

**INHIBITION MYCN- VERMITTELT ZELLZYKLUSTRANSITION DURCH
THYROID CANCER 1 (TC1) IM NEUROBLASTOM – ETABLIERUNG UND
CHARAKTERISIERUNG DES TC1- ÜBEREXPRESSIONSPHÄNOTYPS IN
HUMANEN SH-EP NEUROBLASTOMZELLEN UNTER DEM EINFLUSS
VON MYCN**

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DR. MED.

AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT LEIPZIG

eingereicht von: Moritz Adrian Weiher
geboren am 28. Mai 1986 in Leipzig

angefertigt an: Medizinische Fakultät der Universität Leipzig
Universitätskinderklinik
Selbstständige Abteilung für Pädiatrische Onkologie,
Hämatologie und Hämostaseologie

Betreuer: Prof. Dr. med. Holger Christiansen
Dr. med. Sven Starke

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 17.11.2015

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Bibliographische Beschreibung</i>	<i>III</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>EINLEITUNG</i>	<i>I</i>
Neuroblastom	1
Epidemiologie	2
Histopathologie	3
Verschiedene Phänotypen von Neuroblastomzellkulturlinien	3
Klinik	4
Stadieneinteilung	5
Genetik	7
Myelocytomatosis related oncogene, Neuroblastoma derived - MYCN	8
Einfluss von MYCN auf den Zellzyklus, Proliferation und Apoptose	9
Beeinflussung der Genexpressionen durch MYCN	9
Hyperacetylierung durch MYCN	10
Thyroid Cancer 1 – TC1	11
TC1 Protein und mRNA	11
TC1 in verschiedenen Tumoren	11
Durch TC1 beeinflusste Signalwege	13
Interaktionen der TC1 Partner im Neuroblastom beeinflussen Proliferation und Apoptose	14
WNT/β-catenin Signalweg im Neuroblastom	14
Nuklear Faktor -κB im Neuroblastom	15
<i>Aufgabenstellung</i>	<i>17</i>
<i>MATERIAL UND METHODEN</i>	<i>19</i>
Material	19
Zellkultur	19
Kulturmedien und Zusätze	19
Transformation und Transfektion	20
Colony Forming Assay und Wachstumskurven	21
cDNS Umschreibung / Polymerase Ketten Reaktion / Real Time Detection Polymerase Ketten Reaktion	21
FACS	22
Abfrage der Versteeg Datenbank	23
Zellkultur	23
Plasmidherstellung	24
Transformation von XL10 Gold E. coli Bakterien	25
Transfektion und viraler Überstand	25
Infektion	26
Allgemeine Kulturbedingungen	26
Passagieren von Zellen	27
Bestimmung der Zellzahl	27
Einfrieren von Zellen	27
Auftauen von Zellen	28
Colony Forming Assay (CFA)	28
Nachbearbeitung	29
Proliferationsbestimmung	29
Mikroskopische Auszählung	29
Kristallviolett-färbungen	29
Viabilitätsbestimmung durch den Water Soluble Tetrasoliumsolt (WST) – Assay	30

Real Time Detection Polymerase Chain Reaction (RTD-PCR)	31
mRNS Isolation	31
cDNS Umschreibung	31
Durchführung	31
Polymerase Chain Reaction (PCR)	32
Gellauf	32
Tabelle 7 Verwendete Primer	34
Messungen	35
FACS	36
Propidium Iodid FACS	37
Annexin V Färbung	39
Statistische Auswertung, Grafik- und Textbearbeitung	40
<i>ERGEBNISSE</i>	42
Die Expression von TC1 ist prognostisch hochsignifikant mit einem Überlebensvorteil im Neuroblastom verbunden	42
Die Expression von TC1 korreliert nicht mit der MYCN Expression und ist in einem Panel von neun Neuroblastomzelllinien unabhängig vom MYCN Amplifikationsstatus	44
Expressionssteigerung von TC1 nach Aktivierung von MYCN in der durch 4OHT stimulierbaren Zelllinie SH-EP.mycnER	46
Erhöhte Expression von TC1- mRNS in der Zelllinie SH-EP.mycnER.TC1	48
Überexpression von TC1- mRNS führt zur verminderten Proliferation	50
Mikroskopische Auszählung	50
TC1 überexprimierende Zellen erreichen später Konfluenz in der Zellkultur	51
Verringerte Zellviabilität in TC1 überexprimierenden Zellen im Water Soluble Tetrasoliumsolt (WST) – Assay	52
Überexpression von TC1- mRNS und Aktivierung von MYCN führt mit synergistischem Effekt zu geringerer Koloniebildung von SH-EP.mycnER Zellen	54
Überexpression von TC1 führt nicht zur Induktion von MYC- mRNS	55
Verringerter Anteil an Zellen in der S-Phase durch einen G0/G1 Arrest in Zellen mit TC1 Überexpression	56
Verringerter Anteil von apoptotischen Zellen bei TC1 Überexpression im AnnexinV Apoptose Assay	58
Überexpression von TC1 führt nicht zur Induktion von P21	60
<i>DISKUSSION</i>	61
<i>Zusammenfassung der Arbeit</i>	69
<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	71
<i>ANHANG</i>	84
Verzeichnis der Tabellen	84
Verzeichnis der Abbildungen	85
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	87
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Danksagung	88

Bibliographische Beschreibung

Weiber, Moritz Adrian

Inhibition MYCN- vermittelter Zellzyklustransition durch Thyroid Cancer 1 (TC1) im Neuroblastom – Etablierung und Charakterisierung des TC1-Überexpressionsphänotyps in humanen SH-EP Neuroblastomzellen unter dem Einfluss von MYCN

Universität Leipzig, Dissertation

96 S., 160 Lit., 25 Abbildungen und 15 Tabellen

Referat:

Das Neuroblastom ist der dritthäufigste maligne Tumor im Kindesalter und ist für 15% der Todesfälle durch Krebs bei Kindern unter 14 Jahren verantwortlich. Viele molekularbiologische Vorgänge, die zu der heterogenen Prognose der Patienten beitragen, sind noch nicht verstanden. Als Hauptrisikomerkmak stellt sich die Amplifikation und erhöhte Expression von *MYCN* dar. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Christiansen zeigte *MYCN* Einfluss auf die Genregion von Thyroid Cancer 1 (TC1), das als neuer Marker für maligne Schilddrüsenkarzinome erkannt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden erste Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung von TC1 im Neuroblastom, sowie die Charakterisierung eines TC1 Überexpressionsphänotyps humaner Neuroblastomzelllinien unter Einfluss von *MYCN* durchgeführt. Es wurde ein Überexpressionsvektor von TC1 in die Neuroblastomzelllinie SH-EP eingebracht, welche über ein aktivierbares *MYCN*- Konstrukt verfügt. Dieser neue Phänotyp wurde bezüglich der Proliferation, des Zellzyklus und der Apoptose im Vergleich zu einer Kontrollzelllinie ohne Überexpression untersucht.

Eine In-silico Recherche in der Versteeg Neuroblastomdatenbank ergab eine deutlich bessere Überlebenswahrscheinlichkeit für Patientin mit hoher TC1 Expression.

Es konnte gezeigt werden, dass *MYCN* Amplifikation und Expression in einem Panel von Neuroblastom Zelllinien nicht mit der TC1 Expression korrelieren. Die spezifische Aktivierung von *MYCN* führte hingegen zu einer Expressionssteigerung von TC1. Weiterhin zeigte sich, dass eine TC1 Überexpression die Proliferation hemmt, indem es die *MYCN* induzierte G1- S-Phasen- Transition inhibiert. TC1 zeigt antiproliferative Eigenschaften im Zellkulturmodell und stellt sich als neuer prognostisch günstiger Parameter im Neuroblastom dar.

Abkürzungsverzeichnis

4OHT	4- Hydroxtamoxifen	MYCN	Translatiertes Proteinäquivalent zu <i>MYCN</i>
amp	amplifiziert	n.m.	nicht messbar
b	Basen	NA	nicht amplifiziert
bzw.	Beziehungsweise	NBL	Neuroblastom
CFA	Colony Forming Assay	P. gr.	Primergröße
DMSO	Dimethylsulfoxid	P21	cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21WAF1/CIP1
DNS	Desoxyribonukleinsäure	PBS	phosphate buffered saline
ER	Östrogenrezeptor	PEI	Polyethylenimin
EtOH	Ethanol	PI	Propidiumiodid
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	RKI	Robert Koch Institut
FGFR2	Fibroblasten-Growth-Factor-Rezeptor-2	RNS	Ribonukleinsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	RTD-PCR	Real Time Detection Polymerase-Chain Reaction
ggf.	gegebenenfalls	Stdabw	Standardabweichung
GN	Ganglioneurom	TC1	Thyroid Cancer 1
GNB	Ganglioneuroblastom	TCF	T-cell specific-transcription-factor
H2O2	Wasserstoffperoxid	Topt	Optimum Temperatur
HTERT	human Telomerase reverse transcriptase	u.a.	unter anderem
kDa	Kilo Dalton	vgl.	vergleiche
LB	lysogeny broth	VIP	Vasoaktives-Intestinalen-Peptid
LEF	Lymphoid-enhancer-binding-factor	WNT	Wingless und INT-1
LV	Leervektor	WST	Water soluble Tetrasoliumsolt
MPP+	1-methyl-4-phenylpyridiniumion	wt	Wild Typ
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure	z.B.	zum Beispiel
MYC	myelocytomatosis related oncogene, cellular	β2M	beta2 Mikroglobulin
MYCN	myelocytomatosis related oncogene, Neuroblastoma derived, Genlokus		

EINLEITUNG

Neuroblastome stellen die häufigsten soliden, extrakraniellen Tumore des Kindesalters dar. Sie fallen durch eine deutliche morphologische, genetische und prognostische Variabilität auf. Einer der Hauptmarker, der das Verhalten und die Prognose entscheidend beeinflusst, ist *MYCN*. Die Interaktionen zwischen *MYCN* und zellulären Vorgängen bzw. Proteinen sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Präliminäre Daten der eigenen Arbeitsgruppe ergaben Hinweise, dass *MYCN* über Acetylierungsvorgänge an Histonen zu einer transkriptionellen Regulation von *TC1* beiträgt. Bisher existieren keine publizierten Daten zur Rolle von *TC1* im Kontext des Neuroblastoms.

Neuroblastom

Das Neuroblastom (NBL) ist ein maligner Tumor mit zellulärem Ursprung aus embryonalen neuroektodermalen Zellen der Neuralleiste (van Noesel und Versteeg 2004). Man geht davon aus, dass das Neuroblastom durch einen Defekt während der Entwicklung und Differenzierung von Vorläuferzellen zu normalem Gewebe entsteht (van Noesel und Versteeg 2004). Aufgrund der embryonalen Herkunft sind vorrangig Kleinkinder, selten auch Erwachsene, betroffen (Esiashvili et al. 2007; Then et al. 2010). Das NBL ist vorwiegend im Bereich des sympathischen Grenzstranges und der Nebennieren lokalisiert, kann aber auch in anderen Bereichen des menschlichen Körpers auftreten, in denen Reste embryonaler Vorläuferzellen zu finden sind.

