

Identifikation von Ziel-mRNA Molekülen der RNA-Helikase DDX1 in humanen Neuroblastomzellen

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.**

**an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig**

eingereicht von:

Judith Anna Verbeek, geb. am 21.05.1981 in Engelskirchen

angefertigt an:

Selbstständige Abteilung für Pädiatrische Onkologie, Hämatologie und
Hämostaseologie, Universität Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. med. Holger Christiansen

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

24.02.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Bibliographische Beschreibung	Seite	1
2	Abkürzungsverzeichnis		2
3	Einleitung		
3.1	Das Neuroblastom		5
3.1.1	Fakten und Epidemiologie		5
3.1.2	Pathologie		6
3.1.3	Genetik und Molekularbiologie		7
3.1.4	Genetisches Modell der Neuroblastomentwicklung		10
3.1.5	Klinik		11
3.1.6	Diagnostik		12
3.1.7	Stadieneinteilung		14
3.1.8	Prognose		17
3.1.9	Therapie		18
3.2	DEAD-Box Polypeptid 1 (DDX1)		20
3.2.1	DDX1		20
3.2.2	Das Neuroblastom und DDX1		22
4	Zielsetzung der Arbeit		26
5	Materialien		27
5.1	Chemikalien		27
5.2	Antikörper		28
5.3	Längenstandarts		28
5.4	Verbrauchsmaterialien		28
5.5	Gebrauchsmaterialien		29
5.6	Geräte		30
5.7	Sonstige Materialien (für Zellkultur, IP, RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR)		30
5.8	Lösungen/Puffer		31
6	Methoden		35
6.1	Zellkultur		35
6.1.1	Zelllinien		35
6.1.2	Kulturbedingungen		35

6.2	Western Blot	35
6.2.1	Proteinlysate	35
6.2.2	Bradford Assay	36
6.2.3	Diskontinuierliche Gelelektrophorese/SDS-PAGE	37
6.2.4	Western Blot	38
6.2.5	Immunologischer Nachweis der Proteine	39
6.3	Immunopräzipitation	40
6.3.1	Probenvorbereitung	40
6.3.2	Immunopräzipitation	42
6.4	RNA-Isolation und -Konzentrationsbestimmung	44
6.5	Microarray	45
6.6	PCR	48
6.6.1	cDNA-Synthese	48
6.6.2	Prinzip der PCR	49
6.6.3	Durchführung	51
6.6.4	Nachweis der amplifizierten DNA	52
7	Ergebnisse	54
7.1	Western Blot	54
7.2	Immunopräzipitation	55
7.3	Microarray	57
7.4	PCR	60
8	Diskussion	62
9	Zusammenfassung	68
10	Literaturverzeichnis	70
11	Anhang	84
11.1	Primersequenzen	84
11.2	Ausschnitt der Abb. 4 (ATM) im Original	84
12	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	85
13	Danksagung	86

1 Bibliographische Beschreibung

Verbeek, Judith Anna

Identifikation von Ziel-mRNA Molekülen der RNA-Helikase DDX1 in humanen Neuroblastomzellen

Universität Leipzig, Dissertation

88 Seiten, 127 Literaturangaben, 7 Abbildungen, 1 Tabelle

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakraniell gelegene solide Tumor der pädiatrischen Onkologie. Der Verlauf der Erkrankung geht von spontaner Regression oder Differenzierung bis hin zu tödlich verlaufenden Erkrankungen. Die Mortalität von Patienten mit Tumoren in fortgeschrittenen Stadien ist immer noch sehr hoch. Die aggressivsten Tumoren sind die, die eine Amplifikation des Protoonkogens *MYCN* aufweisen. Eine Untergruppe dieser *MYCN* amplifizierten Tumoren weist eine Coamplifikation von *DDX1* auf. Die Prognose dieser Patienten ist besser als die mit allein *MYCN* amplifizierten Tumoren, wenn auch immer noch schlechter als die von Patienten ohne *MYCN* Amplifikation.

Das *DDX1*-Protein ist eine putative RNA-Helikase. Über seine genaue Funktion ist noch nicht viel bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, potentielle Ziel-mRNAs von *DDX1* zu identifizieren, um einen besseren Einblick in die Funktionen von *DDX1* und mögliche Wege der Beeinflussung von Tumorverhalten und Prognose zu erhalten.

Hierzu wurden eine *DDX1* amplifizierte und eine nicht amplifizierte Zelllinie in Kultur genommen und eine Immunopräzipitation mit Zelllysaten der beiden Zelllinien durchgeführt – jeweils mit einem spezifischen Antikörper gegen *DDX1* und einem unspezifischen Kontrollantikörper. Die Identifizierung der an *DDX1* gebundenen mRNAs erfolgte mittels Microarray. Validiert wurden einige der im Microarray identifizierten RNAs mittels RT-PCR.

CDK1, ATM und p18 ließen sich als spezifische Ziel-mRNAs von *DDX1* identifizieren.

2 Abkürzungsverzeichnis

APC	Anaphase Promoting Complex
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATM	Ataxia Teleangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
BARD	BRCA1 associated RING domain
BCL	B-Cell Leukemia
BDNF	Brain-derived Neurothropic Factor
BMP	Bone Morphogenic Protein
bp	Basenpaare
BRCA	Breast Cancer Gene
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	complementary- oder copy-DNA
CDC	Cell Division Cycle
CDK	Cyklin Dependet Kinase
CDKN	Cyklin Dependet Kinase Inhibitor
CO ₂	Kohlendioxid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosinintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
DEAD	Asparagin, Glutamin, Alanin, Asparagin
DDX1	DEAD-Box Polypeptid 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetale Bovine Serum
G1/2-Phase	Gap1/2-Phase
HCl	Salzsäure
hnRNA	Heterogene nukleäre Ribonukleinsäure
hnRNP	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein

H ₂ O	Wasser
HVA	Homovanillic acid/Homovanillinmandelsäure
IDRF	Image defined Risc Factor
IMT	Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
INPC	International Neuroblastoma Pathology Committee
INRGSS	International Neuroblastoma Risc Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IP	Immunopräzipitation
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LDH	Lactatdehydrogenase
LOH	Loss of heterozygosity/Verlust der Heterozygotie
MIBG	Metajodobenzylguanidin
mRNA	messenger-RNA
mRNP	mRNA-Protein-Komplex
M-Phase	Mitose-Phase
MPF	Mitose Promoting Factor
MYC	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
NaCl	Natriumchlorid
NAG	Neuroblastoma amplified gene
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGF	Nerve growth factor
NME	Protein expressed in nonmetastatic cells
NSE	Neuronen spezifische Enolase
NT3	Neurotrophin-3
NTP	Nukleosidtriphosphat
OMS	Opsoklonus Myoklonus Syndrom
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerasekettenreaktion
PI	Proteaseinhibitor
PIAS	Protein Inhibitor of activated STAT1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S-Phase	Synthese-Phase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris acetate EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline – Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamid
TRK	Tyrosin Rezeptor Kinase
tRNA	transfer-RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	Ultraviolett
VIP	Vasointestinales Peptid
VMA	Vanillylmandelic Acid/Vanillinmandelsäure

3 Einleitung

3.1 Das Neuroblastom

3.1.1 Fakten und Epidemiologie

Bei dem Neuroblastom handelt es sich um einen embryonalen Tumor neuroektodermalen Ursprungs, der aus peripheren sympathischen Ganglienzellen hervorgeht. Auftreten kann er überall dort, wo sich sympathische Ganglienzellen befinden – im Nebennierenmark und den paravertebralen abdominellen und thorakalen Ganglien (Shimada et al. 1999a). Erstmals beschrieben wurde das Neuroblastom 1864 durch Virchow (Nieder et al. 1991).

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakraniell gelegene solide Tumor der Kindheit und macht 7 – 10% aller kindlichen Neoplasien aus, womit es nach Leukämien und Hirntumoren das dritthäufigste Tumorleiden bei Kindern – bei Säuglingen sogar das häufigste – ist (Gurney et al. 1997, Brodeur, 2003). In Deutschland beträgt die Inzidenz von Neuroblastomen und Ganglioneuroblastomen 1,2 Fälle/Jahr/100.000 Kindern unter 15 Jahren, die Prävalenz beträgt ca. 126 Fällen jährlich (Kinderkrebsregister).

Bei dem Neuroblastom handelt es sich um eine Erkrankung vor allem des Säuglings und des Kleinkindes. 36% der Erkrankungen betreffen Säuglinge, 89% werden vor dem 5., 98% der Erkrankungen vor dem 10. Lebensjahr diagnostiziert (Brodeur et al. 2006). Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt ~18 Monate (Brodeur, 2003). Eine geschlechtsgebundene Disposition der Erkrankung konnte bislang nicht nachgewiesen werden, allerdings erkranken mehr Jungen als Mädchen (m:w = 1,1:1). Es gibt bisher keine Hinweise auf Umwelteinflüsse, die das Entstehen von Neuroblastomen begünstigen (Brodeur et al. 2006).

Der klinische Verlauf von an Neuroblastom erkrankten Kindern ist sehr variabel – er geht von spontaner Regression des Tumors auch bei schon metastasierten Tumoren bei Säuglingen, über Reifung des Tumors hin zu benignen Ganglioneuromen, bis hin zu hochmalignem, aggressivem Tumorwachstum, welches nur schlecht auf intensive multimodale Therapie anspricht (Brodeur, 2003). Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die

Prognose von Kindern unter einem Jahr auch bei schon metastasierten Tumoren besser ist, als die von älteren Kindern (s. auch 3.1.8) (Brodeur et al. 2006).

3.1.2 Pathologie

Das Neuroblastom zählt zu der Gruppe der „kleinen, runden, blauen Tumoren“ zu denen auch andere Neoplasien des Kindesalters wie das Ewing Sarkom, das Non-Hodgkin Lymphom, periphere primitive neuroektodermale Tumoren und undifferenzierte Weichteilsarkome wie das Rhabdomyosarkom zählen (Brodeur et al. 2006).

Abhängig von der histologischen Differenzierung kann man drei neuroblastomartige Tumoren unterscheiden – das undifferenzierte Neuroblastom, das Ganglioneuroblastom und das ausgereifte, benigne Ganglioneurom. Die histopathologische Einteilung in diese Gruppen wird mit Hilfe der Shimada Klassifikation von 1984 und der auf dieser basierenden International Neuroblastoma Pathology Committee/INPC-Klassifikation von 1999 durchgeführt. Berücksichtigt werden bei der Einteilung neben dem Grad der Differenzierung der Neuroblasten und dem Vorhandensein von Schwann-Stroma, auch der Mitose-Karyorrhexis-Index, welcher angibt, wie viele Zellen sich in Mitose und Karyorrhexis befinden, Kalzifizierung des Tumors und das Alter des Patienten. Hierüber lassen sich die Tumoren in prognostisch günstige, bzw. ungünstige Gruppen einteilen (Shimada et al. 1999a und 1999b).

Mikroskopische neuroblastische Knoten, so genannte „Neuroblastome in situ“ konnten gehäuft bei Autopsien von Säuglingen nachgewiesen werden, die jünger als 3 Monate waren und aus anderen Gründen, das heißt nicht am Neuroblastom, verstarben (Beckwith et al. 1963). Weiterhin zeigte sich, dass sich neuroblastische Knoten bei jedem Föten während der adrenalen Entwicklung bilden, sich jedoch normalerweise bis zur Geburt zurückbilden, woraus geschlossen werden kann, dass sie einen Teil der normalen adrenalen Entwicklung ausmachen (Turkel et al. 1974, Ikeda et al. 1981). Nicht genau geklärt ist, ob es sich bei den klinisch auffällig werdenden Neuroblastomen um Überbleibsel dieser Knoten oder um Neubildungen handelt (Brodeur, 2003).

3.1.3 Genetik und Molekularbiologie

Veranlagung

Eine hereditäre Prädisposition für die Entwicklung eines Neuroblastoms ist selten und eine positive Familienanamnese besteht nur in 1-2% der Fälle (Maris et al. 1999 und 2002). Der Vererbungsgang in diesen Fällen ist autosomal dominant (Knudson et al. 1972). Bei Genanalysen von Patienten mit hereditärem Neuroblastom zeigte sich ein Prädispositionslokus auf dem Chromosom 16p12-13, wobei jedoch wahrscheinlich eine genetische Heterogenität besteht und mehrere Prädispositionsloki vorhanden sind (Maris et al. 2002). Bei familiären Neuroblastomen beträgt das mediane Alter bei Diagnosestellung ~9 im Gegensatz zu sonst ~18 Monaten, bei mindestens 20% der Patienten mit familiärem Neuroblastom tritt der Primärtumor bilateral adrenal oder multifokal auf (Knudson et al. 1972, Maris et al. 2002, Brodeur et al. 2006).

DNA-Polyploidie des Tumors

Der DNA Gehalt einer normalen Zellen ist diploid. Die meisten Neuroblastome haben einen diploiden, einige aber auch einen hyperdiploiden oder annähernd triploiden Karyotyp. Ein hyperdiploider oder annähernd triploider Karyotyp kommt meist bei Kindern unter einem Jahr mit niedrigen Tumorstadien und guter Prognose vor (Look et al. 1984, Kaneko et al. 1987). Bei Kindern über 1-2 Jahre verliert die DNA-Polyploidie an prognostischer Vorraussagekraft (Look et al. 1991), was daran liegen könnte, dass hyperdiploide und annähernd triploide Tumoren bei Säuglingen meist Zugewinne von vollständigen Chromosomen ohne strukturelle Veränderungen aufweisen, während die hinzugewonnenen Chromosomen bei älteren Kindern meist mehrere strukturelle Veränderungen zeigen (Brodeur, 2003).

Amplifikation des Protoonkogens *MYCN*

Das Protoonkogen *MYCN* liegt auf dem Chromosom 2p24 und ist Mitglied der *MYC* Familie. *MYC* Onkoproteine sind Transkriptionsfaktoren, die bei Überexpression zu unreguliertem Wachstum und Proliferation von Zellen führen können (Brodeur, 2003).

Ungefähr 25% der Neuroblastome zeigen eine Amplifikation des *MYCN*-Gens (Kaneko et al. 2007). Die Amplifikation von *MYCN* ist einer der bedeutendsten Faktoren in der Prognosebestimmung von Kindern mit Neuroblastom. Die Amplifikation korreliert eng mit fortgeschrittenem Tumorstadium, aggressivem Tumorwachstum und schlechter Prognose (Brodeur et al. 1986, Schwab et al. 1994). So zeigen in Stadium 1 und 2 nur 4% der Tumoren eine Amplifikation von *MYCN*, in Stadium 4S 8%, in den Stadien 3 und 4 dagegen sind 31% der Tumoren *MYCN* amplifiziert (Brodeur, 2003). Die Amplifikation ist eine biologische Eigenheit einer Untergruppe aggressiver Neuroblastome. Tumoren, die bei Diagnosestellung keine Amplifikation von *MYCN* zeigen, entwickeln diese auch im weiteren Verlauf nicht (Brodeur et al. 1987, Brodeur, 2003).

Die Anzahl der Kopien von *MYCN* korreliert mit der Proteinexpression von *MYCN* – in *MYCN* amplifizierten Zellen liegt mehr *MYCN* Protein vor als in nicht amplifizierten (Nakagawara et al. 1992, Brodeur et al. 2006). Das *MYCN* Protein wird auch in einigen nicht *MYCN* amplifizierten Tumoren überexprimiert, wobei fragwürdig ist, ob die Überexpression in diesen Fällen prognostische Relevanz hat (Nakagawara et al. 1992, Wada et al. 1993).

Chromosomenaberrationen

Chromosomenaberrationen sind Veränderungen in der Struktur und/oder Anzahl von Chromosomen. Beim Neuroblastom kommen einige Chromosomenaberrationen gehäuft vor, welche den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil bieten:

Bei über der Hälfte aller Neuroblastome zeigt sich ein Zugewinn von genetischem Material vom langen Arm des Chromosoms 17 (17q). Assoziiert ist dieser Zugewinn mit fortgeschrittenen Tumorstadien, Alter der Patienten über einem Jahr, Amplifikation von *MYCN*, zytogenetischer Deletion von Chromosom 1p (Christiansen et al. 1988) und molekularem Verlust von Heterozygotie (LOH) in Chromosom 1p (s.u.), welche alle prognostische Faktoren für einen ungünstigen Verlauf darstellen (Bown et al. 1999). Welche Gene bei dem Zugewinn dieses Chromosomenmaterials hierbei den Wachstumsvorteil ermöglichen ist noch nicht geklärt, diskutiert wird jedoch eine Überexpression von Survivin, welches proapoptotische

Proteine inhibiert und von NME1 und NME2, welche eine kritische Rolle in der Synthese von NTPs spielen (Islam et al. 2000, Godfried et al. 2002).

25-35% der Tumoren weisen einen Verlust von genetischem Material, eine Deletion, auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 auf. Dies nennt man einen LOH (Loss of Heterozygosity/Verlust der Heterozygotie) (Gehring et al. 1995, White et al. 2005). Immer betroffen ist die Region 1p36.2-1p36.3 (White et al. 1995). LOH von 1p kommt meist in Tumoren mit fortgeschrittenen Stadien vor und ist assoziiert mit Amplifikation von *MYCN* - wie diese ist es ein prognostisch ungünstiger Faktor (Maris et al. 1995, Brodeur 2003). Die unabhängige prognostische Signifikanz einer Deletion von 1p ist noch nicht ganz geklärt. Deletion von 1p36, auf welchem mindestens ein Tumorsuppressorgen liegt (Gehring et al. 1995, White et al. 2005, 62-64, Brodeur, 2003), scheint jedoch für ein erhöhtes Rezidivrisiko bei lokalisierten Tumoren zu sprechen (Maris et al. 2000).

Andere häufig vorkommenden Deletionen betreffen die Chromosomen 11q, 14q, 2q, 9p und 18q. Dies spricht für die Existenz weiterer Tumorsuppressorgene an diesen Orten (Takita et al. 1997).

Neurotrophin-Rezeptoren und ihre Liganden

Die Faktoren, welche die maligne Transformation von sympathischen Neuroblasten zu Neuroblastomzellen regulieren, sind noch nicht vollständig geklärt. Es scheinen Neurotrophin-Rezeptor-Signaltransduktionswege involviert zu sein, welche Zellen das Signal geben sich zu differenzieren. Die wichtigsten Liganden für die drei Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, B und C sind der Nerve Growth Factor (NGF), der Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) und Neurotrophin-3 (NT3) (Brodeur, 2003).

Aktivierung von TrkA durch NGF führt zum Überleben und zur Differenzierung der Zelle, während Inhibition der Aktivierung zu Apoptose führt. Hohe Expression von TrkA korreliert mit niedrigem Alter der Patienten, niedrigem Tumorstadium, fehlender Amplifikation von *MYCN* und einer günstigen Prognose (Nakagawara et al. 1993, Suzuki et al. 1993). Dies spricht dafür, dass der TrkA/NGF Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle bei Differenzierung oder Regression in einer Gruppe von Neuroblastomen spielt (Suzuki et al. 1993, Brodeur 2003).

Zusammen mit TrkA wird häufig TrkC bei niedrigen Tumorstadien gefunden, die nicht *MYCN* amplifiziert sind und eine günstige Prognose aufweisen (Yamashiro et al. 1996, Ryden et al. 1996, Brodeur et al. 2006).

Im Gegensatz zu TrkA und TrkC ist eine hohe Expression von TrkB mit aggressiven Tumoren und Amplifikation von *MYCN* assoziiert. Tumoren die TrkB exprimieren, exprimieren oft auch den TrkB Liganden BDNF. Hierüber könnten sie einen auto- oder parakrinen Weg aktivieren, welcher den Zellen Überlebens- und Wachstumsvorteile bietet (Nakagawara et al. 1994, Matsumoto et al. 1995) - zudem scheint die Aktivierung des TrkB/BDNF Signaltransduktionswegs zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu führen (Ho et al. 2002, Jaboin et al. 2003).

3.1.4 Genetisches Modell der Neuroblastomentwicklung

Anhand der genannten genetischen Merkmale lassen sich mindestens zwei Neuroblastomtypen definieren, welche mit dem klinischen Verhalten der Tumoren korrelieren. Es ist möglich, dass alle Neuroblastome eine einzige gemeinsame Mutation haben, sich aber schnell nach der Transformation in Tumorzellen in eine der beiden Richtungen entwickeln (Brodeur, 2003).

Der erste Typ ist durch mitotische Dysfunktion charakterisiert, welche zu einem hyperdiploiden oder annähernd triploiden Karyotyp führt, sonst jedoch kaum weitere genetische Veränderungen aufweist. Dieser Tumortyp exprimiert TrkA, wodurch es in Abhängigkeit vom Vorhandensein von NGF zur Differenzierung oder zum programmierten Zelltod kommt. Die Patienten sind meist jünger als ein Jahr mit lokalisierten Tumoren der Stadien 1, 2 und 4S, die eine gute Prognose aufweisen. Die 3-Jahres-Überlebensrate beträgt ~95% (Brodeur, 2003, Brodeur et al. 2006).

Der zweite Typ, welcher sich noch einmal in 2 Untergruppen unterteilt, ist durch Chromosomenaberrationen gekennzeichnet und weist einen annähernd diploiden Karyotyp auf. Er exprimiert TrkB zusammen mit BDNF und zeigt einen Zugewinn von 17q. Die erste der beiden Untergruppen zeigt Deletionen von 11q und 14q, jedoch keine Amplifikation von *MYCN* und kein 1p LOH. Sie betrifft zumeist Patienten, die älter als ein Jahr sind und Tumoren in den fortgeschrittenen Stadien 3 und 4 haben. Die Krankheit ist langsam progredient und die 3-Jahres-Überlebensrate beträgt nur 50%. Die

zweite Untergruppe charakterisiert sich über Amplifikation von *MYCN* und 1p LOH. Dies sind die aggressivsten Tumoren, die Patienten sind meist zwischen 1 und 5 Jahre alt mit fortgeschrittenen Tumorstadien (3 und 4) und zeigen einen rasch progredienten Krankheitsverlauf, der meist letal endet – die 3-Jahres-Überlebensrate beträgt hier nur 25% (Brodeur, 2003, Brodeur et al. 2006).

3.1.5 Klinik

Die Klinik des Neuroblastoms ist sehr variabel. Sie ist abhängig von der Lokalisation des Primärtumors sowie eventueller Metastasen. Zudem kommen Allgemeinsymptome wie Gedeihstörung, Anämie, unklares Fieber und Knochenschmerzen vor – dies zumeist bei disseminierter Erkrankung (Brodeur et al. 2006).

Bei abdominellen Tumoren fällt initial häufig eine palpable feste Resistenz auf, zudem können Völlegefühl, Unwohlsein und Obstruktion des Darmes und der ableitenden Harnwege auftreten. Seltener kommt es über Kompression der Nierenarterien zu renaler Hypertonie. Venöse Kompression sowie Kompression von Lymphgefäßen können zu peripheren Ödemen führen. Große Lebermetastasen können – vor allem bei Säuglingen – wie auch thorakale Tumoren, zu Dyspnoe führen (Brodeur et al. 2006).

Thorakale Tumoren sind häufig Zufallsbefunde bei Röntgenaufnahmen. Hohe intrathorakale und cervikale Tumoren können zu einem Stau der Vena cava superior führen und ein Horner-Syndrom auslösen, welches bei Diagnosestellung bei 15-20% der cervikalen Tumoren besteht (AWMF Leitlinie 2011, Brodeur et al. 2006).

