kovalente Wechselwirkungen mit hydrophoben Bereichen ein. Dabei ist das Verhältnis von SDS-Molekülen pro Aminosäure annähernd konstant. Durch die komplette Entfaltung und den Besatz mit SDS werden Ladungsunterschiede zwischen den einzelnen Proteinen ausgeglichen. Alle Proteine sind nun negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderung der Proteine hängt hierbei neben der Durchlässigkeit der Matrix nur noch vom Molekulargewicht der Proteine ab. Dabei wandern kleine Proteine schneller als größere.

Als Matrix dienten vertikale Gele aus mit Bisacrylamid vernetztem Acrylamid, die aus einem niedrigprozentigen Sammelgel und einem - je nach erwünschtem

Auftrennungsgrad bzw. Größe des Proteines - 7,5 bis 15 prozentigen Trenngel bestanden. Die Pufferbedingung im Sammelgel gewährleistete das Entstehen einer einheitlichen Proteinfront, diejenige im Trenngel sorgte für eine optimale Auftrennung der Proteine.

Trenn- und Sammelgel wurden durch Mischen von Acrylamidstammllösung (30% (v/v)) mit dem jeweiligen Gelpuffer im erforderlichen Verhältnis (im Sammelgel 5% (v/v) Acrylamid) hergestellt. Die Polymerisation ist eine Radikalkettenreaktion, die durch den Zerfall von Peroxidsulfationen (APS 10% (w/v)) eingeleitet wird. Die Radikale aktivieren in einem zweiten Schritt Tetramethylethyldiaminmoleküle (TEMED 0,08%), deren Radikale die eigentlichen Initiatoren der Radikalkettenpolymerisation sind.

Vor dem Gießen des Geles wurden die Glasplatten mit Spülmittel, destilliertem Wasser und Ethanol gereinigt, aufeinandergelegt und mit 1% (w/v) Agaroselösung abgedichtet. Damit sich eine glatte Lauffront ausbildete und das Gel nicht austrocknete, wurde das Trenngel während der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach dessen Entfernen mit dH₂O wurde das polymerisierte Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet.

Die aufzutrennende Proteinlösung wurde jeweils mit 1/3 VT 3x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5min bei 95°C inkubiert und mit einer Hamilton-Spritze auf das Gel aufgetragen.

Bei Verwendung von Midigelen ließ man die Proben bei 150V in das Sammelgel einlaufen. Die Proteinauftrennung erfolgte im Trenngel bei 300V (Ventilator) bzw. bei 50V über Nacht. Die Laufzeit war abhängig von dem gewünschten Auftrennungsgrad, der anhand des mitlaufenden Größenstandards nachvollzogen werden konnte. Größenunterschiede von 1kDa (entspricht ca. 10 Aminosäuren) konnten mit dieser Methode aufgelöst werden. Die aufgetrennten Proteinbanden wurden mittels Western-Blot-Analyse sichtbar gemacht.

3.3.5 Western-Blotting

Mit dieser Methode erfolgte der Nachweis der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Im ersten Schritt ließ man die Proteine durch ein transversal zur Oberfläche des Geles angelegtes elektrisches Feld auf der anodischen Seite aus dem Gel austreten und transferierte sie auf eine Nitrocellulose-Membran. Dort nahmen die Proteine genau die Position ein, die sie im Gel belegten.

Die auf der Oberfläche der Nitrocellulose immobilisierten Proteine waren nun immunologischen Reaktionen zugänglich.

Dazu wurde die Membran in einer Lösung, die gegen das nachzuweisende Protein gerichtete Antikörper enthielt, inkubiert. Nach Abwaschen des nicht gebundenen Antikörperüberschusses wurde ein Zweitantikörper, der gegen die konstanten Domänen der schweren Kette des Erstantikörpers gerichtet war, hinzugegeben. Dieser Zweitantikörper war mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Dessen Enzymreaktionen erlaubten den hochspezifischen Nachweis des erwünschten Proteines. Zunächst wurde die Nitrozellulose-Membran unter Vermeidung von Verunreinigungen auf die Größe des Acrylamid-Geles zurechtgeschnitten. Anschließend wurde die Membran für 1min in 100% Methanol, für 2min in H₂O und für 5min in Blotpuffer inkubiert. Der elektrophoretische Transfer der Proteine wurde in einer "semi-dry" Blotapparatur (Bio-Rad) vorgenommen. Drei Whatman-3M-Papiere, jeweils so groß wie die PVDF-Membran, wurden in Blotpuffer getränkt und luftblasenfrei übereinander auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Darauf wurden die vorbehandelte PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und nochmals drei in Blotpuffer getränkte Whatman-3M-Papiere gelegt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte je nach Oberfläche der Membran bei einer konstanten Spannung von 200mA (200mA/Fläche der Membran cm² = x min Blotzeit, s. Broschüre Millipore-Membran).

Um unspezifische Antikörperbindung an die Nitrozellulose-Membran zu vermeiden, wurde diese zum Absättigen nach dem Blotten in Blocklösung für 3h bei RT oder über Nacht im Kühlraum inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper in der gewünschten Konzentration in frischer Blocklösung inkubiert (2h, RT; ü.N., 4°C). Die Membran wurde nun 3-mal für 10min in TBS-T-Puffer (1xTBS, 0,2% Tween-20) gewaschen. Der sekundäre, Meerrettich-Peroxidase konjugierte, Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:4000 in Blocklösung zu der Membran gegeben und für 2h inkubiert. Danach wurde diese erneut mit TBS-T-Puffer gewaschen. Die Membran wurde mit ECL-Reagenzien (Amersham) entwickelt. Exogene Proteine wurden mit ECLplus (Verhältnis Lösung A:B ist 40:1, 5min) sichtbar gemacht, endogene Proteine mit ECL (Verhältnis Lösung 1:2 ist 1:1, 3min). Die ECL-Reagenzien erzeugten zusammen mit der Meerrettich-Peroxidase eine Chemilumineszenz, die sich mit geeigneten Filmen nachweisen ließ. Die Membran wurde zur Exposition in Klarsichtfolie verpackt. Die Expositionszeit auf dem ECL-Hyperfilm erfolgte je nach Signalstärke zwischen 1sec und 2h. Die Schwärzung des

Filmes war in gewissen Grenzen der Menge an gebundenem Antikörper und damit der Menge an nachzuweisendem Protein proportional.

3.3.6 Silberfärbung der Polyacrylamidgele (SDS-PAGE)

Zur Anfärbung der Proteine in 2D-Gelen diente das SilverQuest[™] Silver Staining Kit, unter Verwendung des Basic Staining Protokolls, mit welchem Proteinmengen von ≥ 3 ng darstellbar sind, und somit um ein vielfaches sensitiver als die verschiedenen Coomassie-Blue-Färbetechniken ist. Sämtliche Färbeschritte wurden bei RT auf einem Laborschüttler durchgeführt.

Nachdem das Gel für 20 min in Fixierlösung fixiert wurde, folgte ein Waschschrift mit Ethanol 30% für 10 min. Das Ethanol wurde verworfen, und das Gel mit 100ml Sensitisierer für weitere 10 min inkubiert. Das Gel wird 10 min mit Ethanol 30% und weitere 10 min mit Millipore-Wasser gewaschen und dann für 15 min in die Färbelösung gegeben. Nach einem erneuten Waschschrift mit Millipore-Wasser für 20-60 s erfolgte das Entwickeln in Entwicklerlösung für 5-10 min bis sämtliche Proteinbanden sichtbar waren, der Hintergrund des Gels aber noch nicht zu dunkel wurde. Die Reaktion wurde mit 10ml Stopperlösung, die direkt in den Entwickler gegeben wurde, innerhalb von 10 min gestoppt und das Gel abschliessend mit Millipore-Wasser für 10 min gewaschen. Abschliessend konnte das Gel zwischen zwei Folien aufgespannt getrocknet und so konserviert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors E2F-1 in Neuroblastomzellen

4.1.1 Aktivierung von E2F-1 durch 4-Hydroxitamoxifen in Neuroblastomzellen

Obwohl der Transkriptionsfaktor E2F-1 eine wichtige Rolle bei der Einleitung der Apoptose und der Onkogenese spielt, ist nur sehr wenig über den genauen Ablauf der damit verbundenen Signalwege im Neuroblastom bekannt. Das *MYCN*-Onkogen, das als Marker für aggressive Formen humaner Neuroblastome bekannt ist, konnte als ein direktes Zielgen von E2F-1 identifiziert werden (Strieder und Lutz, 2003). Ein weiteres bekanntes Zielgen von E2F-1 ist *Mad2*, ein Gen des mitotischen Kontrollpunktes, das mit einer schlechten Prognose von Neuroblastomen einhergeht. Somit scheint eine starke E2F-1 Aktivität und die damit verbundene Zielgenexpression in Neuroblastomen den Verlauf zu bestimmen (Hernando, 2004). Dabei bleibt die genaue Bedeutung von E2F-1 im Neuroblastom aber unklar.

Um weitere onkogene Zielgene des Transkriptionsfaktors E2F-1 ausfindig zu machen, und die funktionellen Folgen einer Deregulation von E2F in Neuroblastomen untersuchen zu können, wurden humane Neuroblastomzellen analysiert, die ein E2F-1-ER-Fusionsprotein exprimieren (Klon SHEP-1A3; Strieder und Lutz, 2003). Dieses besteht aus dem Transkriptionsfaktor E2F-1 und der Liganden-Bindedomäne des Östrogenrezeptors (ER). Das exprimierte E2F-1 wird durch die Liganden-Bindedomäne inaktiviert, kann aber durch das Östrogenderivat 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) reversibel aktiviert werden (Littlewood et al., 1995; Vigo et al., 1999).

Um den besten Zeitpunkt für eine Zellernte, d.h. für die höchste Genaktivierung, zu bestimmen wurden, zuvor für 24 Stunden mit 0% FCS ausgehungerte Zellen bei einer Konfluenz von 70-80 % (entspricht ca. 10^8 Zellen) mit 200nM 4-OHT für 0 (keine Zugabe von 4-OHT), 1, 4, 8 und 12 Stunde(n) behandelt. Anschliessend wurden die Zellen geerntet, RNA isoliert und, um Verunreinigungen durch genomische DNA auszuschliessen, ein DNase-Verdau durchgeführt. Mittels RT-PCR und Primern für *ZyklusinE* (*CCNE1*), einem bekannten Zielgen von E2F-1 (Ohtani et al., 1995), wurde dann untersucht, wie schnell die Aktivierung von Zielgenen durch das exogene E2F-1 nach Zugabe von 4-OHT erfolgt (s.Abb. 4). *S14*, das Gen der kleinen ribosomalen Untereinheit S14, diente hierbei als Negativkontrolle, es durfte nicht induziert werden.

Wie in Abb.4 zu sehen ist, ist nach einer Stunde eine eindeutige Induktion von Zyklin E (CCNE1) zu erkennen, welche nach 12 Stunden auf Δct 5,84 ansteigt. Der Δct -Wert gibt dabei die Differenz zwischen nicht 4-OHT-induzierten und induzierten Zellen an. Ct-Werte wurden durch die quantitative Real-Time-PCR ermittelt und spiegeln die Stärke einer Genexpression wieder (s.a.3.2.12). Auch morphologisch kann ab etwa 12 Stunden nach 4-OHT-Zugabe ein Abrunden der Zellen, als Zeichen der Apoptose, und nach insgesamt 48 Stunden ein Absterben der gesamten Population beobachtet werden (Verena Strieder, persönliche Mitteilung und eigene Beobachtung).