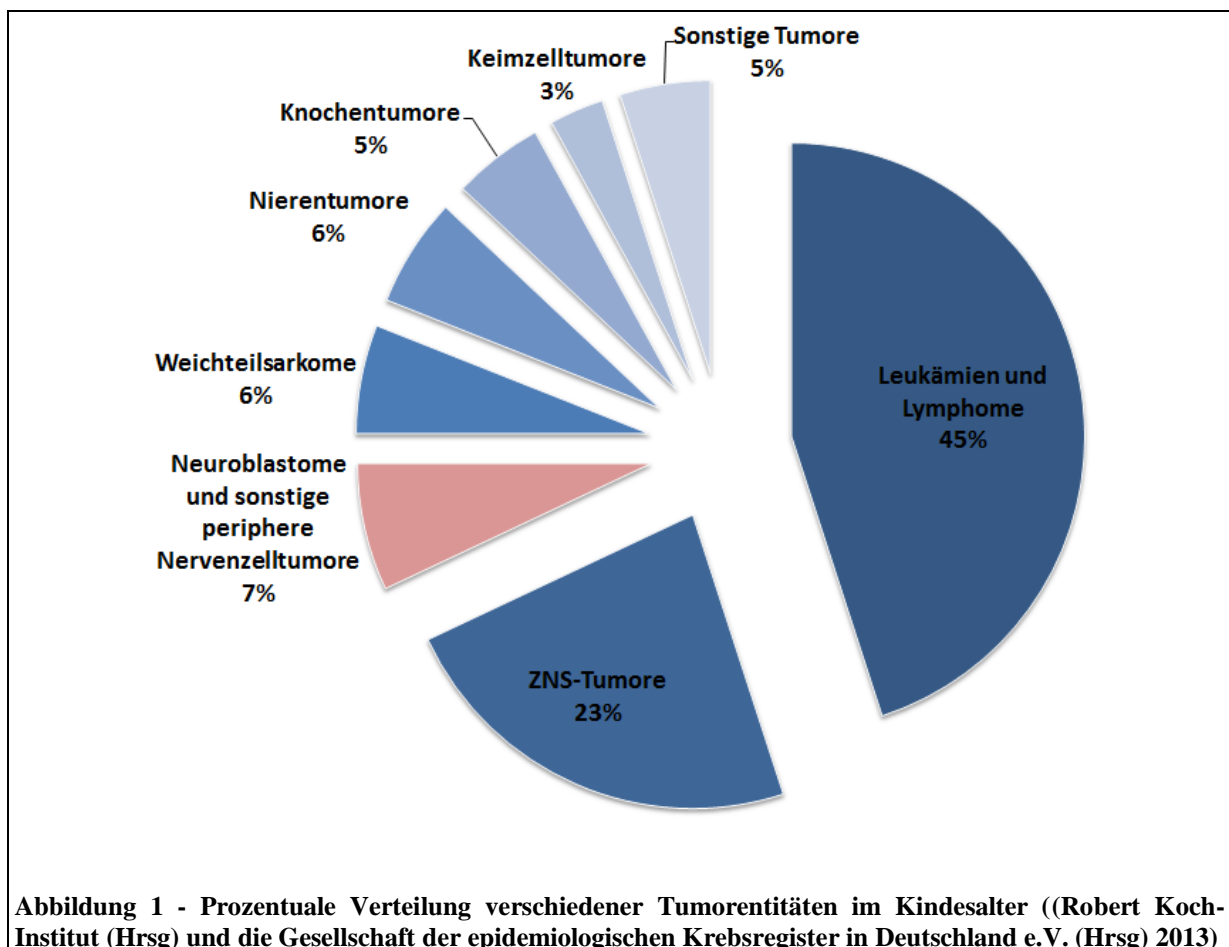
Das klinische Bild des Neuroblastom ist äußerst heterogen. Es können spontane Regressionen sowie Differenzierungsvorgänge auftreten. So ist bei einem Teil der Patienten die Prognose bei Beobachtung oder minimaler Therapie des Tumors gut, während andere Patienten trotz intensiver multimodaler Therapieansätze aufgrund progredienten Tumorwachstums versterben. Ursachen dieses heterogenen Verhaltens werden u.a. in zellulären und molekularbiologischen Vorgängen gesehen, die zu einer Fehlsteuerung der Proliferation und Apoptose beitragen (Bell et al. 2010).

Epidemiologie

Das Neuroblastom ist der dritthäufigste maligne und der häufigste solide, extrakranielle Tumor im Kindesalter (siehe Abbildung 1). Von 100.000 Kindern erkranken im Schnitt 1,4 Kinder. Dabei findet sich eine leicht erhöhte Erkrankungsrate bei Jungen. Auf 12 Jungen erkranken 10 Mädchen (Kaatsch 2010).

Ein Neuroblastom tritt in 40% der Fälle vor dem ersten Lebensjahr auf (Then et al. 2010) und wird im Schnitt im Alter von 17 Monaten diagnostiziert. Nur unter 2% der Patienten sind über 10 Jahre alt (London et al. 2005). Nach 15 Jahren leben noch 74% der Erkrankten (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) 2013), wobei das Erkrankungsstadium und insbesondere der Amplifikationsstatus des Gens *MYCN* eine entscheidende Rolle für die Prognose spielen. Auf *MYCN* wird im Verlauf noch weiter eingegangen.

Das Neuroblastom trägt zu 15% der Todesfälle durch Krebserkrankungen im Kindesalter bei. Eine familiäre Häufung kann nicht beobachtet werden, nur circa 1% aller Fälle sind als familiär bedingt zu betrachten (Longo et al. 2007).



Histopathologie

Klassische Neuroblastomzellen sind kleine, runde Zellen, die durch ein geringes Zytoplasma mit prominenten dunklen Nuklei geprägt sind. Mitotische Aktivität, Karyorrhesis und eine Pleomorphie sind weitere Kennzeichen. Sogenannte Homer-Wright Pseudorosetten treten häufig auf. Sie stellen kreisförmig angeordnete Zellverbände dar, deren Mitte mit eosinophilen Fibrillen, dem Neuropil, ausgefüllt ist. Dies stellt eine primitive Ausbildung von neuritischen Fortsätzen dar (Kumar et al. 2005).

Weiterhin lassen sich in histologischen Aufarbeitungen zwei weitere Zelltypen unterscheiden, die in ihrer Häufigkeit und Zusammensetzung den histologischen Subtyp kennzeichnen und damit Aussagen zur Malignität und Prognose ermöglichen (Shimada et al. 1999). Zum einen sind das Ganglionzellen, die mehr Zytoplasma, aufgelockerte Nuklei und prominente Nukleoli haben, zum anderen Schwann'sche Zellen. Ganglionzellen werden als Ausdifferenzierungsstadien von Neuroblastomen angesehen und zeigen die Ausprägung eines weniger proliferativen Ganglioneuroblastoms an. Die Schwann'schen Zellen grenzen sich genetisch von den Tumorzellen ab (Ambros et al. 1996; Bourdeaut et al. 2007). Ein Vorhandensein von Schwannzell-reichem Stroma spricht für eine gute Prognose. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass durch Wechselwirkungen von Neuroblastom- und Schwann'schen Zellen eine Ausdifferenzierung angeregt wird (Shimada et al. 1999; Liu et al. 2005). Diese Vielgestaltigkeit und Plastizität trägt zur jeweils unterschiedlichen Prognose mit der Möglichkeit einer spontanen Regression entschieden bei.

Verschiedene Phänotypen von Neuroblastomzellkulturlinien

In Neuroblastomen herrscht eine zelluläre Heterogenität, die sich ebenfalls in Zellkulturen von einzelnen Neuroblastomzellen darstellen lässt. Dabei lassen sich drei morphologisch und biochemisch abgrenzbare Entitäten feststellen: neuroblastische N-Typ-Zellen, Substrat-adhärenzte S-Typ-Zellen und intermediäre I-Typ-Zellen (Cheung und Cohn 2005). Bereits in frühen Experimenten zeigten sich Unterschiede bei In-Vitro gehaltenen Kulturen (Tumilowicz et al. 1970; Biedler et al. 1973). Zum Teil spiegeln die drei Zellarten Phänotypen von In-Vivo-Tumoren wieder (Ciccarone et al. 1989).

I-Typ-Tumoren stellen eine Mischform dar, während sich N- und S-Typ-Neuroblastomzellen in der Morphologie (Rettig et al. 1987; Ross et al. 2003) und Markerproteinen (Walton et al. 2004) unterscheiden.

Beide Zelltypen zeigen deutliche Unterschiede in ihrem Verhalten und dem malignen Potential. N-Typ-Zellen zeigen geringere Apoptoseraten und ein höhere Malignität im Tiermodell (Piacentini et al. 1996). Es gibt Unterschiede in der Apoptose (Carr-Wilkinson et al. 2011), z.B. durch eine geringe Sequestrierung von p53 in S-Typ-Zellen (Isaacs et al. 1998), oder erhöhte Expression von Bcl-2 in N-Typ-Zellen (Hanada et al. 1993). Außerdem zeigt sich eine geringere Translation von MYCN in S-Typ-Zellen (Spengler et al. 1997). Auf die herausragende Bedeutung von MYCN als Onkogen im Neuroblastom wird im Verlauf noch eingegangen werden.

Klinik

Das klinische Erscheinungsbild des Neuroblastoms ist extrem variabel und hängt vom Ort der Entstehung und der Biologie des Tumors ab. Es lässt sich eine Einteilung in drei abgrenzbare Entitäten machen, dem lokal wachsenden Tumor, dem metastasierenden Tumor und, als besondere Ausprägung, die 4S- Erkrankung (Maris et al. 2007).

Der lokal wachsende Tumor macht circa 40% der Erkrankungsfälle aus und ist gekennzeichnet durch seine verdrängende Wirkung auf umliegende Gewebe und Strukturen. Es kann zu neurologischen Ausfällen durch die Kompression von Spinalnerven oder sogar des Rückenmarkes kommen. In wenigen Fällen tritt ein paraneoplastisches Syndrom mit Sekretion von Vasoaktiven-Intestinalen-Peptid (VIP) oder in Form eines Opsoclonus-myoclonus-Syndroms auf. Die Sekretion von VIP führt zu wässriger Diarrhoe und im Verlauf zu Wachstumsretardierung (Husain et al. 2011; Bourdeaut et al. 2009). Das Opsoclonus-myoclonus-Syndrom tritt in 2-4% der Fälle eines Neuroblastoms auf und ist durch schnelle Augenbewegungen, Ataxie und unkontrollierte Muskelbewegungen gekennzeichnet (Krug et al. 2010; Pohl et al. 1996).

Etwa 50% der Patienten zeigen einen metastasierten Erkrankungszustand. Häufige Orte der Metastasierung sind das Knochenmark bei 71%, Knochen bei 56%, Lymphknoten bei 31% und Leber bei 30% der Patienten (DuBois et al. 1999). Der Allgemeinzustand ist meist stark beeinträchtigt durch hinzukommende Beschwerden, wie Knochenmarkversagen, Knochenschmerzen oder Renin-vermittelte Hypertension, je nach Ort der Metastasierung (Maris et al. 2007). Eine periorbitale Ekchymose ist ein typisches Zeichen für Streuung eines Neuroblastoms und trat in einer Studie in Toronto bei ca. 15% der Kinder auf (Musarella et al. 1984; Cliff et al. 2001).

Das 4S-Stadium, das in 5% der Fälle vorliegt, ist durch vorhandene Metastasen in Leber, Haut oder Knochenmark gekennzeichnet. Die Erkrankung kann spontan regredient sein oder aber lebensbedrohliche Komplikationen durch hohe Tumorlast und das schnelle Wachstum der Metastasen verursachen (Maris et al. 2007).

Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Beurteilung der Prognose und zur Planung einer individuellen Therapie. Im Laufe der Zeit wurden die offiziellen Einteilungen des Neuroblastoms immer weiter überarbeitet und verfeinert. Dies spiegelt das bessere Verständnis zellulärer Vorgänge wieder, das eine individuellere Therapie ermöglicht.

1971 wurde von Evans et al. eine Stadieneinteilung vorgestellt, die die anatomische Tumorausbreitung beschreibt (Evans et al. 1971). Die Einteilung stellt die Grundlage späterer Klassifizierungen dar und wurde 1988 von einer internationalen Expertengruppe überarbeitet (Brodeur et al. 1993). Auch hier überwiegt die chirurgische Beurteilung der Tumorausbreitung vor anderen Einteilungskriterien. Im Laufe der Zeit wurde aber die Wichtigkeit auch von molekularen und genetischen Markern erkannt, um eine bessere und individuellere Einschätzung vornehmen zu können. Von der International Neuroblastoma Risk Group wurde daher ein vereinfachtes Schema der Tumorausbreitung, wie es in Tabelle 1, Seite 6, angegeben ist, veröffentlicht (Monclair et al. 2009) und dazu eine weitere Klassifizierung erarbeitet, die Alter, histologisches Erscheinungsbild, Differenzierung und genetische Marker mit der Prognose und dem Risiko verknüpft, wie es in Tabelle 2 auf Seite 6 zu sehen ist (Cohn et al. 2009). Die Kenntnis von genetischen Markern ermöglicht die Abschätzung des klinischen Verhaltens des Neuroblastoms und das Erkennen von Patienten mit hohem Risiko (van Noesel und Versteeg 2004). Dabei spielt die MYCN Amplifikation die größte Rolle bei der Klassifikation als ein Hochrisiko-Neuroblastom mit entsprechenden geringen Überlebenschancen, wie in Abbildung 2 ersichtlich. Das Verständnis von zellulären Vorgängen aus molekularbiologischer Forschung zur Genetik und zur Biologie des Neuroblastoms ist zur Verbesserung unserer heutigen Behandlung notwendig (Maris et al. 2007).