Paraspinale Tumoren können durch die Foramina intervertebralia in den Spinalkanal einwachsen und somit durch Kompression von Nervenwurzeln und Rückenmark zu Parästhesien, Paraplegie, Blasen- und Mastdarmlähmung führen (Brodeur et al. 2006).

Obwohl das Neuroblastom ein Katecholamine produzierender Tumor ist, sind hormonbedingte Symptome wie Hypertonie, Tachykardie, Flush und Schwitzen selten (Brodeur et al. 2006).

Metastasierung tritt sowohl hämatogen wie auch lymphogen auf. Bei circa 50% der Patienten liegt bei Diagnosestellung bereits eine Metastasierung

vor. Hämatogene Metastasierung betrifft häufig Knochen und Knochenmark – wodurch es zu Knochenschmerzen und Knochenmarksinsuffizienz kommen kann – und Leber und Haut. Häufig finden sich retroorbitale Metastasen, welche mit typischen periorbitalen Ekchymosen und Protrusio bulbi einhergehen. Selten sind pulmonale und intrakranielle Metastasen. Intrakranielle Metastasen sind prognostisch ungünstig und treten meist bei Rezidiven oder Tumorprogression, nur selten bereits bei Diagnosestellung auf (AWMF Leitlinie 2011, Brodeur et al. 2006).

2-4% der Patienten mit Neuroblastom zeigen ein Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS). Dies ist ein paraneoplastisches Syndrom, bei dem es zu schnellen Augenbewegungen, Ataxie und Myoklonie kommt. Ein weiteres paraneoplastisches Syndrom, welches bei Neuroblastompatienten auftreten kann, ist das Vasoaktive-Intestinale-Protein- (VIP-) Syndrom mit wässriger Diarrhoe. Beide Syndrome treten vor allem bei Tumoren mit günstiger Prognose auf und bessern sich nach Tumorresektion – beim OMS kommt es jedoch in 70-80% der Fälle zu bleibenden neurologischen Defiziten und Entwicklungsretardierung (Kaplan et al. 1980, Mitchell et al. 2002, Brodeur et al. 2006).

Die unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbilder und Lokalisationen des Neuroblastoms lassen differenzialdiagnostisch an viele andere Neoplasien, wie z.B. Rhabdomyosarkom, Ewing-Sarkom, Wilms-Tumor und Lymphome, aber auch an nicht neoplastische Erkrankungen, wie z.B. primäre Lebererkrankungen bei Lebermetastasen, rheumatisches Fieber oder Osteomyelitis bei Knochenschmerzen und an neurologische Grunderkrankungen bei neurologischen Ausfällen als Ursache für die Symptome denken (Brodeur et al. 2006).

3.1.6 Diagnostik

Folgende Untersuchungen werden zur Diagnosestellung bei Verdacht auf ein Neuroblastom und zur Stadienbestimmung, sowie zur Verlaufskontrolle durchgeführt:

Labordiagnostik

Als Tumormarker des Neuroblastoms dienen die Katecholamin-Metabolite Homovanillinmandelsäure (HVA) und Vanillinmandelsäure (VMA). Da das

Neuroblastom ein Katecholamine produzierender Tumor ist, sind diese in 90-95% der Fälle erhöht. Sie lassen sich in Serum und Urin nachweisen und sind gute Verlaufsparemeter (Niemeyer, 2004).

Zudem bestimmt wird die neuronenspezifische Enolase (NSE) im Serum, ein zytoplasmatisches Protein neuronaler Zellen – erhöhte Werte bei fortgeschrittener Krankheit sind prognostisch ungünstig. Neuroblastom unspezifisch sind die Laktatdehydrogenase (LDH) und das Ferritin im Serum. Sie sind jedoch häufig bei großer Tumormasse und/oder schnellem Tumorzunahme erhöht und können als Verlaufsparemeter herangezogen werden (Brodeur, 2003).

Histopathologische und molekularbiologische Diagnostik

Für die histopathologische und die molekularbiologische Diagnostik wird immer eine Tumorbioptie durchgeführt. Diese sollte offen und nicht nadelbioptisch durchgeführt werden, um genügend Tumormaterial für alle Untersuchungen zu erhalten. Histopathologisch erfolgt die Einteilung in die INPC Klassifikation und die Bestimmung des Mitose-Karyorrhexis-Index, molekularbiologisch die Untersuchung auf Amplifikation von *MYCN* und Chromosomenaberrationen. Eine eindeutige Histopathologie ist beweisend für die Diagnose (Brodeur et al. 1993).

Knochenmarksdiagnostik

Um eine Knochenmarksinfiltration sicher auszuschließen, sind tumorfremde Knochenmarkszytologie und -immunzytologie von mindestens 4 verschiedenen Entnahmestellen notwendig. Die Knochenmarksinfiltration zusammen mit erhöhten Katecholamin-Metaboliten im Urin ist neben der eindeutigen Histopathologie des Primärtumors beweisend für ein Neuroblastom (Brodeur et al. 1993, Neuroblastomstudie NB2004).

Bildgebende Diagnostik

Um Ausbreitung des Primärtumors, Infiltration in die direkte Umgebung sowie Metastasierung zu diagnostizieren werden Sonographie und Röntgenaufnahmen, MRT und Szintigraphie mit ¹²³Jod-Metajodobenzylguanidin (MIBG) eingesetzt. ¹²³J-MIBG wird von 90-95% der Neuroblastome aufgenommen. Der Uptake ist spezifisch für Tumoren des sympathischen Nervensystems. Bei negativem ¹²³J-MIBG Scan

können ein Scan mit 111-In-Octreotide, einem Somatostatin-Analogon, sowie eine Knochenszintigraphie mit 99m-Technetium durchgeführt werden (AWMF Leitlinie 2011, Rubello et al. 2002, Howman-Giles et al. 2007).

Screeninguntersuchung

Von Screeninguntersuchungen auf ein Neuroblastom wird abgesehen, da sich in mehreren Studien in gescreenten Populationen zwar eine höhere Prävalenz des Neuroblastoms verglichen mit nicht gescreenten Populationen zeigte, sich jedoch keine Abnahme in der Mortalität fand. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass die zusätzlich diagnostizierten Tumoren fast ausschließlich bei Kindern unter 12 Monaten gefunden wurden und alle prognostisch günstige molekularbiologische Merkmale aufwiesen, sodass sie sich vermutlich auch ohne Therapie spontan zurückgebildet oder differenziert hätten. Aggressive Tumoren und Tumoren bei Kindern über einem Jahr wurden nicht vermehrt diagnostiziert (Woods et al. 2002, Schilling et al. 2002, AWMF Leitlinie 2011).

3.1.7 Stadieneinteilung

Das Neuroblastom wird in Deutschland nach dem International Neuroblastoma Staging System (INSS) von 1988 mit Revision von 1993 in verschiedene Stadien eingeteilt. Kriterien für die Einteilung sind sowohl klinische als auch intraoperative und histologische Befunde (Brodeur et al. 1993).

- Stadium 1: Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter Resektion, mit oder ohne mikroskopisch sichtbaren Resttumor, repräsentativer ipsilateraler Lymphknoten mikroskopisch tumorfrei (dem Tumor adhärenente Lymphknoten, welche mit diesem zusammen entfernt werden, dürfen von Tumor befallen sein).
- Stadium 2A: Lokalisierter Tumor mit makroskopisch inkompletter Resektion, repräsentative ipsilaterale nicht adhärenente Lymphknoten mikroskopisch tumorfrei.
- Stadium 2B: Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter oder inkompletter Resektion, ipsilaterale nicht adhärenente Lymphknoten mit Tumorbefall, vergrößerte kontralaterale Lymphknoten mikroskopisch tumorfrei.

- Stadium 3: Irresektabler unilateraler Tumor mit Infiltration über die Mittellinie, mit oder ohne regionalem Lymphknotenbefall oder lokalisierter unilateraler Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall oder Mittellinientumor mit bilateraler Infiltration (irresektabel) oder bilateralem Lymphknotenbefall. (Die Mittellinie ist hierbei definiert als die Wirbelsäule.)
- Stadium 4: Jeder metastasierte Primärtumor mit Metastasierung in periphere Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder andere Organe außer denen, welche Stadium 4S definieren.
- Stadium 4S: Lokalisierter Primärtumor, wie in Stadium 1 und 2 beschrieben, mit auf Leber, Haut und Knochenmark beschränkter Metastasierung. Nur bei Kindern unter 1 Jahr. Nur begrenzte Knochenmarksinfiltration mit <10% Tumorzellen im Ausstrich und negativem MIBG Scan, sonst Stadium 4.

Multifokale Primärtumoren werden abhängig von der größten Tumorausdehnung eingeteilt und ein subskribiertes M hinter das Stadium gesetzt um zu zeigen, dass es sich um einen multifokalen Primärtumor handelt – beispielsweise Stadium 3_M (Brodeur et al. 1993).

Stadium 4S ist ein Sonderstadium, welches nur bei Kindern unter 1 Jahr auftritt und welches trotz Metastasierung eine sehr gute Prognose aufweist. Der Tumor regrediert zu einem späteren Zeitpunkt häufig spontan, ohne dass eine Therapie benötigt wird (Brodeur, 2003). Eine Unterscheidung zum Stadium 4 ist hierbei besonders wichtig, um eine bei Stadium 4 benötigte, bei Stadium 4S jedoch unnötige aggressive Therapie zu vermeiden.

17% der Neuroblastompatienten befinden sich bei Diagnosestellung im Stadium 1, jeweils 16% im Stadium 2 und 3, 44% im Stadium 4 und 7% im Stadium 4S. Wenn man zusätzlich das Alter der Kinder bei Diagnosestellung berücksichtigt kann man feststellen, dass bei Kindern unter einem Jahr 26% im Stadium 1, 22% im Stadium 2, 14% im Stadium 3, 20% im Stadium 4 und 18% im Stadium 4S diagnostiziert werden, bei den Kindern über einem Jahr jeweils 12% im Stadium 1 und 2, 16% im Stadium 3 und 59% im Stadium 4 (Brodeur et al. 2006). Zusammengefasst

werden bei älteren Kindern häufig fortgeschrittene Stadien diagnostiziert, während bei Säuglingen die niedrigen Stadien überwiegen.

Ein neues Stadiensystem von 2008, das International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS), ermöglicht eine präoperative Stadieneinteilung. Die Tumoren werden nicht mehr abhängig von den intraoperativen und histologischen Befunden eingeteilt, sondern bereits nach der präoperativen Bildgebung. Es wurden bildgebenden Risikofaktoren/Image Defined Risk Factors (IDRF) definiert, anhand derer die Tumoren in die Stadien L1/2, M oder MS eingeteilt werden. Der Vorteil hiervon ist, dass während die INSS-Stadien auf der Resektabilität des Tumors basieren und somit Operateur-abhängig stark divergieren können, die INRGSS-Stadien auf bildgebenden präoperativen Befunden basieren und somit Operateur-unabhängig eine größere, auch retrospektive, Vergleichbarkeit ermöglichen.

- Stadium L1: Lokalisierter Tumor in einem Körperkompartiment, der keine Strukturen der IDRF-Liste miteinbezieht.
- Stadium L2: Lokalisierter Tumor mit Einbeziehung von ein oder mehreren Strukturen der IDRF-Liste.
- Stadium M: Jeder Tumor mit Fernmetastasen, außer denen, welche Stadium MS definieren.
- Stadium MS: Tumor mit auf Leber, Haut und Knochenmark beschränkter Metastasierung. Nur bei Kindern < 18 Monate. Nur begrenzte Knochenmarksinfiltration mit <10% Tumorzellen im Ausstrich und negativem MIBG Scan, sonst Stadium M.

Zu den bildgebenden Risikofaktoren zählen z. B. bei einem thorakalem Tumor ein die Aorta oder großen Aortenabgänge umschließender Tumor, sowie ein die Trachea oder die Hauptbronchien komprimierender Tumor, bei einem abdominellen Tumor z. B. ein die Aorta, Vena cava, Truncus coeliacus, Arteria mesenteria superior, die Iliacalgefäße oder den Nierenhilus umschließender Tumor und die Infiltration der Vena porta (Monclair et al. 2009, Brisse et al. 2011).

3.1.8 Prognose

Die Prognose von Neuroblastompatienten hängt von vielen einzelnen klinischen sowie tumorzellspezifischen biologischen Faktoren – wie dem Alter bei Diagnosestellung, dem Tumorstadium, dem Amplifikationsstatus von *MYCN*, der Tumorzellploidie und Histopathologie – ab (s. auch 3.1.1., 3.1.2, 3.1.4).

Die 5-Jahresüberlebensrate von Neuroblastompatienten beträgt insgesamt 79%. Sieht man sich die 5-Jahresüberlebensrate der einzelnen Stadien an, finden sich dort große Unterschiede. Bei Tumoren der Stadien 1 und 2 beträgt sie 95% und im Stadium 3 75%, während sie im Stadium 4 nur noch 30-40% beträgt (AWMF Leitlinie 2005/2011). Im Stadium 4S zeigt sich eine 3-Jahresüberlebensrate von 80% (Brodeur, 2003).

Abhängig von den genannten Faktoren wurden durch die „Children´s Oncology Group“ 3 Risikogruppen definiert. Abhängig von diesen wird die jeweilige Therapie festgelegt (Brodeur, 2003). Die Langzeitüberlebenswahrscheinlichkeit der Patienten der Niedrigrisikogruppe beträgt >95%, die der Hochrisikogruppe nur 30-40% (AWMF-Leitlinie, 2011).

<u>Stadium</u>	<u>Niedriges Risiko</u>	<u>Mittleres Risiko</u>	<u>Hohes Risiko</u>
1	alle Patienten	keiner	keiner
2	alle Patienten, außer denen > 1 Jahr mit Amplifikation von <i>MYCN</i> + ungünstige Histologie	keiner	> 1 Jahr mit Amplifikation von <i>MYCN</i> + ungünstige Histologie
3	keiner	< 1 Jahr, keine Amplifikation von <i>MYCN</i> <u>oder</u> > 1 Jahr, keine Amplifikation von <i>MYCN</i> + günstige Histologie	jeder mit Amplifikation von <i>MYCN</i> <u>oder</u> > 1 Jahr ohne Amplifikation von <i>MYCN</i> + ungünstige Histologie
4	keiner	< 1 Jahr, keine Amplifikation von <i>MYCN</i>	alle Patienten, außer denen < 1 Jahr, keine Amplifikation von <i>MYCN</i>

4S	keine Amplifikation von <i>MYCN</i> , günstige Histologie, DNA-Ploidie > 1	keine Amplifikation von <i>MYCN</i> , ungünstige Histologie, DNA-Ploidie=1	Amplifikation von <i>MYCN</i>
----	--	--	-------------------------------

Basierend auf der neuen INRGSS-Stadieneinteilung wurden durch die „International Neuroblastoma Risk Group“ auch neue Risikogruppen definiert. Eingeteilt wird in 4 Risikogruppen - sehr niedriges, niedriges, mittleres und hohes Risiko. Bei der Einteilung einbezogen werden die INRGSS-Stadien, das Alter der Patienten, Histologie, *MYCN*-Amplifikation, DNA-Ploidie und 11q-Status. Die 5-Jahres-Überlebensraten werden in der Niedrigstrisikogruppe mit >85%, in der Niedrigrisikogruppe mit 75-85%, in der mittleren Risikogruppe mit 50-75% und in der Hochrisikogruppe mit <50% angegeben (Cohn et al. 2009).

3.1.9 Therapie

Die Prognose der einzelnen Patienten divergiert sehr stark (s. 3.1.8). Daher ist auch die Therapie des Neuroblastoms sehr unterschiedlich – sie wird Risikogruppen-abhängig angepasst und geht von reiner Beobachtung, einfacher Tumorresektion oder leichter Induktionschemotherapie bei Patienten mit niedrigem Risiko, bis hin zu intensiver multimodaler Therapie mit Operation, Chemotherapie, Megatherapie mit autologer Stammzelltransplantation, Radiotherapie und Nachbehandlung mit 13cis-Retinsäure bei Hochrisikopatienten (AWMF Leitlinie 2011).

Die Behandlung der Patienten folgt der derzeit in Deutschland laufenden Neuroblastomstudie NB2004 (Neuroblastomstudie NB2004). Die Therapiedauer kann je nach Stadium der Erkrankung bis zu 2 Jahre betragen (AWMF Leitlinie 2011).

Operation

Die Primäroperation dient einerseits dem Gewinn von Tumormaterial für histopathologische und molekularbiologische Untersuchungen, andererseits der Resektion des Primärtumors. Der Tumor sollte nur reseziert werden, wenn dies risikoarm möglich ist, ansonsten ist darauf zu verzichten. Mitresektion von umliegenden Organen ist immer zu vermeiden (AWMF

Leitlinie 2011). Größere Resttumoren sollten nach der Chemotherapie in einer Zweitoperation entfernt werden (Neuroblastomstudie NB2004).

Chemotherapie

Eingesetzte Chemotherapeutika sind Etoposid, Cisplatin, Carboplatin, alkylierende Substanzen wie Melphalan, Cyclophosphamid, Ifosfamid und Dacarbazin, Anthrazykline wie Adriamycin, und Vincaalkaloide wie Vincristin und Vindesin. Sie werden in Kombination in mehreren Zyklen verabreicht, wodurch synergistische Wirkung der Medikamente sowie eine Dosisreduktion der Einzelstoffe und damit verminderte Toxizität erreicht wird (AWMF Leitlinie 2011, Neuroblastomstudie NB2004).

Getestet wird in Deutschland in der Hochrisikogruppe derzeit eine mögliche Prognosebesserung bei zusätzlicher Induktionschemotherapie mit Topotecan (Neuroblastomstudie NB2004). Topotecan ist ein Topoisomerase-I-Inhibitor, dessen Wirksamkeit vor allem in Kombination mit Etoposid und Cyclophosphamid in mehreren Phase I-II Studien nachgewiesen wurde – sowohl bei der initialen Therapie, wie auch bei der Therapie von Rezidiven (Simon et al. 2007).

Als Induktionschemotherapie bei Tumoren im Säuglingsalter kann eine milde Chemotherapie, z.B. mit Vincristin, Adriamycin oder Cyclophosphamid eingesetzt werden (AWMF Leitlinie 2005).

Eine Megatherapie, d.h. eine myeloablative Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation wird bei Hochrisikopatienten nach der radioaktiven MIBG-Therapie durchgeführt (Neuroblastomstudie NB2004).

Radiotherapie

Das Neuroblastom gilt als strahlensensibler Tumor. Bei der Therapie eingesetzt werden sowohl externe Bestrahlung wie auch interne Strahlentherapie mit radioaktivem MIBG. Eingesetzt wird die Radiotherapie zur Zeit bei aktiven Tumorresiduen nach Chemotherapie. Bei MIBG speichernden Tumoren wird an die Chemotherapie eine Strahlentherapie mit ¹³¹J-MIBG angeschlossen, nach der Megatherapie kann zusätzlich oder alternativ extern bestrahlt werden (AWMF Leitlinie 2011, Neuroblastomstudie NB2004).

Konsolidierungstherapie

Angeschlossen an die Therapie der Hochrisikopatienten wird eine Nachbehandlung mit 13-cis-Retinsäure (Neuroblastomstudie NB2004), welche Zelldifferenzierung induziert und Tumorwachstum inhibiert (Sidell, 1982, Abemayor, 1992).

3.2 DEAD-Box Polypeptid 1 (DDX1)

3.2.1 DDX1

DDX1 gehört zu der Familie der DEAD-Box Proteine. Proteine dieser Familie sind ATP-abhängige putative RNA-Helikasen, die durch acht konservierte Aminosäuremotive charakterisiert sind. Ihr Name ist abgeleitet von dem ATP-Hydrolyse Motiv mit der Aminosäuresequenz D(Asp)-E(Glu)-A(Ala)-D(Asp) (Schmid et al. 1992). Erstmals beschrieben wurde die Familie der DEAD-Box Proteine 1989 (Linder et al. 1989). Proteine dieser Familie beeinflussen sämtliche Prozesse in die RNA involviert ist: ihre Transkription, die Weiterverarbeitung (die RNA-Prozessierung) – wie das Spleißen der prä-mRNA, der nukleäre Transport von RNA und ihr Export ins Zytoplasma – die Translation, der Zusammenbau von Spleißosom und Ribosom wie auch die RNA-Degradation (Tanner et al. 2001, Godbout et al. 1993). Über die RNA-Prozessierung sind einige Proteine dieser Familie an zellulärer Proliferation und Tumorgenese (Hashimoto et al. 2001), andere an antiproliferativen Prozessen beteiligt (Klappacher et al. 2002).

Über die Funktion von DDX1 ist bisher erst wenig bekannt.

Godbout et al. zeigten, dass DDX1 am stärksten in noch undifferenzierten Zellen in frühen Entwicklungsstadien exprimiert wird. Je weiter sich Gewebe differenzieren, desto schwächer exprimieren sie DDX1. Besonders stark exprimiert wird DDX1 in fötalen Geweben des zentralen Nervensystems wie Retina, Gehirn und Rückenmark, wo es auch in höher differenzierten Entwicklungsstadien noch vermehrt vorhanden ist. Dies spricht für eine spezifische regulatorische Rolle von DDX1 in sich differenzierenden Zellen und in Geweben neuroektodermalen Ursprungs (Godbout et al. 1993, Godbout et al. 2002).

In nicht amplifizierten Zelllinien ist DDX1 vor allem im Zellkern lokalisiert, während es sich in amplifizierten Zelllinien auch im Zytoplasma befindet. Dies lässt darauf schließen, dass es normalerweise in den nukleären Metabolismus von RNA involviert ist und dass die DDX1-Proteinmenge im Nukleus entweder streng reguliert wird oder dass es in amplifizierten Zelllinien auch an der zytoplasmären RNA-Prozessierung beteiligt ist (Godbout et al. 1998).

Der erste Schritt in der Herstellung von RNA ist die Transkription. DDX1 scheint in die Transkriptionsaktivierung einiger Gene involviert zu sein (Sunden et al. 2007, Ishaq et al. 2009, Tanaka et al. 2009). Zur weiteren RNA-Prozessierung innerhalb des Nukleus gehört das Schneiden und die Polyadenylierung des 3'-Endes der prä-mRNA. DDX1 scheint auch hieran – ebenso wie am späteren RNA-Transport vom Nukleus ins Zytoplasma sowie innerhalb des Zytoplasmas – beteiligt zu sein (Bleoo et al. 2001, Chen et al. 2002, Kanai et al. 2004, Fang et al. 2004).

DDX1 scheint zudem eine Rolle an der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche zu spielen. DDX1 zeigt sowohl RNA-RNA- und RNA-DNA-Helikase-Aktivität wie auch RNase-Aktivität, sodass vermutet wird, dass DDX1 die betroffenen DNA-Abschnitte von komplementär gebundener RNA reinigt, woraufhin DNA-Reparaturmechanismen durchgeführt werden können. Die Antwort von DDX1 auf DNA-Doppelstrangbrüche scheint ATM abhängig zu sein – mit diesem sowie anderen wichtigen an DNA-Reparatur beteiligten Proteinen bildet es an den Stellen der Doppelstrangbrüche Komplexe. Dies ließ sich jedoch nur bei durch ionisierende Strahlung und Behandlung mit Bleomycin, nicht jedoch bei durch UV-Strahlung oder Cisplatin bedingten DNA-Doppelstrangbrüchen nachweisen (Li et al. 2008).