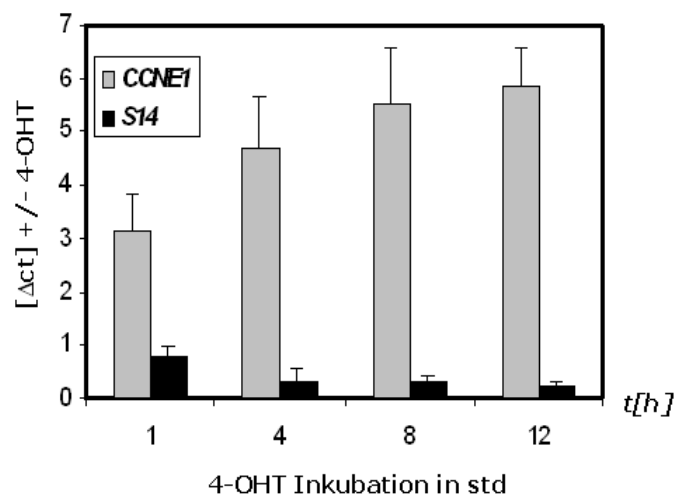


Abb. 4 Durch 4-OHT aktiviertes E2F-1 induziert CCNE1. Die Abbildung zeigt die Kinetik der Induktion der CCNE1-mRNA durch E2F1-ER in SHEP-1A3 Zellen. Die Zellen wurden jeweils für 1, 4, 8 und 12 Stunde(n) mit 4-OHT inkubiert. Das Induktionsmaximum wird nach 8-12 Stunden erreicht (grauer Balken), wobei sich die Werte (Δct) aus der Differenz von induzierten und nicht induzierten Zellen ergeben. Die Messung der S14-mRNA (schwarzer Balken) dient als Negativkontrolle. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichungen vom Mittelwert von unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Auf der Grundlage dieses Pilotexperimentes wurden für die Durchführung der Microarrays RNA aus Zellen isoliert, die für 12 Stunden mit 200 nM 4-OHT behandelt worden waren, anschliessend wurde die RNA isoliert. Die mit DNase vorbehandelte RNA wurde in der RT-PCR mit *ZyklinE*-Primern (s.oben) auf erfolgreiche E2F-1 Aktivierung untersucht und für die weitere Analyse mit cDNA Microarray-Chips weiterverarbeitet: - um Unterschiede in der Geninduktion zu ermitteln wurde GesamtRNA in cDNA umgeschrieben und mit den Fluoreszenz-Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert. Dabei wurde jeweils mit 4-OHT induzierte bzw. nicht induzierte cDNA getrennt voneinander mit Cy3 bzw. Cy5 markiert und an mit Oligonukleotiden

bedruckte Chips hybridisiert. Diese Chips wurden gescannt und am Computer weiter bearbeitet. Anschliessend im Institut für Biometrie und Statistik der Universität Marburg ausgewertet. Pro Microarray-Chip konnten 4.600 Gene (4,6k Chip) auf ihre Induktion hin untersucht werden.

Tabelle 2 (s.S.49) zeigt eine Liste ausgewählter Gene die in diesem Experiment durch 4-OHT aktiviert wurden und daneben, die schon in der Literatur als E2F-1 induziert beschriebenen Gene (Müller et al., 2001; Ren et al., 2002; Stanelle et al., 2002). Gene aus eigenen Daten stehen hierbei neben Genen, die bereits aus der Literatur bekannt waren. Aufgrund von Schwierigkeiten beim Hybridisieren und der Genauigkeit beim Scannen der einzelnen Chips konnten viele Gene nicht eindeutig als induziert bzw. reprimiert identifiziert werden. Schliesslich wurden eine Auswahl der mittels cDNA Microarray identifizierten Kandidatengene durch quantitative RT-PCR auf RNA aus für 12 Stunden durch 4-OHT induzierten bzw. nicht induzierten Zellen überprüft (s.Abb. 5; zur näheren Bezeichnung der einzelnen Gene s.a. Tabelle 2):

- *BM11* (*B lymphoma Moloney-Murine Leukemia Virus insertion region*), das für ein Protein der Polycomb-Gruppe kodiert (Δ ct 3,82). Es wurde zuerst als ein mit c-myc kooperierendes Onkogen im Zusammenhang mit Mauslymphomen beschrieben (van Lohuizen et al., 1991; Haupt et al., 1991). Proteine dieser Gruppe bilden meist multimere Komplexe mit hauptsächlich reprimierenden Eigenschaften. Die Induktiongeschwindigkeit des *BM11* durch E2F-1 war in der RT-PCR mit der von *CCNE1* vergleichbar (Daten nicht gezeigt).
- *TAC1* (*transforming acidic coiled coil*) (Δ ct 3,62) wird ebenfalls durch E2F-1 aktiviert. Es gehört zu einer Gen-Familie, die in der embryonalen Entwicklung, aber auch bei der Entstehung von Tumoren, durch Interaktion mit verschiedenen Partnern in der Transkription und Translation eine wichtige Rolle spielen.
- *CASPASE3* (*cysteinyl aspartate cleaving protease*) (Δ ct 6,01) und *CASPASE7* (Δ ct 2,59) konnten als differentiell exprimierte Gene bestätigt werden (s.Abb. 5; *CASPASE7*, ist induziert, wie bereits in der Literatur angegeben: Müller et al., 2002). Die Gruppe der Caspasen spielen als Enzyme eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Apoptose.

Table 2: Liste der Gene, die auf eine Induktion durch E2F-1 untersucht wurden					
Gen-Symbol	Beschreibung	Accession-Nr	E2F-1-Reguliert	auf/ab	Quelle
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region	AA478036	ja	auf	eigene Daten
Casp3	Caspase3, apoptosis related cystein protease	U13737	ja	auf	eigene Daten/Müller (2001)
Casp7	Caspase7, apoptosis related cystein protease	U67319	ja	auf	Müller (2001)
CCNE1	ZyclinE 1	BE733577	ja	auf	Ohtani (1995)
CFLAR(FLIP)	Caspase8 and FADD-like apoptosis regulator	NM_003879	?	ab?	Stanelle (2002)*
DYRK2	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2	AA609151	nein	(-)	Müller (2001)
TACC1	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	H47327	ja	auf	eigene Daten/Müller (2001)
Alle Symbole, wie unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/index.html angegeben.					
*CFLAR als indirektes aufreguliertes Gen angegeben.					

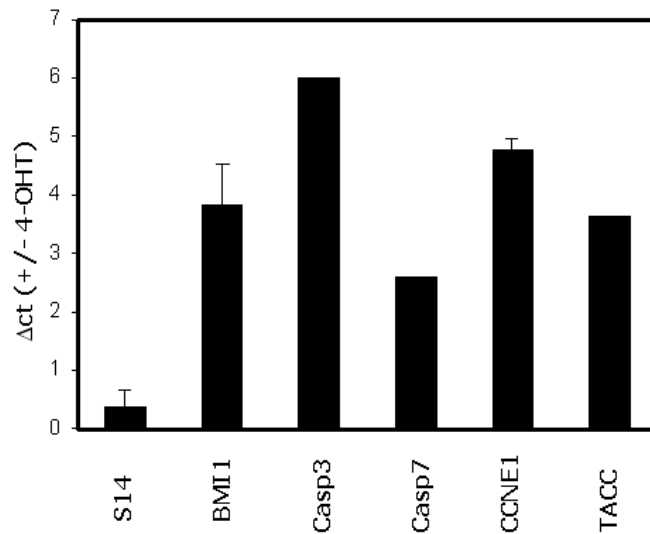


Abb. 5 E2F-1 aktiviert die Gene BMI1, TACC1 & CASP3/7. SHEP-1A3 wurden für 12 std mit 4-OHT bzw. mit der gleichen Menge Ethanol behandelt. Anschliessend wurde die mRNA verschiedener Gene auf ihre Induktion hin untersucht. Δct berechnet sich aus der Differenz der mit 4-OHT inkubierten / nicht inkubierten Zellen. Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von Duplikaten einer Zellinduktion und der daraus synthetisierten cDNA. Neben dem Kontrollgen CCNE1 zeigen auch die Gene BMI1, TACC1, CASP3 und CASP7 eine Induktion in SHEP-1A3. Unterschiede der mRNA-Mengen wurden durch Normalisierung mit S14 ausgeglichen.

DYRK2 (*dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinases*) und *CFLAR* (*FLIP*) (*Caspase8 and FADD-like apoptosis regulator*) konnte mittels RT-PCR für *DYRK2* (Δct 0,89) keine Induktion ermittelt werden (induziert in Müller et al., 2002; s.Tabelle 2), bei *CFLAR(FLIP)* (Δct -2,90) (s.Abb. 5) zeigte sich dagegen ein scheinbar repressiver Einfluß, d.h. seine Expression nimmt ab (*CFLAR* wird induziert bei Stanelle et al, 2002; s.Tabelle 2). *DYRK2* gehört zu einer Genfamilie mit bisher 7 bekannten Isoformen über dessen Funktionen und Eigenschaften bisher nicht viel bekannt ist, nur dass sie Schlüsselrollen in Wachstum, Überleben und Differenzierung haben. *CFLAR* hat antiapoptotische Eigenschaften und die induzierbare Degradation von *CFLAR* führt in Tumorzellen zur, durch den Faktor TRAIL aktivierten, Apoptose. Die hier gezeigten Unterschiede zu anderen Arbeiten in der Induktion dieser beiden Gene könnten auf gewebe- oder zelllinienabhängige genetische Unterschiede, bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F-1, hinweisen.

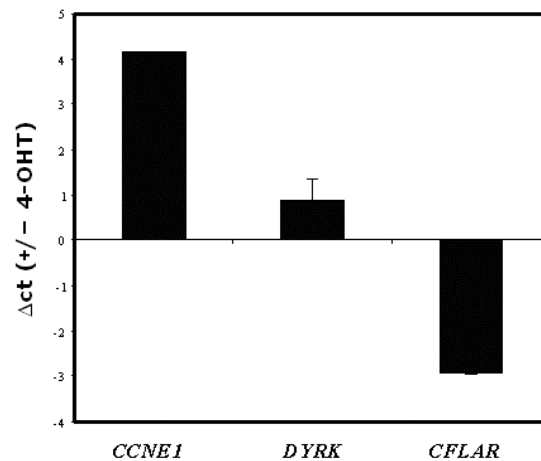


Abb.6 Unterschiede in der Induktion von Genen im Neuroblastom. Die Gene *DYRK* und *CFLAR* sind aus der Literatur als direkte Zielgene von E2F-1 bekannt (s.Text). In *SHEP-1A3* wurde *DYRK*-mRNA nicht durch E2F-ER induziert (Durchführung s.oben). *CFLAR* wird in *SHEP-1A3* reprimiert. Δ ct-Werte und Fehlerbalken ergeben sich, wie in Abb.4 beschrieben.

4.1.2 Direkte Induktion ausgewählter Gene durch E2F-1

In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob die gefundenen differentiell exprimierten Gene direkte Zielgene von Transkriptionsfaktoren sind oder über mehrere Zwischenschritte reguliert werden. Hierfür wurden die Zellen neben 4-OHT mit 10 μ g/ml des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (CHX) allein und mit 4-OHT kombiniert für jeweils 12 Stunden behandelt. Da die Aktivierung des E2F-1-ER posttranslational erfolgt ist sie unabhängig von der Proteinbiosynthese, weshalb direkt und ausschliesslich durch E2F-1 aktivierte Gene von einer Hemmung durch CHX unbeeinflusst bleiben. Geninduktion aller Kandidatengene wurde mittels quantitativer RT-PCR getestet und war bei kombinierter Behandlung mit 4-OHT und CHX ebenso vorhanden, wie bei alleiniger Behandlung mit 4-OHT. Das bereits bekannte direkte Zielgen *ZyklinE* (*CCNE1*) diente als Positivkontrolle. *CASP3* war bereits als direktes Zielgen von E2F-1 bekannt (Müller et al., 2001) und wurde daher nicht erneut getestet. Für alle weiteren in Tabelle 2 genannten Gene mit Ausnahme von *CFLAR* konnte eine direkte Induktion beobachtet werden (s.Abb.7).

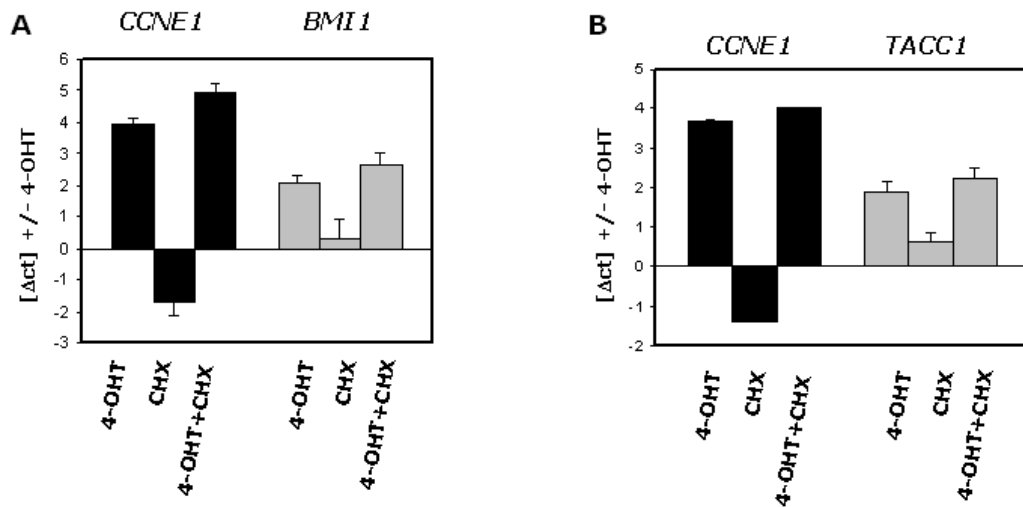


Abb.7 Induktion von BMI1 und TACC1 durch E2F-1 erfolgt unabhängig von Proteinbiosynthese. SHEP-1A3 wurden mit 4-OHT, CHX und 4-OHT+CHX zusammen für jeweils 12 std. inkubiert und anschliessend die mRNA der genannten Gene mittels qRT-PCR gemessen. Die Gene BMI1 und TACC1 sind direkte Zielgene von E2F-1, da Proteinbiosynthese für ihre Induktion nicht notwendig ist. Act-Werte und Fehlerbalken ergeben sich, wie in Abb.4 beschrieben.