Tabelle 1 – Einteilung nach International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) 2009 (Tabelle nach Monclair, 2009)

Stadium	
L1	Lokalisierte Tumor ohne Einbeziehung von vitalen Strukturen und beschränkt auf ein Körperareal
L2	Lokoregionaler Tumor mit Risikofaktoren in der Bildgebung
M	Fernmetastasierte Erkrankung
MS	Metastasierte Erkrankung bei Kinder jünger als 18 Monate mit Metastasen beschränkt auf Haut, Leber oder Knochenmark

Tabelle 2 – Einteilung nach der International Neuroblastoma Risk Group 2009 (Tabelle nach Cohn, 2009)

INRG Stadium	Alter (Monate)	Histologie	Tumor Differenzierung	MYCN	11q Aberration	Ploidität	Risikogruppe
L1/L2		GN Reif GNB gemischt					Sehr gering
L1		Andere als GN Reif oder GNB gemischt		NA			Sehr gering
L2	< 18	Andere als GN Reif oder GNB gemischt	Differenziert	NA	Nein		Niedrig
			Differenziert	Amp	Ja		Mittel
	≥ 18	GNB nodular; NBL	Schlecht / gar nicht differenziert	NA	Nein		Niedrig
				NA	Ja		Mittel
				Amp			Hoch
M	< 18			NA		Hyperdiploid	Niedrig
	< 12			NA		Diploid	Mittel
	12 < 18			NA		Diploid	Mittel
	< 18			Amp			Hoch
	≥ 18						Hoch
MS	< 18			NA	Nein		Sehr gering
				NA	Ja		Hoch
				Amp			Hoch

Legende: GN Ganglioneurom, GNB Ganglioneuroblastom, NBL Neuroblastom, NA nicht amplifiziert, Amp amplifiziert

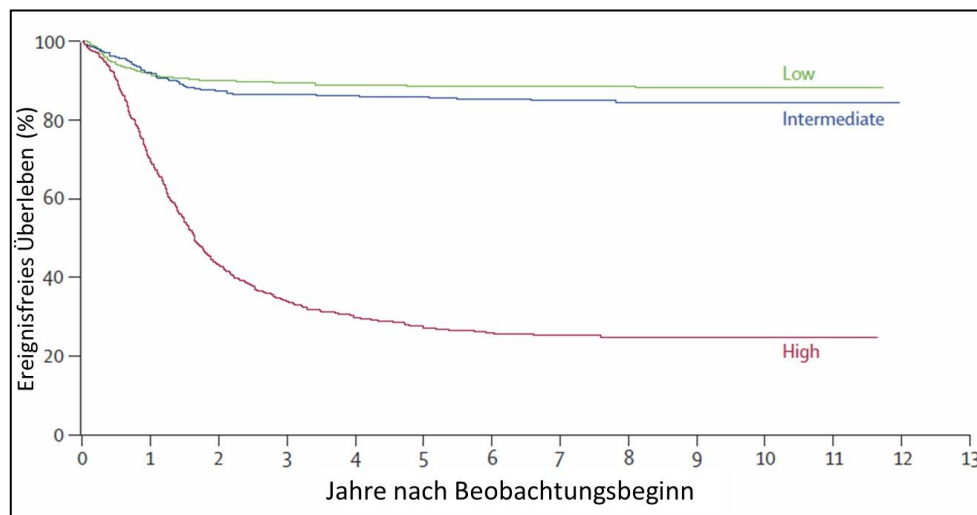


Abbildung 2 – Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Jahren nach Beobachtungsbeginn unterteilt in Risikogruppen mit niedrigem (Low, grün), mittlerem (Intermediate, blau) und hohem (High, rot) Risiko. Abbildung nach Figure 4 aus (Maris et al. 2007).

Genetik

Die genetische Einschätzung des Neuroblastoms ist unerlässlich bei der Beurteilung der Prognose und stellt eine wichtige Säule zur Therapieplanung dar. Schon in frühen genetischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Karyotyp des vorliegenden Tumors die Unterteilung in einen günstigen oder ungünstigen Verlauf ermöglicht (Christiansen und Lampert 1988). Das Neuroblastom ist geprägt von Amplifikationen und Verlusten von Genabschnitten. Ein polyploider Chromosomensatz ist häufig. Während ein hyperdiploider oder triploider Chromosomensatz mit einer besseren Prognose einhergeht, verlaufen di- und tetraploide Vervielfältigungen prognostisch schlechter (Hayashi et al. 1989; van Noesel und Versteeg 2004; Davidoff 2012). Auch einzelne Abschnitte werden vervielfältigt oder gehen verloren. Der Verlust eines kurzen Armes von Chromosom 1 (1p) oder eines langen Armes von Chromosom 11 (11q) tritt in Tumoren mit schlechterer Prognose auf (Christiansen und Lampert 1989; Fong et al. 1989; Guo et al. 1999).

Bereiche, die häufiger amplifiziert vorgefunden werden, sind der lange Arm von Chromosom 17 (17q) und Teile des kurzen Armes von Chromosom 2 (2p). In diesem Bereich von Chromosom 2 liegt das Onkogen MYCN. Eine Amplifikation dieses Gens führt zu einer deutlich schlechteren Prognose. (Brodeur et al. 1984; Christiansen et al. 1995; Vandesompele et al. 2001).

In der Zusammenschau genetischer Marker lässt sich die Malignität des Tumors, die Prognose und die damit notwendige Aggressivität der Therapie abschätzen. Eine Übersicht dazu bietet Tabelle 3.

Die genetischen Wechselwirkungen, die zur Fehlsteuerung des Neuroblastoms beitragen und den Zellzyklus fördern, aber ebenfalls zu einer spontanen Regression führen können, sind Ziele intensiver Forschung, aber bis jetzt noch schlecht verstanden (Bell et al. 2007); (Kitanaka et al. 2002).

Im „Danse Macabre“ (van Noesel und Versteeg 2004) der genetischen Fehlregulation des Neuroblastoms spielt MYCN eine wichtige Rolle.

Tabelle 3 – Einteilung von Neuroblastomzellen in prognostische Gruppen anhand genetischer Marker (nach Brodeur 2003 und van Noesel und Versteeg 2004)

	Geringes Risiko	Mittleres Risiko	Hohes Risiko
Alter	< 1 Jahr	> 1 Jahr	> 1 Jahr
5 Jahres Überlebensrate	95%	50%	25%
Ploidität	Hyperdi- /Triploid	Di-/Tetraploid	Di-/Tetraploid
1p Verlust	Selten	Selten	Häufig
11q Verlust	Selten	Häufig	Selten
17q Vervielfältigung	Selten	Häufig	Häufig
MYCN	Normal	Normal	Amplifiziert

Myelocytomatosis related oncogene, Neuroblastoma derived - MYCN

Myelocytomatosis related oncogene, Neuroblastoma derived (*MYCN*) wurde erstmals als *MYC* ähnliche Sequenz in amplifizierten Genbereichen von Neuroblastomzellen beschrieben (Schwab et al. 1983). Relativ schnell wurde der Nachweis von *MYCN* Amplifikationen mit einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium und einem schwereren Verlauf korreliert (Brodeur et al. 1984). *MYCN* stellt ein Onkogen dar und ruft in normalen Zellen neoplastische Veränderungen hervor (Schwab et al. 1985). Für die normale Entwicklung und Differenzierung von Zellen ist es, wie *MYC* auch, unverzichtbar (Varlakhanova et al. 2010). *MYC* lässt sich in der embryologischen Entwicklung von *MYCN* ersetzen (Malynn et al. 2000), sodass viele Erkenntnisse über *MYC* auf *MYCN* übertragen werden können.

Eine Amplifikation der Genregion von *MYCN* findet sich in circa 25% aller Neuroblastome (Look et al. 1991) und spricht für eine höhere Malignität (Brodeur et al. 1984; Seeger et al. 1985). Die Amplifikation geht mit einer höheren Expression von *MYCN* einher (Nisen et al. 1988; Souza et al. 2011). Aber auch in nicht amplifizierten Tumoren kann *MYCN* verstärkt exprimiert werden (Wada et al. 1993). Eine generelle Aussage über einen schlechteren Verlauf bei hoher *MYCN* Expression wird momentan kontrovers diskutiert (Souza et al. 2011). Es ist ein nicht linearer Zusammenhang anzunehmen, der durch vielfältige genetische Wechselwirkungen von *MYCN* ausgelöst wird, zu dessen auch die konträre Proliferationsanregung und Apoptoseneigung gehören (Tang et al. 2006; Dahms 2008).

Das translatierte Proteinäquivalent von *MYCN* ist MYCN. Dies ist ein 62-64 kDa großes Phosphoprotein, das vorwiegend im Nukleus zu finden ist und ebenfalls, wie das zu 38% homologe *MYC* Protein, an DNS binden kann (Slamon et al. 1986). Dies kann über eine Leuzin-Reißverschlussstruktur (Landschulz et al. 1988), eine Helix-Loop-Helix Struktur (Murre et al. 1989) und über eine basische Proteinregion erfolgen (Davis 1990). Eine Übersicht über

die DNS-bindenden Elemente gibt die Arbeit von Wenzel et al. (Wenzel und Schwab 1995). Durch diese Vielzahl von Wechselwirkungen wird den Vertretern der MYC Klasse diverse Beeinflussungsmöglichkeiten auf zelluläre Vorgänge ermöglicht.

Die vielfältigen Wechselwirkungen von MYCN führen zu einer grundlegenden Veränderung von zellulären Prozessen und tragen zur Entartung einer Zelle bei.

Einfluss von MYCN auf den Zellzyklus, Proliferation und Apoptose

MYCN beschleunigt die Proliferation durch eine Beschleunigung des G1-S Phase Überganges (Lutz et al. 1996). Um den G1-S Kontrollpunkt zu unterwandern bewirkt es einen G1 Arrest. Dazu wird Cyclin D induziert, das den Abbau von p27 auslöst (Bouchard 1999; Perez-Roger et al. 1999). Zusätzlich kommt es zu einer Repression von p21 (Bell et al. 2006).

MYCN induziert Apoptosen, wenn weitere Wachstumsfaktoren fehlen, wie z.B. bei Serummangel (Ueda und Ganem 1996; Jasty et al. 2001; Hogarty 2003), oder zusätzliche Apoptose-auslösende Signale hinzukommen, z.B. Chemotherapeutika (Fulda et al. 1999). Diese Ambivalenz der Beeinflussung von MYCN auf den Zellzyklus zeugt von den komplexen zellulären Vorgängen, die zur Tumorentstehung führen, und den notwendigen ausgleichenden Regulationen um das System zu stabilisieren (Evan und Littlewood 1998).

Einer der Partner der MYC Familie, die die Tendenz zur Apoptose unterdrücken, ist Bcl-2 (Cory et al. 1999). Dieses Protein befindet sich in der mitochondrialen Membran und verhindert die Apoptose (Hockenbery et al. 1990), indem es den Austritt von Cytochrom-c aus den Mitochondrien verhindert und damit die Aktivierung der Caspase-Kaskade blockiert (Kluck et al. 1997; Yang et al. 1997). Eine erhöhte Apoptose, ausgelöst durch Serummangel und Aktivierung von MYCN in einem MYCN-induzierbaren System, kann durch eine Bcl-2 Überexpression ausgeglichen werden (Ushmorov et al. 2008).

Beeinflussung der Genexpressionen durch MYCN

MYCN übt auf unterschiedliche Arten Wirkung auf andere Gene und Proteine aus (Bell et al. 2010), indem es auf die Translation und Transkription einwirkt. Dadurch wird eine Dysregulation von zellulären Vorgängen ermöglicht, die verschiedene Sicherungssysteme und selbst die MYC eigene Apoptoseneigung umgehen.

Es besitzt mehrere DNS bindende Regionen und es dimerisiert hierzu mit dem MAX Protein, um direkte Wirkung auf Ebene der DNS ausüben zu können (Amin et al. 1993; Wenzel und

Schwab 1995). Dadurch wird eine Bindung an Promotorregionen mit der Sequenz CACGTG (Westermarck et al. 2011) und eine Steigerung von Genexpressionen direkt ermöglicht.

Beispiele für eine direkte Beeinflussung der Steigerung der Proteinexpression durch MYCN sind α -Prothymosin, Ornithin decarboxylase und Id2 (Lutz et al. 1996). Für α -Prothymosin sowie Telomerase konnte eine direkte Bindung des MYCN/MAX Dimers an den Promotor nachgewiesen werden (Mac et al. 2000). Um von MYCN regulierte Gene in Neuroblastomzellen zu finden, wurden Zellsysteme entwickelt, in denen man MYCN gezielt ein- bzw. ausschalten kann. Dadurch können Veränderungen im Genom direkt auf die Wirkung von MYCN zurückgeführt werden (Eilers et al. 1989; Ushmorov et al. 2008). In einer Arraystudie mit einem solchen System zeigte sich eine hohe Beeinflussung von ribosomalen Proteinen (Boon et al. 2001). Zu erwähnen ist außerdem eine Beeinflussung des mRNS Abbaus durch Induktion von miRNS (Schulte et al. 2008).

Ein weiterer Weg zur Regulation der Genexpression ist über Hypermethylierung und – acetylierung von Genabschnitten. Eine Hypermethylierung durch MYCN wurde für das Caspase-8 Gen beschrieben, das die extrinsische Apoptosekaskade auslöst (Hopkins-Donaldson et al. 2000; Teitz et al. 2000). Durch Wechselwirkung mit dem TRansactivation/tRansformation- domain Associated Protein (TRRAP) ist es MYC Varianten möglich, die Histon Acetylierung mit konsekutiver Steigerung der Transkription zu beeinflussen (Cole und McMahon 1999).