Chen et al. wiesen eine Interaktion von DDX1 mit heterogenem nukleären Ribonukleoprotein K (hnRNP K) nach und zeigten, dass die Helikaseaktivität von DDX1 in vitro nur im Komplex mit hnRNP K vorhanden war, dass DDX1 also von Co-Faktoren abhängig ist (Chen et al. 2002). Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine sind vor allem an der prä-mRNA Prozessierung beteiligt (Kiledjian et al. 1992), sind jedoch auch in die weitere Prozessierung involviert. hnRNP K ist ein multifunktionelles Protein, welches in die Regulation von Transkription, Translation, Transport von RNA und

Signalübertragung involviert ist (Michael et al. 1997, Takimoto et al. 1993, Dreyfuss et al. 1993), als Transkriptionsaktivator fungiert und auch an Translationsinhibition (dem Silencing) von Zelldifferenzierung regulierenden Proteinen beteiligt ist (Michelotti et al. 1996, Ostareck et al. 1997, Ostareck-Lederer et al. 2002). DDX1 könnte über Interaktion mit hnRNP K in diese Prozesse involviert sein.

In seiner Aminosäuresequenz zeigt DDX1 homologe Sequenzen mit hnRNP U (Godboud et al. 1994), welches in die Prozessierung von hnRNA zu mRNA (Kiledijan et al. 1992) und in die Repression der RNA-Elongation durch die RNA Polymerase II involviert ist (Kim et al. 1999). Über die homologe Region mit hnRNP U könnte DDX1 in diese RNA Prozessierungsschritte eingreifen.

Zhang et al. wiesen eine Mitbeteiligung von DDX1 an der angeborenen Immunabwehr nach. Sie zeigten, dass DDX1 an der Identifizierung von viraler RNA und der darauffolgenden Zytokinproduktion beteiligt ist (Zhang et al. 2011).

3.2.2 Das Neuroblastom und DDX1

Amplifikation von *MYCN* in Neuroblastomzellen korreliert eng mit fortgeschrittenem Tumorstadium, aggressivem Tumorwachstum und schlechter klinischer Prognose (s. 3.1.3). Die Größe des *MYCN* Amplikons beträgt zwischen 100 und 1500 kbp (Amler et al. 1989), sodass neben dem *MYCN* Gen angrenzende DNA mitkopiert wird. Diese auf dem *MYCN* Amplikon coamplifizierten Gene könnten den Phänotyp der Tumoren mit beeinflussen (Kaneko et al. 2007).

Mehrere dieser in einem Teil der *MYCN* amplifizierten Tumoren coamplifizierten Gene – darunter *DDX1* – wurden identifiziert. Hierbei zeigte sich, dass die Häufigkeit ihrer Coamplifikation auf dem *MYCN* Amplikon direkt mit ihrer räumlichen Nähe zu *MYCN* auf dem Chromosom 2p24/25 korreliert (Weber et al. 2004).

Die Coamplifikation von *DDX1* mit *MYCN* in Neuroblastom- und Retinoblastomzelllinien wurde erstmals 1993 beschrieben (Godbout et al. 1993). *DDX1*, welches ~400 kbp telomerwärts von *MYCN* auf dem Chromosom 2p24 liegt (Amler et al. 1996), wird in ungefähr 50-70% der

MYCN amplifizierten Tumoren coamplifiziert – eine alleinige Amplifikation von *DDX1* wird nicht beschrieben (Manohar et al. 1995, Squire et al. 1995, George et al. 1997, Weber et al. 2004). In den *DDX1* coamplifizierten Tumoren korreliert die Anzahl der kopierten *DDX1* Gene mit der Menge der *DDX1*- mRNA und des *DDX1*-Proteins (Godbout et al. 1998). George et al. fanden *DDX1* Coamplifikation häufiger in den Tumorstadien 4 und 4s, Weber et. al. und Kaneko et. al. konnten keine Korrelation zwischen *DDX1* Coamplifikation und klinischen Parametern wie Tumorstadium oder Alter bei Diagnosestellung feststellen (Weber et al. 2004, Kaneko et al. 2007). Kaneko et al. beschrieben, dass *DDX1* häufiger in Tumoren mit geringer Kopiezahl des *MYCN*-Gens, d. h. mit weniger als 40 Kopien von *MYCN*, coamplifiziert ist, als in denen mit mehr Kopien (Kaneko et al. 2007).

Versuche, die prognostische Relevanz der Coamplifikation von *DDX1* im Neuroblastom zu bestimmen, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Einige Studien brachten *DDX1* mit einer Prognoseverschlechterung verglichen mit allein *MYCN* amplifizierten Tumoren in Verbindung, jedoch ohne dabei statistische Signifikanz zu erreichen (Squire et al. 1995, George et al. 1997).

Andere fanden keine signifikante Korrelation in der Prognose von Patienten mit oder ohne Coamplifikation von *DDX1* (Manohar et al. 1995, De Preter et al. 2005).

Weber et al. zeigten eine statistisch signifikante Prognoseverbesserung bei Patienten mit *MYCN* amplifizierten Tumoren, welche *DDX1* coamplifiziert waren, gegenüber denen, die nur *MYCN* amplifiziert waren. In ihrer Studie zeigte sich eine 25% 6-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit Amplifikation von *MYCN*, unter Berücksichtigung der Coamplifikation von *DDX1* zeigte sich eine 35% 6-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit *DDX1* coamplifizierten Tumoren, während die der Patienten ohne Coamplifikation von *DDX1* 0% betrug. Vor allem Patienten, bei denen *DDX1* stark exprimiert wurde, zeigten eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit. Während der ersten 24 Monate nach Diagnosestellung zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate der Patienten mit oder ohne Coamplifikation von *DDX1*, sodass diese von besonderem Interesse für die Prognose von Patienten mit

MYCN amplifizierten Tumoren scheint, die die ersten zwei Jahre überlebt haben. Die prognostische Relevanz von *DDX1* erwies sich unabhängig von Alter und Tumorstadium bei Diagnosestellung, sodass Coamplifikation von *DDX1* eine prognostisch günstigere Untergruppe von *MYCN* amplifizierten Tumoren unabhängig von Alter und Tumorstadium definiert. Die Prognose ist allerdings noch immer ungünstiger als die von Patienten mit nicht *MYCN* amplifizierten Tumoren, deren 6-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei ~60% liegt. (Weber et al. 2004).

Eine tendenziell bessere Prognose bei *DDX1* coamplifizierten Tumoren fanden auch Kaneko et al. und Defferrari et al. (Kaneko et al. 2007, Defferrari et al. 2007).

Kaneko et al. stellten eine signifikante Prognosebesserung bei Kindern mit *DDX1* coamplifizierten Tumoren gegenüber denen mit allein *MYCN* amplifizierten Tumoren fest, die über 18 Monate alt waren – allerdings nur dann wenn nicht auch *NAG* (Neuroblastom amplifiziertes Gen) coamplifiziert war. Für Kinder die jünger als 18 Monate waren, fand sich hier, im Gegensatz zu der Studie von Weber et al. bei denen sich die prognostische Relevanz von *DDX1* unabhängig vom Alter bei Diagnosestellung zeigte, kein signifikanter Prognoseunterschied (Kaneko et al. 2007).

Defferrari et al. untersuchten Tumoren mit *MYCN* gain, das heißt Tumoren, die die 2- bis 4-fache Menge an Kopien des *MYCN* Gens aufweisen (Ambros et al. 2001), welches bei 6-8% der Neuroblastome der Fall ist (Valent et al. 2002, Spitz et al. 2004) und wiesen in einem Teil dieser Tumoren eine gleichzeitige Zunahme von *DDX1* nach. Alle Patienten mit *DDX1/MYCN* gain zeigten eine verbesserte Überlebensrate verglichen sowohl mit *MYCN* amplifizierten, wie auch mit nicht *MYCN* amplifizierten Tumoren, allerdings auch häufig unerwünschte Ereignisse. Auf Grund der geringen Fallzahl in dieser Studie wurde keine statistische Signifikanz erreicht, weshalb nur ein Trend zu einer Prognosebesserung angegeben werden konnte (Defferrari et al. 2007).

Obwohl es widersprüchliche Ergebnisse zu der Frage nach der prognostischen Relevanz von Coamplifikation und Überexpression von *DDX1* im Neuroblastom gibt, scheint es nach den Studien von Weber et al., Kaneko et al. und Defferrari et al. doch wahrscheinlich, dass sich eine

Coamplifikation von *DDX1* günstig auf die Prognose auswirken kann. Hiernach definieren *DDX1* coamplifizierte Neuroblastome eine Untergruppe von *MYCN* amplifizierten Neuroblastomen die, unabhängig von klinischen prognostischen Faktoren, zu einer verbesserten Prognose der Patienten im Vergleich zu denen mit allein *MYCN* amplifizierten Tumoren, führt.

Auch für andere Tumoren konnte eine Prognosebesserung bei Amplifikation von *DDX1* nachgewiesen werden. Taunk et al. zeigten in einer Studie an Brustkrebsgewebe eine deutlich bessere Prognose für Patientinnen mit Tumoren mit hohen *DDX1*-Leveln gegenüber denen mit niedrigen Leveln (Taunk et al. 2011).

Eine Möglichkeit des Einflusses auf Tumorwachstum und damit auf die Prognose durch *DDX1* könnte neben einer direkten antiproliferativen Wirkung über eine erhöhte Chemosensibilität von *DDX1* amplifizierten Tumoren gegenüber nicht amplifizierten Tumoren verursacht werden (Weber et al. 2004). Dass Amplifikation von Genen zu einer Sensibilisierung auf Chemotherapie führen kann, weiß man beispielsweise von *MYCN* selbst. Fulda et al. belegten, dass hohe *MYCN* Level Neuroblastomzellen für Therapeutika gesteuerte Apoptose sensitivisieren können (Fulda et al. 2000) – dies könnte auch ein Möglichkeit bei *DDX1* sein (Weber et al. 2004).

4 Zielsetzung der Arbeit

Patienten mit *MYCN* amplifizierten Neuroblastomen, bei denen *DDX1* coamplifiziert vorliegt, haben – verglichen mit Patienten ohne *DDX1* Coamplifikation – eine bessere Prognose.

Über die biologischen Funktionen von *DDX1* ist bisher wenig bekannt. Eine Erklärung für die beschriebene Prognoseverbesserung lässt sich daraus nicht ableiten.

Zielsetzung der Arbeit ist es, spezifische Ziel-mRNAs der RNA-Helikase *DDX1* in humanen Neuroblastomzellen zu identifizieren.

Es soll untersucht werden, ob es spezifische mRNAs gibt, deren Prozessierung durch *DDX1* beeinflusst wird und deren Genprodukte einen möglichen Aufschluss über Änderung im Verhalten der Tumorzellen und dadurch bedingte Prognosebesserung geben können.

5 Materialien

5.1 Chemikalien

Acrylamid 4K-Lösung (30%), Mix 37,5:1	AppliChem, Darmstadt
Agarose: Nusieve® 3:1 Agarose	Cambrex Bio Science, Rockland, ME, USA
Seakem® LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
APS/Ammoniumperoxidisulfat 10%	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G250	Roth, Karlsruhe
DOC/Sodiumdeoxycholate ≥ 97%	Sigma-Aldrich, Seelze
DMSO/Dimethylsulfoxid für die Spektroskopie	Merck, Darmstadt
DTT/DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Seelze
DTT 0,1 M	invitrogen, Karlsruhe
EDTA/Ethylenediaminetetraacetic acid	Sigma-Aldrich, Seelze
Eisessig 100% wasserfrei, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Entwicklungslösung: ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Freiburg
Entwickler: Developer (A+B) G153 for medical film processing, for Curix 60	Agfa, Köln
Ethanol Rotipuran® >99,8%, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethidium Bromide Aquaeous Solution, 10mg/ml (1µl/l H ₂ O eingesetzt)	Sigma-Aldrich, Seelze
Ficoll Type 400	Sigma-Aldrich, Seelze
Fixierer: Rapid Fixer G354 for medical film processing, for Curix 60	Agfa, Köln
Formamide	Sigma-Aldrich, Seelze
Flüssigstickstoff	Westfalen AG, Münster
Formaldehydlösung, min. 35%, reinst	Merck, Darmstadt
Gasgemisch für den Gaskocher: C206D Super Gasgemisch Butan/Propan	Camping-Gaz, Hungen
Glycin Puffersubstanz	Riedel de Haën, Seelze
KH ₂ PO ₄ /Kaliumdihydrogenphosphat z.A.	Merck, Darmstadt
KCl/Kaliumchlorid ≥ 99,5% p.a.	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol, min. 98%	Sigma-Aldrich, Seelze
Methanol zur Analyse	Merck, Darmstadt

NaCl/Natriumchlorid	Riedel de Haën, Seelze
Na ₂ HPO ₄ /di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat z.A.	Merck, Darmstadt
NP-40	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Ortho-Phosphorsäure 85%	Fluka, Neu-Ulm
Salzsäure rauchend 37% pro Analyse	Merck, Darmstadt
SDS/Sodium dodecyl sulfate 20%	AppliChem, Darmstadt
TEMED/Tetramethylethyldiamid p.a.	Roth, Karlsruhe
Tris (hydroxymethyl) aminomethane, +99%	Acros Organics, Geel, Belgien
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
Wasser (H ₂ O): Aqua ad iniectabilia, 10 ml Aqua 1 l	Braun, Melsungen Sigma-Aldrich, Seelze
Xylene cyanole FF	Sigma-Aldrich, Seelze

5.2 Antikörper

β-Tubulin Antikörper MAB 3408, Maus, monoklonal	Chemicon International, Hofheim
CDC2 Antikörper (A17) (ab18), Maus, monoklonal	Biozol, Eching
CDK2 Antikörper (M2): sc163	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
DDX1 Antikörper NB 200-349, Kaninchen	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
p53 Antikörper (AB6) Maus MAB (DO1) (Pantropic)	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Kontrollantikörper IP: rabbit IgG 1 g/l, 15006 unspezifischer Antikörper aus Kaninchen Präimmunsereum	Sigma-Aldrich, Seelze in Arbeitsgruppe vorhanden
ECL anti rabbit IgG, Horseradish-Peroxidase- linked, species specific, whole antibody, from donkey	Amersham Biosciences, Freiburg
ECL anti mouse IgG, Horseradish-Peroxidase- linked, species specific, whole antibody, from sheep	Amersham Biosciences, Freiburg

5.3 Längenstandarts

Precision Plus Kaleidoscope Standarts	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Smart Ladder und Smart Ladder SF (Small Fragments)	Eurogentec, Köln

5.4 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfgefäße, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon pp-test tubes, 15 ml, 50 ml – Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Faltenfilter	Schleicher-Schuell, Düsseldorf
Gel-Blotting-Paper	Schleicher-Schuell, Düsseldorf
Handschuhe: Safe Skin PFE Powder Free Latex Exam Gloves	Kimberly-Clark, Koblenz
Kanülen für 2 ml Spritzen: DB Microlance (TM) 1½" / 0,9 mm x 40 mm	Becton Dickinson, FranklinLakes, NJ, USA
Küvetten ½ Mikro	Ratiolab, Dreieich
Kryoröhrchen: Cryo vials, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Plastikpipetten 5 (bzw. 10 und 25 ml) in 1/10 ml – Cellstar®, für den Pipetboy	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Glaspipetten Pasteur	Hirschmann, Eberstadt
Pipettenspitzen für den Pipetman: ART/ Aerosol Resistant Tips 10 (bzw. 20P, 100E, 1000E)	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
Röntgenfilm: Hyperfilm	Amersham Biosciences, Freiburg
Spritzen: Quadroject Plus 2 ml	Dispomed Witt, Gelnhausen
Luer-Lok 50 ml Plastikpak	Becton Dickinson, FranklinLakes, NJ, USA
Sterile Filter: Millex GS Filter Unit 0,22 µm	Millipore, Bedford, MA, USA
Westernmembran Immobilon(TM)-P(SQ) 0,2 µm Membran (optimized for low MV proteins)	Millipore, Bradford, MA, USA
Zellkratzer: Disposable Cell Scraper, sterile	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten Nunclon Surface 10 bzw. 15 cm Durchmesser	Nunc, Wiesbaden

5.5 Gebrauchsmaterialien

Entwicklungskassette: Cronex® Cassette, 24x30 cm, Quanta III	DuPont, Wilmington, DE, USA
Glasware (Flaschen, Bechergläser, etc.)	Schott, Mainz
Küvette zur RNA-Mengenbestimmung: Black Quartz Typ 40008454 pathlength 10 mm	
PCR Gelkammer 9,5x10 cm	
PCR Laufkammer 10x15 cm	
Pipetboy Pipetus®-akku	Hirschmann, Eberstadt
Pipetman elektronische Pipette P2 (bzw. 10, 20, 100, 200, 1000)	Gibson, Middleton, WI, USA
Rührfische: Magnetrührstäbchen Plastibrand®, PTFE	Brand, Wertheim
Westernappatur: „Mini PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell“ mit Zubehör und „Mini Trans Blot Cell“	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

5.6 Geräte

Autoklav: Variklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Bench: Hera safe	Heraeus, Düsseldorf
Drehschüttler: Reax 2	Heidolph, Schwabach
Eisbereiter: AF10	Scotsman, Vernon Hills, IL, USA
Entwicklungsmaschine: Curix 60	Agfa, Köln
Feinwaage: Explorer® Pro	Ohaus, Giessen
Gaskocher: Labogaz 200	Camping-Gaz, Hungen
Heizblock: Techne DRI Block® DB-3D	Thermo-Dux, Wertheim
Heizblock mit Schüttler: KTMR-133	HLC/Heap Labor Consult, Bovenden
Heiz-/Rührplatte: Ikamag® Ret	Ika, Staufen
PCR Bildentwickler: ImageMaster VDS mit integriertem Fujifilm thermal imaging system FTI-500	Pharmacia, Freiburg
pH-Meter: Ultra Basic UB10 ph/mV Meter	Denver Instrument, Göttingen
Kühlzentrifugen: Biofuge Fresco	Heraeus, Düsseldorf
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.OR	Heraeus, Düsseldorf
Varifuge 3.ORS	Heraeus, Düsseldorf
Mikroskop: Leica DMIL	Leica, Wetzlar
PCR-Maschine: GeneAmp® PCR System 2400	Perkin Elmer, Überlingen
Reinstwasseranlage: Ultraclear	SG Wasseraufbereitung, Barsbüttel
Schüttler: MTS4	Ika, Staufen
Sonifier: Sonopuls HD 2070	Bandelin electronics, Berlin
Sonifizierstab: UW2070	Bandelin electronics, Berlin
Spektrophotometer: Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Stromgerät: Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia, Freiburg
Power Pac 3000	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Waage: PM2000	Mettler-Toledo, Giessen
Wasserbäder: Julabo F12 und 20B	Julabo, Seelbach
Zellkulturinkubator: BBD6220	Heraeus, Düsseldorf

5.7 Sonstige Materialien (für Zellkultur, IP, RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR)

BSA/Bovine Serum Albumin acetylated	Promega, Mannheim und Sigma- Aldrich, Seelze
dNTPs: GeneAmp® dNTPs	Applied BioSystems, Darmstadt

5x first strand buffer	invitrogen, Karlsruhe
Medium RPMI 1640 with L-Glutamine	BioWhittaker(TM), Combrex Bioscience, Verviers, Belgien
10x MoBiTaqK Reactionbuffer	MoBiTec, Göttingen
Oligo (dT) 12-18 Primer	invitrogen, Karlsruhe
Pd(N)6 Random Hexamer	Amersham Biosciences, Freiburg
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Polymerase K, MoBiTaq	MoBiTec, Göttingen
Proteinaseinhibitor-Cocktail, Mammalian	Sigma-Aldrich, Seelze
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Seelze
Protein G Sepharose®	Sigma-Aldrich, Seelze
M-MLV Reverse Transcriptase	invitrogen, Karlsruhe
SuperScript II RNase H-Reverse Transkriptase	invitrogen, Karlsruhe
Rinderserum/Fetal Bovine Serum, Gibco (TM) EU approved	invitrogen, Karlsruhe
RNase AWAY (TM)	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
RNase free DNase	Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor: Recombinant RNasin® Ribonucleaseinhibitor	Promega, Mannheim
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Trypsin/EDTA (10x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Vanadyl-ribonucleosid complexes	Sigma-Aldrich, Seelze
Yeast tRNA	invitrogen, Karlsruhe

Die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-EP waren in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Primer wurden von der Firma Purimex in Grebenstein bezogen.

5.8 Lösungen/Puffer

pH Einstellungen wurden mit 35% HCl, bzw. 1-5 M NaOH durchgeführt.

Wegfrier-Medium:

- 1 ml DMSO
- 6,5 ml Medium (RPMI + 10% FBS + 1% Antibiotika)
- 2,5 ml FBS

10xPBS: pH 7,4

- 80 g NaCl

- 2 g KCl
- 14,4 g Na₂HPO₄
- 2,4 g KH₂PO₄
- ad 1000 ml mit H₂O

1xPBS:

100 ml 10xPBS ad 1000 ml mit H₂O, autoklavieren

NP-40-Lysepuffer:

- 7,5 ml 5 M NaCl
- 2,5 ml NP-40
- 12,5 ml 1 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane
- ad 250 ml mit H₂O

Bradford-Lösung:

- 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250
- 50 ml 95% Ethanol
- 100 ml 85% Ortho-Phosphorsäure
- ad 1000 ml mit H₂O, filtern

3xSDS:

- 60 ml 0,5 M TrisHCl pH 6,8
- 3 ml 0,5 M EDTA
- 1,2 g SDS
- 2,3 g DTT
- 30 mg Bromphenolblau
- 15 ml Glycerol
- ad 100 ml mit H₂O

8% Trenngel:

- 5,568 ml 30% Acrylamid
- 5,22 ml 1,5 M TrisHCl pH 8,8
- 105 µl 20% SDS
- 13,8 µl Temed
- 138 µl 10% APS
- ad 21 ml mit H₂O

4xSammelgelpuffer: pH 6,7

- 30,25 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane
- 2 g SDS
- ad 500 ml mit H₂O

Sammelgel:

- 2,5 ml 4xSammelgelpuffer
- 1,7 ml 30% Acrylamid
- 8 µl Temed
- 300 µl 10% APS
- 5,8 ml H₂O

10xSDS-Laufpuffer: pH 8,3

- 30,28 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane
- 130,14 g Glycin Puffersubstanz
- 10 g SDS
- ad 1000 ml mit H₂O

1xSDS-Laufpuffer

100 ml 10xSDS-Laufpuffer ad 1000 ml mit H₂O

20% Blot-Puffer: pH 8,3

- 100 ml 10xSDS-Laufpuffer
- 200 ml Methanol
- ad 1000 ml mit H₂O

20xTBS: pH 7,6

- 48,4 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane
- 160 g NaCl
- ad 1000 ml mit H₂O

1xTBS:

50 ml 10xTBS ad 1000 ml mit H₂O

Blockmilch:

- 25 g Magermilchpulver
- 25 ml 20xTBS
- 1 ml Tween
- ad 500 ml mit H₂O

TBS-T-Waschpuffer:

- 1000 ml 1xTBS
- 1 ml Tween

RIPA-Puffer:

- 2,5 ml TrisHCl pH 7,5
- 7,5 ml 5 M NaCl
- 2,5 ml NP-40

- 2,5 g DOC
- 2,5 ml 10% SDS
- 500 µl 0,5 M EDTA
- ad 250 ml mit H₂O

50xTAE:

- 242 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane
- 57,1 ml 100% Essigsäure (Eisessig)
- 100 ml 0,5 M EDTA
- ad 1000 ml mit H₂O

1xTAE:

20 ml 50xTAE ad 1000 ml mit H₂O

Agarosegele:

0,75% Gel: 0,75 g Agarose ad 100 ml mit 1xTAE – aufkochen

2,5% Gel: 2,5 g Agarose ad 100 ml mit 1xTAE - aufkochen

3,5% Gel: 3,5 g Agarose ad 100 ml mit 1xTAE - aufkochen

5xDNA-Probenpuffer:

- 7,5 g Ficoll Type 400
- 25 mg Bromphenolblau
- 25 mg Xylene Cyanole FF
- 5 ml 0,5 M EDTA
- ad 50 ml mit 1xTAE

6 Methoden

6.1 Zellkultur

6.1.1 Zelllinien

Für die Versuche wurden zwei humane Neuroblastozelllinien, IMR-32- und SH-EP-Zellen, in Kultur genommen. Die IMR-32-Zellen sind *MYCN* amplifiziert und *DDX1* coamplifiziert, zudem weisen sie eine Deletion auf 1p auf, die SH-EP-Zellen zeigen diese genetischen Veränderungen nicht. Die Zelllinie IMR-32 entstammt ursprünglich einem abdominalen Neuroblastom eines 13 Monate alten Jungen, welches 1967 reseziert wurde. SH-EP ist eine Tochterzelllinie von SK-N-SH, die 1970 gewonnenem Knochenmarksaspirat eines 4-jährigen Mädchens mit thorakalem Neuroblastom und Knochenmarksmetastasen entstammt. Beide Zelllinien setzten sich aus je zwei morphologisch unterschiedlichen Zelltypen zusammen (Tumilowicz et al. 1970, Biedler et al. 1973, Thiele, 1998).