Das Ergebnis von BMI1 in der qRT-PCR aus CHX-behandelten Zellen ist angesichts der Sequenzanalyse des BMI1-Promotors plausibel. Dieser zeigt neben Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 auch eine Sequenz, die Ähnlichkeit zur Konsensus-Bindungsstelle für E2F-Proteine aufweist (Abb.8)

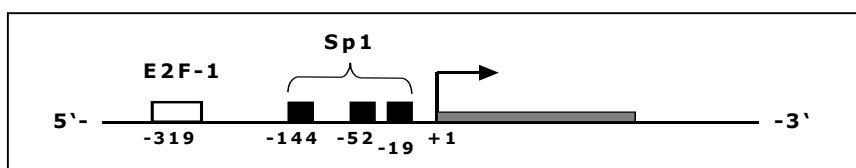


Abb.8 Abbildung des BMI1-Promotors. Die Position +1 markiert das 5'-Ende der publizierten cDNA-Sequenz (der transkriptionelle Startpunkt wurde noch nicht bestimmt). In 5'-Richtung von der BMI1-Promotorregion liegt neben 3 möglichen Sp1-Bindestellen (19, 52, 144 bp vom Start der cDNA-Sequenz) eine E2F-1-Bindestelle in Position -319.

Zur weiteren Bestätigung ob das *BMII*-Gen direkt durch E2F-1 reguliert wird, wurde ein Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP-Assay) durchgeführt.

Der ChIP-Assay gibt Auskunft darüber, ob ein Transkriptionsfaktor *in vivo* an einen bestimmten Promotor bindet. Dafür wurde Formaldehydquervernetztes Chromatin aus unbehandelten und mit 4-OHT behandelten SHEP-1A3-Zellen mit verschiedenen Antikörpern präzipitiert (*das Chromatin für diesen Versuch wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Werner Lutz zur Verfügung gestellt*). Für den ChIP-Assay wurden Primer (bmichip54 u. bmichip34, s.2.2.12) verwendet, die im 1. Exon des *BMII* Gens liegen (das Produkt umfasst den Bereich von Basenpaar + 268 bis + 458 relativ zum Start-Codon) (s.Abb. 9). Andere Primer, die näher an möglichen E2F-Bindestellen lagen, konnten aufgrund häufiger GC-haltiger Sequenzen nicht erfolgreich eingesetzt werden.

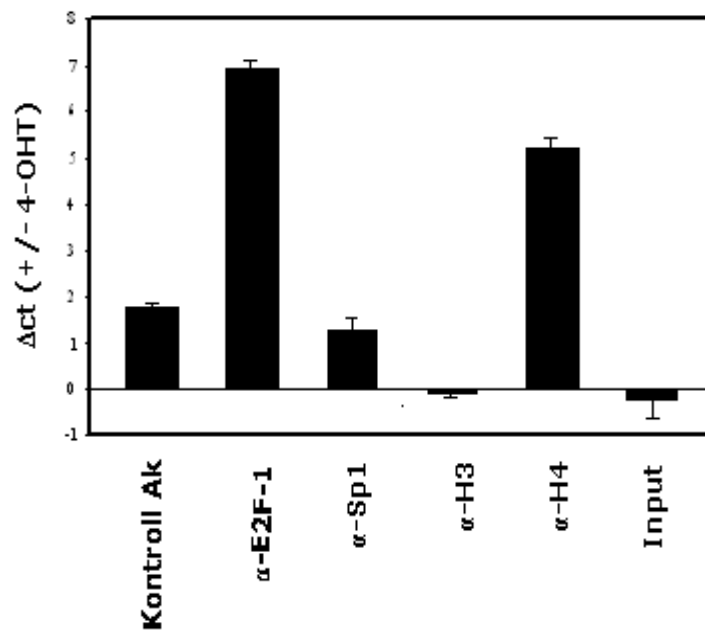


Abb. 9 E2F-1 bindet an den BMI-Promotor *in vivo*. Chromatin wurde aus mit 4-OHT inkubierten und nicht inkubierten SHEP-1A3-Zellen gewonnen. Anschliessend wurde es mit spezifischen Antikörpern (Ak) gegen E2F-1, Sp1, H3, H4 und einem Kontroll-Ak präzipitiert. Das Chromatin wurde als Matritze für die qRT-PCR mit *BMII*-Primern eingesetzt. Die Werte ergeben sich aus der Differenz zwischen unbehandelten und 4-OHT behandelten Zellen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung zweier unabhängiger Versuche.

Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Anreicherung des *BMII*-Promotors in der anti-E2F-1 präzipitierbaren Fraktion des Chromatins aus 4-OHT-behandelten Zellen. Der E2F-1-Partner Sp1 ist nicht induziert. E2F-1 beeinflusst also nicht die Bindung von Sp1 an den *BMII*-Promotor. Mit H3- und H4-Antikörpern behandelte DNA, gibt Aufschluss über die Acetylierung der beiden Histone H3 und H4, und ist damit ein Marker transkriptionell aktiver Gene. Das ChIP-Experiment zeigt eine Zunahme der Acetylierung von Histon H4 am *BMII*-Promotor in 4-OHT-behandelten Zellen.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass der Transkriptionsfaktor E2F-1 den *BMII*-Promotor in humanen Neuroblastomen direkt bindet und *BMII* auf diesem Wege reguliert wird.

4.2 Identifizierung von Regulatoren des *MYCN*-Gens durch Affinitäts-Chromatographie

4.2.1 Prinzip der biochemischen Aufreinigung

Myc-Onkoproteine sind Transkriptionsfaktoren, die Zielgene sowohl reprimieren, als auch aktivieren können und in der Tumorigenese des humanen Neuroblastoms eine wichtige Rolle spielen. Es ist bekannt, dass das *MYCN*-Gen durch E2F-Transkriptionsfaktoren aktiviert werden kann (Strieder und Lutz, 2003). Neben diesen sind auch die Faktoren Sp1 und Sp3 an einer transkriptionellen Regulation beteiligt. Allerdings reichen E2F und Sp1/Sp3 allein nicht aus, um in Neuroblastomzelllinien, das *MYCN*-Gen zu aktivieren. In Neuroblastomzelllinie, die *MYCN* nicht exprimieren, ist E2F nicht in der Lage an den Promoter zu binden (*PD Dr. Lutz, persönliche Mitteilung*). In-vivo-footprint Analysen (sog. DNA-Schutz-Experimente) deuten aber darauf hin, dass im proximalen Anteil des *MYCN* Promotors weitere Proteinbindungen auftreten (Lutz und Schwab, 1997). Ebenso ist bekannt, dass E2F-Proteine an Promotoren Wechselwirkungen mit weiteren Transkriptionsfaktoren eingehen (Karlseder et al., 1996). Durch eine DNA-Affinitätsaufreinigung sollen diese Faktoren selektiv angereichert und mit dem Verfahren der Massenspektrometrie identifiziert werden. Für die Aufreinigung der Faktoren wurde ein Kernextrakt aus IMR-32 Zellen hergestellt. Dabei handelt es sich um eine Zelllinie eines humanen Neuroblastoms, bei der das *MYCN*-Gen amplifiziert und stark exprimiert wird (s.Abb.10).

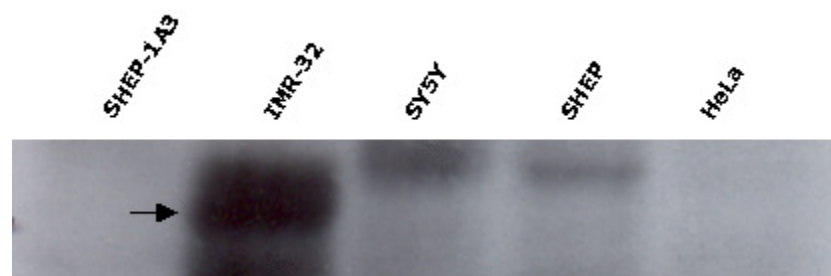


Abb.10 Western-blot mit α -N-Myc-Ak. Nachweis der *MYCN*-Expression in verschiedenen Zelltypen. Positive Expression ist nur in IMR-32 zu sehen (Pfeil befindet sich auf Bandenebene). Auch ein aktiviertes E2F-1 in Shep-1A3 vermag die Expression nicht zu ermöglichen.

Die DNA-Affinitätschromatographie wird mit DNA-Fragmenten aus der *MYCN*-Promotorsequenz durchgeführt. Die am 3'-Ende biotinylierte DNA wird an Streptavidin-Agarosebeads (s.Abb. 11) gebunden und mit Kernextrakt inkubiert. Die Verwendung von Kernextrakten birgt den Vorteil einer 10- bis 100-fachen Anreicherung der Transkriptionsfaktoren, da diese sich in eukaryotischen Zellen vorwiegend im Zellkern befinden. Aus dem Kernextrakt sollen mittels der DNA, die eine hochaffine Sequenz für spezifische DNA-bindende Proteine enthält, diese Proteine angereichert werden. Die Verbindung zwischen Streptavidin und Biotin ist extrem resistent gegen hohe Salz- und Harnsäurekonzentrationen und stellt eine der stabilsten biologischen Interaktionen dar. Die Proteine werden, nachdem sie von der Aufreinigungssäule eluiert wurden, auf einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und weiter analysiert.

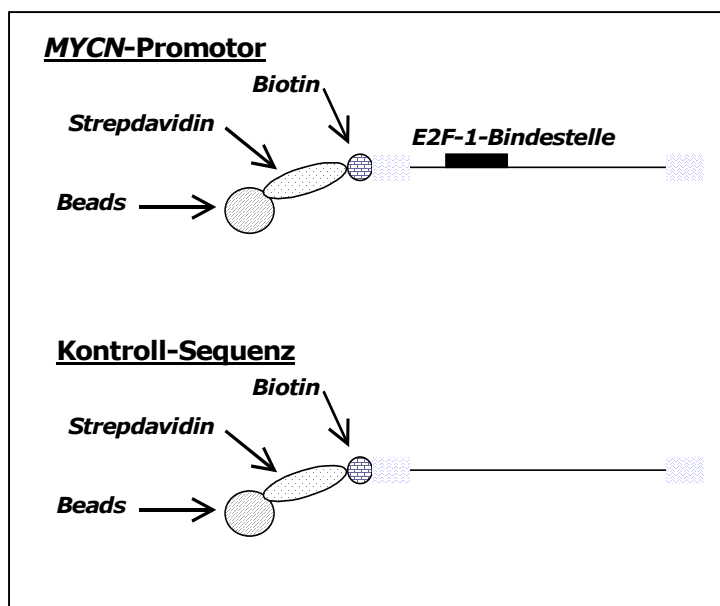


Abb.11 Schema der an Streptavidin-Agarosebeads gekoppelten biotinylierten DNA-Sequenzen. Die obere Sequenz besteht aus der Promotor-Sequenz des MYCN-Gens (die enthaltene E2F-1-Bindestelle ist schematisch dargestellt), während die Kontroll-Sequenz keine proteinspezifischen Bindestellen enthält und der Differenzierung von sequenzspezifischen Proteinen dient. Die markierten Bereiche (sog. Spacer) bestehen aus Sequenzen, die in Footprint-Analysen keine DNA-Protein-Wechselwirkungen gezeigt haben. Sie sollen verhindern, dass es zu einer sterischen Behinderung der Proteinbindung durch die Streptavidin-Agarose kommt.

4.2.2 Herstellung einer DNA-Affinitätsmatrix

Zur Herstellung einer Matrix zur Aufreinigung von MYCN-Promotorbindenden Proteinen, diente nicht-kovalent an Streptavidin-Agarose gebundene biotinylierte DNA. Die DNA-Abschnitte mit einer Länge von 226 Basenpaaren (bp) wurden mittels PCR aus humaner genomischer DNA amplifiziert und beinhalten den *MYCN*-Promotor, sowie zusätzlich einen genomischen Bereich am 3'-Ende, der experimentell keine

DNA-Protein-Wechselwirkung zeigte. Durch diesen Sicherheitsabstand soll eine sterische Behinderung der Proteinbindung durch die Streptavidin-Agarose verhindert werden (Abb.11).