Hyperacetylierung durch MYCN

Ausgehend von der Überlegung, dass MYCN über Acetylierung der DNA die Regulation anderer Gene beeinflussen kann, ergaben unpublizierte Daten der AG Christiansen, dass eine Aktivierung von MYCN in der Zellkultur über Acetylierungsvorgänge (Hypoacetylierung) zu einer Hochregulation von TC1 führt (Dr. E. Bergmann, persönliche Kommunikation, unpublizierte Daten). TC1 ist in verschiedenen Tumorsystemen als klassisches Onkogen bekannt. Bisher ist über eine Bedeutung von TC1 im Neuroblastom nichts publiziert (Stand Juni 2014), es stellt aber aufgrund der bisherigen Datenlage ein interessantes Target Gen für MYCN dar.

Thyroid Cancer 1 – TC1

Thyroid Cancer – 1 (TC1) ist ein im Jahr 2000 erstmals beschriebenes Gen und entspricht C8orf4, der offiziellen Bezeichnung, abgeleitet von der Genregion in der es liegt. Durch Suppressions- Subtraktions- Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass es in papillären Schilddrüsenkarzinomen im Vergleich zu normalem Schilddrüsengewebe überexprimiert wird (Chua et al. 2000). Darauf folgte die weitere Charakterisierung des Gens, der transkribierten mRNA und des daraus hervorgehenden Proteins (Chua et al. 2000; Sunde et al. 2004; Gall et al. 2007). TC1 ist innerhalb des Genoms von Vertebraten konserviert und besitzt daher eine biologische Bedeutung (Kim et al. 2009).

TC1 Protein und mRNA

Die Gensequenz von Thyroid Cancer 1 (TC1) befindet sich im Bereich 8p11.2 und umfasst 1833 Basen. Sie beinhaltet keine Introns und die abgelesene mRNA umfasst 1327 Basen (Chua et al. 2000). Es wird ein monomeres Protein mit 106 Aminosäuren transkribiert, das ein Molekulargewicht von 14,38kDa hat und nativ ungeordnet ist (Sunde et al. 2004). Nativ ungeordnete Proteine weisen keine Sekundärstruktur auf und es wird vermutet, dass sie dadurch mit einer größeren Anzahl verschiedener Partner interagieren können und durch Fehlen einer festen räumlichen Form weniger Platz innerhalb der Zelle benötigen (Uversky 2002; Fink 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass TC1 regulatorische Einflüsse ausübt (Gall et al. 2007).

Innerhalb von TC1 liegen eine Leuzin-Reißverschlussstruktur und eine Nucleus-Localisation-structure vor. Das Protein sammelt sich in den Bereichen der Nukleoli an und wird sehr strikt durch Proteasome reguliert (Jung 2006).

TC1 in verschiedenen Tumoren

Eine Bedeutung von TC1 konnte bisher gezeigt werden in Schilddrüsen- (Chua et al. 2000; Sunde et al. 2004; Melo Martins et al. 2007), Kolon- (Friedman et al. 2004), Magen- (Kim 2006), Mamma- (Yang et al. 2006; Yang et al. 2007; Xu et al. 2013), hämatologischen (Zhang et al. 2011) und Lungen- (Su et al. 2013) Tumoren. Eine Beschreibung im Neuroblastom steht momentan noch aus (Stand April 2014). Eine Übersicht bietet Tabelle 4 auf Seite 12.

Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte TC1 Expressionsrate kennzeichnend für Schilddrüsenkarzinome ist und sie gegenüber gutartigen Veränderungen der Schilddrüse abgrenzt (Melo Martins et al. 2007).

Analog wurde innerhalb von Magenkarzinomen festgestellt, dass TC1 mit einer erhöhten Aggressivität einhergeht und verstärkt bei höheren Tumorstadien und in Metastasen exprimiert wird (Kim 2006). Im Gegensatz hierzu sinkt die Expression von TC1 in Kolonkarzinomen mit steigender Malignität des Tumors auf ein Minimum bei Metastasen und innerhalb von Zellkulturen ab (Friedman et al. 2004). Eine neuere Untersuchung bestätigte die abnehmende Expression in Kolonkarzinomen und zeigte zum Vergleich die erhöhte Expression in Ovarialkarzinomen auf (Xu et al. 2013).

In Mammakarzinomen ist die Genregion 8p11-p12, in der auch TC1 liegt, in 15% der Fälle amplifiziert. Untersuchungen zeigten die tumorigene Wirkung einer TC1 Überexpression. Die Aktivierung des Fibroblasten-Growth-Factor-Rezeptor 2 (FGFR2), der in Mammakarzinomen überexprimiert wird, führt zu einer Verdopplung der TC1 Expression (Yang et al. 2006).

Ein proliferationsfördernder Effekt wurde auch in follikulären dendritischen Zellen festgestellt (Kim et al. 2006).

TC1 wird durch Cisplatin induziert und ist in Cisplatin-resistenten Tumoren durch Hypermethylierung ausgeschaltet (Chang et al. 2010).

Tabelle 4 – Bisherige Ergebnisse zu TC1 in verschiedenen Tumormodellen.

Zellart	TC1	Wirkung	Quelle
Schilddrüsenkarzinom	Überexpression	Erhöhte Malignität, reduzierte Apoptose, erhöhte Proliferation	(Chua et al. 2000) (Melo Martins et al. 2007) (Sunde et al. 2004)
Kolonkarzinom	Sinkende Expression mit höherem Tumorstadium		(Friedman et al. 2004) (Xu et al. 2013)
Ovarialkarzinom	Steigende Expression mit höherem Tumorstadium		(Xu et al. 2013)
Magenkarzinom	Überexpression	Höhere Aggressivität und Proliferation, Korrelation mit WNT	(Kim 2006)
Mammakarzinom	Amplifikation der Genregion	Tumorigene Wirkung	(Yang et al. 2006)
Follikuläre dendritische Zellen		Steigerung Proliferation	(Kim et al. 2006)
Hämatologische Malignome	Verlust von Kopien		(Zhang et al. 2011)
Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom	Steigende Expression mit höherem Tumorstadium	Erhöht Proliferation und Invasivität	(Su et al. 2013)

Durch TC1 beeinflusste Signalwege

TC1 bewirkt eine erhöhte Proliferation und geht mit einer größeren Aggressivität des Tumors in Schilddrüsen-, Magen- und Lungenkarzinomen einher (Sunde et al. 2004; Kim 2006; Su et al. 2013). Dies erreicht TC1 durch die Beeinflussung des Zellzyklus. Es reguliert unabhängig und teilweise abhängig von den Extracellular signal-Related Kinases 1 und 2 (ERK1/2) den Übergang der G1 zur S Phase des Zellzyklus positiv. Dabei erfolgt ein Teil der Aktivierung von TC1 sowohl über ERK1/2 als auch über diverse Wachstumsfaktoren (Wang et al. 2008).

Erklärungen für das aggressivere Verhalten wurden in einer Beeinflussung des WNT/ β -catenin Signalweges mit Aktivierung von nachgeschalteten Genen gesehen. Unter diesen Zielgenen wird MYC, als potentes Onkogen, und auch CyclinD1, als Zellzyklusregulator, positiv reguliert.

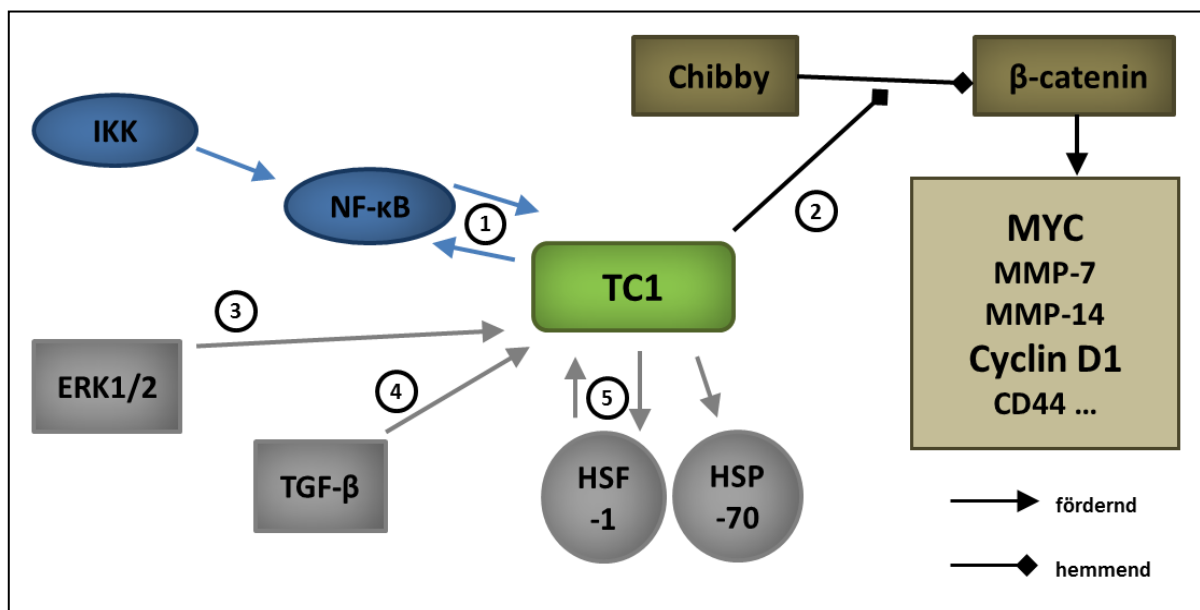


Abbildung 3 – grafische Zusammenfassung der im Text beschriebenen Wechselwirkungen von TC1 mit anderen zellulären Proteinen und Signalwegen. In den Kreisen sind die jeweiligen Literaturangaben: (1) Kim et al. 2009, (2) Jung 2006, (3) Wang et al. 2008, (4) Friedman et al. 2004, (5) Park et al. 2007

Die Beeinflussung des WNT/ β -catenin Signalweges erfolgt über eine konkurrierende Wirkung von TC1 und β -catenin um die Bindung an Chibby (Jung 2006). Durch die Bindung an Chibby kann β -catenin nicht mehr mit dem T-Cell-specific-transcription-factor (TCF) und dem Lymphoid-enhancer-binding-factor (LEF) interagieren, wodurch die Aktivierung der WNT/ β -catenin Zielgene ausfällt (Takemaru et al. 2003). Der Komplex TC1 – Chibby verhindert eine Anlagerung von β -catenin und entlässt es aus der negativen Wirkung von Chibby mit anschließender positiver Regulation der Zielgene von β -catenin (Jung 2006). Dabei werden

nicht alle Zielgene des WNT/ β -catenin Signalweges gleichermaßen stimuliert (Yang et al. 2007).

Durch extrazellulären Stress, wie UV-Strahlung, Hitze oder H_2O_2 , wird TC1 hochreguliert (Park et al. 2012). Dabei läuft die Aktivierung von TC1 über den Heat Shock Factor 1 (HSF-1), den TC1 im positiven Feedback stimuliert. Das Heat Shock Protein 70 (HSP-70) und Interleukin 6 (IL-6) werden durch TC1 verstärkt exprimiert. Dadurch erhält TC1 eine regulatorische Aufgabe innerhalb der Stressantwort der Zelle, die bei einem TC1 Knock-down inadäquat ausfällt (Park et al. 2012).

Die Expression von TC1 wird durch Interleukin 1- β (IL1- β) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) über Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) gesteigert (Kim et al. 2006). TC1 verbessert die DNS Bindung und den Kerntransport von NF- κ B (Kim et al. 2009).

Interaktionen der TC1 Partner im Neuroblastom beeinflussen Proliferation und Apoptose

WNT/ β -catenin Signalweg im Neuroblastom

Die WNT Familie besteht aus 19 Proteinen (Nusse und Lim 2013) und ist ein wichtiger Signalgeber zur Ausbildung der Neuralleiste (Wu et al. 2003). Sie trägt entscheidend zur Ausbildung und Differenzierung von neuroektodermalen Zellen bei und ist damit neben *MYCN* ein wichtiges Gen zur Differenzierung der neuroblastischen Zellen (Cheung und Cohn 2005).

Der WNT/ β -catenin Signalweg besteht aus verschiedenen Signalkaskaden, die in einen canonical und in einen non-canonical Weg eingeteilt werden.

Im canonical Weg kommt es zur Hemmung des Abbaus von β -catenin mit anschließender Akkumulation und Translokation in den Nukleus, wo es verschiedene genregulatorische Aufgaben in Verbindung mit TCF/LEF übernimmt. Ausgelöst wird der Vorgang durch Aktivierung des Frizzle(Fz)/Low density lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) Rezeptors durch WNT mit anschließender Hemmung des GSK3-APC-Axin Komplexes, der den Abbau von β -catenin steuert (Karim et al. 2004; Logan und Nusse 2004).

Der non-canonical Weg stellt verschiedene Signalkaskaden dar, die durch die Aktivierung des Fz-Rezeptors durch WNT ausgelöst werden. Hauptsächlich werden über ein gekoppeltes G-

Protein Inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃), 1,2 diacylglycerol (DAG) und Ca²⁺ gesteigert und die davon abhängigen Signalwege ausgelöst. Deshalb wird er auch als Calcium-abhängiger Signalweg bezeichnet (De 2011).