6.1.2 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in Zellkulturplatten mit 10, bzw. 15 cm Durchmesser, mit je 10 bzw. 20 ml RPMI-Medium kultiviert. Dem RPMI-Medium wurden 10% hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum und 1% Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) zugefügt. Die Zellkulturen wurden bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturinkubatoren kultiviert. Gearbeitet wurde mit sterilen Instrumenten unter einer Bench mit Luftabzug.

6.2 Western Blot

Der Nachweis der stärkeren Expression der RNA-Helikase DDX1 auf Proteinebene in IMR-32-Zellen im Vergleich zu SH-EP-Zellen erfolgte mittels Western Blot.

6.2.1 Proteinlysate

IMR-32- und SH-EP-Zellen wurden in Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser) ausplattiert, unter o. g. Bedingungen kultiviert (s. 6.1.2) und bei 80% Konfluenz geerntet. Das Medium wurde abgesaugt, der Zellrasen einmal mit 1xPBS gewaschen, 1 ml Trypsin hinzugegeben und die

Schalen für ca. 5 min in einen Inkubator gegeben, sodass sich die Haftung der Zellen an die Zellkulturschale löste. Nach Lösung der Zellen wurden 8 ml Medium hinzugegeben und mit einer Pipette und dem Medium die Platten 4-mal gespült, sodass eine homogene Lösung der Zellen entstand. Die Lösung wurde in 15 ml Falkonröhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellpellets entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

Zur Zelllyse wurden jeweils 300 µl NP-40-Lysepuffer mit Proteaseinhibitor (PI) (1:1000) zu den auf Eis aufgetauten Zellpellets gegeben, diese homogenisiert und in Eppendorfgefäße überführt. Die Proben wurden 3-mal abwechselnd in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in einem 42°C warmen Wasserbad wieder aufgetaut („Freeze-Thaw“ Methode), dann 15 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden bei 14.000 rpm und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und die Proteinkonzentration darin bestimmt. Die Zelltrümmer wurden verworfen.

6.2.2 Bradford Assay

Der Bradford Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Er beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine bindet und diese Bindung eine Verschiebung des photospektrometrischen Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 zu 595 nm bewirkt. Diese Absorptionzunahme bei 595 nm wird gemessen und ist der Proteinkonzentration annähernd proportional. Der Proteingehalt der Proben wird anhand einer BSA-Referenzkurve ermittelt (Bradford, 1976).

Um die Referenzkurve zu erhalten, wurde die Absorption bei 595 nm im Spektrophotometer von 0, 1, 2, 4, 6 und 8 µl BSA in jeweils 100 µl 0,15 M NaCl und 1 ml Bradford-Lösung gemessen. Danach wurde die Absorption der Proteinlysate in Doppelbestimmung gegen einen Leerwert gemessen, wobei jeweils 1 µl Lysat in eine Küvette zu 100 µl 0,15 M NaCl und 1 ml Bradford-Lösung gegeben wurde. Die Proteinkonzentration konnte anhand der Referenzkurve bestimmt werden.

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die 300 µl Proteinlysate mit 150 µl 3xSDS versetzt bei -20°C eingefroren.

6.2.3 Diskontinuierliche Gelelektrophorese/SDS-PAGE

Die SDS-Gelelektrophorese ermöglicht es Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Die Proteine laufen hierbei durch ein Gel aus stark vernetztem Polyacryl. Natriumdodecylsulfat (SDS) als stark negativ geladenes Detergenz denaturiert die Proteine durch Bindung an ihre hydrophoben Bereiche und lädt sie dadurch negativ auf. Der negativen Ladung wegen wandern sie nun bei Anlegen einer Spannung von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt allein von ihrem Molekulargewicht ab – je kleiner ein Protein ist, desto schneller wandert es durch das Gel (Alberts et al. 2004, Kap. 8).

Die Gelelektrophorese und der Western Blot wurden mit der „Mini PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell“ von Biorad durchgeführt. Zunächst wurden zwei Glasscheiben (10x8,2 cm und 10x7,2 cm) mit Ethanol gereinigt, wobei die größere der beiden Scheiben an den Seiten integrierte Spacer von 1,5 mm enthielt. Die Glasscheiben wurden senkrecht in den Stand zum Gießen der Gele eingesetzt. Die Gele wurden vorsichtig von oben einpipettiert – zunächst möglichst gleichmäßig und blasenfrei das 8% Trenngel bis ca. 0,5 cm unterhalb der Stelle, an die der Probenkamm reichen würde. Das Gel wurde sofort mit Isopropanol überschichtet, um eine waagerechte Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und auf das Trenngel das Sammelgel gegeben. Der Probenkamm (1,5 mm dick) zum Formen der 10 Geltaschen wurde eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, konnte der Kamm vorsichtig entfernt werden und die Glasplatten mit dem Gel in die Elektrophorese-Laufkammer eingesetzt werden. Es konnten jeweils 2 Gele parallel eingesetzt werden. Beim Einsetzen der Platten in die Kammer wurde darauf geachtet, dass die Seiten mit den jeweils kürzeren Glasscheiben einander in der Mitte zugewandt waren. Der Raum zwischen ihnen sowie der Boden der Kammer wurden mit 1xSDS-Laufpuffer gefüllt, sodass die Gele an ihrem Oberrand mit Laufpuffer überschichtet waren und mit ihrem Unterrand im Puffer standen.

Bevor die mit 3xSDS versetzten IMR-32- und SH-EP-Proteinlysate in die Geltaschen einpipettiert wurden, wurden sie 5 min bei 95°C denaturiert. Je nach Proteinkonzentration in den Proben wurden zwischen 7 und 30 µl Lysat eingesetzt. Die spätere Zuordnung der Proteine zu ihrem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe eines Markers (8 µl Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards), der anstelle von Lysat in eine Geltasche gegeben wurde. Kathode und Anode wurden angeschlossen und die Proben bei 35 mA bei einem Gel, bzw. 70 mA bei zwei Gelen, laufen gelassen, bis das im 3xSDS enthaltene Bromphenolblau den Unterrand des Gels erreichte.

6.2.4 Western Blot

Die Immobilisation und Sichtbarmachung der im Gel aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Übertragung ("Blotting") auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. In der Blotkammer wird hierzu eine zur Laufrichtung des Gels senkrechte Spannung angelegt – die Kathode befindet sich hinter dem Gel, die Anode hinter der PVDF-Membran – sodass die Proteine vom Gel auf die Membran wandern. Sie nehmen hierbei auf der Membran dieselbe Position wie zuvor auf dem Gel ein (Towbin et al. 1979).

Das Blotting wurde über wet-transfer mit der Mini-Blot-Apparatur von Bio-Rad durchgeführt. Auf die weiße Seite des Blot-Rahmens wurde ein in 20% Blot-Puffer getränktes Blot-Pad gelegt, darauf kam ein in Blot-Puffer getränktes Gel-Blotting-Papier und darauf die auf die Größe des Gels zugeschnittene PVDF-Membran, die zuvor 1 min in Methanol und 2 min in Wasser getränkt und danach in Blotpuffer gegeben wurde. Auf die Membran kam das von den Glasplatten gelöste Gel, dann wieder ein in Blot-Puffer getränktes Gel-Blotting-Papier und ein Blot-Pad. Zwischen den Schichten durften sich keine Luftblasen befinden, um einen gleichmäßigen Proteintransfer zu gewährleisten. Der Blot-Rahmen wurde geschlossen, in die Blot-Kammer gegeben, ein Kühlakku eingesetzt, die Kammer vollständig mit Blot-Puffer gefüllt und Strom angeschlossen. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei 225 mA für 90 min.

6.2.5 Immunologischer Nachweis der Proteine

Die Sichtbarmachung der Proteine auf der Membran erfolgte durch Markierung mit einem spezifischen Erstantikörper, gegen den wiederum ein Zweitantikörper eingesetzt wurde. Der Zweitantikörper ist an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche zusammen mit einer Reaktionslösung (ECLPlus Detection Reagent) zu einem chemilumineszenten Signal führt, das auf einem Autoradiographiefilm aufgenommen werden kann (Amersham Produktinformation).

Die Membran wurde zunächst 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in Blockmilch inkubiert, um unspezifische Bindungsreaktionen der später eingesetzten Antikörper an die Membran zu verhindern und hierdurch auf dem Film einen besseren Hintergrund ohne unspezifische Bindungen zu erhalten. Danach wurde sie entsprechend der Molekülgröße der zu identifizierenden Proteine (DDX1 ~88 kDa und β -Tubulin ~51 kDa) in Streifen geschnitten und die jeweiligen Streifen über Nacht bei 4°C mit dem in Blockmilch gelösten Erstantikörper in Falcon-Röhrchen rotierend inkubiert. Sowohl die Erst- als auch die Zweitantikörper wurden jeweils im Verhältnis 1:2000 eingesetzt. Als Erstantikörper wurde neben DDX1 β -Tubulin zur Ladekontrolle eingesetzt, da dieses von allen Zellen ähnlich stark exprimiert wird. Die Ladekontrolle diente dem Ausschluss, dass unterschiedlich starke Banden durch unterschiedlich starke Proteinbeladung der Geltaschen verursacht sein könnten. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Membranstreifen 45 min lang rotierend mit TBS-T-Waschpuffer gewaschen, um nicht oder nur lose gebundene Antikörper zu entfernen. Der Waschpuffer wurde dabei regelmäßig gewechselt (nach 5, 10, 25 und 40 min). Nach dem Waschen wurden die Membranstreifen 2 h bei Raumtemperatur rotierend mit dem jeweiligen in Blockmilch gelösten Zweitantikörper inkubiert. Nach der Zweitantikörperinkubation wurden die Membranstreifen wieder wie zuvor 45 min gewaschen, danach wurden sie auf eine mit Ethanol gereinigte Glasplatte gelegt und 5 min lang mit ECLPlus benetzt. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit einem Papiertuch abgesaugt und die Glasplatte in Frischhaltefolie gewickelt. In der Dunkelkammer konnte nun der Film belichtet werden – hierfür wurde er je nach Signalstärke der Banden für 2 sek bis zu 1 min unter Druck in einer

Entwicklungsmappe auf die Membran gelegt und anschließend in den Entwickler gegeben.

6.3 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation (IP) ist eine Methode um Chromatin-Protein, RNA-Protein und Protein-Protein Interaktionen nachzuweisen. Zu Beginn wurden allein DNA-Protein und Protein-Protein Komplexe nachgewiesen, inzwischen wird sie auch für mRNA-Protein-Komplexe (mRNPs) genutzt. Hierzu wurden DNA-Immunopräzipitations-Protokolle abgewandelt (Niranjanakumari et al. 2002, Tenenbaum et al. 2002). Das hier genutzte Protokoll basiert auf den Protokollen von Niranjanakumari et al. von 2002, Tenenbaum et al. von 2002 und Gilbert et al. von 2004. Die IP wurde genutzt um spezifisch nur die an DDX1 gebundenen mRNAs aus den Zelllysaten zu isolieren, um sie dann im Microarray identifizieren zu können.

Das Prinzip der IP beruht darauf, dass mRNP-Komplexe in der Zelle durch reversible Fixierung mit Formaldehyd quervernetzt werden, die Zellen hiernach geerntet und lysiert werden und mit einem spezifischen Antikörper nach den interessierenden Proteinen, hier DDX1, gefischt wird. Die an das Protein gebundene RNA wird dabei mitgezogen. Anschließend kann der an kleine Plastik Kügelchen, sogenannte Beads, gebundene Antikörper mit den gebundenen mRNP-Komplexen abzentrifugiert und von dem restlichen Reaktionsansatz getrennt werden. Die Quervernetzung von Protein und RNA kann durch Hitze gelöst und die RNA isoliert werden. Nach der Isolation kann sie dann in weiteren Versuchen identifiziert werden (Niranjanakumari et al. 2002).

6.3.1 Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung gehört die Zellernte, die Herstellung der Zelllysate und das Sonifizieren der Lysate. Hierbei wird das Chromatin in kleinere Segmente geschert. Der Sonifiziererfolg wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft, wobei das nicht sonifizierte Chromatin in den Geltaschen hängen bleibt, während das sonifizierte sich über einen Bereich von mehreren Kilobasen erstreckt. Gleichzeitig wurden die in den Proben enthaltenen RNA-Konzentrationen gemessen, um sicherzugehen, dass ausreichend RNA für die IP vorhanden war.

Zellernte:

Die auf Zellkulturschalen (15 cm Durchmesser) ausplattierten IMR-32- und SH-EP-Zellen wurden vor der Ernte für 15 min bei Raumtemperatur mit 35% Formaldehyd (1% Endkonzentration) im RPMI-Medium inkubiert, um Protein und RNA aneinander zu binden. Hiernach wurde das Medium entfernt, die Platten 2x mit eiskaltem 1xPBS gewaschen und danach die Zellen in 1 ml eiskaltem 1xPBS mit 1 µl PI und 2,5 µl RNasin®, einem Ribonuklease Inhibitor, geerntet. Die Zellen aus je drei Schalen wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt, bei 1200 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Zelllysate:

Je ein Zellpellet der IMR-32-Zellen und eines der SH-EP-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, pro Falcon 2 ml RIPA-Puffer (mit PI und RNasin®, s. 6.3.2) zugegeben und die Zellen mechanisch durch 10-faches Hoch- und Runterziehen in einer Spritze mit einer 0,9x40 mm Kanüle lysiert, dann 20 min auf Eis inkubiert. Aus jedem Lysat wurden 40 µl zur Gelelektrophorese und 200 µl zur RNA-Isolation entnommen, der Rest wurde 5x15 sek bei 80% mit einem Stab-Sonifizierer geschert. Zwischen den Zyklen wurde je 30 sek pausiert. Zu jeder Zeit - sowohl während des Sonifizierens als auch während der Pausen - befanden sich die Proben auf Eis. Nach dem Sonifizieren wurden die Lysate in Eppendorfgefäße überführt und bei 14.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der die mRNPs enthaltende Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, die Zelltrümmer wurden verworfen. Vom Überstand wurden 40 µl zur Gelelektrophorese - zum Überprüfen des Sonifiziererfolgs - und 200 µl für die Bestimmung der RNA-Konzentration entnommen, der Rest bis zur IP bei -80°C eingefroren.

Für die Agarosegelelektrophorese mussten zunächst Chromatin und RNA aus den Protein-Komplexen gelöst werden. Dies geschah mit Hilfe eines Proteaseverdau im Thermocycler für 3h bei 55°C und über Nacht bei 65°C, wobei zu den 40 µl Lysat jeweils 2 µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzugegeben wurden. Die Agarosegelelektrophorese wurde analog der Beschreibung in Kapitel 6.6.4 durchgeführt, mit Ausnahme davon, dass

0,75% Gele gegossen wurden, breitere Kämme genutzt wurden (1,5 mm) und neben SmartLadder SF (Small Fragments) zur Beurteilung der größeren Fragmente auch SmartLadder als Marker eingesetzt wurde. Das sonifizierte und somit zerkleinerte Chromatin erstreckte sich über einen großen Bereich und blieb nicht wie das nicht sonifizierte Chromatin in den Taschen hängen.

Die RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung aus den 200 µl Lysaten vor und nach dem Sonifizieren wurde, wie mit den 200 µl Input in Kapitel 6.4 beschrieben, durchgeführt.

6.3.2 Immunopräzipitation

Nach dem Nachweis, dass das Chromatin sonifiziert und RNA in den Proben enthalten war, wurde die Immunopräzipitation durchgeführt.

Sämtliche genutzte Lösungen wurden vor dem Gebrauch steril gefiltert und je 1:1000 PI und 1:400 RNasin® hinzugefügt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte fanden, sofern nicht anders vermerkt, über Kopf rotierend bei 4°C statt. Waschschrte bedeuten, dass die Beads 10 min in RIPA-Puffer gewaschen, dann abzentrifugiert, der Puffer abpipettiert und verworfen und die Beads in neuem Puffer aufgenommen wurden. Zentrifugiert wurde für 5 min bei 4°C mit 3000 rpm.

Blocken und Antikörper-Coating/-Beschichtung der Beads:

Die Sepharose-G-Beads wurden 3x in RIPA-Puffer gewaschen und anschließend über Nacht in 5 ml RIPA-Puffer, 200 µl Yeast-tRNA, 284 µl BSA (stock: 100 mg BSA in 5 ml RIPA), PI und RNasin® geblockt. Dann wurden sie abzentrifugiert, in neuem RIPA-Puffer aufgenommen und für die IP-Ansätze und Preclearing-Schritte aufgeteilt. Pro IP wurden 50 µl Beads eingesetzt, für die Preclearing-Schritte je 60 µl. Über Nacht wurden die Beads mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Pro IP wurden 2,5 µg Antikörper eingesetzt (DDX1 bzw. unspezifisches Kaninchen-IgG in der Kontroll-IP), für das Preclearing II 2,5 µg unspezifischer Antikörper aus Kaninchen Präimmenserum. Für das Preclearing I wurde kein Antikörper eingesetzt.

Preclearing:

Im Preclearing I werden unspezifisch an die Beads bindende Proteine und Nukleinsäuren aus dem Lysat gezogen, im Preclearing II unspezifisch an Antikörperstrukturen bindende Proteine und Nukleinsäuren. Hierdurch kommt es zu einem hohen Verlust an RNA, jedoch auch zu einer höheren Spezifität.

Die mRNP-Lysate wurden langsam auf Eis aufgetaut, zu den Beads für das Preclearing I gegeben und eine Stunde inkubiert. Währenddessen wurden die Beads für das Preclearing II zweimal gewaschen und dann auf Eis gestellt. Nach dem Preclearing I wurden die Beads abzentrifugiert und der die mRNPs enthaltende Überstand zu den Beads für das Preclearing II überführt. Es wurde wiederum eine Stunde lang inkubiert, wonach die Beads abzentrifugiert und der Überstand für die IPs genutzt wurde.

Immunopräzipitation:

Die Immunopräzipitation fand über Kopf rotierend 2 Stunden lang bei Raumtemperatur statt.

Der Ansatz für eine IP enthielt neben den schon erwähnten 50 µl Antikörper-beschichteten Beads, die vor der IP 5-mal gewaschen wurden, 100 µl mRNP-Lysat, 1 µl PI, 5 µl RNasin®, 850 µl RIPA, 5 µl Vanadyl Ribonukleosid Komplexe (aus einer 10% Lösung), 10 µl 100 mM DTT, und 30 µl 0,5 M EDTA.

Um ausreichend viel RNA zu erhalten wurden die verschiedenen IP-Ansätze, also IMR-32-Lysat mit DDX1- bzw. Kontroll-Antikörper und SH-EP-Lysat mit DDX1- bzw. Kontroll-Antikörper je zweimal angesetzt, sodass insgesamt 8 IPs angesetzt wurden. Nach der IP wurden die jeweils gleichen Ansätze zusammengeführt.

Neben dem mRNP-Lysat, das in der IP eingesetzt wurde, wurden jeweils weitere 200 µl des Lysats als Input genommen. Diese 200 µl rotierten zusammen mit den IP-Ansätzen. Aus dem Input wurde nach der RNA-Isolation die totale zelluläre RNA-Konzentration gemessen und somit sichergestellt, dass die RNA während der IP nicht zerstört wurde.

Nach der IP wurden die Beads 6-mal mit eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen und danach zur RNA-Isolation in 800 µl RLT-Puffer (Qiagen) aufgenommen (s. 6.4). Analog wurde mit den 200 µl Input verfahren.

6.4 RNA-Isolation und -Konzentrationsbestimmung

Die Formaldehydfixierung der RNA-Protein-Komplexe wurde aufgelöst, indem zu den mit Antikörper und mRNPs gebundenen Beads 800 µl RLT-Puffer mit zusätzlichen 3 µl RNasin® gegeben wurde und die Ansätze bei 35°C für 3¼ h und 65°C für 45 min in einem Heizblock geschüttelt wurden. Zusätzlich wurde gleichzeitig ein Proteinverdau mit 50 µl Proteinase K durchgeführt, sodass sich nach 4 h nur noch Beads und Nucleinsäuren in den Proben befanden. Die Beads wurden bei 3000 rpm und 4°C für 5 min abzentrifugiert und der die Nucleinsäuren enthaltende Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Analog wurde mit dem Input verfahren.

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit's von Qiagen gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Nur im ersten Schritt wurde vom Protokoll abgewichen - es wurden 8 µl β-Mercaptoethanol und 800 µl 70% Ethanol zugefügt, da die RNA sich in 800 µl RLT-Puffer befand. Beim Input, bei dem jeweils 200 µl Input in 800 µl RLT gelöst wurden, wurden 10 µl β-Mercaptoethanol und 1000 µl Ethanol zugefügt.

Der optionale on-column Verdau mit RNase freier DNase wurde für 20 min durchgeführt, die DNase wurde wieder ausgewaschen. Eluiert wurde die RNA abschließend in 40 µl Aqua ad iniectabilia.

Die RNA-Konzentration des Inputs der SH-EP- und IMR-32-Lysate wurde mittels eines Spectrophotometers bestimmt, um sicherzustellen, dass die RNA während der IP nicht zerstört wurde. Um zunächst einen Referenzwert zu erhalten, wurde die mit „RNase Away“ ausgewaschene Quarz-Mikroküvette mit 95 µl Aqua ad iniectabilia gefüllt und im Programm „Nucleic Acid“ -> „RNA“ -> „Pathlength 10 mm“ in der Einheit „ng/µl“ bei einer Verdünnung von 1:20 gemessen. Zu diesen 95 µl wurden nun 5 µl der Proben gegeben, erneut gemessen und der jeweilige Wert gegen den Referenzwert errechnet.