Durch eine weitere PCR mit am 3'-Ende biotinylierten Primern sind die DNA-Fragmente in der Lage an die Streptavidin-Agarose zu binden. Parallel zur Promotor-DNA wurde als Negativkontrolle DNA amplifiziert, die aus einem 186 bp langen Segment besteht, welches sich in einer nicht konservierten Region ca. 1,4 Kilobasen oberhalb des *MYCN*-Promotors befindet. Zusätzlich wurde an diesen Abschnitt eine dem biotinylierten Primer (24 bp) entsprechende Sequenz angehängt, so dass sich die Länge der Kontroll-DNA mit insgesamt 210 bp, der Promotor-DNA angleicht. Die Sequenz des Kontrollabschnitts weist ansonsten keine Ähnlichkeit zum Promotorbereich auf, insbesondere ist keine E2F-Bindestelle vorhanden. Sie dient dazu, Proteine zu identifizieren, die unspezifisch an die Affinitätsmatrix oder DNA binden. Zusätzlich ist nur in der Kontroll-DNA eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *SacI* (GAG CTC) vorhanden, die nach einem Verdau Produkte in einer Länge von 51 bp und 135 bp lieferte. Dies diente zur Kontrolle auf eventuelle Verunreinigung der Promotor-DNA durch Kontroll-DNA und konnte mit der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden (hier nicht gezeigt).

4.2.3 DNA-Affinitätsaufreinigung im analytischen Maßstab

Die Affinitätsaufreinigung erfolgte unter Bedingungen, die zuvor erfolgreich für einen EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, sog. Gelretardierungsexperiment) mit dem *MYCN*-Promotorbereich verwendet wurden (Lutz und Schwab, 1997).

Für die Anreicherung von Transkriptionsfaktoren des *MYCN*-Promotors im analytischen Maßstab, wurde jeweils 1mg des Kernextraktes für die Promotor- bzw. Kontrollsäule mit der gleichen Menge Streptavidin-Agarose, die auch für die eigentliche Aufreinigung verwendet wurde, in Dilutionspuffer (DB) vorgereinigt, um unspezifisch an die Matrix bindende Proteine zu entfernen. Die Matrix wurde anschliessend abzentrifugiert, das Kernextrakt nach Vorreinigung mit jeweils 80 µg Lachssperma-DNA mit den DNA-Beads (s. 4.2.1) ü.N. bei 4°C inkubiert. Die DNA-Beads bestanden aus 50 µl Streptavidin-Agarose-Beads, an die jeweils 2 µg biotinylierte DNA gebunden war.

Als Nächstes wurde die Matrix mit Hilfe mehrerer Waschschriffe, die mit Bindepuffer (BB) durchgeführt wurden, von nicht bindenden Proteinen befreit um die

Wechselwirkungen zwischen Transkriptionsfaktoren und ihrer spezifischen Bindungsstelle zu stabilisieren. Anschliessend wurden die Proteine durch Hitzeelution bei 95 °C in 1x Ladebuffer von der DNA gelöst. Die Streptavidin-Agarose mit noch gebundener biotinylierter DNA wurde abschliessend abzentrifugiert, und die im Überstand befindlichen Proteine in ein neues Gefäß überführt (die einzelnen Waschschritte sind schematisch in Abb.12 dargestellt).

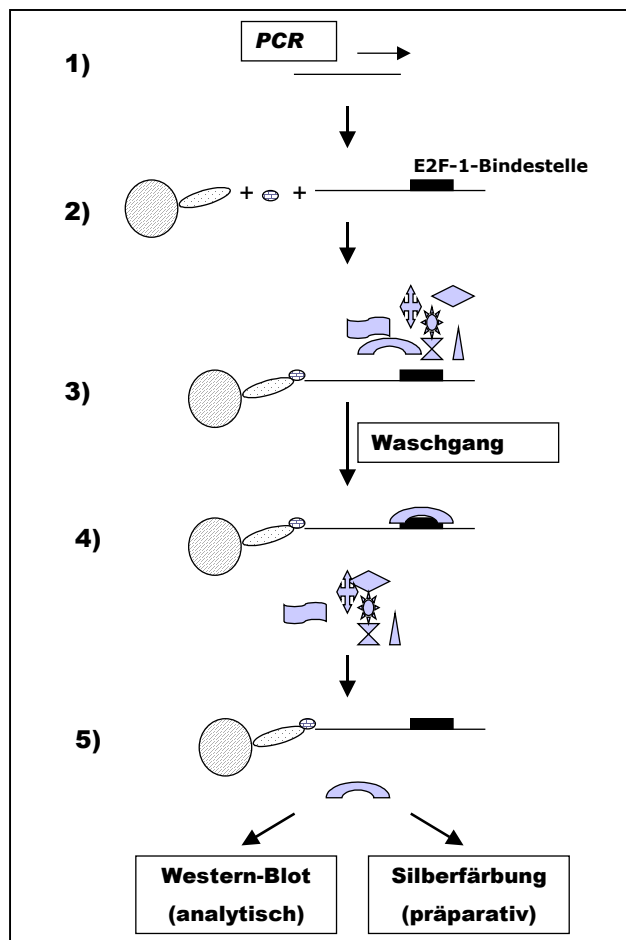


Abb.12 Schematische Darstellung der Proteinaufreinigung mit Hilfe an Streptavidin-Agarose-Beads gekoppelter DNA (1+2). Der DNA-Abschnitt enthält den MYCN-Promotor mit einer bekannten E2F-1-Bindestelle. In Schritt 3 wird die DNA mit einem Proteineluat inkubiert und nicht gebundene Proteine werden in mehreren Waschschritten entfernt (4). Im letzten Teil werden spezifisch gebundene Proteine von der DNA getrennt und in einem ersten Schritt mittels Western-Blot analysiert. Anschliessend werden Proteine im präparativen Maßstab aufgereinigt, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

Die aufgereinigten Proteine wurden mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und durch Silberfärbung (nicht gezeigt) bzw. mit α -E2F-1-Antikörper im Western-Blot (s.Abb.13) sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle zum Nachweis der erfolgreichen Anreicherung von Regulatoren von *MYCN* wurde das E2F-1-Protein im Western-Blot nachgewiesen werden.

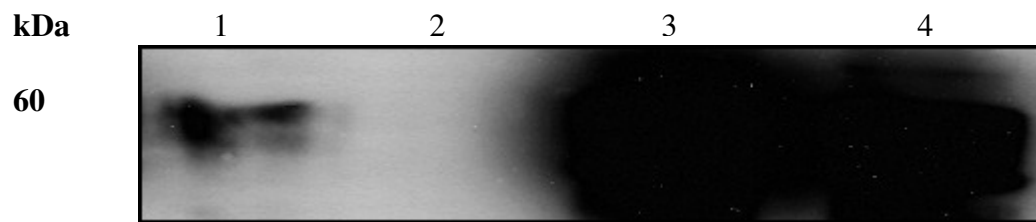


Abb.13 Western-blot mit α -E2F-1-Ak. Spur 1 ist mit der MYCN-Promotor-Sequenz aufgereinigter Kernextrakt (KE) mit sichtbarer E2F-1-Bande. Daneben wurde KE mit der Kontroll-Sequenz aufgereinigt, ohne sichtbares E2F-1. In den Spuren 3&4 wurde, als Nachweis für vorhandenes E2F-1, das vorher mit der DNA-Sequenzen inkubierte KE (Input) aufgetragen. In Spur 3 der KE von der Promotor-Sequenz und in Spur 4 aus der Kontroll-Sequenz. Die überbelichteten Banden entstehen durch einen hohen Anteil nicht gebundenes E2F-1.

In Abb.13 ist im mit dem Promotorbereich aufgereinigten Extrakt eine Bande zu erkennen, die mit einer Größe von 60 kDa dem Transkriptionsfaktor E2F-1 entspricht. Zum Vergleich daneben sind die Überstände des aufgereinigten Gesamtproteinextraktes (Input) aufgetragen. In der Spur, des durch den Kontrollbereich aufgereinigten Extrakts (Spur 2) ist keine Bande sichtbar, E2F-1 konnte in diesem Bereich nachweislich nicht binden.

4.2.4 Aufreinigung im präparativen Maßstab und Identifizierung der aufgereinigten Proteine mittels Massenspektrometrie

Um eine für die Massenspektrometrie ausreichende Menge Proteins zu erhalten, wurde das oben aufgeführte Protokoll (s.4.2.1) in einem 10-fach höheren Maßstab (entsprechend 10 mg KE) unter sonst gleichen Bedingungen wiederholt. Die eluierten Proteine wurden mit Hilfe des SilverQuestTM Silver Staining Kits sichtbar gemacht. Neben der Input-Kontrolle aus 50 μ g Gesamtprotein ist eine Spur, des mit Promotor-DNA aufgereinigten Proteins zu sehen. Daneben befindet sich das, mit Kontroll-DNA aufgereinigte Protein (s.Abb14). Bei 60 kDa ist in der Promotor-Spur eine Bande zu erkennen, die dem aufgereinigtem E2F-1 entspricht (hier nicht gezeigt). Es sind im Bereich zwischen 260 und 300 kDa zwei und bei ca. 120 kDa eine weitere zum Kontrollbereich differenzielle Banden sichtbar (s. Pfeile in Abb.14). Die Größe der in diesen Banden befindlichen Proteine lassen auf multimeren Komplexe verschiedener Proteine schließen.

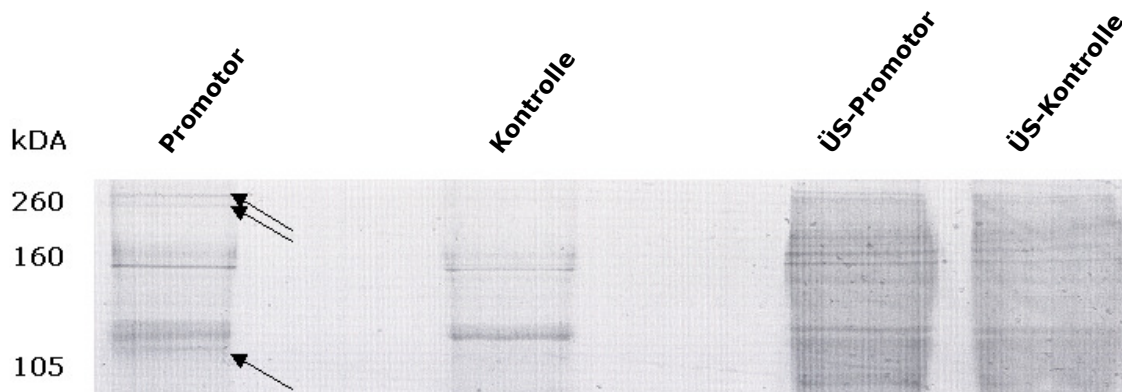


Abb.14 Ausschnitt des gefärbten Gels, das zur massenspektrometrischen Analyse ausgewählt wurde. Es sind drei differenzielle Banden sichtbar (Pfeile), die sich im Bereich 260-300 kDa bzw. 120 kDa befinden. Zum Vergleich sind die Proteinreste (ÜS= Überstand, der Promotor/Kontroll-Aufreinigung) aus dem aufgereinigten KE mitaufgetragen.

Die Schwäche der einzelnen Banden erklärt sich durch eine zu geringe Anreicherung an Proteinen oder aber durch nur in sehr geringer Menge vorhandenes Protein, für welches die verwendete Menge Kernextrakt nicht ausreichte. Das gesamte SDS-Page Gel wurde an das ZMBH (Dr.T.Ruppert, Zentrum für Medizin und Biologie in Heidelberg) geschickt, um mittels Massenspektrometrie die Proteine, die sich als differenzielle Banden darstellen ließen, zu identifizieren.

Aufgrund der zu geringen Proteinmenge in den einzelnen Banden war es allerdings nicht möglich, auf einzelne Proteine rückzuschliessen. Eine Wiederholung mit größeren Proteinmengen konnte im Laufe dieser Promotion nicht mehr durchgeführt werden.