Der WNT/ β -catenin Signalweg ist bei unterschiedlichen Erkrankungen gestört (Moon et al. 2004), vornehmlich in Karzinomen, wie beim Kolonkarzinom mit Defekt des *APC* Gens (Munemitsu et al. 1995; Morin 1999). Die Aktivierung von WNT/ β -catenin abhängigen Zielgenen führt zur Steigerung der Expression von mehreren verschiedenen Genen, darunter Cyclin D1 und *MYC* (Akiyama 2000).

Im Neuroblastom konnte eine erhöhte WNT-Liganden-Expression mit verstärkter Expression von β -catenin in Hochrisikotumoren ohne Amplifikation von *MYCN* gezeigt werden (Liu et al. 2007). Dies bestätigte den vorherigen Nachweis einer niedrigen Expression von WNT-5 α in Hochrisiko-Neuroblastomen (Blanc et al. 2005b). In Doxorubicin-unempfindlichen Neuroblastomzellen zeigt sich ebenfalls eine erhöhte Aktivierung des WNT/ β -catenin Weges mit verstärkter Expression des *MDR1* Genes (Flahaut et al. 2009). Interessanterweise konnte in dieser Studie und auch in der von Liu et al. durchgeführten Untersuchung keine Steigerung der Aktivität von β -catenin/TCF im TOPflash reporter Assay gezeigt werden.

Demgegenüber zeigt sich bei Hemmung von WNT1 in der nicht *MYCN* amplifizierten Zellreihe SH-SY5Y ein schlechteres Wachstum mit erhöhter Apoptose (Zhang et al. 2009).

Nuklear Faktor - κ B im Neuroblastom

Die Familie der Nuklear Faktor- κ B (NF- κ B) Proteine umfasst fünf Gene, *NFKB1*, *NFKB2*, *RelA*, *RelB* und *c-Rel*, aus denen sieben Proteine hervorgehen, *RelA*, *RelB*, *c-Rel*, *p105*, *p50*, *p100* und *p52* (Chen und Greene 2004). Diese Proteine besitzen als gemeinsames Merkmal am N-terminalen Ende eine circa 300 Aminosäuren lange homologe, sogenannte Rel-homology domain (Grumont und Gerondakis 1989; Mosialos et al. 1991). Es werden drei verschiedene Hauptsignalkaskaden unterschieden, ein canonical sowie ein non-canonical Weg und ein atypischer Signalweg (Perkins 2007; Gilmore 2006). Zur Entfaltung ihrer Wirkung dimerisieren sie und können nach Übergang in den Nukleus an sogenannten Nuklear Faktor- κ B Elementen der DNS die Transkription sowohl aktivieren als auch hemmen.

Initial wurden sie als Proteine charakterisiert, die an die Immunglobulin-heavy-chain- μ -and- κ -enhancer-Sequenz binden (Singh et al. 1986; Sen und Baltimore 2006). Deshalb wurden ihnen Steuerungseigenschaften im Bereich der Immunantwort zugeschrieben. Mit der Zeit

wurde ihr Einfluss in fast allen zellulären Vorgängen deutlich (Chen und Greene 2004). NF- κ B zeigt eine Vielzahl von Interaktionen und kann oft gegensätzliche Effekte hervorrufen (Perkins und Gilmore 2006).

Diese Ambivalenz zeigt sich auch in bisherigen Untersuchungen im Neuroblastom. In den S-Typ SH-EP Zellen wurde nachgewiesen, dass NF- κ B für das Überleben notwendig ist und eine Hemmung zu vermehrter Apoptose führt (Bian 2002). Demgegenüber scheint er aber die Apoptose durch MPP⁺ in SH-EP Zellen zu vermitteln (Yang et al. 2010). Ebenfalls zeigt sich, dass NF- κ B in N-Typ Neuroblastomen die Apoptose vermittelt, insbesondere nach Einwirkung von Doxorubicin (Bian et al. 2001) oder Acetaminophen (Posadas et al. 2012). Eine aktuelle Arbeit stellt diese Ambivalenz des NF- κ B Systems noch weiter heraus und zeigt in einem N-Typ System, dass NF- κ B die Apoptoseinduktion von Trimethyltin durch eine Erhöhung von bcl-2 und XIAP verhindert (Qing et al. 2013).

Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Ist die Expression von TC1 von prognostischer Bedeutung für Patienten mit Neuroblastom?
- Ist die Amplifikation von MYCN mit einer höheren oder niedrigeren Expression von TC1 assoziiert?
- Führt die Expression von MYCN zu einer transkriptionellen Regulation von TC1?
- Weiterhin soll ein Zellkulturmodell mit stabiler Überexpression von TC1 in einer Neuroblastomzelllinie etabliert werden. Dadurch soll geklärt werden, ob eine TC1 Überexpression zu einer veränderten Proliferation, Apoptose oder zu einem veränderten Zellzyklus führt.
- Darauf aufbauend soll außerdem der regulative Einfluss von MYCN auf Proliferation, Apoptose und Zellzyklus in dem neu etablierten Zellmodell untersucht werden.

MATERIAL UND METHODEN**Material****Zellkultur**

	Hersteller	Herstellerbezeichnung	Herstellernummer
6-well Platte	<i>Greiner Bio-One CellStar</i>	<i>6 Well Cell Culture Plate</i>	<i>657 160</i>
24-well Platte	<i>Greiner Bio-One CellStar</i>	<i>TC Platte 24 Well</i>	<i>662 160</i>
96-well Platte	<i>Greiner Bio-One CellStar</i>	<i>96 Well Cell Culture Plate</i>	<i>655 180</i>
Zellkulturplatte 15 cm	<i>Sarstedt</i>	<i>Tissue Culture Dish 150x20 mm</i>	<i>83.1803</i>
Zellkulturplatte 10 cm	<i>Sarstedt</i>	<i>Tissue Culture Dish 100x20 mm</i>	<i>83.1802</i>
Stripette 5 ml	<i>Sarstedt</i>	<i>Serological Pipette 5 ml</i>	<i>86.1253.001</i>
Stripette 10 ml	<i>Sarstedt</i>	<i>Serological Pipette 10 ml</i>	<i>86.1254.001</i>
Stripette 25 ml	<i>Sarstedt</i>	<i>Serological Pipette 25 ml</i>	<i>86.1685.001</i>
Falcon 50 ml	<i>Greiner CellStar</i>	<i>Polypropylene Tube</i>	<i>227 261</i>
Falcon 15 ml	<i>Sarstedt</i>	<i>Röhre 15 ml</i>	<i>62-554 502</i>
Kryo Tube	<i>Nunc</i>	<i>Cryogenic Tubes</i>	<i>375353</i>

Kulturmedien und Zusätze

	Hersteller	Herstellerbezeichnung	Herstellernummer
RPMI Medium	<i>PAA</i>	<i>RPMI 1640</i>	<i>E15-842</i>
DMEM	<i>PAA</i>	<i>DMEM High Glucose</i>	<i>E15-843</i>
PBS	<i>PAA</i>	<i>Dulbecco's PBS (1x)</i>	<i>H15-002</i>
FCS	<i>PAA</i>	<i>Fetal Bovine Serum Standard Quality</i>	<i>A15-101</i>
Penicillin / Streptomycin	<i>PAA</i>	<i>L-Glutamin 200mM with Pen/Strep 100x</i>	<i>P11-013</i>
Hygromycin	<i>PAA</i>	<i>Hygromycin B</i>	<i>P02-015</i>
Neomycin	<i>PAA</i>	<i>G-418 Sulphate</i>	<i>P31-011</i>
Puromycin	<i>InvivoGen</i>	<i>Puromycin</i>	<i>ant-pr-1</i>

MATERIAL UND METHODEN

Trypsin	PAA	Trypsin EDTA (10x)	L11-003
DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG	Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie	A994.1
4OHT	Sigma	(Z)-4-Hydroxytamoxifen	H7904
Ethanol, rein	Merck	Ethanol	1.11727.2500

Vollmedium für SH-EP Zellen		Hungermedium	
RPMI Medium	500 ml	RPMI Medium	500 ml
FCS	50 ml (10%)	FCS	5 ml (1%)
Penicillin/Streptomycin	5 ml (1%)	Penicillin/Streptomycin	5 ml (1%)
Neomycin	1,5 ml (0,3%)	Neomycin	1,5 ml (0,3%)
Einfriermedium		Trypsin 1%	
Vollmedium	65%	Trypsin	5 ml
FCS	25%	PBS	45 ml
DMSO	10%		
Vollmedium für PhönixEco Zellen			
DMEM	500 ml		
FCS	50 ml (10%)		
Penicillin/Streptomycin	5 ml (1%)		

Zellkulturzusätze

	SH-EP.mycnER	SH-EP.mycnER.TC1	SH-EP.mycnER.LV
Medium	Vollmedium		
Hygromycin	200 µg/ml Medium	-	-
Puromycin	-	2,5 µg/ml Medium	

4OHT
4OHT + Ethanol, rein eingestellt auf 1mmol

Transformation und Transfektion

	Hersteller	Herstellerbezeichnung	Herstellernummer
Ampicillin	ratiopharm	Ampicillin-ratiopharm® 1,0	PZN-2036628
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG	LB-Medium (Luria/Miller)	X968.1
Polyethylenimin (PEI)	Polyscience	Polyethylenimin, Linear (MW 25,000)	#23966
Plasmid Aufreinigung	Qiagen	MaxiPrep Kit	12163
Bakterienschüttler	Edmund Bühler GmbH	SM30 mit TH30 Aufsatz	
Bakterienzentrifuge	Beckman	Allegra 64R Centrifuge	
Konzentrationsbestimmung	ThermoScientific	Nanodrop	

Plasmide

pcDNA3.HA-TC1	Von der Arbeitsgruppe von Inchul Lee, Seoul Korea
pBabe.puro	Bestände der AG Christiansen, Ursprung: (Morgenstern und Land 1990)
pBabe.puro.TC1	Umkloniert von E. Bergmann am 16.02.2010 in Leipzig

Mikroskop mit Fluoreszenz	Keyence	Bioone
Kryotank	AIR LIQUIDE	ARPEGE 140
Tiefkühlschrank (-80°C)	Lettich	Freezer HS5586

Colony Forming Assay und Wachstumskurven

Kristallviolettlösung		Entfärbelösung	
Kristallviolett	0,5%	Essigsäure	10%
Ethanol, vergällt	20%	Ethanol, vergällt	30%
H ₂ O	79,5%	H ₂ O	60%

	Hersteller	Herstellerbezeichnung	Herstellernummer
Kristallviolett	<i>Sigma</i>	<i>Crystal Violet</i>	<i>C3886</i>
Ethanol, vergällt	<i>Dr. K. Hollborn & Söhne</i>	<i>Ethanol 99% mit Methylethylketon vergällt</i>	<i>EG-Nr. 200-578-6</i>
Ethanol, rein	<i>Merck</i>	<i>Ethanol</i>	<i>1.11727.2500</i>
Trypanblau	<i>Sigma</i>	<i>TRYPAN BLUE SOLUTION (0,4%)</i>	<i>T8154</i>
WST	<i>Roche</i>	<i>WST-1</i>	<i>11644807001</i>
Essigsäure	<i>Roth</i>	<i>Essigsäure</i>	<i>KK62.1</i>

**cDNS Umschreibung / Polymerase Ketten Reaktion / Real Time Detection
Polymerase Ketten Reaktion**

	Hersteller	Herstellerbezeichnung	Herstellernummer
HotStarTaq Mix	<i>Qiagen</i>	<i>HotStarTaq Plus</i>	<i>203605</i>
SYBR Green	<i>ThermoScientific</i>	<i>Absolute qPCR SYBR Green Mix</i>	<i>AB-1158/B</i>
RNeasy Mini Kit	<i>Qiagen</i>	<i>RNeasy Mini Kit</i>	<i>74106</i>
dATP	<i>Applied Bioscience</i>	<i>dATP</i>	<i>18252-015</i>
dTTP	<i>Applied Bioscience</i>	<i>dTTP</i>	<i>18255-018</i>
dCTP	<i>Applied Bioscience</i>	<i>dCTP</i>	<i>18253-013</i>
dGTP	<i>Applied Bioscience</i>	<i>dGTP</i>	<i>18254-011</i>
Oligo-dt Primer	<i>Invitrogen</i>	<i>Oligo(dT) 12-18 Primer</i>	<i>18418012</i>
RNase	<i>Invitrogen</i>	<i>RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor</i>	<i>10777</i>
M-MLV-RT	<i>Invitrogen</i>	<i>M-MLV Reverse Transcriptase</i>	<i>28025</i>