6.5 Microarray

Die in den 1990er Jahren entwickelten DNA-Microarrays oder auch DNA-Chips ermöglichen es in einem Experiment die Genexpression einer Zellart über die in den Zellen vorhandenen mRNA-Level von Tausenden von Genen gleichzeitig zu bestimmen und mit mRNA-Leveln einer anderen Zellart zu vergleichen. Das Prinzip eines Arrays beruht auf einer Hybridisierung von freien „targets“ – den aus den biologischen Proben gewonnenen Nukleinsäuren – mit „probes“ – den auf dem Array fest gebundenen bekannten DNA-Fragmenten (Bertucci et al. 2003). Diese DNA-Fragmente, die genspezifische Nukleotidsequenzen enthalten, werden in bekannter Anordnung robotergesteuert auf dem Untergrund, häufig einer Glasplatte, als kleine Punkte, sogenannten „spots“ aufgetragen, sodass jedem komplementär gebundenen Target ein Gen zugeordnet werden kann. Auf einem Quadratzentimeter eines Arrays können bis zu 10.000 verschiedene Sequenz-Spots liegen. Sie entstammen zumeist bekannten cDNA-, genomischen DNA- oder Plasmid-Datenbanken. Durch die Vielzahl der auf einem Array vorhandenen Gensequenzen ist es nicht nötig im Voraus zu überlegen, welche Gene interessant wären und untersucht werden sollten, sondern man kann ganz unvoreingenommen breitgefächert suchen (Lockhart et al. 2000).

Prinzipiell kann der Ablauf eines Microarray Experiments folgendermaßen beschrieben werden: Zuerst wird der Array mit den Probes produziert, dann die Target-cDNA für die Hybridisierung vorbereitet. Hierzu wird die im vorhergehenden Versuch isolierte mRNA präamplifiziert und in gelabelte cDNA umgeschrieben. Dieses Kennzeichnen oder Labeln wird während (direktes Labeln) oder nach der cDNA Synthese (indirektes Labeln) mit fluoreszierenden oder radioaktiven Sonden durchgeführt. Der Vorteil vom fluoreszierenden Labeln ist, dass Targets aus verschiedenen Proben – unterschiedlich gelabelt – gleichzeitig mit einem Array hybridisiert und so verglichen werden können (komparatives Design). Zum Labeln häufig genutzte fluoreszierende Farbstoffe sind Cy3 und Cy5. Nach dem Labeln wird die cDNA aufgereinigt um nicht-inkorporierte fluoreszierende Sonden aus der Probe zu entfernen und damit den Hintergrund gering zu halten. Der Array wird geblockt um unspezifisches Binden der Targets zu

verhindern, dann wird er mit den Targets hybridisiert. Während der Hybridisierung binden diese an die zu ihnen komplementären Probes. Nach dem Hybridisieren wird der Array gewaschen um nicht oder nur lose gebundene Target-cDNAs zu entfernen und anschließend mit einem Rasterlasermikroskop abgelesen. Die Intensität beider gelabelter Target-cDNAs wird einzeln an jedem Spot abgelesen und miteinander verglichen. So wird festgestellt, welche mRNAs in der zu untersuchenden Probe im Vergleich zur Referenzprobe vermehrt vorkommen und welchem Gen sie zuzuordnen sind (Majtan et al. 2004, Victor et al. 2005).

Das Printen der Arrays, die Präamplifikation der mRNA und ihre Umschreibung in cDNA, deren Kennzeichnung sowie die Hybridisierung mit dem Microarray und dessen Auswertung wurden durch die Microarray Unit des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Hr. Dr. rer. nat. Michael Krause (Durchführung) und Fr. Dr. rer. physiol. Birgit Samans (Auswertung) durchgeführt. Auch die Präamplifikation der mRNA für die PCR wurde durch die Microarray Unit übernommen.

Eingesetzt wurden Microarrays mit je 11552 einzelsträngigen humanen cDNA-Klonen [IMT 11.5k human cDNA chip (ResGen/Invitrogen; Human Sequence Verified cDNA Uni Gene Set)]. Die Arrays wurden über Nacht mit cDNA hybridisiert, die aus der in der IP gewonnenen mRNA aus dem IMR-32-Lysat umgeschrieben wurde. Die cDNA, die der mRNA der SH-EP-Lysate entsprach, wurde nicht mit einem Array hybridisiert sondern nur in der folgenden PCR eingesetzt. Sie diente der Kontrolle, dass nicht unspezifisch durch den DDX1-Antikörper mitgezogene mRNA fälschlicherweise als spezifische mRNA angesehen werden würde.

Das Experiment wurde im Sandwichverfahren durchgeführt – hierbei wird die gelabelte cDNA mit zwei übereinanderliegenden identischen Arrays hybridisiert, so dass man zwei technische Repliken und somit jeweils eine Doppelbestimmung der Werte erhält.

Zur Identifizierung der durch DDX1 gebundenen mRNA wurde ein komparatives "common-reference" Design ausgewählt. Bei einem "common-reference" Design kann man zwei Gruppen von cDNA vergleichen, indem man alle Proben gegen dieselbe Kontrolle – hier die

totale zelluläre mRNA, den Input des IMR-32-Lysats – vergleicht. Der Vergleich zwischen den zwei Gruppen erfolgt dann indirekt über die Quotienten zur gleichen Kontrolle (Victor et al. 2005). Die zwei Gruppen, die jeweils gegen die mRNA des Inputs hybridisiert wurden, waren einerseits die mRNA der IP mit DDX1-AK und andererseits die mRNA der IP mit Kontroll-AK der IMR-32-Zelllysate. Es wurden also insgesamt zwei Sandwich-Arrays, d.h. vier Arrays hybridisiert.

Gelabelt wurden DDX1-AK-cDNA und Kontroll-AK-cDNA jeweils mit Cy5, die Input-cDNA mit Cy3. Zwischen zwei Arrays wurde DDX1-AK-cDNA und Input-cDNA, zwischen zwei weiteren Arrays Kontroll-AK-cDNA und Input-cDNA gegeben (s. Abb. 1).

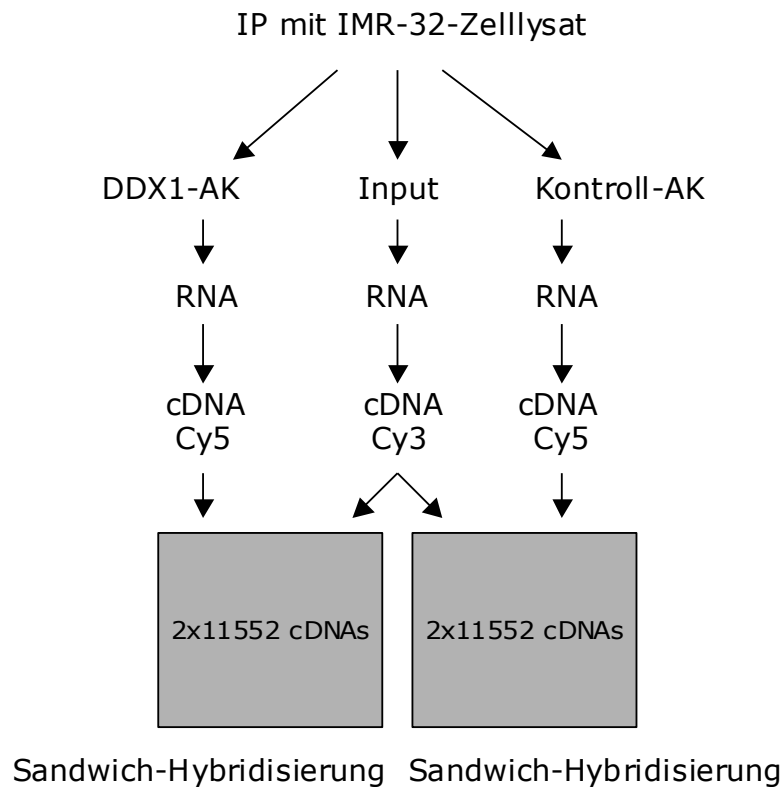


Abb.1: Schematische Darstellung des cDNA-Array-Experiments. Die in der IP gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben und fluoreszierend gelabelt (cDNA aus der IP mit DDX1-AK bzw. Kontroll-AK mit Cy5, cDNA des Inputs mit Cy3). Nun wurde cDNA aus der IP mit DDX1-AK in einem Sandwich-Experiment zwischen zwei Arrays gegen den Input hybridisiert, zwischen zwei weiteren Arrays cDNA aus der IP mit dem Kontroll-AK gegen den Input.

Nach der Hybridisierung wurde zunächst die jeweilige Signalintensität beider gebundener Farbstoffe zusammen an jedem Spot gemessen (A-Wert). Danach wurde pro Spot die jeweilige Ratio bzw. der Quotient der Signalintensität von DDX1-AK-cDNA zu Input-cDNA, bzw. Kontroll-AK-cDNA zu Input-cDNA ermittelt (M-Wert). Falls zwischen den beiden A- oder M-Werten eines Sandwichexperiments zu große Diskrepanz bestand, wurden die Spots aus der Wertung genommen. Die Mittelwerte der M-Werte von DDX1-AK-cDNA:Input-cDNA und Kontroll-AK-cDNA:Input-cDNA wurden miteinander verglichen und ein Ranking erstellt. cDNA auf einem vorderen Rankingplatz bei DDX1-AK:Input und hinterem Rankingplatz bei Kontroll-AK:Input spricht somit für spezifisch an DDX1 gebundene mRNA.

Die statistische Auswertung des Array-Experiments erfolgte wie o.g. durch Fr. Dr. rer. physiol. Birgit Samans, zur Fehlerminimierung wurden die Werte mittels medianer Normalisierung standardisiert und Qualitätskontrollen durchgeführt. In die Auswertung eingegangen sind nur Werte, bei denen der M-Wert DDX1-AK:Input $>0,5$ war, da die Streuung sonst zu breit gewesen wäre.

6.6 PCR

Die PCR diente der Verifizierung der im Microarray gefundenen möglichen Ziel-mRNAs von DDX1.

6.6.1 cDNA-Synthese

Da RNA sehr instabil ist und man zur Durchführung einer PCR cDNA benötigt, wurde die RNA zunächst in stabilere cDNA umgeschrieben. Dies geschah mit Hilfe von reverser Transkriptase, einem onkoretroviralen Enzym, dass RNA als Vorlage für die Synthese von cDNA nutzt. Als Ausgangspunkt für die Synthese wird ein kurzer Oligo(dT)-Primer benötigt (Majtan et al. 2004). Die Transkription fand wie auch die PCR im Thermocycler statt. Jeder Reaktionsansatz enthielt:

1 μ l Oligo(dT)-Primer

0,5 μ l Random-Hexamere (Sodium Salt)

0,5 μ l RNasin®

10 µl präamplifizierte RNA

Der Ansatz wurde 10 min bei 70°C erhitzt, dann 30 sek auf 55°C und 30 sek auf 35°C, anschließend auf 4°C gekühlt. Nun wurden dem Ansatz

2,5 µl 5x first strand buffer

1,25 µl DTT

0,75 µl BSA

je 0,5 µl dATP, dTTP, dGTP, dCTP

0,5 µl RNasin®

1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase

hinzugefügt und der Ansatz wiederum im Thermocycler inkubiert. Diesmal für 10 min bei 25°C, dann folgten drei Zyklen von 45°C für 5 min, 42°C für 15 min und 38°C für 10 min, woraufhin noch einmal für 15 min auf 75°C erhitzt und danach auf 4°C gekühlt wurde. Die gewonnenen 20 µl cDNA wurden bei -20°C eingefroren.

6.6.2 Prinzip der PCR

Die Polymerasekettenreaktion wurde 1985 von Miller entwickelt. Sie ermöglicht es innerhalb weniger Stunden in vitro ein spezifisches DNA-Segment milliardenfach zu amplifizieren (Alberts et al. 2004, Kap. 8). Als Ausgangsmaterial reicht im Prinzip ein einzelnes DNA-Molekül. Die PCR beruht auf einer einfachen enzymatischen Reaktion, bei der die Menge der DNA in drei sich stetig wiederholenden Zyklen amplifiziert wird. Ihre Menge nimmt hierbei exponentiell zu (Arnheim et al 1992). Die einzelnen Schritte der PCR werden so häufig wiederholt, bis eine ausreichende Menge an DNA hergestellt ist – im Regelfall sind dies 20-30 Reaktionszyklen (Alberts et al. 2004, Kap. 8).

Um die Reaktion zu ermöglichen braucht man nur wenige Materialien:

DNA-Matrize oder Template: Hier die cDNA, die aus der in der IP gewonnenen und präamplifizierten mRNA umgeschrieben wurde.

Zwei Oligonukleotid-Primer: Primer sind chemisch synthetisierte Oligonukleotide von cirka 20 Basen, die das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren. Sie sind komplementär zu den beiden Enden des zu

amplifizierenden Segments, einer zum kodierenden, einer zum nicht kodierenden Strang, und bilden den Startpunkt für die DNA Synthese. Die Primer verbleiben am 5` Ende der neusynthetisierten Stränge (Alberts et al. 2004, Kap. 8). Die Länge von ~20 Basen ist notwendig, um zu verhindern, dass die Primer unspezifisch an anderen Stellen der DNA binden und somit auch andere Genabschnitte amplifiziert würden. Bei einer Länge von ~20 Basen kann man davon ausgehen, dass die Sequenz spezifisch für das zu amplifizierende Segment ist. Die Genauigkeit der Bindung der Primer an die Matrize ist jedoch auch abhängig von Temperatur und pH-Wert der Reaktionslösung, sodass diese für jedes Primerpaar angepasst werden können, um möglichst spezifische Bindung zu gewährleisten (Arnheim et al. 1992).

Nukleotide: Die Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) sind die Bausteine aus denen die neuen DNA-Stränge synthetisiert werden.

Taq-Polymerase: Die Taq-Polymerase ist eine thermostabile Polymerase, isoliert aus *Thermus aquaticus*, einem thermophilen Bakterium, die es ermöglicht, auch bei hohen Temperaturen zu arbeiten. Die Polymerase synthetisiert mit Hilfe der freien dNTPs ausgehend von den an die DNA Einzelstränge gebundenen Primern in 5´ – 3´ Richtung neue DNA-Stränge. Sie kann Sequenzen von bis zu 1000 Basen pro Minute ergänzen (Arnheim et al. 1992).

Salze und Pufferlösung: Salze und Pufferlösung sind notwendig, um eine geeignete chemische Umgebung für den Reaktionsablauf der PCR zu schaffen.

Thermocycler: Im Thermocycler finden die einzelnen Reaktionschritte der PCR statt.

Die Reaktion findet in drei Schritten statt. Diese sind an die natürlichen DNA Replikationsschritte in der Zelle angelehnt:

Denaturierung der DNA: Durch Erhitzen auf durchschnittlich 92-96°C für 30-60 sek wird die DNA Doppelhelix denaturiert, das heißt in ihre beiden Einzelstränge aufgespalten, sodass die Primer binden können.

Annealing/Hybridisierung: Nach der Aufspaltung der DNA in ihre Einzelstränge lagern sich bei 55-60°C die Primer an und bilden somit die Startpunkte für die Polymerase. Dieser Schritt dauert ungefähr 30 sek.

Polymerisation/Elongation: Bei 72°C findet die Neusynthese der DNA an beiden Einzelsträngen durch die Polymerase statt, sodass sich pro Zyklus die Menge der DNA verdoppelt.

6.6.3 Durchführung

Zur Erstellung passender Primerpaare wurden mit Hilfe der Datenbank NCBI die Sequenzen der verschiedenen mRNAs und die zugehörigen DNA-Abschnitte herausgesucht und in das Programm "Oligo" (Primer Analysis Software, Version 6.41) transferiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer intronübergreifend plaziert wurden, um eine mögliche Kontamination der Probe mit genomischer DNA zu erkennen. Lügen die Primer auf demselben Exon, könnte man nicht zwischen amplifizierter genomischer DNA und cDNA unterscheiden (Arnheim et al. 1992). Intronübergreifend ist dies möglich, da bei der mRNA Prozessierung die Introns herausgeschnitten werden (Alberts et al. 2004, Kap. 6) und die amplifizierten Sequenzen der cDNA von der mRNA somit kürzer sind als die von möglicherweise in der Probe vorhandener DNA. Die Primer wurden von der Firma Purimex bezogen. Die besten Pufferbedingungen, Zeiten und Temperatur für die Hybridisierung wurden getestet. Die spezifischen Primersequenzen sind im Anhang (s. 11.1) aufgeführt.

Konstruiert wurde Primer für die im Microarray identifizierten an DDX1 gebundenen mRNAs von *CDK1*, *ATM*, *BARD1* und *p18* sowie für *MYCN*, für welches keine spezifische Bindung an DDX1 nachgewiesen wurde und welches daher als Kontrolle bei der PCR eingesetzt wurde.

Ein Reaktionsansatz enthielt jeweils:

5 µl 10xPuffer

1 µl cDNA

je 2 µl dATP, dTTP, dCTP, dGTP

je 1 µl der beiden Primer

0,2 µl Taq-polymerase

H₂O ad 50 µl

Der Reaktionszyklus begann jeweils mit einer ersten Denaturierung bei 95°C für 3 min, danach liefen die drei Zyklen abhängig von der Ausgangsmenge der cDNA 29- bis 37-mal durch, woraufhin noch ein finaler Elongationsschritt von 5 min bei 72°C angehängt wurde, bevor auf 4°C gekühlt wurde, um die Reaktion zu beenden. Die Denaturierung der DNA erfolgte jeweils bei 95°C für 20 sek und die Polymerisation bei 72°C für 40 sek. Die Hybridisierung fand abhängig von dem jeweiligen Primerpaar bei 60-62°C für 20-30 sek statt (s. 11.1).

6.6.4 Nachweis der amplifizierten DNA

Nachgewiesen werden können PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese. Hierbei werden die DNA-Fragmente abhängig von ihrer Größe im Gel durch Anlegen einer elektrischen Spannung aufgetrennt. Mit 5xDNA-Probenpuffer versetzt laufen sie von der Kathode zur Anode, wobei kleine Fragmente schneller laufen als große. Je höherprozentig das Gel ist, desto besser werden kleine DNA-Fragmente aufgetrennt. Um nach Sichtbarmachen der Banden die Fragmentgröße bestimmen zu können, wird in eine Tasche statt eines PCR-Produkts ein Marker einpipettiert, der die jeweiligen Basenpaare angibt (SmartLadder SF). Sichtbar gemacht wird die DNA nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht.

Die DNA-Fragmente der verschiedenen Primer waren jeweils zwischen 100 und 200 Basenpaaren, nur das Fragment von *MYCN* cirka 400 Basenpaare lang.

Durchführung:

Für das 3,5% Agarosegel (für *MYCN* 2,5%) wurden 3,5 g (bzw. 2,5 g) Agarose in 100 ml 1xTAE-Puffer unter ständigem Rühren aufgekocht, weitergerührt bis es handwarm war und dann möglichst blasenfrei in die geschlossenen Gelkammern mit eingesetzten 1 mm dicken Kämmen eingefüllt. Die Kämmen dienten zum Formen der Geltaschen, in die später die PCR-Produkte pipettiert wurden. Zum Polymerisieren wurde das Gel bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank gelagert bis es fest war. Danach wurden die Kämmen und die Abdichtung der Kammer vorsichtig entfernt,

das Gel in die Laufkammer gelegt und vollständig mit 1xTAE-Puffer überschichtet. Zu 25 µl PCR-Produkt wurden jeweils 5 µl 5xDNA-Probenpuffer gegeben, hiervon 15 µl in die Geltaschen pipettiert. In eine Tasche kamen zur Beurteilung der Fragmentgröße 7,5 µl des Markers SmartLadder SF. Die Gele liefen bei einer Spannung von 75 V. Wenn nach ca. 90 min Marker und Laufpuffer den Unterrand des Gels erreichten, wurde der Lauf gestoppt, das Gel 15 min in Ethidiumbromid gefärbt und danach 15 min in Wasser gelegt um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen. Die im Gel vorhandenen DNA-Banden konnten hiernach unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

7 Ergebnisse

7.1 Western Blot

Im Western Blot zeigte sich, dass die RNA-Helikase DDX1 in IMR-32-Zellen auf Proteinebene stärker exprimiert wird als in SH-EP-Zellen, sodass sich diese beiden Zelllinien für die IP als *DDX1* amplifizierte, bzw. als Kontroll-Zelllinie eignen.

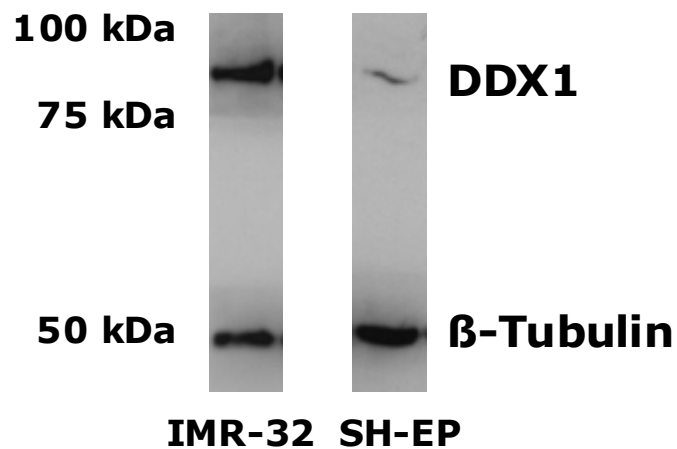


Abb. 2: Überexpression von DDX1-Protein in IMR-32-Zellen verglichen mit SH-EP-Zellen. Western Blot zum Nachweis von DDX1-Protein in IMR-32- und SH-EP-Zelllysaten. Als Ladekontrolle wurde β -Tubulin eingesetzt. Es zeigt sich, dass DDX1-Protein in den IMR-32-Zellen im Vergleich zu den SH-EP-Zellen stärker exprimiert wird. Obwohl mehr SH-EP Proteinlysat als IMR-32-Proteinlysat eingesetzt wurde (β -Tubulin-Bande bei SH-EP stärker als bei IMR-32) ist die DDX1-Bande bei IMR-32 stärker ausgeprägt als bei SH-EP.