4.3 Eine Mutation der CT1-Box beeinträchtigt nicht die Aktivierung von *MYCN* durch E2F-1

Aus Vorarbeiten von PD Dr. W. Lutz ist bekannt, dass der *MYCN*-Promoter je zwei CT- bzw. GC-Boxen aufweist, die insgesamt vier potentielle Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren SP1 und Sp3 ergeben. Ebenso wie der Transkriptionsfaktor E2F-1, der ein bekannter Aktivator des *MYCN*-Gens ist (Strieder und Lutz, 2003), wurden auch Sp1/Sp3 als Regulatoren dieses Onkogens identifiziert. Darüberhinaus lässt sich eine Interaktion zwischen den beiden Faktoren vermuten, denn Sp1 kann mit E2F-1 kooperieren (Karlseder et al, 1996). Schaut man sich weiterhin die Anordnung der potentiellen Sp1-Bindestellen im *MYCN* Promotor an, so fällt ihr regelmässiger Abstand zueinander von jeweils 23, 25 und nochmals 23bp auf. Ähnliche Wiederholungen in der Basensequenz sind auch aus dem SV40-Promotor bekannt, der ebenfalls GC-Boxen enthält (zum Beispiel Hertz und Mertz, 1986). Diese Regelmäßigkeit flüßaufwärts des Promotors legt die Vermutung nahe, dass die Sp1 Bindungsstellen untereinander oligomerisieren und den Promotorbereich so falten, dass dadurch die E2F-1-Bindestelle räumlich über dem Startbereich des Promotors zum liegen kommt, was so eine Genaktivierung ermöglicht (s.Abb. 15).

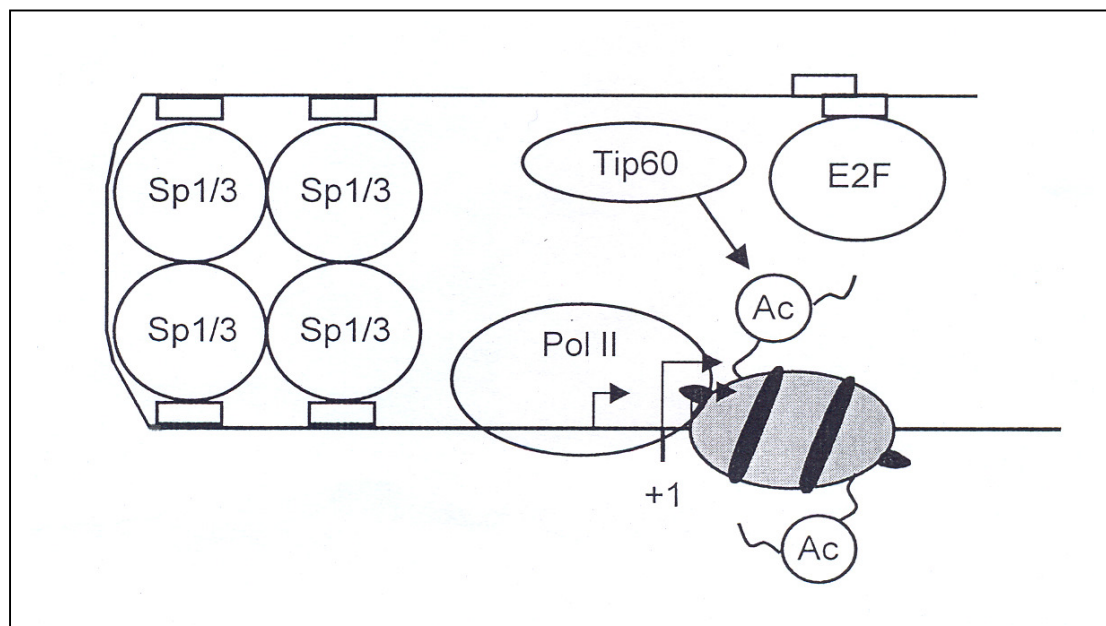


Abb. 15 Schematische Darstellung für eine mögliche Anordnung der Transkriptionsfaktoren E2F und Sp1/3 am aktiven *MYCN*-Promotor in IMR-32 Zellen. Der mit +1 bezeichnete Pfeil markiert die Startstelle des Promotors. Die Kästchen sind die Bindestellen der Transkriptionsfaktoren E2F und Sp1/3. Mit Ac benannte Kreise sind die am aminoterminalen Ende acetylierten Histone H3 und H4. Das dunkel eingefärbte Oval stellt ein mit acetylierten Histonen gekoppeltes Nukleosom.

Diese Hypothese sagt vorher, dass bereits der Verlust einer CT-/GC-Boxen zu einem für die Aktivierung positionierten E2F-1 und somit zu einer Reduzierung der Promotoraktivität führen müsste. Es sollte nun mit Hilfe von Reporter-Experimenten geklärt werden, ob beide Transkriptionsfaktoren aufgrund von Wechselwirkungen untereinander für die transkriptionelle Regulation notwendig sind oder E2F-1 alleine ausreicht. Für drei der vier Sp1-Bindungsstellen lagen bereits entsprechend mutierte Reporterkonstrukte vor (Mutationen der zwei GC-Boxen an Position -59/-64 und -126/-131 und der CT-Box an Position -155/-160).

Ziel dieses Projektes war es, die CT1-Box an Position -94/-99, also die vierte potentielle Sp1-Bindestelle des *MYCN*-Promotors durch eine Punktmutation zu zerstören, so dass der Transkriptionsfaktor Sp1 in diesem Bereich nicht mehr binden konnte.

Für die Bindungsanalyse wurde ein pGL3-Basic Vektor verwendet, der eine 230 bp umfassende *MYCN*-Wildtyp(Wt)-Sequenz beinhaltet. Mit Hilfe des QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis-Kit wurde eine 4 bp umfassende Mutation in den Vektor eingefügt, es entstand das Konstrukt pWt1-mutant. Dabei wurden zwei zueinander komplementäre Primer (WT-1 mutant #1/2) benutzt, in deren Sequenz die Mutation von *MYCN*-Wt: CCCT zu Mutant: AGAG verändert wurde, wodurch gleichzeitig an dieser Stelle eine zusätzliche Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI (TCT AGA) entstand.

Die neue Sequenz wurde mit Hilfe der PCR-Technik auf die Konstrukte übertragen und anschliessend eine DNA präpariert. Positive Klone wurden durch XbaI-Verdau identifiziert (erwartete Fragmente: 1,8 kb bzw. 3 kb) und anschliessend amplifiziert. Maxi-Prep DNA eines positiven Klons wurde isoliert und die korrekte Identität des PCR-Fragments durch Sequenzierung festgestellt. Das Plasmid wurde anschliessend der Arbeitsgruppe Suske für den Reporterassay von Sp1 zur Verfügung gestellt.

Es zeigte sich jedoch, dass eine Mutation der CT1-Box die Aktivierung durch E2F-1 nicht beeinträchtigt. Funktionsverluste der CT2- bzw. GC2-Boxen ergaben eine abgeschwächte Funktion, aber keinen Aktivierungsverlust. Lediglich eine Mutation der GC1-Box an Position -59/-64 führte zum Aktivierungsverlust des *MYCN*-Promotors durch Sp1 (Abb.16).

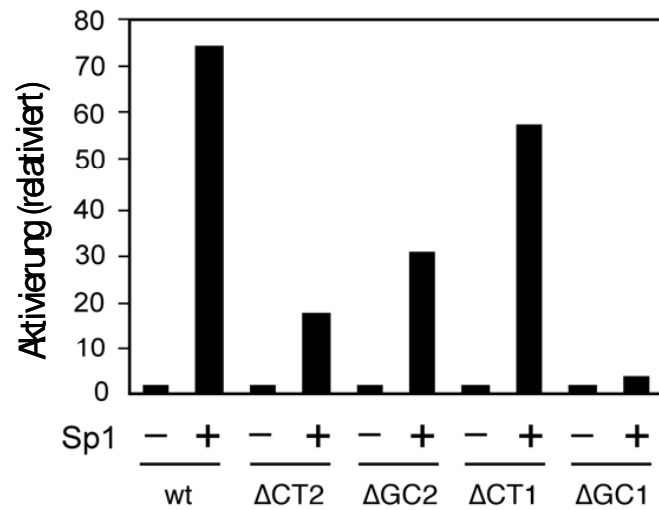


Abb. 16 Sp1 aktiviert den MYCN Promotor. Alle vier Bindestellen beeinflussen die Aktivierung des MYCN Promotors durch Sp1/3. Reporterkonstrukte mit den Punktmutationen in jeder der Sp1/3-Bindestellen wurden in Schneiderzellen mit Sp1 transfiziert. Für jedes Konstrukt wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Die Aktivität in Abwesenheit von Sp1 wurde auf den Wert 1 gesetzt.

Diese Ergebnisse belegen einerseits die Rolle von Sp1 und Sp1-Bindestellen für die MYCN-Expression im Neuroblastom, zeigen aber auch, dass nicht alle Bindungsstellen notwendig sind. Somit findet kein Aufbau einer übergeordneten Promotorstruktur unter simultaner Beteiligung aller vier Bindungsstellen statt.

5 Diskussion

Der Transkriptionsfaktor E2F-1 spielt bei der Einleitung der S-Phase im Zellzyklus (s.1.2) und bei der Auslösung des Programmierten Zelltodes, der Apoptose, eine wichtige Rolle. Daraus ergeben sich einerseits onkogene und andererseits tumorsuppressive Eigenschaften, die im Gegensatz zueinander stehen. Dereguliertes E2F-1, das unter der Kontrolle des Faktors pRb steht, findet sich häufig als onkogenetischer Auslöser in vielen verschiedenen Gewebetypen.

Verena Strieder konnte in ihrer Arbeit zeigen, dass *MYCN* ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors E2F-1 in humanen Neuroblastomzellen darstellt. Daneben führt ein induzierbares E2F-1 in SHEP-1A3-Zellen zur Apoptose (Strieder und Lutz, 2003).

5.1 E2F-1 aktiviert *BMII* direkt im humanen Neuroblastom

In dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor E2F-1 in Neuroblastomen, neben dem bekannten *MYCN* (Strieder und Lutz, 2003) weitere, bisher unbekannte, direkte onkogene Zielgene hat. Darunter befindet sich *BMII* (*BMII* = **B** lymphoma **M**oloney-Murine Leukemia Virus **i**nsertion **r**egion), es gehört zur Gruppe der Polycomb-Proteine (PcG) und wurde zuerst als Onkogen entdeckt, das mit *c-myc* bei der Entstehung von Lymphomen in der Maus kooperiert (Haupt et al., 1991; van Lohuizen et al., 1991). PcG sind Transkriptionsfaktoren, die Komplexe mit hauptsächlich reprimierenden Eigenschaften bilden (Orlando, 2003). Jacobs et al (1999 a, b) konnten außerdem nachweisen, dass die Tumorsuppressoren p16 und p19^{Arf}, die beide durch das Gen *ink4a* kodiert werden (Haber, 1997), in Mausfibroblasten durch *BMII* reprimiert werden, wodurch die Seneszenz blockiert bzw. die Zellen immortalisiert werden. In Kombination mit einem aktivierten H-ras führt dies zu Neoplasien. Diese Fähigkeit ist essenziell für die Selbsterneuerung von hämatopoietischen und neuronalen Stammzellen, als auch von Krebszellen (Bea et al., 2001; Molofsky et al., 2003). Die Deregulation der *ink4a*-Produkte bzw. der beiden Tumorsuppressor-Signalwege p16/ZyklinD/Rb und p19^{Arf}/MDM2/p53 ist eine der häufigsten Ursachen in der Entstehung humaner Tumore (Hall und Peters, 1996). Ausserdem findet sich eine *BMII*-Amplifikation in Mantelzell-Lymphomen und es wird in kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC = non-small cell lung cancer)

(Vonlanthen et al., 2001), Kolorektalkarzinomen (Kim et al., 2004), Mammakarzinomen (Dimri et al., 2001), Myelomen und Medulloblastomen (Bea et al., 2001; DeVos et al., 2002; Molofsky et al., 2003) überexprimiert. Schlussendlich wird BMI1 bei der Transformation von humanen hämatopoetischen Progenitorzellen für das Fusionsprotein E2a-Pbx1 benötigt (Smith et al., 2003).

Der Umstand, dass BMI1 die Tumorsuppressoren p16 und p19^{Arf} reprimiert, lässt die Vermutung zu, dass diese Funktion auch eine zentrale Rolle in der Entstehung von Neuroblastomen spielt (s.Abb. 15). Es ist bekannt, dass *MYCN* Neuroblastomzellen für einen apoptotischen Stimulus sensitiviert (Lutz et al., 1998; Fulda et al., 1999). Wird die Apoptose jedoch durch BMI1 blockiert, wäre dies eine Erklärung für die Amplifikation von *MYCN* in Neuroblastomen. *MYCN* und *BMI1* sind beides direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors E2F-1 (s.oben) und beide Onkogene verfügen vermutlich über einen positiven Rückkoppelungsmechanismus. *MYCN* kann E2F-1 direkt aktivieren und wird hierüber selber wieder direkt aktiviert (Beier et al., 2000; Leone et al., 2001) (s.Abb. 17). BMI1 reprimiert dagegen den ink4a-Locus, was zur Phosphorylierung von pRb durch CDKs und der Aktivierung von E2F-1 führt (s.Abb. 17). Hierdurch wird der Transkriptionsfaktor E2F-1, der die beiden kooperierenden Onkogene *MYCN* und *BMI1* aktiviert, verstärkt und somit möglicherweise die neoplastischen Eigenschaften des Neuroblastoms bewirkt oder zumindest negativ beeinflusst.