MATERIAL UND METHODEN

Mercaptoethanol	<i>Sigma</i>	<i>2-Mercaptoethanol</i>	<i>M3148</i>
96-well PCR Platte	<i>Sarstedt</i>	<i>96 Well Multiply® -PCR Plate</i>	<i>72.1980.202</i>
Plattenfolie	<i>BioRad</i>	<i>Microseal B Adhesive Sealer</i>	<i>MSB-1001</i>
SmarLadder SF	<i>Eurogentec</i>	<i>SmartLadder SF</i>	<i>MW-1800-04</i>
Agarose	<i>Roth</i>	<i>Agarose HR-PLUS</i>	<i>HP30.2</i>
Ethidiumbromid	<i>Merck</i>	<i>Ethidiumbromid 1%</i>	<i>1.11608.0030</i>
TAE- Konzentrat	<i>MILLIPORE</i>	<i>Modified TAE Buffer Concentrate 50x</i>	<i>V78053</i>
Primer		<i>Siehe Extraseite, Tabelle 7, Seite 34</i>	
RTD-PCR Gerät	<i>BioRad</i>	<i>C1000 Thermal Cycler, CFX96</i>	
PCR-Gerät	<i>Applied Bioscience</i>	<i>Gene Amp PCR System 2400</i>	
Heizplatte	<i>IKAMAG</i>	<i>REO</i>	
UV – Fotokammer	<i>Pharmacia Biotech</i>	<i>Image Master VDS</i>	
Spannungsquelle	<i>Pharmacia Biotech</i>	<i>Gene Power Supply GPS 200/400</i>	

FACS

<i>PI Färbe Lösung</i>	
PBS	99,9 ml
Triton-X-100	0,1 ml (0,1%)
DNase freie RNaseA	20 mg
Propidium Iodid	2 mg

	Hersteller	Herstellerbezeichnung	Herstellernummer
FACS Röhrchen	<i>BD Falcon</i>	<i>5ml Polystyrene Round Bottom Tube</i>	<i>352 054</i>
Propidium Iodid	<i>Sigma</i>	<i>Propidium Iodide</i>	<i>P4170</i>
PBS	<i>PAA</i>	<i>Dulbecco's PBS (1x)</i>	<i>H15-002</i>
Triton-X-100	<i>Sigma</i>	<i>Triton® X-100 for molecular biology</i>	<i>T8787</i>
RNase A	<i>Roth</i>	<i>RNase A</i>	<i>7164.1</i>
ApoAlert® Annexin V Kit	<i>Clontech Laboratories</i>	<i>ApoAlert® Annexin V Apoptosis Kit</i>	<i>630109</i>
FACS Gerät mit Software	<i>BD Science</i>	<i>BD LSR II (Firmware 1.9)</i>	
Auswertsoftware	<i>BD Science</i>	<i>BD FACS Diva (Version 6.1.3)</i>	
		<i>FlowJo (Version 7.6.5)</i>	

Abfrage der Versteeg Datenbank

Es wurde am 30.12.2013 die Versteeg Datenbank unter

R2: microarray analysis and visualization platform (<http://r2.amc.nl>) (Jan Koster und Rogier Versteeg)

abgefragt. Dabei wurde das Single Dataset „Tumor Neuroblastoma public - Versteeg - 88 - MAS5.0 - u133p2“ verwendet und nach *C8orf4*, als Kennzeichnung für TC1, als „Probe set“ gesucht. Es sind keine Veränderungen an den Voreinstellungen der grafischen Darstellung gemacht wurden. Es erfolgte mit dem Kaplan Scanner eine Kaplan-Meier Analyse nach allen Datensätzen (overall) sowie unter Ein- und Ausschluss der *MYCN* Amplifikation.

Zellkultur

Zur Untersuchung der biologischen Wirkungen einer hohen TC1 Expression sollte eine Neuroblastomzelllinie mit konstant stabiler hoher TC1 Expression geschaffen und über einen längeren Zeitraum verfolgt werden.

Dazu wurde die Neuroblastomzelllinie SH-EP.mycnER ausgewählt, welche eine niedrige Grundexpression von TC1 aufweist. Diese Zelllinie besitzt einen murinen viralen Oberflächenrezeptor.

Außerdem enthält sie ein stabil integriertes und gut charakterisiertes chimäres MYCN-Fusionsprotein, welches durch Tamoxifen (4OHT) über einen Östrogen Rezeptor (ER) aktivierbar ist (Eilers et al. 1989; Schulte et al. 2008). Durch Gabe von Tamoxifen ändert das mycnER Konstrukt seine Konformität und erlaubt eine Translokation in den Nukleus, von wo es genregulierende Eigenschaften übernehmen kann.

Dadurch sind Wirkungen von MYCN und TC1 gleichzeitig in einem System beobachtbar.

Zur stabilen Einbringung wurde das TC1 Gen in einen pBABE-puro Vektor inkloniert. In diesem Vektor liegen Resistenzgene für Ampicillin und Puromycin vor und TC1 steht unter Kontrolle des SV40 Promotors, der eine hohe Expression sichert.

Technisch wurde eine Infektion mit viralem Überstand aus PhönixEco Zellen durchgeführt. Durch eine Polyethylenimin (PEI) Transfektion wurde zuvor in die PhönixEco Zelllinie der Vektor eingebracht.

Plasmidherstellung

Das pcDNA3.HA-TC1 Plasmid wurde uns freundlicherweise von Inchul Lee (Seoul, Korea) zur Verfügung gestellt. Durch Dr. med. Eckhard Bergmann wurde das TC1 Gen von diesem Vektor in ein pBABE.puro Plasmid umklontiert. Die schematische Darstellung des Plasmid Vektors ist in Abbildung 4 auf Seite 24 abgebildet.

XL10 Gold Bakterien wurden zur Replikation des Vektors verwendet. Die Plasmide wurde mittels Transformation in die Bakterien eingebracht und durch das Bakterienwachstum in Flüssigmedium über Nacht vermehrt. Anschließend wurde eine Plasmidaufreinigung mit dem Qiagen MaxiPrep Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid- DNS Konzentration wurde am NANODROP (ThermoScientific) durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt.

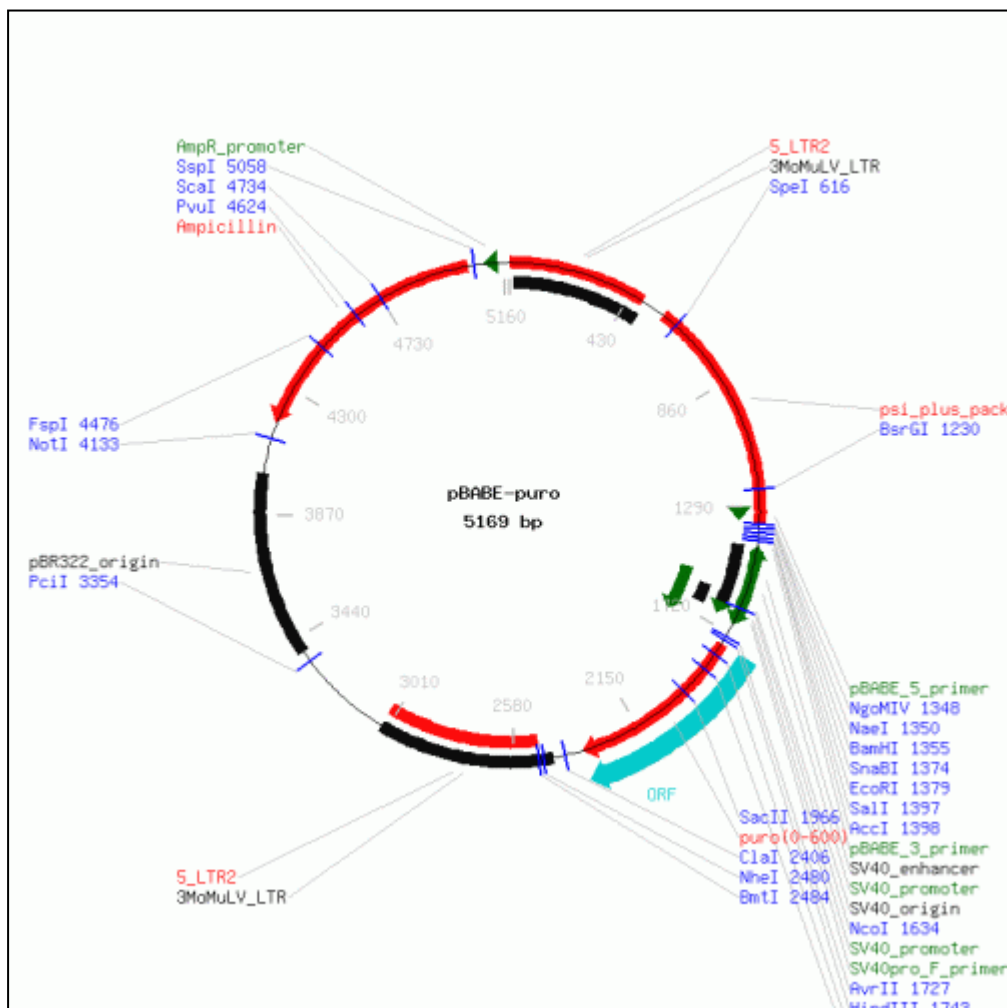


Abbildung 4 – Schematische Darstellung des verwendeten pBABE-puro Vektors. Aus Lablife

Transformation von XL10 Gold E. coli Bakterien

Zur Vermehrung der Plasmid Vektoren wurden XL10 Gold E.coli Bakterien verwendet (Labore der Universitätskinderklinik Leipzig). Diese wurden bereits durch die medizinisch technische Assistentin Sylvia Taube chemisch kompetent gemacht und als Zellpellets von 1 ml bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden eine Tube des Bakterienstammes auf Eis über 10 min aufgetaut. Im Anschluss erfolgte vor Beigabe von 1 mg Plasmid ein Hitzeschock von 55°C über 1 min und die anschließende Überführung in 3 ml LB-Medium ohne Ampicillin. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C im Schüttler. Danach wurden die Bakterien über Nacht in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin in einer Konzentration von 100µg/ml im Bakterenschüttler inkubiert.

Transfektion und viraler Überstand

Die Transfektion erfolgte mit der Polyethylenimin (PEI) Methode. Dabei bildet das PEI um die Plasmid-DNS ein Vesikel und erleichtert die Anlagerung der DNS an die Zellwand und dadurch die spätere Endozytose der Vektoren.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden am Vortag PhönixEco Zellen in der 5. Passage auf drei 10 cm Zellkulturplatten mit je einer Zellzahl von 5×10^6 Zellen in 10 ml DMEM- Medium ausgesetzt. Dadurch wurde am folgenden Tag eine Zelldichte von 80-90% erreicht, um einen hohen Transfektionserfolg zu sichern.

Das Medium wurde durch 6 ml frisches DMEM Medium ersetzt.

Der Transfektionsmix wurde frisch hergestellt. Dazu wurde getrennt pro Platte in separaten Eppendorf Tubes 50 µl PEI-Lösung mit 500 µl PBS und 20 µg Plasmid DNS in 500 µl PBS verdünnt. Es wurde dabei das Plasmid pBABE.puro.TC1 und pBABE.puro, als Leervektorkontrolle, eingesetzt. Die Lösungen wurden fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die DNS und die PEI Lösungen gut miteinander unter mehrfachem Aufziehen mit der Pipette gemischt und weitere zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gesamtlösung wurde unter sanftem Schwenken der Platte tropfenweise auf der Zellkulturschale zügig verteilt.

Nach 24 und 48 Stunden wurde der Überstand jeder Platte separat abgenommen und in jeweils zwei 15 ml Falcon Röhrchen verteilt. Es wurde wieder 6 ml warmes und frisches Medium auf die Zellen gegeben bzw. die Zellen nach 48 Stunden verworfen.

Die Falcon Röhren wurden unverzüglich in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

Infektion

Die Infektion erfolgte bei SH-EP.mycnER Zellen mit einem murinen viralen Rezeptor in der 17. Passage. Die Zellen wurden am Vortag mit $0,3 \times 10^6$ Zellen in 10 ml RPMI Medium in 10 cm Zellkulturplatten ausgesetzt und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Am Tag der Infektion erreichten sie eine Konfluenz von circa 5-10% der Platte.

Das Medium wurde abgenommen und die Platten einmalig mit PBS gewaschen. Der eingefrorene virale Überstand wurde rasch aufgetaut und mit 6 µl Polybrene versetzt, sofort zu den Zellen gegeben und die Platten sanft geschwenkt. Nach einer dreistündigen Inkubation der Zellen im Brustschrank wurden weitere 9 ml DMEM Medium hinzugefügt. 48 Stunden nach Infektionsbeginn wurde das Kulturmedium wieder auf RPMI Medium umgestellt und eine Selektion mit 2,5 µg/ml Puromycin begonnen.

Die Selektion wurde dauerhaft fortgesetzt und die selektierten Zellen getrennt nach Plasmid gepoolt und weiter in Kultur gehalten. Es wurde die TC1 Expression bei der Überexpressionszelllinie und der Kontrolle bestimmt und die Messungen im weiteren Verlauf und nach Auftauen aus der Kryokonservierung wiederholt.

Die Zellen wurden nach der dritten Passage bei -80°C konserviert mit 2×10^6 Zellen pro Kryotube im genannten Einfriermedium.