7.2 Immunopräzipitation

Die Fragmentierung des in die IP eingesetzten Chromatins nach Sonifikation wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

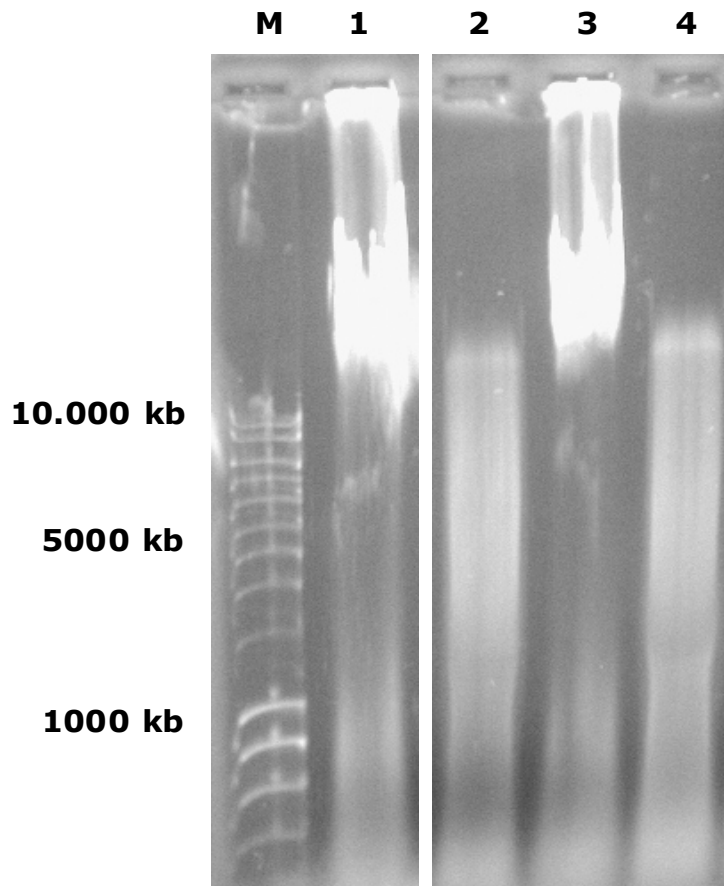


Abb. 3: Nachweis des gescherten Chromatins. Das nicht sonifizierte Chromatin bleibt größtenteils im oberen Drittel des Gels hängen (>10.000 kb), das 5x15 sek mit einem Stabsonifizierer gescherte Chromatin erstreckt sich über einen Bereich von mehreren Kilobasen. M: Marker, 1: IMR-32-Chromatinlysate, nicht sonifiziert, 2: IMR-32-Chromatinlysate, sonifiziert, 3: SH-EP-Chromatinlysate, nicht sonifiziert, 4: SH-EP-Chromatinlysate, sonifiziert.

Die in den Proben vor und nach Sonifizieren nachweisbaren RNA-Konzentrationen betragen:

IMR-32-Lysat:	1. IP: vor Sonifikation:	145,7 ng/ μ l
	nach Sonifikation:	208,9 ng/ μ l
	2. IP: vor Sonifikation:	133,2 ng/ μ l
	nach Sonifikation:	263,8 ng/ μ l
SH-EP-Lysate:	1. IP: vor Sonifikation:	320,7 ng/ μ l
	nach Sonifikation:	491,7 ng/ μ l
	2. IP: vor Sonifikation:	218,1 ng/ μ l
	nach Sonifikation:	383,8 ng/ μ l

Nach der IP betrug die RNA-Konzentration im Input der IMR-32-Lysate 175,1 ng/ μ l bzw. 100,5 ng/ μ l, bei den SH-EP-Lysaten 328,6 ng/ μ l bzw. 122,2 ng/ μ l. Das in den SH-EP-Lysaten jeweils mehr totale zelluläre RNA enthalten war als in den IMR-32-Lysaten schließt zusätzlich aus, dass mit dem DDX1-Antikörper bei den IMR-32-Lysaten nur deshalb mehr mRNA mitgezogen wurde, weil insgesamt mehr RNA im Lysat vorhanden war.

7.3 Microarray

Durchgeführt und ausgewertet wurde der Microarray von der Microarray Unit des IMT Marburg. Die Liste der Gene, bei welchen der Unterschied zwischen der durch DDX1- und Kontroll-Antikörper gezogenen mRNA-Menge am Deutlichsten war, ist hier wiedergegeben, wobei die ersten 40 Gene mit absteigender Signifikanz aufgelistet sind.

	Mittelwert der A-Werte DDX1-AK : Input	Mittelwert der A-Werte Kontroll-AK : Input	Mittelwert der M-Werte DDX1-AK : Input	Mittelwert der M-Werte Kontroll-AK : Input	Ranking-Platz der M-Werte DDX1-AK : Input	Ranking-Platz der M-Werte Kontroll-AK : Input	Ranking Unterschied der M-Werte DDX1-AK : Input vs Kontroll-AK : Input	Gen-Symbol	Gen-Funktion
1	9,9985	9,5108	0,5448	-0,254	103	11296	11193	<i>MGST1</i>	Stoffwechsel
2	9,9742	9,2788	0,7051	-0,179	67	10826	10759	<i>ARNT</i>	Signaltransduktion, Transkriptionsregulation
3	9,5591	9,0422	0,5604	-0,167	96	10681	10585	<i>LOC664727</i>	unbekannt
4	10,344	9,783	0,8437	-0,1	46	9492	9446	<i>CDC2</i>	Zellzykluskontrolle, Apoptose
5	10,221	9,6178	0,6143	-0,08	83	8900	8817	<i>CYP2U1</i>	Stoffwechsel
6	9,5953	9,0019	0,635	-0,025	76	6947	6871	<i>FKBP8</i>	Immunsystem-/ Apoptoseregulation
7	9,5517	8,9442	0,5876	-0,02	88	6737	6649	<i>B4GALT1</i>	Stoffwechsel
8	9,6334	9,2152	0,5193	-0,017	118	6606	6488	<i>DPYSL5</i>	Neuronales Zellwachstum
9	10,061	9,5975	0,5734	-0,008	93	6245	6152	<i>ATM</i>	Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur, Apoptose
10	9,5466	9,309	0,6472	-0,004	73	6092	6019	<i>OMD</i>	unbekannt
11	9,5622	9,2525	0,9094	0,0148	32	5253	5221	<i>PPEF1</i>	Protein-Phosphatase -> evtl. neuronale Funktion und/oder Entwicklung
12	9,5722	9,3751	0,5338	0,0285	109	4646	4537	<i>AMPD1</i>	Energiestoffwechsel
13	9,622	9,2217	0,7393	0,0374	61	4271	4210	<i>ATP7B</i>	Kupfertransport
14	9,9298	9,9071	0,6375	0,0387	75	4216	4141	<i>PMVK</i>	Stoffwechsel
15	9,6106	9,3144	0,5366	0,0714	108	2958	3850	<i>BMP1</i>	Embryonale Differenzierung, Gewebsdifferenzierung
16	9,9987	9,6245	0,738	0,0833	62	2569	2507	<i>AARS</i>	tRNA-Synthase
17	9,7006	9,2111	0,8068	0,096	50	2192	2142	<i>CADPS</i>	Membrantransport
18	9,5762	9,4872	0,516	0,0949	120	2229	2109	<i>MAP3K4</i>	Zelluläre Stressreaktion
19	9,9033	9,9261	0,8479	0,1069	44	1900	1856	<i>PIAS1</i>	Transkriptionsregulation
20	9,7685	9,4322	0,7739	0,136	56	1295	1239	<i>CDH6</i>	Zelladhäsion
21	9,7426	9,1473	1,6818	0,142	11	1188	1177	<i>ACTA2</i>	Zellstruktur
22	9,5979	9,4173	0,604	0,1437	85	1169	1084	<i>FABP7</i>	Stoffwechsel

23	9,8764	9,5163	1,0402	0,1746	26	746	720	<i>BARD1</i>	Zellzykluskontrolle, Apoptose
24	9,9643	9,4934	0,8526	0,1751	43	737	694	<i>PPM1D</i>	Zelluläre Stressreaktion
25	9,6724	10,046	0,5757	0,1734	91	758	667	<i>WASF3</i>	Signaltransduktion
26	9,9497	9,5645	0,552	0,2313	99	336	237	<i>CDKN2C</i>	Zellzykluskontrolle
27	9,6473	9,702	0,5393	0,2313	106	335	229	<i>PTD004</i>	unbekannt
28	10,113	9,6644	1,0557	0,261	24	248	224	<i>ADORA2B</i>	Signaltransduktion
29	9,6556	9,3086	1,1109	0,2649	22	240	218	<i>P2RY5</i>	Signaltransduktion
30	9,815	9,442	1,3643	0,3022	17	185	168	<i>PDK3</i>	Stoffwechsel
31	10,496	10,071	0,5192	0,2501	119	278	159	<i>CENPF</i>	Zellzyklus
32	9,5213	9,2367	0,8712	0,3321	37	147	110	<i>DNMT2</i>	DNA-Bindeprotein
33	9,7217	9,9346	0,8653	0,332	39	148	109	<i>IMPA2</i>	Signaltransduktion
34	9,5061	9,1353	0,7789	0,3263	54	152	98	<i>SUHW2</i>	unbekannt
35	10,199	9,9758	1,4336	0,4328	15	86	71	<i>RGS13</i>	Signaltransduktion
36	9,7461	9,6832	0,9023	0,3966	33	102	69	<i>MAPK13</i>	Zelluläre Stressreaktion
37	9,5688	9,4653	0,8583	0,4376	40	82	42	<i>TRPV6</i>	Calcium Transport
38	9,8675	10,054	0,6335	0,362	77	118	41	<i>CYP51A1</i>	Stoffwechsel
39	9,9478	9,5327	1,6782	0,5286	12	51	39	<i>TOR1A</i>	Energiestoffwechsel
40	9,8741	9,5529	1,1424	0,5204	21	52	31	<i>DEGS1</i>	Stoffwechsel

Tab. 1: Liste der Gene, der im Miroarray identifizierten an DDX1 gebundenen mRNAs. Die A-Werte geben die Leuchtintensität beider gebundener Farbstoffe an einem Spot an, die M-Werte die Ratio der Signalintensität von DDX1-, bzw. Kontroll-AK-cDNA zu Input-cDNA. Eingeschlossen wurden nur cDNAs deren M-Wert DDX1-AK:Input >0,5 war (s. 6.5). Nach Auslesen des Arrays wurde jeweils ein Ranking für die mittleren M-Werte der DDX1-AK-cDNA:Input-cDNA sowie eines für Kontroll-AK-cDNA:Input-cDNA erstellt, dann die jeweiligen Rankingplätze miteinander verglichen. In der Tabelle dargestellt sind die Gene bei denen die Rankingunterschiede der cDNAs besonders groß waren, d.h. deren cDNAs bei DDX1-AK-cDNA:Input-cDNA einen vorderen, bei Kontroll-AK-cDNA:Input-cDNA einen weit hinten liegenden Rankingplatz aufwiesen, die zugehörige mRNA also wahrscheinlich an DDX1 gebunden war.

Für *MYCN* betrug der mittlere A-Wert bei DDX1-AK:Input 9,2948, bei Kontroll-AK:Input 9,2634, der mittlere M-Wert bei DDX1-AK:Input 0,1911 und bei Kontroll-AK:Input 0,1234. Im Ranking von DDX1-AK:Input fand es sich auf Platz 685, im Ranking von Kontroll-AK:Input auf Platz 1528 und hatte damit einen Ranking-Unterschied von 843. Da der M-Wert <0,5 war, ging es – wie viele andere Gene – wie unter 6.5 beschrieben – nicht in die Auswertung mit ein.

Im Microarray fanden sich mehrere mRNAs, deren kodierte Proteine über die Kontrolle des Zellzyklus das Tumorverhalten beeinflussen könnten. Interessant erschienen unter den ersten 30 besonders *CDK1* (=CDC2) (Position 4), *ATM* (Position 9), *BARD1* (Position 23) und *p18* (=CDKN2C) (Position 26), da diese alle Regulatoren des Zellzyklus sind und/oder Apoptose induzieren können und somit die Tumorerproliferation beeinflussen könnten. CDK 1 ist eine wichtige Zellzykluskinase (Alberts et al. 2004, Kap. 17), p18 ein Zellzykluskinaseinhibitor (Guan et al. 1994), ATM spielt vor allem bei der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche eine wichtige Rolle (Bartek et al. 2003), BARD1 bei der Apoptoseeinleitung (Irminger-Finger et al. 2001).

Um das Ergebnis des Microarrays zu validieren und sicherzugehen, dass die mRNAs dieser vier Gene tatsächlich spezifisch an DDX1 gebunden waren, wurden Primer konstruiert und die Ergebnisse mittels PCR validiert.

Insgesamt zeigte sich, dass unter den ersten 40 möglichen Ziel-mRNAs von DDX1 6 (=15%) sind, deren Genprodukte eine Rolle in Zellzykluskontrolle und/oder Apoptoseeinleitung spielen (neben den o.g. auch *CENPF* und *FKBP8*), 9 (=22,5%) die in zelluläre Signaltransduktion involviert sind (*ARNT*, *WASF3*, *ADORA2B*, *P2RY5*, *IMPA2*, *RGS13*, *MAP3K4*, *PPM1D*, *MAPK13*), 3 davon v.a. in die Reaktion auf zellulären Stress (*MAP3K4*, *PPM1D*, *MAPK13*), 3 (=7,5%), die am Zellwachstum beteiligt sind (*DPYSL5*, *PPEF1*, *BMP1*), 2 (=5%) mit Beteiligung an der Transkriptionregulation (*ARNT*, *PIAS1*) und 11 (=27,5%), die in den Stoffwechsel involvierte Proteine kodieren (*MGST1*, *CYP2U1*, *B4GALT1*, *AMPD1*, *ATP7B*, *PMVK*, *FABP7*, *PDK3*, *CYP51A1*, *TOR1A*, *DEGS1*) (weitere Informationen über die einzelnen Gene sind in der OMIM®-Datenbank der NCBI erhältlich: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>).

Dies zeigt, dass DDX1 einen Einfluss auf diverse Prozesse im Zellzyklus zu haben scheint und in die verschiedensten Abläufen im Dasein einer Zelle involviert ist, sodass es über verschiedene Mechanismen der verstärkten Proliferation und Malignität von *MYCN* amplifizierten Tumoren entgegen wirken könnte.

7.4 PCR

Für die mRNA bzw. cDNA von *p18*, *CDK1* und *ATM* zeigte sich nach der PCR in der Agarosegelelektrophorese, dass sie bei jeweils beiden Zelllinien im Input vorhanden waren, sonst nur in dem Ansatz des IMR-32-Lysats, zu dem bei der IP DDX1-Antikörper gegeben wurden. Bei den Ansätzen mit Kontroll-Antikörper im IMR-32-Lysat und DDX1- und Kontroll-Antikörper im SH-EP-Lysat war die cDNA der genannten Gene gar nicht oder in nur geringer Menge nachweisbar, sodass das Ergebnis des Microarrays bestätigt wurde und sie spezifische Ziel-mRNAs von DDX1 zu sein scheinen.

MYCN-cDNA war erwartungsgemäß nur im Input beider Lysate nachweisbar, im Input der *MYCN* amplifizierte Zelllinie IMR-32 stärker als im Input der nicht *MYCN* amplifizierte Zelllinie SH-EP.

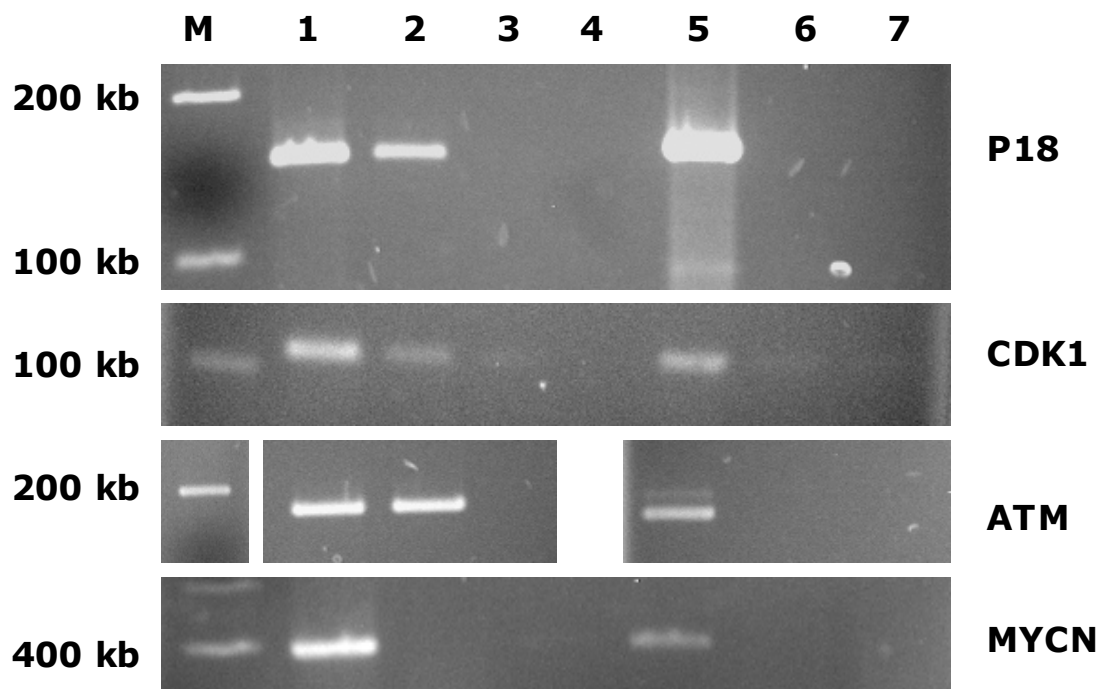


Abb. 4: Nachweis von *p18*-/*CDK1*-/*ATM*-/*MYCN*-cDNA mittels PCR und Gelelektrophorese. *p18*-/*CDK1*- und *ATM*-cDNA sind im Input beider Zelllysate sowie im IMR-32-Zelllysate, zu dem bei der IP DDX1-AK gegeben wurde, nachweisbar. *MYCN*-cDNA ist nur im Input beider Zelllysate nachweisbar, im Zelllysate der *MYCN* amplifizierte Zelllinie IMR-32 stärker als in der nicht *MYCN* amplifizierte Zelllinie SH-EP. M: Marker, 1-3: IMR-32-Lysate (1: Input, 2: IP mit DDX1-AK, 3: IP mit Kontroll-AK), 4: kein Lysat, 5-7: SH-EP-Lysate (5: Input, 6: IP mit DDX1-AK, 7: IP mit Kontroll-AK). Für die Klarheit der Abbildungen wurde das zu den anderen Gelen nicht einheitlich gelaufene Gel mit *ATM*-cDNA entsprechend angeordnet. Das originale unveränderte Gel ist im Anhang abgebildet.

Eine Ausnahme bildete *BARD1*. In der PCR war *BARD1*-cDNA in den IMR-32-Lysaten bei denen in der IP DDX1- bzw. Kontroll-AK eingesetzt wurde, ungefähr gleichstark nachweisbar. So ließ sich für *BARD1* das Microarrayergebnis nicht bestätigen. Eine PCR mit SH-EP-cDNA wurde nach diesem Ergebnis nicht mehr durchgeführt.

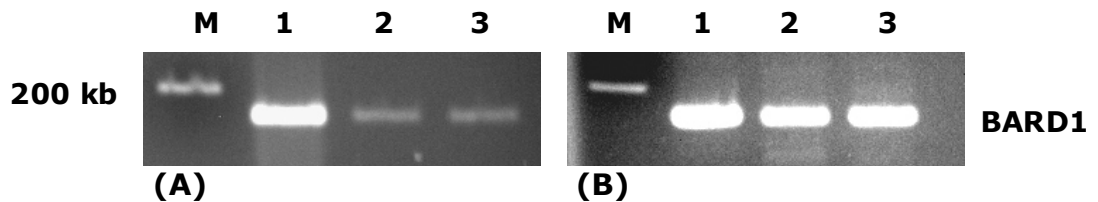


Abb. 5: Nachweis von *BARD1*-cDNA mittels PCR und Gelelektrophorese. (A): 30 PCR-Zyklen, (B): 35 PCR-Zyklen. *BARD1*-cDNA ist gleichstark im IMR-32-Zelllysate, zu dem bei der IP DDX1-AK gegeben wurde, wie in dem zu dem bei der IP Kontroll-AK gegeben wurde, nachweisbar. M: Marker, 1-3: IMR-32-Lysate (1: Input, 2: IP mit DDX1-AK, 3: IP mit Kontroll-AK).

8 Diskussion

Da die Sterblichkeit von Neuroblastompatienten in fortgeschrittenen Stadien trotz intensiver Forschung immer noch sehr hoch ist, ist es notwendig, tieferen Einblick in die molekularbiologischen Vorgänge des Neuroblastoms zu erhalten, um spezifischere potentielle Angriffspunkte für die Therapie zu finden. Neue Therapien auf molekularbiologischen Grundlagen könnten Neuroblastom spezifische Gene, Proteine und Signaltransduktionswege angreifen, welche für die maligne Entartung und Proliferation der Zellen verantwortlich sind. Dadurch könnten sie höhere Wirksamkeit in den Tumorzellen erreichen und geringere allgemeine Toxizität und somit geringere Nebenwirkungen und therapiebedingte Folgeschäden als konventionelle Therapien verursachen.

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Ziel-mRNAs der RNA-Helikase DDX1 zu identifizieren, um einen Anhalt dafür zu finden, weshalb Kinder mit *MYCN* amplifizierten Tumoren, die zusätzlich auch *DDX1* amplifiziert sind, eine bessere Prognose haben, als diejenigen, deren Tumoren nur *MYCN*, nicht aber *DDX1* amplifiziert sind. Im Microarray fanden sich mehrere Gene, deren Genprodukte direkt in den Zellzyklus eingreifen, ihn beschleunigen, anhalten oder die Apoptose, den programmierten Zelltod, einleiten können. Sie alle könnten Einfluss auf die bessere Prognose der Patienten mit *DDX1* coamplifizierten Tumoren gegenüber denen mit allein *MYCN* amplifizierten Tumoren haben.

Allein durch die Identifizierung der an DDX1 gebundenen mRNAs kann noch nicht gesagt werden, ob die durch die mRNA kodierten Proteine mit Hilfe von DDX1 verstärkt oder vermindert exprimiert werden und somit die bessere Prognose durch Über- oder Unterexpression der Proteine bedingt ist. Hierfür müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Im Folgenden wird auf die über Microarray und PCR identifizierte Ziel-mRNAs von DDX1 (*CDK1*, *ATM* und *p18*), bzw. die durch die mRNAs kodierten Proteine eingegangen:

CDK1, früher auch CDC2 oder p34 genannt, ist eine Cyklin-abhängige-Kinase (CDK). Die Familie der CDKs bildet eine wichtige Kontrollinstanz im Ablauf des Zellzyklus. Nur bei ihrer Aktivierung ist es Zellen möglich, die

Kontrollpunkte im Zellzyklus zu überwinden und den Zellzyklus fortzusetzen (Alberts et al. 2004, Kap. 17).

CDK1 bildet zusammen mit Cyklin B1 den Mitose-Promoting-Faktor (MPF), welcher nach der G2-Phase die Mitosephase einleitet und alle frühen Mitoseabläufe steuert (Castedo et al. 2002, Alberts et al. 2004, Kap. 17).

Grundsätzlich ist CDK1 also ein das Zellwachstum, bzw. die Zellteilung förderndes Protein. Es wurden jedoch auch mehrere Wege beschrieben über die CDK1 Apoptose induziert – in einigen Situationen in denen CDK1 aktiviert, in anderen in denen es inaktiviert wird.

In Mammakarzinomzellen wurde gezeigt, dass CDK1-Aktivität für das Ansprechen auf die Chemotherapie mit einem Mitosespindelgift – Paclitaxel (Taxol®) – notwendig ist (Yu et al. 1998, Wahl et al. 1996).

Die durch das Tumorsupressorprotein p53 induzierte Apoptose verläuft dem entgegen über eine Inhibition von CyklinB1 und CDK1 (Yun et al. 1999, Taylor et al. 1999). Auch scheinen CDK1-inaktive Zellen schneller mit Apoptose auf DNA-Strangbrüche zu reagieren als CDK1-aktive Zellen. Gezeigt wurde dies mit Hilfe der DNA-Strangbruch induzierenden Topoisomerase-II-Inhibitoren Mitoxantron und Teniposid. In den CDK1 inhibierten Zellen zeigte sich nach der Behandlung eine höhere Apoptoserate als in den CDK1 kompetenten Zellen (Ongkeko et al. 1995).