In dem hier verwendeten Zellmodell kommt es trotzdem durch das induzierbare E2F-1-ER zur Apoptose. Diese lässt sich durch einen alternativen p53-unabhängigen Signalweg, der über den Faktor p73 vermittelt wird, erklären. P73 wird in Zellen, ohne funktionierendes p53, direkt von E2F-1 aktiviert (Irwin et al., 2000) und scheint somit in SHEP-1A3 gegenüber der antiapoptotischen Wirkung des *BMI1* zu überwiegen. Der mit p53 verwandte Transkriptionsfaktor p73 ist ein Tumorsuppressor, der in der Lage ist, Zellen, die sich im Übergang von der G₁- in die S-Phase befinden, zu arretieren oder durch Apoptose den Zelltod hervorzurufen. Er ist auf Chromosom 1p36.2-3 lokalisiert (s.1.5.3), einer Region, die in vielen Neuroblastomen verloren geht. Ein Verlust dieser Region und eine Deregulation von E2F-1, die zur indirekten Deaktivierung von p53, durch den negativen Einfluß durch BMI1, führt, könnte somit zu Immortalisierung und neoplastischen Eigenschaften der Neuroblastomzellen führen.

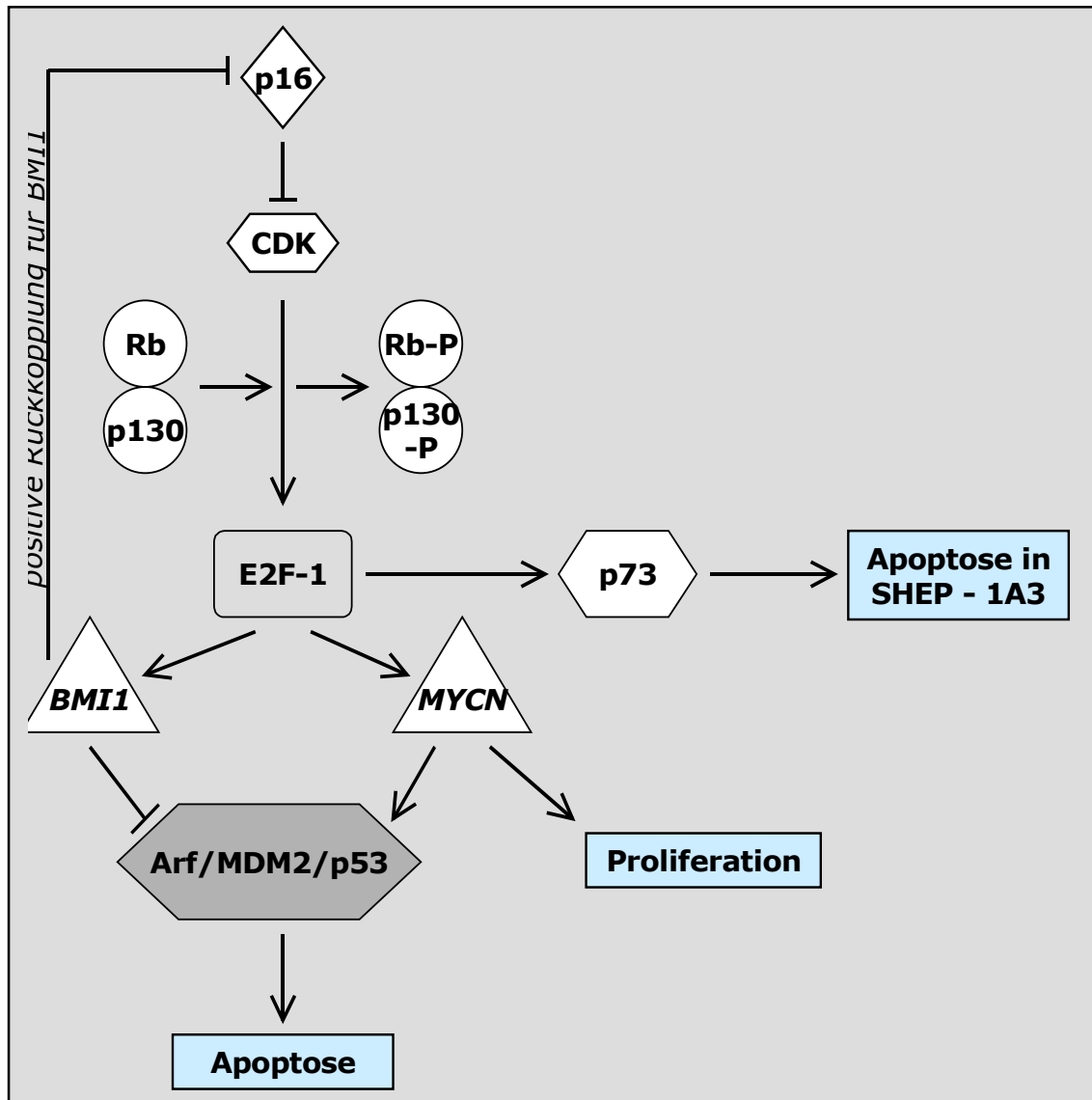


Abb. 17 Modell zu den Funktionen von BMI1 und MYCN im Rb/E2F-1 Signalweg in Neuroblastomen. BMI1 blockiert den Arf/MDM2/p53-Mechanismus, ist in SHEP-1A3 allerdings nicht in der Lage, die durch das E2F-1-ER-konstrukt getriggerte Apoptose zu verhindern. Eine mögliche Erklärung ist ein abweichender Apoptosepfad über p73, ein weiteres Ziel von E2F-1. Es verfügt aber über einen positiven Rückkoppelungsmechanismus, indem es den *ink4a*-Locus reprimiert, was zur Phosphorylierung von pRb durch CDKs und der Aktivierung von E2F-1 führt.

Um die Funktion des Polycomb-Proteins BMI1 im Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktors E2F-1 zu ermitteln kann mittels RNA-Interferenz, dem sog. PTGS (*posttranscriptional gene silencing*) (Fire et al., 1998), *BMI1* gezielt in kultivierten Zellen ausgeschaltet werden. Hierbei wird ein Vektor, der für einen kurzen RNA-Abschnitt, der small interfering RNA (siRNA) kodiert, in die Zellen transfiziert. Die siRNA steht unter Kontrolle eines starken viralen Promotors und kann nun konstitutiv hergestellt werden. Intrazellulär werden nun RNA-Doppelstränge gebildet, die nach ihrer Synthese entwunden und sich dann als komplementäre RNA-Stücke an die endogene mRNA anlagern können. Die so neu entstandenen RNA-Doppelstränge werden durch RNasen inaktiviert und abgebaut. Anschliessend kann der eingetretene Funktionsverlust der spezifischen mRNA analysiert werden, ob z.B. *BMI1* als direktes Zielgen von E2F-1 essentiell für dessen Funktion in Neuroblastomen ist.

Ob die Apoptose in SHEP-1A3 über p73 vermittelt wird ist nicht untersucht worden, kann aber z.B. mittels RT-PCR und quantitativer Analyse der mRNA ermittelt werden.

5.2 Mittels Affinitätschromatographie lassen sich an die *MYCN*-Promotorsequenz bindende Proteine aufreinigen

Wie gezeigt werden konnte wird *MYCN* durch die E2F-Transkriptionsfaktoren beeinflusst. E2F-1 kooperiert dabei mit den Faktoren Sp1/3, sie sind aber alleine nicht ausreichend, um ein transkriptionell inaktives *MYCN* zu aktivieren. In dieser Arbeit konnten Voraussetzungen für eine biochemische Aufreinigung von Faktoren geschaffen werden, die für die Kontrolle von *MYCN* benötigt werden. Mit Hilfe einer DNA-Affinitätsmatrix konnten erfolgreich an die *MYCN*-Gensequenz bindende Proteine dargestellt werden, die in der Menge allerdings nicht ausreichend für eine massenspektrometrische Analyse angereichert werden konnten.

Für eine zu geringe Proteinkonzentration kommen mehrere Ursachen in Betracht. So wird, um unspezifisch an DNA bindende Proteine zu entfernen, Lachssperma-DNA als Kompetitor benutzt, an den diese Proteine binden sollen. Dadurch soll die Reinheit der aufgereinigten spezifischen Faktoren erhöht werden. Die verwendete Lachssperma-DNA kann unter Umständen eine zu grosse Menge an Protein binden. So muss neben der optimalen Menge, die verwendet werden kann, auch der, für die Bindung unspezifischer Proteine beste Grad der Scherung gefunden werden. Der Scherungsgrad

muß, genau wie die Menge, in mehreren Aufreinigungsversuchen ermittelt werden. Hier gilt: je größer die gewonnene Proteinmenge, desto besser sind die zuvor bestimmten Bedingungen. Neben der Lachssperma-DNA wäre aber auch die Verwendung anderer Kompetitoren, wie poly (dI-dC), poly(dA-dT), poly(dG-dC), Kalbsthymus-DNA oder niedrigkonzentriertes Heparin, jeweils einzeln oder in Kombination, denkbar (Kadonaga, 1991). So wurden auch speziell synthetisierte DNA-Kompetitoren verwendet, deren Sequenz sich nur an den entscheidenden Punkten von der interessierenden Sequenz unterschieden und haben erfolgreich hochaufgereinigte Transkriptionsfaktoren geliefert (Kroeger und Abraham, 1997).

Weitere empfindliche Parameter, die Einfluß auf die erfolgreiche Aufreinigung von Transkriptionsfaktoren nehmen, sind u.a. die Bedingungen während der Bindung der Proteine, wie Zeit, Temperatur, pH-Wert und Ionenkonzentration, die unter Umständen variiert werden müssen. So müssen weitere Versuche durchgeführt werden, um die einzelnen Schritte zu optimieren. Eine Kontrolle der jeweiligen Schritte kann mit Hilfe des EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), durch den die Menge ungebundener Proteine im Überstand analysiert wird, überprüft werden.

Natürlich darf neben allen methodischen Ursachen für eine zu geringe Proteinextraktion nicht ausser Betracht gelassen werden, dass es sich bei dem unbekanntem Faktor um ein Protein handeln könnte, welches nur in sehr geringer Menge vorkommt. In dieser Arbeit wurde auf der Basis von Literaturwerten die Annahme zugrunde gelegt, dass die aufzureinigenden Faktoren jeweils ein hunderttausendstel der Menge des Kernextrakts ausmachen und bei der Aufreinigung ein Anteil von knapp 50% dieser Faktoren verloren geht. Unter diesen Annahmen müsste sich eine Menge von etwa 5ng des Proteins ergeben, die mit der Silberfärbung dargestellt werden könnte und ausreichend ist für eine massenspektrometrische Analyse. Ist das Verhältnis des aufzureinigenden Proteins aber geringer müsste der Ansatz dementsprechend vergrößert werden.

Die erfolgreiche Aufreinigung von Proteinen würde dann im weiteren Verlauf die massenspektrometrische Analyse nach sich ziehen. Die anschließende Untersuchung ihrer Funktion hinge davon ab, ob bereits Informationen über ihre biochemische und biologische Funktion vorhanden wären und welche Reagenzien für die Untersuchung dieser Proteine zur Verfügung stünden. In weiteren Schritten würde die Fähigkeit dieser Proteine untersucht alleine oder in Kombination mit E2F-1, ein inaktives *MYCN*-Gen

zu aktivieren. Dazu könnten die in dieser Arbeit verwendeten SHEP-1A3-Zellen verwendet werden.

Die Untersuchung primärer Neuroblastome auf die Expression dieser Proteine, mittels quantitativer RT-PCR, soll eine mögliche Korrelation zwischen der Expression des neuen Gens und der Expression von MYCN ermitteln.