Nach der fünften Passage wurden Experimente durchgeführt.

Allgemeine Kulturbedingungen

Zur allgemeinen Zellkultur wurden Zellkulturplatten mit 10 und 15 cm Durchmesser verwendet. Es wurde Vollmedium verwendet und das zur entsprechenden Selektion passende Antibiotikum zugesetzt, siehe Tabelle 5 (Seite 26).

Die Zellen wurden in einem Heraeus BBD 6220 Begasungsbrutschrank bei 37°C, 96% relativer Luftfeuchte und 5% CO₂ kultiviert. Arbeiten wurden in einer ThermoScientific Sterilbench durchgeführt.

Tabelle 5 – Antibiotika Zusätze zu einzelnen Zellkulturen

Zellart	Antibiotikum	Endkonzentration	Selektion von
SH-EP.mycnER	Hygromycin	200µg/ml	Selektion des murinen viralen Vektors
SH-EP.mycnER.TC1 / LV	Puromycin	2,5µg / ml	pSuper.puro Vektor

Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% gesplittet.

Es wurde das Medium abgesaugt und ein Waschschrift mit sterilem PBS angeschlossen. Danach wurden die Zellen im Brutschrank mit 1-2ml 1-prozentigem Trypsin/EDTA inkubiert. Die Proteinaseaktivität wurde durch Hinzufügen der vierfachen Menge frischen Mediums gestoppt und die Zellen sanft resuspendiert und in einem 50 ml Falcon aufgenommen. Durch einen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 200 g wurden die Zellen pelletiert, der Überstand abgenommen und somit Trypsinreste entfernt. Die Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert, gezählt und zur weiteren Kultur mit $0,5 - 2 \times 10^6$ pro Zellkultur auf eine neue Zellkulturschale überführt. Das Antibiotikum zur weiteren Selektion wurde hinzugegeben.

Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte aus einem definierten Volumen mit einer unbekanntem Zellzahl heraus. Es wurden 10µl der Zellsuspension mit 90µl Trypanblau gemischt, um eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen zu ermöglichen.

Es wurde eine Neubauer Zählkammer mit passendem Deckgläschen verwendet, das fest und mit sichtbaren Newton'schen Ringen auf der Zählkammer befestigt wurde. Es wurde so viel der Zell- Trypanmischung an den Rand des Deckgläschens gegeben, dass gerade das gesamte Feld ausgefüllt wurde. Es wurden vier der 4x4 Felder der lebenden Zellen ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor von 10 und 1×10^4 erhielt man die Zellzahl pro Milliliter.

Einfrieren von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden Zellen mit je 2×10^6 Zellen pro Kryo Tube in flüssigen Stickstoff bei -173°C aufbewahrt. Es wurde das Medium abgesaugt und ein Waschschrift mit sterilem PBS angeschlossen. Danach wurden die Zellen im Brutschrank mit 1-2 ml 1-prozentigem Trypsin/EDTA inkubiert. Die Proteinaseaktivität wurde durch Hinzufügen der vierfachen Menge frischen Mediums gestoppt und die Zellen sanft resuspendiert und in einem 50 ml Falcon aufgenommen. Durch einen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 200 g wurden die Zellen pelletiert, der Überstand abgenommen und somit Trypsinreste entfernt. Die Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert und gezählt. Eine nochmaliger Zentrifugationsschritt mit gleichen Bedingungen schloss sich an und der Überstand wurde

wieder verworfen. Die Zellen wurden in so viel vorausberechneten Volumen Einfriermedium aufgenommen, dass eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt war. Danach wurden auf Eis die Kryo Tubes mit je 1 ml des Einfriermediums – Zellsuspension beschickt. Die Tubes wurden verschlossen, sofort in die Zellgefrierbox sortiert und über Nacht in den Tiefkühlschrank bei -80°C gestellt. Am nächsten Tag wurden die Tubes in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen von Zellen

Zellen aus Kryo-Tubes wurden in einem warmen Wasserbad bis kurz vor dem kompletten Auftauen erwärmt. Die gesamte Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon mit 10 ml Vollmedium überführt und eine Zentrifugation von 5 min bei 200 g angeschlossen. Der DMSO haltige Überstand wurde entfernt und die Zellen in frischen Medium resuspendiert und auf einer 15cm Zellkulturplatte ausgesetzt. Das entsprechende Selektionsantibiotikum wurde hinzugefügt.

Colony Forming Assay (CFA)

Am Tag 0 wurden auf einer 6-well Platte je Well 5000 Zellen in einem Volumen von 2,5 ml Vollmedium ausgesetzt. Jede Platte wurde für circa eine Minute sanft geschwenkt. Es wurde jeweils eine 6-well Platte mit SH-EP.mycnER Zellen die TC1 überexprimierten und jeweils eine Platte mit der zugehörigen Kontrollzelllinie ohne Überexpression beschickt.

Eine Stimulation von MYCN erfolgte am Tag 1 bei der Hälfte der Wells durch Zugabe von 500 μl Vollmedium mit einer Konzentration von 200nM 4OHT. Die andere Hälfte erhielt ebenfalls 500 μl Vollmedium mit zugesetzten reinen Ethanol ohne 4OHT.

Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop begutachtet und Wachstum, Konfluenz und morphologisches Erscheinungsbild beurteilt.

Am Tag 4 und Tag 8 wurde das Medium abgesaugt und ohne Zeitverzug erneut 3 ml Vollmedium mit entsprechender Konzentration der 4OHT Lösung oder nur der entsprechenden Menge Trägerlösung zugesetzt.

Abgeschlossen wurde der Assay am Tag 11. Das Medium wurde gründlich abgesaugt und die Platten für 24-48h getrocknet. Danach erfolgte eine Fixierung mit 1 ml kalten 70% Ethanol

pro Well für 10 Minuten. Der Alkohol wurde langsam abgeschüttet und die Platten wiederum für 24h getrocknet und danach verschlossen bis zur Färbung aufbewahrt.

Die Färbung erfolgte mit der Kristallviolett-färbung. Es wurde pro Well 750 ml der Kristallviolettlösung vorsichtig zugefügt und sanft geschwenkt. Nach 30 Minuten wurde das Kristallviolett abgenommen und überschüssiges nicht fixiertes Kristallviolett durch vorsichtiges Baden der Platte in drei Wasserbädern entfernt.

Nachbearbeitung

Die Platten wurden am HP Scanner ScanJet 5300C mit 600dpi eingescannt. Dazu wurden passende rein weiße Papierkreise zur Erhöhung des Kontrastes eingelegt. Zusätzlich wurde der Kontrast um 20% mit der Bildbearbeitungssoftware GIMP portable Vers. 2.8. verstärkt und die Wells kreisförmig ausgeschnitten.

Proliferationsbestimmung

Mikroskopische Auszählung

Für die Mikroskopische Auszählung wurden am Tag 0 je 6000 Zellen in 600 µl Vollmedium je Well in einer 24-Well Platte ausgesetzt. Es wurde jeweils eine 24-well Platte mit SH-EP mycnER Zellen, die TC1 überexprimierten, und jeweils eine Platte mit der zugehörigen Kontrollzelllinie ohne Überexpression beschickt.

Es erfolgte eine tägliche Zellzählung ab Tag 1. Dabei wurde das Medium von drei Wells abgesaugt, das Well mit 300 µl PBS gewaschen und 100 µl Trypsin dazugegeben. Nach 2 Minuten im Brutschrank wurden die Zellen durch sanftes Pipettieren gelöst und die gesamte Suspension in 100 µl Trypanblau aufgenommen. Es erfolgte eine Auszählung von vier Quadranten in der Neubauer Zählkammer und es wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der vier Quadranten und dann der drei gleich behandelten Wells gebildet.

Kristallviolettfärbungen

Am Tag 0 wurden auf elf 6-well Platten je Well 5000 Zellen in einem Volumen von 3 ml Vollmedium ausgesetzt. Jede Platte wurde für ca. eine Minute sanft geschwenkt. Es wurden

jeweils drei Wells einer 6-well Platte mit SH-EP.mycnER.TC1 Zellen die TC1 überexprimierten und jeweils drei Wells der Platte mit der zugehörigen Kontrollzelllinie SH-EP.mycnER.puro ohne Überexpression beschickt. Bei der Platte für Tag 1 wurden nur zwei Wells benutzt.

Am Tag 7 wurde ein Mediumwechsel bei den noch vorhandenen Platten vorgenommen. Das alte Medium wurde abgesaugt und sofort durch 3 ml frisches Vollmedium pro Well ersetzt.

Jeden Tag wurde eine Platte entfernt. Das Medium wurde gründlich abgesaugt und die Platten für 24-48h getrocknet. Danach erfolgte eine Fixierung mit 1 ml kalten 70% Ethanol pro Well für 10 Minuten. Der Alkohol wurde langsam abgeschüttet und die Platten wiederum für 24h getrocknet und danach verschlossen bis zur Färbung aufbewahrt.

Die Färbung erfolgte mit Kristallviolett. Es wurde pro Well 750 µl der Kristallviolettlösung vorsichtig zugefügt und sanft geschwenkt. Nach 30 Minuten wurde das Kristallviolett abgenommen und überschüssiges nicht fixiertes Kristallviolett durch vorsichtiges Baden der Platte in nacheinander drei Wasserbädern entfernt. Die Prozedur wurde an insgesamt zehn Tagen durchgeführt.

Viabilitätsbestimmung durch den Water Soluble Tetrasoliums salt (WST) – Assay

Das Tetrasoliums salt wird durch intakte Zellen reduziert. Dabei verändert sich die Farbe des Salzes. Durch Messung der Absorption bei 450 nm kann diese Farbveränderung im Verlauf der Zeit gemessen werden und ist ein Maß für die Zellviabilität. In Vorexperimenten erwies sich eine einstündige Inkubation des Tetrasoliums salzes mit den Zellen als ausreichend, um einen Unterschied von 500 Zellen zu zeigen. Innerhalb von 500 bis 50.000 Zellen konnte so eine Quantifizierung der Zellzahl getroffen werden.

Für den WST-Assay wurden am Tag 0 166 Zellen in 300 µl Vollmedium je Well einer 96-Well Platte ausgesetzt. Es wurde jeweils eine 96-well Platte mit SH-EP mycnER Zellen die TC1 überexprimierten und jeweils eine Platte mit der zugehörigen Kontrollzelllinie ohne Überexpression beschickt.

Ab Tag 1 erfolgte die Messung mit der WST-Lösung. Dazu wurde die frisch aufgetaute WST-Stocklösung mit der gleichen Menge PBS verdünnt und davon pro Well einer Plattenspalte 10 µl zugesetzt. Es erfolgte sofort die Messung der Absorption bei 450 nm mit dem MRX II Microplate Reader (DYNEX TECHNOLOGIES), als Referenzwellenlänge wurde 650 nm eingestellt. Danach wurde die Platte wieder zurück in den Brutschrank gestellt und es erfolgte nach einer Stunde eine erneute Messung. Diese Prozedur wurde weitere neun Tage

mit jeweils einer neuen Spalte der Platte wiederholt. Die 0 Stunden Werte wurden von den 1 Stunden Werten abgezogen und aus den erhaltenen Werten der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Die erhaltenen Werte wurden abhängig von der Zeit grafisch aufgetragen.

Real Time Detection Polymerase Chain Reaction (RTD-PCR)

mRNS Isolation

Die mRNS Isolation erfolgte mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit nach Anleitung des Herstellers. Die Menge an gewonnener RNS wurde am NANODROP bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt.

cDNS Umschreibung

Die cDNS Umschreibung erfolgte mit der M-MLV-RT. Es wurde pro Ansatz 1 µg RNS eingesetzt und die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers, dabei kamen Oligo-dT Primer und eine RNase zum Einsatz.

Durchführung

Die Echtzeit Polymerase Ketten Reaktionen wurde mit dem Qiagen Hot Star Taq Plus Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zur Detektion wurde SYBR Green von BioRad verwendet. Die RTD- PCR mit den in der Tabelle aufgeführten Bedingungen durchgeführt und mit der vom Hersteller bereitgestellten Software ausgewertet.

Ein einzelnes Well enthält:

- 10 µl Hot Star Taq Mix
- 2 µl SYBR Green
- 0,25 µM pro Primer (entspricht 0,5 µl forward und 0,5 µl reverse Primer je 1:10 verdünnt)
- 1 µg cDNS (entspricht 1 µl)
- 6 µl H₂O

Tabelle 6 PCR Bedingungen

	>----- - 40x - -----<				
1	2	3	4	5	
95°C	94°C	60°C	72°C	95°C	
5min	30s	30s	30s	10s	
			<< zu Schritt 2		

Bei der Verwendung des TC1-F Primers wurde dem Ansatz 5% DMSO zugefügt, dies entspricht 1 µl pro Well. Der H₂O Anteil wurde auf 5 µl pro Ansatz reduziert.

Zur Vereinfachung der Durchführung wurde der HST Mix mit dem SYBR Green und Primer gemischt und auf der 96-well-PCR-Platte vorgelegt. Es wurde die cDNS in dem zusätzlich benötigten H₂O verdünnt und in den entsprechenden Wells verteilt.