In der Neuroblastomtherapie werden sowohl Spindelgifte – Vincristin und Vindesin – wie auch der Topoisomeraseinhibitor Etoposid und Adriamycin, welches als Anthrazyklin sekundär die Topoisomerase-II hemmt, eingesetzt (AWMF Leitlinie 2011). Eine Beeinflussung der CDK1-Level in Neuroblastomzellen durch DDX1 könnte demnach Auswirkung auf das Ansprechen auf verschiedene chemotherapie-induzierte Apoptosereize haben.

Ein anderer Weg über den CDK1 das Tumorverhalten beeinflussen könnte, läuft über eine Degradationsinduktion von MYCN. Sjöstrom et al. zeigten, dass CDK1 in neuronalen Vorstufen MYCN für den Abbau markiert und darüber das Ende der Proliferationsphase der Zellen und den Beginn der neuronalen Differenzierung einleitet (Sjöstrom et al. 2005). Somit könnte DDX1 über Erhöhung der Proteinlevel von CDK1 und hierüber über

vermehrten Abbau von MYCN direkt der durch MYCN geförderten Tumorprogression entgegenwirken.

Es bleibt zu untersuchen, welche Rolle CDK1 beim Neuroblastom spielt, ob die Proteinlevel von CDK1 in *DDX1* amplifizierten Zellen höher sind als in nicht amplifizierten, die Translation der mRNA somit durch *DDX1* gefördert wird, oder ob sie im Gegenteil inhibiert wird und es über einen Mangel an CDK1 zu einem Zellzyklusarrest kommt. Interessant erscheint besonders, dass bei erhöhten CDK1-Leveln CDK1 direkt der MYCN bedingten Tumorproliferation entgegen wirken könnte, indem es dieses für den Abbau markiert, sodass die Tumorproliferation verlangsamt würde und die Tumorzellen sich zu benignen Zellen differenzieren könnten.

ATM (Ataxia teleangiectasia mutated) ist eine Proteinkinase, die für die zelluläre Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche verantwortlich ist. Bei Schädigung der DNA-Struktur aktiviert oder inaktiviert ATM Schlüsselproteine des Zellzyklus und der DNA-Reparatur, sodass DNA-Schäden beseitigt werden können, oder, wenn dies nicht möglich ist, die Apoptose eingeleitet wird (Bartek et al. 2003, Kastan et al. 2004).

Mutation des *ATM*-Gens und hierdurch bedingter Verlust des ATM-Proteins führt zu der progressiven neurodegenerativen Krankheit Ataxia teleangiectatica (AT), auch Louis-Bar-Syndrom genannt, die neben typischen weiteren Symptomen durch Immundefizienz, extreme Sensitivität auf ionisierende Strahlung und erhöhte Anfälligkeit für Krebserkrankungen gekennzeichnet ist (Menkes et al. 1995, Kap. 10).

Radiotherapie, wie auch einige Chemotherapeutika – beispielsweise die Topoisomeraseinhibitoren – induzieren DNA-Doppelstrangbrüche. Über Aktivierung von ATM kann dann Zellzyklusarrest und Apoptose ausgelöst werden. Eine Regulation intrazellulärer Level von ATM durch *DDX1* könnte demnach direkten Einfluss auf die Aktivierung dieser Prozesse haben.

ATM scheint zudem für die zelluläre Antwort auf Retinsäure verantwortlich zu sein, welche in der Konsolidierungstherapie bei Neuroblastompatienten der Hochrisikogruppe – zu denen fast alle Patienten mit *MYCN* amplifizierten Tumoren zählen – angewandt wird. Fernandez et al. zeigten, dass SH-SY5Y-Neuroblastomzellen eine ATM-abhängige Zelldifferenzierung

in postmitotische, neuronähnliche Zellen als Reaktion auf eine Therapie mit Retinsäure durchlaufen, während ATM defekte Zellen hierauf mit Zelltod reagieren (Fernandez et al. 2007). Bei einer vermehrten Proteinexpression von ATM über DDX1 könnten die Tumorzellen vermehrt in den postmitotischen Zustand übergehen und sich differenzieren, bei verminderten Proteinleveln von ATM mit vermehrter Apoptose auf die Retinsäuretherapie antworten.

Hu et al. zeigten, dass die Translation und damit Aktivität von ATM durch MYCN herunterreguliert wird. Die MYCN induzierte Tumorgenese scheint somit über eine Minderung von ATM und damit Ausschaltung einer wichtigen DNA-Reparaturinstanz zu verlaufen (Hu et al. 2010). DDX1 könnte über eine Translationsförderung von ATM diesem Mechanismus entgegenwirken.

Hohe ATM-Level könnten das Gleichgewicht von Proliferation zu Apoptose in Richtung Apoptose verschieben.

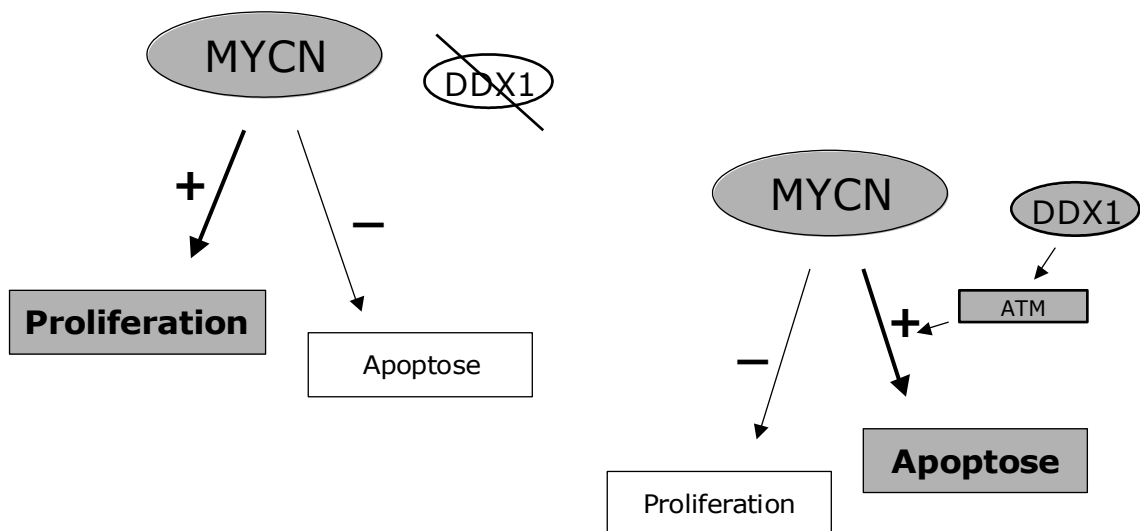


Abb.6: Schematische Darstellung der Beeinflussung der MYCN bedingten Tumorpheriferation durch DDX1 und ATM. Während MYCN zu einer unkontrollierten Tumorpheriferation führt, könnte DDX1 über ATM dieser entgegenwirken und das Verhältnis von MYCN gesteuerter Proliferation zu Apoptose in Richtung Apoptose der Tumorzellen verschieben und somit die Prognose der Patienten verbessern.

p18, auch Cyklin dependent Kinase Inhibitor 2C (CDKN2C) oder INK4C genannt, spielt eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle. Es inhibiert über CDK4 und 6 die Bildung der in der S-Phase benötigten DNA-Replikationsproteine und führt darüber zu einem Arrest in der G1-Phase (Guan et al. 1994, Massague, 2004). Über vermehrte Bildung von p18-Protein über DDX1 würde eine antiproliferativ wirksame Kontrollinstanz im Zellzyklus gestärkt.

BARD1 (BRCA1 associated RING domain) ist ein putatives Tumorsuppressorprotein (Irminger-Finger et al. 2001) und hätte somit über DDX1 gesteuerte vermehrte Proteinexpression das Tumorverhalten der Neuroblastomzellen beeinflussen können. In der PCR zeigte sich jedoch keine spezifische Bindung der *BARD1*-mRNA an DDX1.

Weitere interessante Ziel-mRNAs, welche im Microarray identifiziert wurden, sind beispielsweise *BMP1* und *PIAS1*, da auch diese in den Zellzyklus eingreifen. Sie wurden jedoch noch nicht mittels PCR validiert.

Aus der Identifizierung und Validierung der drei Ziel-mRNAs von DDX1 – *CDK1*, *ATM* und *p18* – lassen sich Hypothesen zur Prognoseverbesserung *DDX1* coamplifizierter und hoch exprimierender *MYCN* amplifizierter Neuroblastome ableiten:

Mit einer Hochregulation von p18 würde eine Kontrollinstanz im Zellzyklus gestärkt.

CDK1 kann über Degradationsinduktion von MYCN dessen Abbau beschleunigen (Sjostrom et al. 2005). Eine Erhöhung von CDK1-Leveln in *MYCN* amplifizierten Neuroblastomen könnte somit zu einem beschleunigten Abbau und damit einer Verminderung der Funktionen von MYCN in der Tumorgenese beitragen.

Die Inhibierung von ATM ist ein wichtiger Bestandteil MYCN induzierter Tumorgenese (Hu et al. 2010), DDX1 könnte dieser entgegenwirken. Erhöhte ATM-Level könnten die Apoptoseantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche (therapieinduziert und spontan) erhöhen.

Veränderte Proteinlevel von CDK1 und ATM könnten zu einem besseren Ansprechen der Tumorzellen auf die Therapie führen.

Eine Hochregulation dieser Proteine könnte also das Tumorverhalten entscheidend beeinflussen und eine Prognosebesserung der *DDX1* coamplifizierten Tumoren gegenüber den allein *MYCN* amplifizierten Tumoren erklären.

Bisher ist nur in Einzelfällen bekannt, wie *DDX1* Translation beeinflusst, sodass zu klären bleibt, ob über *DDX1* die Translation von *CDK1*, *ATM* und *p18*-mRNA gefördert oder inhibiert wird und festgestellt werden kann, ob höhere oder niedrigere Proteinlevel einen günstigen Einfluss auf das Tumorverhalten haben. Man könnte dies beispielsweise feststellen, indem man Proteinlysate von Wild-Typ SH-EP Zellen mittels Western Blot Analyse mit Proteinlysaten *DDX1*-transfizierter SH-EP Zellen vergleicht.

Neben der besseren Prognose von Neuroblastompatienten mit *MYCN*-amplifizierten und *DDX1*-coamplifizierten Tumoren gegenüber denen mit allein *MYCN*-amplifizierten Tumoren, zeigte sich auch bei Brustkrebspatientinnen eine deutliche Prognosebesserung bei Patientinnen mit hohen Leveln an *DDX1* im Tumorgewebe gegenüber denen mit niedrigen Leveln (Taunk et al. 2011). Auch hier ist der Wirkmechanismus von *DDX1* noch nicht geklärt. Eine weitere Abklärung der genauen Funktion von *DDX1* erscheint sinnvoll.

9 Zusammenfassung

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.**

**Identifikation von Ziel-mRNA Molekülen der RNA-Helikase
DDX1 in humanen Neuroblastomzellen**

eingereicht von:

Judith Anna Verbeek, geb. am 21.05.1981 in Engelskirchen

angefertigt an:

Selbstständige Abteilung für Pädiatrische Onkologie, Hämatologie und
Hämostaseologie, Universität Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. med. Holger Christiansen

eingereicht:

April 2014

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakraniell gelegene solide Tumor der pädiatrischen Onkologie. Der Verlauf der Erkrankung geht von spontaner Regression oder Differenzierung bis hin zu tödlich verlaufenden Erkrankungen. Die Mortalität von Patienten mit Tumoren in fortgeschrittenen Stadien ist immer noch sehr hoch. Die aggressivsten Tumoren sind die, die eine Amplifikation des Protoonkogens *MYCN* aufweisen. Eine Untergruppe dieser *MYCN* amplifizierten Tumoren weist eine Coamplifikation von *DDX1* auf. Die Prognose dieser Patienten ist besser als die mit allein *MYCN* amplifizierten Tumoren, wenn auch immer noch schlechter als die von Patienten ohne *MYCN* Amplifikation.

Das *DDX1*-Protein ist eine putative RNA-Helikase. Über seine genaue Funktion ist noch nicht viel bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, potentielle Ziel-mRNAs von *DDX1* zu identifizieren, um einen besseren Einblick in die Funktionen von *DDX1* und mögliche Wege der Beeinflussung von Tumorverhalten und Prognose zu erhalten.

Hierzu wurden eine *DDX1* amplifizierte und eine nicht amplifizierte Zelllinie in Kultur genommen und eine Immunopräzipitation mit Zelllysaten der beiden Zelllinien durchgeführt – jeweils mit einem spezifischen Antikörper gegen *DDX1* und einem unspezifischen Kontrollantikörper. Die Identifizierung der an *DDX1* gebundenen mRNAs erfolgte mittels Microarray. Validiert wurden einige der im Microarray identifizierten RNAs mittels RT-PCR. *CDK1*, *ATM* und *p18* ließen sich als spezifische Ziel-mRNAs von *DDX1* identifizieren. *DDX1* könnte über Förderung oder Inhibition der Translation dieser mRNAs das Verhalten der Tumoren beeinflussen, da sie alle in die Zellzykluskontrolle involviert sind.

Weiterführende Untersuchungen können klären, wie die Proteinexpression dieser drei Ziel-mRNAs durch *DDX1* beeinflusst wird, ob es zu vermehrten oder verminderten Protein-Leveln kommt und wie und ob Änderungen der Protein-Level die Prognosebesserung der *DDX1* coamplifizierten Tumoren gegenüber den allein *MYCN* amplifizierten Tumoren erklären können. Vor allem vermehrte Expression von *CDK1* und *ATM* könnten über Degradationsinduktion von *MYCN* durch *CDK1*, bzw. Wiederherstellung der durch *MYCN* verminderten Aktivität von *ATM* und somit wieder verstärkter Zellzykluskontrolle und wiederhergestellten DNA-Reparaturmechanismen der durch *MYCN* Amplifikation erhöhten Malignität der Tumoren entgegenwirken.

10 Literaturverzeichnis

E. Abemayor (1992)

„The effects of retinoic acid on the in vitro and in vivo growth of neuroblastoma cells“
Laryngoscope 102: 1133-1149, 1992

B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter (Herausgeber) (2004)

Kapitel 6 „Wie Zellen das Genom ablesen: Von der DNA zum Protein“, pp 345-431
Kapitel 8 „Handhabung von Proteinen, DNA und RNA“, pp 543-632
Kapitel 17 „Zellzyklus und programmierter Zelltod“, pp 1141-1193
aus „Molekularbiologie der Zelle“ 4. Auflage 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim

Amersham Product Booklet „ECL Plus Western Blotting Detection Reagents“

P.F. Ambros, I.M. Ambros (2001)

„Pathology and biology guidelines for resectable and unresectable neuroblastic tumors and bone marrow examination guidelines“
Medical and Pediatric Oncology 37: 492-504, 2001

L.C. Amler, M. Schwab (1989)

„Amplified N-myc in human neuroblastoma cells is often arranged as clustered tandem repeats of differently recombined DNA“
Molecular and Cellular Biology 9: 4903-4913, 1989

L.C. Amler, J. Schürmann, M. Schwab (1996)

„The DDX1 gene maps within 400 kbp 5` to MYCN and is frequently coamplified in human neuroblastoma“
Genes, Chromosomes & Cancer 15: 134-137 (1996)

AWMF/Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2005/2011)

Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie: Neuroblastom, aktualisierte Auflage von 2005, bzw. 2011
<http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/11/025-008.htm> (online 18.02.2008)
http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-008l_S1_Neuroblastom_2011-08_01.pdf (online 11.05.2012)

N. Arnheim, H. Erlich (1992)

„Polymerase chain reaction strategy“
Annual Review of Biochemistry 61: 131-156, 1992

J. Bartek, J. Lukas (2003)

„Damage alert“
Nature 421: 486-488, 2003

J.B. Beckwith, E.V. Perrin (1963)

„In situ neuroblastomas: a contribution to the natural history of neural crest tumors“

The American Journal of Pathology 43: 1089-1104, 1963

F. Bertucci, P. Viens, R. Tagett, C. Nguyen, R. Houlgatte, D. Birnbaum (2003)

„DNA arrays in clinical oncology: promises and challenges“

Laboratory Investigation 83: 305-316, 2003

J.L. Biedler, L. Helson, B.A. Spengler (1973)

„Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture“

Cancer Research 33: 2643-2652, 1973

S. Bleoo, Y. Sun, M.J. Hendzel, J.M. Rowe, M. Packer, R. Godbout (2001)

„Association of human DEAD box protein DDX1 with a cleavage stimulation factor involved in 3´-end processing of pre-mRNA“

Molecular Biology of the Cell 12: 3046-3059, 2001

N. Bown, S. Cotterill, M. Lastowska, S. O´Neill, A.D. Pearson, D. Plantaz, M. Meddeb, D. Danglot, C. Brinkschmidt, H. Christiansen, G. Laureys, F. Speleman, J. Nicholson, A. Bernheim, D.R. Betts, J. Vandesompele, N. Van Roy (1999)

„Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma“

The New England Journal of Medicine 340: 1954-1961, 1999

H.J. Brisse, M.B. McCarville, C. Granata, K.B. Krug, S.L. Wootton-Gorges, K. Kanegawa, F. Giammarile, M. Schmidt, B.L. Shulkin, K.K. Matthay, V.J. Lewington, S. Sarnacki, B. Hero, M. Kaneko, W.B. London, A.D.J. Pearson, S.L. Cohn, T. Monclair (2011)

„Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: consensus report from the international neuroblastoma risk group project“

Radiology 261:1 243-257, 2011

M.M. Bradford (1976)

„A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding“

Analytical Biochemistry 72: 248-254, 1976

G.M. Brodeur, R.C. Seeger (1986)

„Gene amplification in human neuroblastomas: basic mechanisms and clinical implications“

Cancer Genetics and Cytogenetics 19: 101-111, 1986

G.M. Brodeur, F.A. Hayes, A.A. Green, J.T. Casper, J. Wasson, S. Wallach, R.C. Seeger (1987)

„Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients“

Cancer Research 1947: 4248-4253, 1987

G.M. Brodeur, J. Pritchard, F. Berthold, N.L.T. Carlsen, V. Castel, R.P. Castleberry, B. De Bernardi, A.E. Evans, M. Favrot, F. Hedborg, M. Kaneko, J. Kemshead, F. Lampert, R.E.J. Lee, A.T. Look, A.D.J. Pearson, T. Philip, B. Roald, T. Sawada, R.C. Seeger, Y. Tsuchida, P.A. Voute (1993)

„Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment“

Journal of Clinical Oncology 11: 1466-1677, 1993

G.M. Brodeur (2003)

„Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma“

Nature Reviews. Cancer. 3: 203-216, 2003

G.M. Brodeur, J. M. Maris (2006)

Kapitel 31 „Neuroblastoma“, pp 933-970

in „Principles and Practice of Pediatric Oncology“, P.A. Pizzo, D.G. Poplack (Hrsg.), 5. Auflage 2006, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA

M. Castedo, J.-L. Perfettini, T. Roumier, G. Kroemer (2002)

„Cyklin-dependent Kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe“

Cell Death and Differentiation 9: 1287-1293, 2002

H. Christiansen, F. Lampert (1988)

„Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma “

British Journal of Cancer 57(1): 121-126, 1988

H.-C. Chen, W.-C. Lin, Y.-G. Tsay, S.-C. Lee, C.-J. Chang (2002)

„An RNA helicase, DDX1, interacting with poly(A) RNA and heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein K“

The Journal of Biological Chemistry 277: 40403-40409, 2002

S.L. Cohn, A.D.J. Pearson, W.B. London, T. Monclair, P.F. Ambros, G.M. Brodeur, A. Faldum, B. Hero, T. Iehara, D. Machin, V. Mosseri, T. Simon, A. Garaventa, V. Castel, K.K. Matthay (2009)

„The international neuroblastoma risk group (INGR) classification system: an INRG task force report“

Journal of Clinical Oncology 27: 289-297, 2009

R. Defferrari, G.P. Tonini, M. Conte, F. Papio, A.R. Sementa, A. Valent, F. Schena, P. Perri, K. Mazzocco (2007)

„Concomitant DDX1 and MYCN gain in neuroblastoma“

Cancer Letters 256: 56-63, 2007

K. De Preter, F. Speleman, V. Combaret, L. Lunec, J. Board, A. Pearson, A. De Paepe, N. Van Roy, G. Laureys, J. Vandesompele (2005)

„No evidence for correlation of DDX1 gene amplification with improved survival probability in patients with MYCN-amplified neuroblastomas“

Journal of Clinical Oncology 23: 3167-3168, 2005

G. Dreyfuss, G.M. Matunis, S. Pinol-Roma, C.G. Burd (1993)

„hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA“
Annual Review of Biochemistry 62: 289-321, 1993

J. Fang, S. Kubota, B. Yang, N. Zhou, H. Zhang, R. Godbout, R.J. Pomerantz (2004)

„A DEAD box protein facilitates HIV-1 replication as a cellular co-factor of Rev“
Virology 330: 471-480, 2004

N.D. Fernandes, Y. Sun, B.D. Price (2007)

„Activation of the kinase activity of ATM by retinoic acid is required for CREB-dependent differentiation of neuroblastoma cells“
The Journal of Biological Chemistry 282: 16577-16584, 2007

S. Fulda, W. Lutz, M. Schwab, K.M. Debatin (2000)

„MycN sensitizes neuroblastoma cells for drug-triggered apoptosis“
Medical and Pediatric Oncology 35: 582-584, 2000

M. Gehring, F. Berthold, L. Edler, M. Schwab, L.C. Amler (1995)

„The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma“
Cancer Research 55: 5366-5369, 1995

R.E. George, R. Kenyon, A.G. McGuckin, N. Kohl, P. Kogner, H. Christiansen, A.D.J. Pearson, J. Lunec (1997)

„Analysis of candidate gene co-amplification with MYCN in neuroblastoma“
European Journal of Cancer 33: 2037-2042, 1997

C. Gilbert, A. Kristjuhan, G.S. Winkler, J.Q. Svejstrup (2004)

„Elongator interactions with nascent mRNA revealed by RNA immunoprecipitation“
Molecular Cell 14: 457-464, 2004

R. Godbout, J. Squire (1993)

„Amplification of a DEAD box protein gene in retinoblastoma cell lines“
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 7578-7582, 1993

R. Godbout, M. Hale, D. Bisgrove (1994)

„A human DEAD box protein with partial homology to heterogenous nuclear ribonucleoprotein U“
Gene 138: 243-245, 1994

R. Godbout, M. Packer, W. Bie (1998)

„Overexpression of a DEAD box protein (DDX1) in neuroblastoma and retinoblastoma cell lines“
The Journal of Biological Chemistry 273: 21161-21168, 1998

R. Godbout, M. Packer, S. Katyal, S. Bleoo (2002)

„Cloning and expression analysis of the chicken DEAD box gene DDX1“

Biochimica et Biophysica Acta – Gene Structure and Expression 1574: 63-71, 2002

M.B. Godfried, M. Veenstra, P. v Sluis, K. Boon, R. v Asperen, M.C. Hermus, B.D. v Schaik, T.P. Voute, M. Schwab, R. Versteeg, H.N. Caron (2002)

„The N-myc and x-myc downstream pathways include the chromosome 17q genes nm23-H1 and nm23-H2“
Oncogene 21: 2097-2101, 2002

K.-L. Guan, C.W. Jenkins, Y. Li, M.A. Nichols, X. Wu, C.L. O´Keefe, A.G. Matera, Y. Xiong (1994)