5.3 Ausblick

Viele Medikamente mit zytostatischer Wirkung üben einen Einfluss auf die DNA-Synthese oder den Zellmetabolismus auf enzymatischer Ebene aus. Über den apoptotischen Signalweg führen sie dann zur Rückbildung der Tumore. Diese Möglichkeit der Krebstherapie ist allerdings durch Inaktivierung des apoptotischen Signalweges während der Krebsentwicklung, zum Beispiel durch Verlust von p53 (Levine, 1997), wie er in vielen Krebsarten erfolgt, und einer daraus folgenden Resistenzbildung gefährdet. Dabei handelt es sich meist um proximal gelegene Abschnitte des apoptotischen Signalweges, so dass die weiter distal liegenden Mechanismen funktionell intakt bleiben. Diese Vermutung ergibt sich aus der Beobachtung das sich bei der spontanen Regression eines Tumors, wie sie auch beim Neuroblastom häufig beobachtet werden kann, eine erhöhte Apoptosefrequenz zeigt (Papac, 1990), der eigentliche Signalweg der Apoptose also noch intakt ist.

Es konnte gezeigt werden, dass dem Transkriptionsfaktor E2F-1, durch die Kontrolle der Zellproliferation, als auch der Apoptose, eine besondere Rolle in der Tumorentstehung zukommt (Bell and Ryan, 2004; DeGregori and Johnson, 2006; u.a.). Die Identifizierung von an der Tumorentstehung beteiligter Zielgene von E2F-1 unterstreichen seine Bedeutung und machen ihn zu einem interessanten Ziel bei der Entwicklung wirksamer Medikamenten.

6 Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste solide pädiatrische Tumor außerhalb des ZNS. Eine Amplifikation und Expression des Onkogens *MYCN* im Neuroblastom geht, im Vergleich zu anderen Neuroblastomen, mit einer sehr ungünstigen Prognose einher.

An der Regulierung der *MYCN*-Expression sind Die E2F-Transkriptionsfaktoren beteiligt, die Myc-Proteine können ihrerseits E2F-Gene aktivieren. Neben bereits bekannten E2F-1-Zielgenen konnte das Gen *BMI1* als neues E2F-1-Zielgen identifiziert werden. *BMI1* codiert für ein Protein der Polycomb-Gruppe und besitzt onkogene Eigenschaften.

In einem zweiten Projekt konnten Proteine mit Hilfe einer Affinitätschromatographie angereichert werden, die spezifisch an die *MYCN*-Promotorsequenz binden. Dadurch wurden Voraussetzungen für die Identifizierung und Charakterisierung von möglichen Transkriptionsfaktoren des *MYCN*-Gens geschaffen.

Summary

The neuroblastoma is the most common solid pediatric tumor outside the central nervous system. The amplification and expression of the oncogene *MYCN* in neuroblastoma is associated with a very poor prognosis.

The regulation of the *MYCN* expression is controlled by E2F transcription factors, which can in turn be activated by myc proteins. In addition to previously known E2F-1 activated genes it could be shown that the *BMI-1* gene is also regulated by E2F-1. The Bmi1 protein is a member of the polycomb group of proteins that are known to have oncogenic functions.

In a second project *MYCN* promotor-specific proteins could be enriched by means of affinity chromatography. This provides the basis for future characterisation of possible *MYCN* activating transcription factors.

7 Literaturverzeichnis

Amati, B., Alevizopoulos, K., Vlach, J. (1998) Myc and the cell cycle. *Front Biosci* 3, D250-D268.

Bea, S., Tort, F., Pinyol, M., Puig, X., Hernandez, L., Hernandez, S., Fernandez, P.L., vanLohuizen, M., Colomer, D., Campo, E. (2001) BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur in mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 61, 2409-2412

Beier, R., Burgin, A., Kiermaier, A., Fero, M., Karsunsky, H., Saffrich, R., Morroy, T., Ansorge, W., Roberts, J., Eilers, M. (2000) Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by Myc are genetically separable events. *EMBO J* 19, 5813-5823

Bell, L.A., Ryan, K.M. (2004) Life and death decision by E2F-1. *Cell Death and Differentiation* 11, 137-142

Berthold, F., Hero, B. (2000) Neuroblastoma – Current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs* 59, 1261-1277

Blake, M.C., Azizkhan, J.C. (1989) Transcription Factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 9, 4994-5002

Bown, N., Cotterill, S., Lastowka, M., O'Neil, 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 neuroblastomas. *N Eng J Med* 340, 1954-1961

Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., Weintraub, H., (1990) Sequence-specific DNA-binding complex with myc. *Science* 250, 1149-1151

Bordow, S.B., Norris, M.D., Haber, P.S., Marshall, G.M., Haber, M. (1998) Prognostic significance of *MYCN* oncogene expression in childhood neuroblastoma. *J Clin Oncol* 16, 3286-3294

Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., Eilers, M., (1999) Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J* 27, 5321-5333

Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., Lüscher, B. (2001) Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/ Max/ Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Gen Dev* 15, 2042-2047.

Brodeur, G.M., Green, A.a., Hayes, F.A., Williams, D.L., Tsatis, A.A. (1981) Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res* 41, 4678-4686

Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E., Bishop, J.M. (1984) Amplification of N-myc in untreated neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224, 1121-1124

Brodeur, G.M., Hayes, F.A., Green, A.A., Casper, J.T., Wasson, J., Wallach, S., Seeger, R.C. (1987) Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res* 47, 4248-4253.

Brodeur, G.M. (2003) Neuroblastoma: Biological Insights Into A Clinical Enigma. *Nature Reviews* 3, 203-216

Cain, K., Bratton, S.B., Cohen, G.M. (2002) The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84, 203-214

Carachi, R. (2002) Perspectives on neuroblastomas. *Pediatr Surg Int* 18, 299-305

Caron, H. (1995) Allelic loss of chromosom 1 and additional chromosom 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol* 24, 215-221

Chiang, C.M., Roeder, R.G. (1995) Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267, 531-536

Chodosh, L.A. (1988) Purification of DNA-Binding Proteins Using Biotin/Streptavidin Affinity Systems. *Current Protocols in Molecular Biology*, Unit 12.6.1-12.6.9

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* 5, 141-149

Cohn, S.L., London, W.B., Huang, D., Katzenstein, H.M., Salwen, H.R., Reinhart, T., Madafiglio, J., Marshall, G.M., Norris, M.D., Haber, M. (2000) MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with non-amplified *MYCN*. *J Clin Oncol* 18, 3604-3613

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

Corvi, R., Amler, L.C., Savelyeva, L., Gehring, M., Schwab, M. (1994) *MYCN* is retained in single copy at schromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5523-5527

Courey, A.J., Tjian, R. (1988) Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamin-rich activation motif. *Cell* 55, 887-898

de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R., Leone, G. (2003) Identification and Characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *Jour of Bio Chem* 43, 42041-42049

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

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

DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jaloi, L., Nevins, J.R. (1997) Distinct role for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 7245-7250

Dick, F.A., Dyson, N. (2003) pRB contains an E2F1-specific binding domain that allows E2F1-induced apoptosis to be regulated separately from other E2F activities. *Mol Cell* 12, 639-649.

Dimri, G.P., Martinez, J.L., Jacobs, J.J., Keplusek, P., Itahana, K., van Lohuizen, M., Campisi, J., Wazer, D.E., Band, V. (2002) The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 62, 4736-4745

Dou, Q.P., Levin, A.H., Zhao, S., Pardee, A.B. (1993) Cyclin E and cyclin A as candidates for the restriction point protein. *Cancer Res* 7, 1493-1497

Dynan, W.S., Tjian, R. (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35, 79-87

Dyson, N. (1998) The Regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 699-703

Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K.R., Bishop, J.M. (1989) Chimeras of myc oncogene and steroid receptors cause hormone-independent transformation of cells. *Nature* 340, 66-68

Evans, A.E., D'Angio, G.J., Randolph, J. (1971) A proposed staging for children with neuroblastoma. *Cancer* 27, 374-378

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

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 744-745

Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M., Dryja, T.P. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643-646

Frolov, M.V., Dyson, N.J. (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *Journal of Cell Sci* 117, 2173-2181

Fulda, S., Lutz, W., Schwab, M., Debatin, K.M. (1999) MycN sensitizes neuroblastoma cells for drug-induced apoptosis. *Oncogene* 18, 1479-1486

Furukuwa, Y., Nishimura, N., Satoh, M., Endo, H., Iwase, S., Yamada, H., Matsuda, M., Kano, Y., Nakamura, M. (2002) Apaf-1 is a mediator of E2F-1 induced apoptosis. *J Biol Chem* 277, 39760-39768

Gabrielsen, O.S., Huet, J. (1993) Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor. *Methods Enzymol* 218, 508-525

Gadgil, H., Jurado, L.A., Jarett, H.W. (2001) DNA Affinity Chromatography of Transcription Factors. *Anal Biochem* 290, 147-178

Galaktionov, K., Chen, X., Beach, D. (1996) Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 382, 511-577

Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., Eisenmann, R.N. (2000) The MYC/MYD/MAX network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-699

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* 18, 4948-4957

Haber, D.A. (1997) Splicing into senescence: the curious case of p16 and p19^{Arf}. *Cell* 91, 555-558

Hagen, G., Müller, S., Beato, M., Suske, G. (1992) Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acid Res* 20, 5519-5525

Hagen, G., Müller, S., Beato, M., Suske, G. (1994) Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J* 13, 3843-3851

Hall, M., Peters, G. (1996) Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 68, 67-108

Hann, S.R., Eisenmann, R.N. (1984) Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol* 4, 2486-2497

Hannon, G.J., Beach, D. (2000) p15^{INK4b} is a potential effector of cell cycle arrest mediated. *Nature* 371, 257-261

Harbour, J.W., Lou, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98, 859-869

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

Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, C.L., Swindell, E., et al (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinase p21. *Mol Biol Cell* 6, 387-

Haupt, Y., Alexander, W.S., Barry, G., Klinken, S.P., Adams, J.M. (1991) Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphogenesis in E μ -myc transgenic mice. *Cell* 65, 753-763

Hengst, L., Reed, S.I. (1998) Inhibitors of the Cip/Kip Family. *Curr Top Microbiol Immunol* 227, 25-41

Henriksson, M., Lüscher, B., (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 68, 109-182.

Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J.F., Obaya, A.J., O'Connell, B.C., Mateyak, M.K., Tam, W., Kohlhuber, F., Dang, C.V., Sedivy, J.M., Eick, D., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (2000) Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 2229-2234

Hernando, E., Nahle, Z., Juan, G., Diaz-Rodriguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benzra, R. et al. (2004) Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature*, 430, 797–802

Hertz, G.Z., Mertz, J.E. (1986) Bidirectional promoter elements of simian virus 40 are required for efficient replication of the viral DNA. *Mol Cell Biol* 6, 3513-3522

Eick, D., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (2000) Identification of CDK4 as a target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 2229-2234

Hsiao, K.M., McMahon, S.L., Farnham, P.J. (1994) Multiple DNA elements are required for the growth regulation of the mouse E2F-1 promoter. *Genes Dev* 8, 1526-1537

Hsieh, J.-K., Fredersdorf, S., Kouzarides, T., Martin, K. and Lu, X. (1997) E2F-1 induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. *Genes Dev* 11, 1840-1852

Hurlin, P.J., Steingrimmson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Eisenmann, R.N. (1999) Mag, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. EMBO J 18, 7019-7028

Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., Kaelin, Jr. W.G. (2000) Role for the p53 homologue p73 in E2F-1 induced apoptosis. Nature 407, 645-648

Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., Nevins, J.R. (2001) Role for E2F in Control of Both DNA Replication and Mitotic Functions as Revealed from DNA Microarray Analysis. Mol Cell Biol 21, 4684-4699

Jacobs, J.J.L., Kieboom, K., Marino, S., DePino, R.A., Lohuizen, A. van (1999a) The oncogene and Polycomb group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. Nature 397, 164-168

Jones, R.M., Branda, J., Johnston, K.A., Polymenis, M., Gadd, M., Rustgi, A., Callanan, L., Schmidt, E.V. (1996) An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is target for activation by c-myc. Mol Cell Biol 16, 4754-4764

Kaczynski, J., Cook, T., Urrutia, R. (2003) Sp1- and Kruppel-like transcription factors. Genome Biol 4, 206

Kadonaga, J.T. (1991) Purification of Sequence-Specific Binding Proteins by DNA Affinity Chromatography. Methods Enzymol 208, 10-28

Kato, G.J., Barrett, J., V, Villa-Garcia, M., Dang, C.V. (1990) An amino-terminal c-myc domain required for neoplastoc transformation activates transcription. Mol Cell Biol 10, 5914-5920

Karlseder, J., Rothender, H., Wintersberger, E. (1996) Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcriptionfactor E2F. Mol Cell Biol 16, 1659-1667

Karn, G.J., Barrett, J., Villa-Garcia, M., Dang, C.V. (1990) An amino-terminal c-Myc domain requires for neoplastic transformation activates transcription. *Mol Cell Biol* 10, 5914-5920

Kim, J.H., Yoon, S.Y., Kim, C.N., Moon, S.K., Choe, I.S., Choe, Y.K., Kim, J.W., (2004) The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Lett* 203, 217-224

Kingsley, J., Winoto, A. (1992) Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 muligene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12, 4251-4261

Kovesdi, I., Reichel, R., Nevins, J.R. (1986) Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* 45, 219-228

Kretzner, L., Blackwood, E.D., Eisenmann, R.N. (1992) The Myc and Max proeteins possess distinct transcriptional activities. *Nature* 359, 426-429

Kroeger, K.M., Abraham, L.J. (1997) Magnetic bead purification of specific transcription factors using mutant competitor oligonucleotide. *Anal Biochem* 250, 127-129

Lee, M.H., Reynisdottir, I., Massague, J. (1995) Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domaine structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9, 639-649

Leone, G., De Gregori, J., Yan, Z., Jakoi, L., Ishida, S., Williams, R.S. and Nevins, J.R. (1998) E2F3 activity is regulated during the cell cycle andisrequires for the induction of S phase *Genes Dev* 12, 2120- 2130

Leone, G., Nuckolls, F., Ishida, S., Adams, M., Sears, R., Jakoi, L., Miron, A., R. Nevins, J.R. (2000) Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol Cel Biol* 20, 3626-3632

Levine, A. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331

Lissy, N.A., Davis, P.K., Erwin, M., Kaelin Jr.W.G. (2000) A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death by TCR activation. *Nature* 407, 642-645

Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G., Evan, G.I. (1995) A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acid Res* 10, 1686-1690

van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijn, B., Wiebtjens, E., van der Gulden, H., Berns, A. (1991) Identification of cooperating oncogenes in E μ -myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 735-752

Look, A.T., Hayes, F.A., Nitschke, R., McWilliams, N.B., Green, A.A. (1984) Cellular DNA contents as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 311, 231-235

Look, A.T. et al (1991) Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 9, 581-591

Lukas, J., Aagaard, L., Strauss, M., Bartek, J. (1995) Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control. *Cancer Res* 21, 4818-4823

Lundberg, A.S. and Weinberg, R.A. (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*, 18, 753-761

Lutz, W. and Schwab, M. (1997) In vivo regulation of single copy and amplified N-myc in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 15, 303-15

Lutz, W., Fulda, S., Jeremias, I., Debatin, K.M., Schwab, M. (1998) MycN and IFN γ cooperate in apoptosis in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 17, 339-346

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

McMahon, S.B., Wood, M.A., Cole, M.D. (2000) The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* 20, 556-562

Marhin, W.W., Chen, S., Facchini, L.M., Fornace, A.J. Jr., Penn, L.Z., (1997). Myc represses the growth arrest gene gadd45. *Oncogene* 14, 2825-2834.

Maris, J.M., (1996) Familial predisposition to neuroblastoma does not map to chromosome band 1p36. *Cancer Res* 65, 3421-3425

Maris, J.M., Weiss, M.J., Mosse, Y., Hii, G., Guo, C., White, P.S., Hogarty, M.D., Mirensky, T., Brodeur, G.M., Rebbeck, T.R., Urbanek, M., Shusterman, S. (2002) Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Res* 62, 6651-6658

Mason, G.A., Hart-Mercer, J., Miller, E.J., Strang, L.B., Wynne, N.A. (1957) Adrenaline secreting neuroblastoma in infant. *Lancet* 2, 322-325

Molofsky, A.V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.K., Clarke, M.F., Morrison, S.J. (2003) Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425, 962-967

Moroni, M.C., Hickman, E.S., Denchi E.L., Carpara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H., Helin, K. (2001) Apaf-1 is a transcriptional target of E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3, 552-558

Müller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., Helin, K. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation and apoptosis. *Genes Dev* 15, 267-285

Nevins, J.R. (2001) The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* 10, 699-703

Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M., Nakatani, Y. (2002) A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296, 1132-1136

Ohtani, K., DeGregori, J., Nevins, J.R. (1995) Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 12146-12150

Orlando, V. (2003) Polycomb, epigenomes, and control of cell identity. *Cell* 112, 599-606

Papac, R.J. (1990) Spontaneous regression of cancer. *Conn Med* 54, 179-182

Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 71, 1286-1290

Pardee, A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-608

Pearson, S.B., Eichele, H.P., Wang, T.S. (1991) Human DNA polymerase α gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol Cell Biol* 11, 2081-2095

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

Phillips, A.C., Stewarts, S., Ryan, K.M., Helin, K., Vousden, K.H. (1997) Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1. *Genes Dev* 11, 1853-1863

Pines, J. (1993) Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trend Biochem Sci* 18, 195-197

Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument, B.H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., Massague, J. (1994) Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78, 59-66

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* 65, 395-407

Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A., Dynlacht, B.D. (2002) E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G₂/M checkpoints. *Genes Dev* 16, 245-256

Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, Massague, J. (1995) Kip/Cip and INK4 CDK inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β . *Genes Dev* 9, 1831-1845

Schulze, A., Zerfas, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Berges, J., Helin, K., Jansen-Dürr, P., Hengelein, B. (1995) Cell-cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11264-11268

Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F. Brodeur, G.M., Goldstein, M., Trent, J. (1983) Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogenes is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor. *Nature* 305, 245-248

Schwab, M., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Grzeschik, K.H., Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Brodeur, G.M., Trent, J. (1984a) Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 308, 288-291

Schwab, M., Ellison, J., Busch, M., Rosenau, W., Varmus, H.E., Bishop, J.M. (1984b) Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 4940-4944

Sears, R., Ohtani, K., Nevins, J.R. (1997) Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 Gene in response to cell growth signals. *Mol Cell Biol* 17, 5227-5235

Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Sather, H. (1985) Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313, 1111-1116

Sherr, C.J. (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-555

Sherr, C.J. (1996) Cancer Cell Cycles. *Science* 274, 1672-1677

Sherr, C.J., Roberts, J.M. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149-1163

Smith, K.S., Chanda, S.K., Lingbeek, M., Ross, D.T., Botstein, D., van Lohuizen, M., Cleary, M.L. (2003) Bmi-1 regulation ofINK4A-ARF is a downstream requirement for transformation of hematopoietic progenitors by E2a-Pbx1. *Mol Cell*, 12, 393-400

Staller, P., Peukert, K., Seoane, S., Karsunky, H., Möröy, T., Bartek, J., Massague, J., Hänel, F., Eilers, M. (2001) Repression of p15ink4b expression by Myc via association with Miz-1. *Nature Cell Biol* 3, 392-399

Stanele, J., Stiewe, T., Theselin, C.C., Peter, M., Pützer, B.M. (2002) Gene expression changes in response to E2F-1 activation. *Nucleic Acids Res* 30, 1859-1867

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

Strieder, V., Lutz, W. (2003) E2F Proteins Regulate *MYCN* Expression in Neuroblastomas. *J Biol Chem* 278, 2983-2989

Supp, D.M., Witte, D.P., Branford, W.W., Smith, E.P., Potter, S.S. (1996) Sp4, a member of the Sp-family of zinc-finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability and male fertility. *Dev Biol* 176, 284-299

Takeda, O., Homma, C., Maseki, N., Sakurai, M., Kanda, N., Schwab, M., Nakamura, Y., Kaneko, Y. (1994) There may be two tumor suppressor genes on chromosome 1p closely associated with prognosis of neuroblastoma patients. *Oncogene* 17, 30-39

Tanese, N., Saluja, D., Vassallo, M.F., Chen, J.L., Admon, A. (1996) Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: HtafIII130 and hTAFIII100. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13611-13616

Timarchi, J.M., Fairchild, B., Verona, R., Moberg, K., Amdon, N., Lees, J.A. (1998) E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2850-2855

Timarchi, J.M., Fairchild, B., Wen, J., Lees, J.A. (2001) The E2F-6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing Polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 1519-1524

Tweddle, D.A., Pearson, A.D.J., Haber, M., Norris, M.D., Xue, C., Flemming, C., Lunec, J. (2003) The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Letters* 197, 93-98

Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., Bishop, J.M. (1982) Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* 42, 773-779

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36, 131-149

Vermeulen, K., Berneman, Z.N., Van Bockstaele, D.R. (2003) Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 36, 165-167

Vigo, E., Müller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C., Helin, K. (1999) CDC25A Phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-Induced S- Phase. *Mol Cell Biol* 19, 6379-6395

Virchow, R. (1864) Hyperplasie der Zirbeldrüse und der Nebenniere. Die krankhaften Geschwulste, 65

Vonlanthen, S., Heighway, J., Altermatt, H.J., Gugger, M., Kappeler, A., Borner, M.M., van Lohuizen, M., Betticher, D.C. (2001) The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br J Cancer* 84, 1372-1376

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

Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330

Weiss, M.J., Guo, C., Shusterman, S., Hii, G., Mirensky, T.L., White, P.S., Hogarty, M.D., Rebbeck, T.R., Teare, D., Urbanek, M., Brodeur, G.M., Maris, J.M. (2000) Localization of a hereditary neuroblastoma predisposition gene to 16p12-13. *Med Pediatr Oncol* 35, 526-530

White, P.S., Maris, J.M., Beltinger, C., Sulman, E., Marshall, H.N., Fujimori, M., Kaufmann, B.A., Biegel, J.A., Allen, C., Hilliard, C. et al (1995) A region of consistent deletion in neuroblastoma maps with human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 5520-5524

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., Matise, T.C., Gregory, S.G., Reynolds, C.P., Brodeur, G.M. (2001) Detailed molecular analysis of 1p36 in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 36, 37-41

Wright, J.H. (1910) Neurocytoma or neuroblastoma, a kind of tumor not generally recognized. *J Exp Med* 12, 556-561

Wu, X., Levine, A.J. (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 3602-3606

Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D., 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* 12, 2424-2433

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
α -	anti-
1A3	Klon einer humanen Neuroblastomzelllinie mit E2F-1-ER Konstrukt
BB	Bindepuffer
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	circa
Cdk	Cyclin Dependent Kinase (Zyclinabhängige Kinase)
cDNA	copy DNA
CDI	Cdk Inhibitor
ChiP	Chromatin-Immunpräzipitation
CKI	Cyclin Kinase Inhibitor (Zyclin Kinase Inhibitor)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cy3/cy5	Farbstoff der an cDNA bindet
CycE	ZyclinE
Da	Dalton
DB	Dilutionspuffer
DEPC	Diethylpyrokarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DH5 α	E. coli Klonierungsstamm
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Minimal Essential Medium (Zellkulturmedium)
DMF	N.N-Dimethylformamid

DNA	Deoxyribonucleidacid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EB	Eluationspuffer
ECL	Enhanced Chemilumineszen (verstärkte Chemilumineszenz)
E. coli	Escherichia coli
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay (Gelretardierungsexperiment)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
E2F-1-ER	Fusionsprotein aus dem Transkriptionsfaktor E2F-1 und der hormonbindenden Domäne des Östrogenrezeptors
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
g	Gramm
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	hour (Stunde)
IMR-32	humane Neuroblastomzelllinie mit hoher <i>MYCN</i> -Amplifikation
Ink4	inhibitor of kinase 4
IPTG	Isopropyl-Thiogalactopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium (Wachstumsmedium für E. coli)
MEF	Mausembryofibroblasten
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
Myc	Myelocytomatosis protein
μ	mikro
NaAcetat	Natriumazetat
NES	Nuclear Export Signal (Exportsignal aus dem Zellkern)
NLS	Nuclear Localisation Signal

	(nukleares Lokalisierungssignal)
NP-40	Nonidet P-40
NSE	neuronspezifische Enolase
N-Terminus	Amino-Terminus
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
pRB	Retinoblastoma Protein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodezylphosphat)
sec	Sekunde
SH-EP	humane Neuroblastomzelllinie
siRNA	Small Interference RNA
SV40	Simian Virus
TAE	Tris-Azetat/EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline (Tris gepufferte Salzlösung)
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA (Puffer)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TSA	Trichostatin A
u	unit (Einheit)
UV	ultraviolett

ü.N.	über Nacht
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
XL1blue	E. coli Klonierungsstamm
z.B.	zum Beispiel

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Arnold Aumüller Barth Basler Baum Beato Bertalanffy Bien Cetin Daut Eilers Feuser
Fruhstorfer Gemsa Geus Gotzen Griss Gudermann Happle Hofmann Jungclas Klenk
Klose Koolmann Kretschmer Krieg Kroll Lang Löffler Lohoff Maier Maisch Mennel
Moll Moosdorf Mueller Neubauer Oertel Remschmidt Renz Richter Rothmund Schäfer
Schneider Seitz Seyberth Schmirt Steiniger Suske Röhm Voigt Wagner Weihe Werner
Wolf Wulf