„Growth suppression by p18, a p16(INK4/MTS1)- and p14(INK4B/MTS2)-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function.“
Genes & Development 8: 2934-2952, 1994

J.G. Gurney, J.A. Ross, D.A. Wall, W.A. Bleyer, R.K. Severson, L.L. Robison (1997)

„Infant cancer in the US: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992“
Journal of Pediatric Hematology/Oncology 19: 428-432, 1997

K. Hashimoto, Y. Nakawaga, H. Morikawaka, M. Niki, Y. Egashira, I. Hirata, K. Katsu, Y. Akao (2001)

„Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and c-myc protein in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines“
Carcinogenesis 22: 1965-1970, 2001

R. Ho, A. Eggert, T. Hishiki, J.E. Minturn, N. Ikegaki, P. Foster, A.M. Camoratto, A.E. Evans, G.M. Brodeur (2002)

„Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas“
Cancer Research 62: 6462-6466, 2002

R. Howman-Giles, P.J. Shaw, R.F. Uren, D.K. Chung (2007)

„Neuroblastoma and other neuroendocrine tumors“
Seminars in Nuclear Medicine 37: 286-302, 2007

H. Hu, L. Du, G. Nagabayashi, R.C. Seeger, R.A. Gatti (2010)

„ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421“
Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 1506-1511, 2010

Y. Ikeda, J. Lister, J.M. Bouton, M. Buyukpamukcu (1981)

„Congenital neuroblastoma, neuroblastoma in situ, and the normal fetal development of the adrenal“
Journal of Pediatric Oncology 16: 636-644, 1981

I. Irminger-Finger, W.-C. Leung, J. Li, M. Dubois-Dauphin, J. Harb, A. Feki, C.E. Jefford, J.V. Soriano, M. Jaconi, R. Montesano, K.-H. Krause (2001)

„Identification of BARD1 as mediator between proapoptotic stress and p53-dependent apoptosis“

Molecular Cell 8: 1255-1266, 2001

M. Ishaq, L. Ma, X. Wu, Y. Mu, J. Pan, J. Hu, T. Hu, Q. Fu, D. Guo (2009)

„The DEAD-box RNA helicase DDX1 interacts with RelA and enhances nuclear Factor kappaB-mediated transcription“

Journal of Cellular Biochemistry 106: 296-305 (2009)

A. Islam, H. Kageyama, N. Takada, T. Kawamoto, H. Takayasu, E. Isogai, M. Ohira, K. Hashizume, H. Kobayashi, Y. Kaneko, A. Nakagawara (2000)

„High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma“

Oncogene 19: 617-623, 2000

J. Jaboin, A. Hong, C.J. Kim, C.J. Thiele (2003)

„Cisplatin-induced cytotoxicity is blocked by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB signal transduction path in neuroblastoma“

Cancer Letters 193: 109-114, 2003

Y. Kanai, N. Dohmae, N. Hirokawa (2004)

„Kinesin transports RNA: Isolation and characterization of an RNA-transporting granule“

Neuron 43: 513-525 (2004)

S. Kaneko, M. Ohira, Y. Nakamura, E. Isogai, A. Nakagawara, M. Kaneko (2007)

„Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma“

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 133: 185-192, 2007

Y. Kaneko, N. Kanda, N. Maseki, M. Sakurai, Y. Tsuchida, T. Takeda, I. Okabe, M. Sakurai (1987)

„Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas“

Cancer Research 47: 311-318, 1987

S.J. Kaplan, C.T. Holbrook, H.G. McDaniel, W.L. Buntain, W.M. Crist (1980)

„Vasoactive intestinal peptide secreting tumors of childhood“

American Journal of Diseases of Children 134: 21-24, 1980

M.B. Kastan (2001)

„Checking two steps“

Nature 410: 766-767, 2001

M.B. Kastan, J. Bartek (2004)

„Cell-cycle checkpoints and cancer“

Nature 432: 316-323, 2004

M. Kiledjian, G. Dreyfuss (1992)

„Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: Binding

RNA through RGG box"
The EMBO Journal 11: 2655-2664, 1992

M.K. Kim, V.M. Nikodem (1999)

„hnRNP U inhibits carboxy-terminal domain phosphorylation by TFIIF and represses RNA polymerase II elongation"
Molecular and Cellular Biology 19: 6833-6844, 1999

Kinderkrebsregister (2008)

"Auswertungen im Detail - Neuroblastome und Ganglioneuroblastome - Deutschland 2003 - 2007 - Stand 09/2008"
Deutsches Kinderkrebsregister, Leiter Dr. Peter Kaatsch, Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik, Johannes Gutenberg Universität Mainz
<http://www.kinderkrebsregister.de> (online 11.05.2012)

G.W. Klappacher, V.V. Lunnyak, D.B. Sykes, D. Sawka-Verhelle, J. Sage, G. Brard, S.D. Ngo, D. Gangadharan, T. Jacks, M.P. Kamps, D.W. Rose, M.G. Rosenfeld, C.K. Glass (2002)

„An induced Ets repressor complex regulates growth arrest during terminal macrophage differentiation"
Cell 109: 169-180, 2002

A.G.J. Knudson, L.C. Strong (1972)

„Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma"
The American Journal of Human Genetics 24: 514-532, 1972

L. Li, E.A. Monckton, R. Godbout (2008)

„A role for DEAD box 1 at DNA double-strand breaks"
Molecular and Cellular Biology 28: 6413-6425, 2008

P. Linder, P.F. Lasko, M. Ashburner, P. Leroy P.J. Nielsen, K. Nishi, J. Schnier, P.P. Slonimsky (1989)

„Birth of the D-E-A-D-Box"
Nature 337: 121-122

D.J. Lockhart, E.A. Winzeler (2000)

„Genomics, gene expression and DNA arrays"
Nature 405: 827-836, 2000

A.T. Look, F.A. Hayes, R. Nitschke, N.B. McWilliams, A.A. Green (1994)

„Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma"
The New England Journal of Medicine 311: 231-235 (1994)

A.T. Look, F.A. Hayes, J.J. Shuster, E.C. Douglass, R.P. Castleberry, L.C. Bowman, E.I. Smith, G.M. Brodeur (1991)

„Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group Study"
Journal of Clinical Oncology 9: 581-591 (1991)

T. Majtan, G. Bukovska, J. Timko (2004)

„DNA microarrays – techniques and applications in microbial systems“
Folia Microbiol 49: 635-664, 2004

C.F. Manohar, H.R. Salwen, G.M. Brodeur, S.L. Cohn (1995)

„Co-amplification and concomitant high levels of expression of a DEAD box gene with MYCN in human neuroblastoma“
Genes, Chromosomes & Cancer 14: 196-203, 1995

J.M. Maris, P.S. White, C.P. Beltinger, E.P. Sulman, R.P. Castleberry, J.J. Shuster, A.T. Look, G.M. Brodeur (1995)

„Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma“
Cancer Research 55: 4664-4669, 1995

J.M. Maris, K.K. Matthay (1999)

„Molecular biology of neuroblastoma“
Journal of Clinical Oncology 17: 2264-2279 (1999)

J.M. Maris, M.J. Weiss, C. Guo, R.B. Gerbing, D.O. Stram, P.S. White, M.D. Hogarty, E.P. Sulman, P.M. Thompson, J.M. Lukens, K.K. Matthay, R.C. Seeger, G.M. Brodeur (2000)

„Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children´s Cancer Group study“
Journal of Clinical Oncology, 18: 1888-1899, 2000

J.M. Maris, M.J. Weiss, Y. Mosse, G. Hii, C. Guo, P.S. White, M.D. Hogarty, T. Mirensky, G.M. Brodeur, T.R. Rebbeck, M. Urbanek, S. Shusterman (2002)

„Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13“
Cancer Research 62: 6651-6658, 2002

J. Massague (2004)

„G1 cell-cycle control and cancer“
Nature 432: 298-306, 2004

K. Matsumoto, R.K. Wada, J.M. Yamashiro, D.R. Kaplan, C.J. Thiele (1995)

„Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells“
Cancer Research 55: 1798-1806, 1995

J.H. Menkes, K. Till (1995)

Kapitel 10 „Tumors of the nervous system“, pp 635-701
in „Textbook of Child Neurology“, J.H. Menkes (Hrsg.), 5. Auflage 1995,
Williams & Wilkins, Baltimore, USA

W.M. Michael, P.S. Eder, G. Dreyfuss (1997)

„The K nuclear shuttling domain: A novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein“
The EMBO Journal 16: 3587-3598, 1997

E.F. Michelotti, G.A. Michelotti, A.I. Aronsohn, D. Levens (1996)

„Heterogenous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor“
Molecular and Cell Biology 16: 2350-2360 (1996)

W.G. Mitchell, Y. Davalos-Gonzalez, V.L. Brumm, S.K. Aller, E. Burger, S.B. Turkel, M.S. Borchert, S. Hollar, S. Padilla (2002)

„Opsoclonus-ataxia caused by childhood neuroblastoma: developmental and neurologic sequelae“
Pediatrics 109: 86-98, 2002

T. Monclair, G.M. Brodeur, P.F. Ambros, H.J. Brisse, G. Cecchetto, K. Holmes, M. Kaneko, W.B. London, K.K. Matthay, J.G. Nuchtern, D. von Schweinitz, T. Simon, S.L. Cohn, A.D.J. Pearson (2009)

„The international neuroblastoma risk group (INRG) staging system: an INRG task force report“
Journal of Clinical Oncology 27: 298-303, 2009

A. Nakagawara, M. Arima, C.G. Azar, N.J. Scavarda, G.M. Brodeur (1992)

„Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas“
Cancer Research 52: 1364-1368, 1992

A. Nakagawara, M. Arima-Nakagawara, N.J. Scavarda, C.G. Azar, A.B. Cantor, G.M. Brodeur (1993)

„Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma“
The New England Journal of Medicine 328: 847-854, 1993

A. Nakagawara, C.G. Azar, N.J. Scavarda, G.M. Brodeur (1994)

„Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas“
Molecular and Cellular Biology 14: 759-767, 1994

Neuroblastomstudie NB2004

Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie

„NB2004 high risk trial protocol for the treatment of children with high risk neuroblastoma“

Version 3.00 vom 01.05.2007

M.L. Nieder, M.W. Gauderer (1991)

„Recent developments in the management of neuroblastoma“
Progress in Pediatric Surgery 26: 124-136, 1991

C. Niemeyer (2004)

Kapitel 11 „Krebserkrankungen“, pp 327-355

in „Kinderheilkunde und Jugendmedizin“ B. Koletzko (Hrsg.), 12. Auflage 2004, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

S. Niranjanakumari, E. Laska, R. Brazas, M.A. Garcia-Blanco (2002)

„Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions in vivo“

Methods 26: 182-190, 2002

OMIM® - Datenbank / Online Mendelian Inheritance in Men ®

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> (online 12.09.2010)

W. Ongkeko, D.J.P. Ferguson, A.L. Harris, C. Norbury (1995)

„Inactivation of Cdc2 increases the level of apoptosis induced by DNA damage“

Journal of Cell Science 108: 2897-2904, 1995

D.H. Ostareck, A. Ostareck-Lederer, M. Wilm, B.J. Thiele, M. Mann, M.W. Hentze (1997)

„mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3` end“

Cell 89: 597-606, 1997

A. Ostareck-Lederer, D.H. Ostareck, C. Cans, G. Neubauer, K. Bomsztyk, G. Superti-Fuga, M.W. Hentze (2002)

„c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs“

Molecular and Cellular Biology 22: 4535-4543, 2002

D. Rubello, C. Bui, D. Casara, M.D. Gross, L.M. Fig, B. Shapiro (2002)

„Functional szintigraphy of the adrenal gland“

European Journal of Endocrinology 147: 13-28, 2002

M. Ryden, R. Sehgal, C. Dominici, F.H. Schilling, C.F. Ibanez, P. Kogner (1996)

„Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastomas with favourable tumour stage and good prognosis“

British Journal of Cancer 74: 773-779, 1996

F.H. Schilling, C. Spix, F. Berthold, R. Erttmann, N. Fehse, B. Hero, G. Klein, J. Sander, K. Schwarz, J. Treuner, U. Zorn, J. Michaelis (2002)

„Neuroblastoma screening at one year of age“

The New England Journal of Medicine 346: 1047-1053, 2002

S.R. Schmid, P. Linder (1992)

„D-E-A-D protein family of putative RNA helicases“

Molecular Microbiology 6: 283-292, 1992

M. Schwab (1994)

„Where pathology meets molecular biology: N-myc amplification in human neuroblastoma as a paradigm for a clinical use of an oncogene alteration“

Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 78: 26-33, 1994

H. Shimada, I.M. Ambros, L.P. Dehner, J.-I. Hata, V.V. Joshi, B. Roald (1999a)

„Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors - recommendations by the International Neuroblastoma Pathology

Committee"
Cancer 86: 349-363, 1999

H. Shimada, I.M. Ambros, L.P. Dehner, J.-I. Hata, V.V. Joshi, B. Roald, D.O. Stram, R.B. Gerbing, J.N. Lukens, K.K. Matthay, R.P. Castleberry (1999b)

„The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System)“
Cancer 86: 364-372, 1999

N. Sidell (1982)

„Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro“
Journal of the National Cancer Institute 68: 589-596, 1982

T. Simon, A. Längler, U. Harnischmacher, M.C. Frühwald, N. Jorch, A. Clawiez, F. Berthold, B. Hero (2007)

„Topotecan, cyclophosphamide, and etoposide (TCE) in the treatment of high risk neuroblastoma. Results of a phase II trial“
Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 133: 653-661, 2007

S.K. Sjostrom, G. Finn, W.C. Hahn, D.H. Rowitch, A.M. Kenney (2005)

„The Cdk1 complex plays a prime role in regulating N-Myc phosphorylation and turnover in neural precursors“
Developmental Cell 9: 327-338, 2005

R. Spitz, B. Hero, M. Skowron, K. Ernestus, F. Berthold (2004)

„MYCN-status in neuroblastoma: characteristics of tumours showing amplification, gain, and non-amplification“
European Journal of Cancer 40: 2753-2759, 2004

J.A. Squire, P.S. Thorner, S. Weitzman, J.D. Maggi, P. Dirks, J. Doyle, M. Hale, R. Godbout (1995)

„Investigation of MYCN and a DEAD box gene (DDX1) in primary neuroblastoma“
Oncogene 10: 1417-1422, 1995

Y. Sunden, S. Semba, T. Suzuki, Y. Okada, Y. Orba, K. Nagashima, T. Umemura, H. Sawa (2007)

„DDX1 promotes proliferation of the JC virus through transactivation of its promoter“
Microbiology and Immunology 51: 339-347, 2007

T. Suzuki, E. Bogenmann, H. Shimada, D. Stram, R.C. Seeger (1993)

„Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas“
Journal of the National Cancer Institute 85: 377-384, 1993

M. Takimoto, T. Tomonaga, M. Matunis, M. Avigan, H. Krutzsch, G. Dreyfuss, D. Levens (1993)

„Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to

the human c-myc promoter, in vitro"
The Journal of Biological Chemistry 268: 18249-18258, 1993

J. Takita, Y. Hayashi, J. Yokota (1997)

„Loss of heterozygosity in neuroblastomas – an overview“
European Journal of Cancer 33: 1971-1973, 1997

K. Tanaka, S. Okamoto, Y. Ishikawa, H. Tamura, T. Hara (2009)

„DDX1 is required for testicular tumorigenesis, partially through the transcriptional activation of 12p stem cell genes“
Oncogene 28: 2142-2151, 2009

N.K.Tanner, P. Linder (2001)

„DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions“
Molecular Cell 8: 251-262, 2001

N.K. Taunk, S. Goyal, H. Wu, M.S. Moran, S. Chen, B.G. Haffty (2011)

„DEAD box 1 (DDX1) expression predicts for local control and overall survival in early stage, node-negative breast cancer“
Cancer 00: 1-11, 2011

W.R. Taylor, S.E. DePrimo, A. Agarwal, M.L. Agarwal, A.H. Schönthal, K.S. Katula, G.R. Stark (1999)

„Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53“
Molecular Biology of the Cell 10: 3607-3622, 1999

S.A. Tenenbaum, P.J. Lager, C.C. Carson, J.D. Keene (2002)

„Ribonomics: identifying mRNA subsets in mRNP complexes using antibodies to RNA-binding proteins and genomic arrays“
Methods 26: 191-198, 2002

C.J. Thiele (1998)

„Neuroblastoma Cell Lines“
J. Human Cell Culture. Lancaster, UK, Kluwer Academic Publishers. 1998, Vol 1, p 21-53

H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon (1979)

„Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications“
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76: 4350-4354, 1979

J.J. Tumulowicz, W.W. Nichols, J.J. Cholon, A.E. Greene (1970)

„Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma“
Cancer Research 30: 2110-2118, 1970

S.B. Turkel, H.H. Itabashi (1974)

„The natural history of neuroblastic cells in the fetal adrenal gland“
The American Journal of Pathology 76: 225-243, 1974

A. Valent, G. Le Roux, M. Barrois, M.J. Terrier-Lacombe, D. Valteau-Couanet, B. Leon, B. Spengler, G. Lenoir, J. Benard, A. Bernheim (2002)

„MYCN gene overrepresentation detected in primary neuroblastoma tumour cells without amplification“

Journal of Pathology 198: 495-501, 2002

A. Victor, S.J. Klug, M. Blettner (2005)

„cDNA-Microarrays - Strategien zur Bewältigung der Datenflut“

Deutsches Ärzteblatt, Jg. 102, Heft 6: A 355-360, 2005

A.F. Wahl, K.L. Donaldson, C. Fairchild, F.Y.F. Lee, S.A. Foster, G.W. Demers, D.A. Galloway (1996)

„Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis“

Nature medicine 2: 72-79, 1996

R.K. Wada, R.C. Seeger, G.M. Brodeur, P.A. Einhorn, S.A. Rayner, M.M. Tomayko, C.P. Reynolds (1993)

„Human neuroblastoma cell lines that express N-myc without gene amplification“

Cancer 72: 3346-3354, 1993

A. Weber, P. Imisch, E. Bergmann, H. Christiansen (2004)

„Coamplifikation of DDX1 correlates with an improved survival probability in children with MYCN-amplified human neuroblastoma“

Journal of Clinical Oncology 22: 2681-2690, 2004

P.S. White, J.M. Maris, C. Beltinger, E. Sulman, H.N. Marshall, M. Fujimori, B.A. Kaufman, J.A. Biegel, C. Allen, C. Hilliard (1995)

„A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within 1p36.2-.3“

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 5520-5524, 1995

P.S. White, P.M. Thompson, T. Gotoh, E.R. Okawa, J. Igarashi, M. Kok, C. Winter, S.G. Gregory, M.D. Hogarty, J.M. Maris, G.M. Brodeur (2005)

„Definition and characterisation of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma“

Oncogene 24: 2684-2694, 2005

W.G. Woods, R.-N. Gao, J.J. Shuster, L.L. Robison, M. Bernstein, S. Weitzman, G. Bunin, I. Levy, J. Brossard, G. Dougherty, M. Tuchman, B. Lemieux (2002)

„Screening of infants and mortality due to neuroblastoma“

The New England Journal of Medicine 346: 1041-1046, 2002

D.J. Yamashiro, A. Nakagawara, N. Ikegaki, X.G. Liu, G.M. Brodeur (1996)

„Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas“

Oncogene 12: 37-41, 1996

D. Yu, T. Jing, B. Liu, J. Yao, M. Tan, T.J. McDonnell, M.-C. Hung (1998)

„Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase“

Molecular Cell 2: 581-591, 1998

J. Yun, H.-D. Chae, H.E. Choy, J. Chung, H.-S. Yoo, M.-H. Han, D.Y. Shin (1999)

„p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y factor“

The Journal of Biological Chemistry 274: 29677-29682, 1999

Z. Zhang, T. Kim, M. Bao, V. Facchinetti, S.Y. Jung, A.A. Ghaffari, J. Qin, G. Cheng, Y.-J. Liu (2011)

„DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsRNA in dendritic cells“

Immunity 34: 866-878, 2011

11 Anhang

11.1 Primersequenzen

p18: 37 Zyklen, Hybridisierung 20 sek bei 60°C

forward: 5' - GGG GAC CTA GAG CAA CTT ACT AG - 3'

reverse: 5' - CTT TCA AAT CGG GAT TAG CAC C - 3'

CDK1: 29 Zyklen, Hybridisierung 20 sek bei 60°C

forward: 5' - TGG AAA CCA GGA AGC CTA GCA - 5'

reverse: 5' - TTT TGC CAG AAA TTC GTT TGG - 3'

ATM: 37 Zyklen, Hybridisierung 30 sek, bei 62°C

forward: 5' - GGC AAA ATC CTT CCT ACT C - 3'

reverse: 5' - GAT TCA TGG TCC AGT CAA A - 3'

BARD1: 30 und 35 Zyklen, Hybridisierung 20 sek bei 60°C

forward: 5' - TGA ATC ATC CTC AGC TAG CCA C - 3'

reverse: 5' - CCA GGA ACA ACA ACA TGA GTT AC - 3'

MYCN: 37 Zyklen, Hybridisierung 30 sek bei 60°C

forward: 5' - AGA CGA CAC CCT GAG CGA T - 3'

reverse: 5' - TGT GGT TTC TGC GAC GCT - 3'

11.2 Ausschnitt der Abb. 4 (ATM) im Original

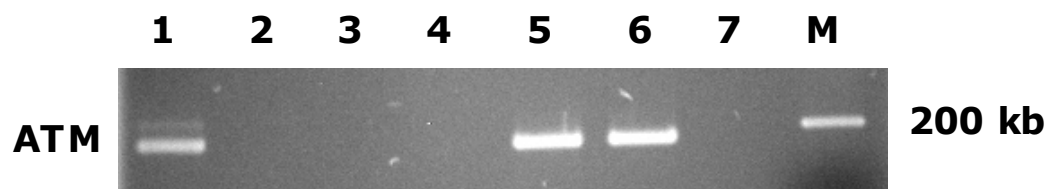


Abb. 7: Ausschnitt der Abb. 4 (ATM) im Original: Nachweis von ATM-cDNA mittels PCR und Gelelektrophorese. 1-3: SH-EP-Lysate (1: Input, 2: IP mit DDX1-AK, 3: IP mit Kontroll-AK), 4: kein Lysat, 5-7: IMR-32-Lysate (5: Input, 6: IP mit DDX1-AK, 7: IP mit Kontroll-AK), M: Marker.

12 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die bei Planung, Durchführung und Erstellung dieser Doktorarbeit geholfen haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Holger Christiansen für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der wissenschaftlichen Untersuchungen im Neuroblastomlabor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin an der Philipps-Universität Marburg.

Herrn PD Dr. med. Axel Weber danke ich für die gute Betreuung während der experimentellen Tätigkeit sowie für seinen Rat bei der Abfassung der Arbeit und für die Korrekturvorschläge.

Zudem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor - Herrn Dr. med. Eckhard Bergmann, Frau Monika Faulhaber und Frau Martina Seitz, meinen Mitdoktoranden Heiko Held, Johanna Dietl, Julian Dahms und Anja Schmidt - für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gegenseitige Unterstützung und Hilfe bei der Arbeit.

Herzlicher Dank geht zudem an die Microarray Unit des IMT Marburg - vor allem an Herrn Dr. rer. nat. Michael Krause und Frau Dr. rer. physiol. Birgit Samans - für die Planung, Durchführung und Auswertung des Microarray Experiments.