Es wurden immer Triplikate mit gleichen Bedingungen angesetzt und der Mittelwert und die Standardabweichung daraus ermittelt. Zusätzlich wurden Kontrollen, ebenfalls als Triplikate ohne cDNS, aber mit Primern, SYBR Green und HST Mix angesetzt.

Anschließend wurde eine Schmelzkurve der Produkte angelegt, um deren Güte zu bestimmen.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion erfolgte in einem Cycler. Es wurden die Tubes mit folgenden Chemikalien beschickt. Es wurde cDNS von SH-EP.mycnER, SH-EP.mycnER.TC1 und SH-EP.mycnER.LV verwendet. Die PCR Einstellungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Ein einzelnes Well enthielt:

- 10 µl Hot Star Taq Mix
- 2µl Coral Load
- 0,25 µM pro Primer (entspricht 0,5 µl forward und 0,5 µl reverse Primer je 1:10 verdünnt)
- 1 µg cDNS (entspricht 1 µl)
- 6 µl H₂O

Gellauf

Für die DNA-Elektrophorese wurden 2%ige Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer suspendiert und unter ständigem Rühren auf einer Kochplatte aufgeköcht und gelöst. Anschließend wurde die geschmolzene Agarose in einen Gelträger mit einem 8er-Kamm gegossen.

Das polymerisierte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (1x TAE) übertragen, so dass das Gel vollständig vom Puffer bedeckt war. Den DNS-Proben war bereits Coral Load zur besseren Sichtbarkeit der Lauffront und Beschwerung der DNS Probe zugesetzt. Die Mischung wurde in die Taschen des Gels pipettiert. Parallel zu den Proben wurde ein Größenstandard (SmartLadderSF) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 85V

angelegt und das Gel für ca. 1 h laufen gelassen. Das Gel wurde in einer 0,05% Ethidiumbromid Bad ($0,5\mu\text{g}$ Ethidiumbromid/ml) für 10 min gefärbt und in einem weiteren Wasserbad für 10 min von überschüssigem Ethidiumbromid entfärbt. In der UV- Kammer konnte das Gel kontrolliert werden, die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte per digitaler Speicherung des Anzeigenbildes.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 7 Verwendete Primer

Zielgen	Name	Sequenz (5' → 3')	P.gr.	T _{opt}	Lieferant	Nummer	Quelle	
β2M								
	β2M-B	Fwd	TGAGTATGCCTGCCGTGTGAAC	79b	62°C	OPERON	#1003796941	Dr. med. Sven Starke
		Rev	TGCTGCTTACATGTCTCGATCCC					
TC1								
	TC1-E	Fwd	CAAGCCATCATCATGTCCAC	93b	60°C	Purimex	#092214	<i>Kim et al., 2006 FEBS</i>
		Rev	GTTGCCACGGCTTTCTTAC				#092215	
	TC1-F	Fwd	AGCCACCAAGCCATCATCAT	72b	60°C	Purimex	#110157	<i>Friedmann et al. 2004, Int J. Cancer</i>
		Rev	TGTGTCTGAAGTGGTAGCCATG				#110158	
MYCN								
	MYCN	Fwd	CCACAAGGCCCTCAGTACC	72b	58,5°C	OPERON	#1003477091	Dr. med. Sven Starke
		Rev	TCTTCCTTTCATCATCTTCATCA				#1003477092	
P21								
	P21	Fwd	TCACTGTCTTGACCCTGTGTC	127b	60°C	OPERON	#1003689693	Dr. med. Sven Starke
		Rev	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA				#1003689694	
TRAP								
	TRAP1C	Fwd	AGCAGCTTTGCTATGTCCTCCTTG	79b	62,4°C	OPERON	#1003796944	Dr. med. Sven Starke
		Rev	AAGATTACGGCCTGTTTCATGCG				#1003796943	
HTERT								
	HTERT	Fwd	TGACACCTCACCTACCCAC	95b	60°C	Purimex	#082586	Dr. med. Sven Starke
		Rev	CACTGTCTCCGCAAGTTCAC				#082587	
MYC								
	MYC	Fwd	CAGCAGCGACTCTGAGGA	191b	58°C	Purimex	110353	Dr. med. Axel Weber
		Rev	GCGCTGCGTAGTTGTG				110354	

Messungen

Expression von TC1- und MYCN- mRNA in 9 verschiedenen kultivierten Neuroblastomzelllinien

Die RTD-PCR Messung erfolgte mit dem Primern β 2M-B, TC1-E und MYCN.

Die cDNS wurde aus in Kultur befindlichen Zellen der Zelllinien IMR-32, Kelly, SY5Y und SH-EP wt gewonnen. Andere cDNS wurde freundlicherweise von Sven Starke zur Verfügung gestellt, dazu gehörten IMR-5, SMS-KCN, SKN-BE, NB69 und SKN-AS.

Expression von TC1- mRNA nach Aktivierung von MYCN in der durch 4OHT stimulierbaren Zelllinie SH-EP.mycnER

Zur Bestätigung der Aktivierung des mycnER Konstruktes in den SH-EP Zellen wurden folgende Genexpressionen, die durch MYCN gesteuert werden, bestimmt:

- TRAP1 – Hochregulation durch MYCN (Sven Starke, unpublizierte Daten, persönliche Kommunikation) (Berwanger et al. 2002)
- HTERT – Hochregulation durch MYCN (Hiyama et al. 1999; Krams et al. 2004)

Es wurden mehrere Zeitverläufe angelegt. Dabei wurden am Tag 0 auf 15 cm-Platten 2×10^6 Zellen der SH-EP mycnER Zellreihe in einem Stadium unter der 25. Passage in einem Volumen von 20 ml ausgesetzt. Die Platten wurden vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen.

Am Tag 1 wurde der Hälfte der Platten jeweils 4 μ l 4OHT, entsprechend einer Konzentration von 200 nMol zugesetzt. Die andere erhielt nur die Trägerlösung, entsprechend 4 μ l Ethanol. Eine Platte wurde nicht stimuliert. Bei ihr wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig von der Platte gelöst, im auf der Platte verbliebenen PBS resuspendiert und in ein Eppendorf Tube überführt. In einer Tischzentrifuge wurde die Suspension für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde bei -20°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt eine RNS Extraktion durchgeführt.

Das gleiche geschah mit je einer stimulierten Platte und einer Alkoholkontrolle zu den Zeitpunkten 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Zugabe von 4OHT oder Ethanol.

Die RTD-PCR Messung erfolgte mit dem Primern β 2M-B, TC1-E, P21, TRAP1C, HTERT und im späteren Verlauf nochmals mit TC1-F.

Expression von MYC- und P21- mRNA in Abhängigkeit von der TC1 Expression

Die RTD-PCR Messung erfolgte mit dem Primern β 2M-B, TC1-F, MYC und P21 in den Zelllinien SH-EP.mycnER, der Zelllinie mit Überexpression von TC1 SH-EP.mycnER.TC1 und der Kontrollzelllinie SH-EP.mycnER.LV.

FACS

Die FACS Messungen erfolgten in der Core Unit Fluoreszenz-Technologien des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) Leipzig an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig unter Unterstützung durch Dipl. biol. Kathrin Jäger und Dr. rer. nat. Andreas Lösche.

Zur Vorbereitung auf die FACS Analysen wurden die Zellen am Tag 0 mit einer Zellzahl von 400.000 Zellen in 2,5 ml Vollmedium pro Well einer 6-Well Platte ausgesetzt. Es wurden je zwei Wells mit SH-EP.mycnER.TC1 und zwei für die Kontrollzelllinie SH-EP.mycnER.LV angelegt. Am Tag 2 wurde das Medium abgesaugt und sofort mit der gleichen Menge Hungermedium ersetzt. Einen weiteren Tag später wurde jeweils ein Well der gleichen Zelllinie mit 0,2 μ l / 1ml 4OHT stimuliert und das andere als Ethanol Kontrolle benutzt. Am Tag 4 wurde die Färbung der Zellen für die FACS Analyse durchgeführt.

Tabelle 8 – Übersicht über die Kultivierung

Tag	0	1	2	3	4
	6-Well Platten 400.000 Zellen / Well 2,5 ml Vollmedium / Well 2 Wells mit SH-EP.mycnER.TC1 2 Wells mit SH-EP.mycnER.LV	→	Mediumwechsel auf 2,5 ml Medium mit 0,1%FCS	Stimulation	FACS Analyse

Zur Vorbereitung wurde der Überstand abgesaugt und jedes Well vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin (1fach) 2 Minuten im Brutschrank inkubiert, mit 4 ml Medium gelöst und für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml Binding Puffer aus den ApoAlert AnnexinV Kit gewaschen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 200 g für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 500 μ l Binding Puffer gut resuspendiert. Es schloss sich eine Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer und folgend die jeweilige Färbung an.

Propidium Iodid FACS

Es wurden nach Aufarbeitung und Zählung der Zellen 100.000 Zellen für die PI-Färbung verwendet. Es erfolgte eine Aufarbeitung nach dem Protokoll „Cell cycle analysis of fixed cells stained with propidium iodide“ aus dem Current Protocols in Cell Biology (Bonifacino et al. 2001). Diese Zellen wurden auf ein Volumen von 300 µl eingestellt und mit 1,2 ml eiskaltem 70 % Ethanol fixiert. Danach wurden die Zellen bei -20°C eine Stunde eingefroren. Nach einer Stunde wurden die Zellen bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 2 ml PBS resuspendiert. Nach einer Minute Pause erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 200 g für 5 Minuten. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Zellen in 500 µl Propidium Iodid-Färbelösung aufgenommen und in ein FACS Röhrchen überführt. Durch das in der Färbelösung enthaltene Triton-X wird die Zellwand permeabel für Propidium Iodid, das sich dann an die DNS anlagern kann.

Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die FACS Messung im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht und im PI- Kanal durchgeführt. Es wurden jeweils 10.000 Ereignisse erfasst. Hierfür wurde die vom Hersteller bereit gestellte Software DIVA 6.1.3 verwendet.

Zum Ausschluss von Eigenfluoreszenzen und Zelltrümmern wurde eine Probe ohne PI-Farbstoff im FACS Gerät gemessen. Hier wurde empirisch die Grenze für PI negative und PI positive Zellen bei einer Signalintensität im PI-Area (PI-A) Kanal von 16k ermittelt. Veranschaulicht durch Abbildung 5.

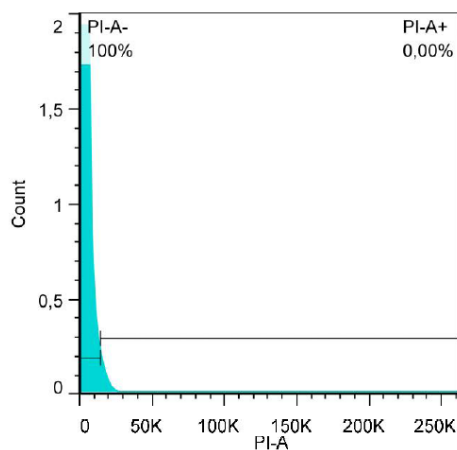


Abbildung 5 – Messung einer ungefärbten Probe im PI Kanal, Darstellung als Histogramm. Eingezeichnete Grenze zwischen PI negativen, ausgeschlossenen und PI positiven Zellen.

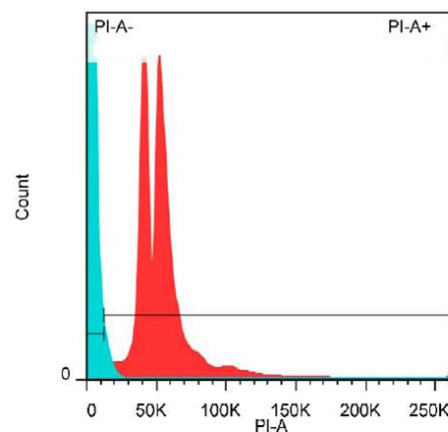


Abbildung 6 – Darstellung der nachträglich gefärbten Probe aus Abbildung 5. Blau sind die Ereignisse, welche bereits ohne Färbung ein Signal verursachen.

Um auszuschließen, dass durch Wahl dieser Grenze gewünschte Zellen ausgeschlossen würden, wurde die Probe nachträglich mit Propidium Iodid gefärbt und nachgemessen. Auch im folgenden PI-Area (PI-A) Histogramm in Abbildung 6 auf Seite 37 bestätigt sich die Festlegung der Grenze. Der eigentliche Zellzyklus wird durch die Grenze nicht beeinflusst. Zusätzlich wurde die PI negative und die PI positive Population im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC), wie in Abbildung 7 auf Seite 38, dargestellt. Während im Vorwärtsstreulicht (FSC) die Größe, kann im Seitenstreulicht (SSC) die Granularität bestimmt werden. Es wurden durch die Wahl der PI- Grenze nur kleine schwach granuliert Objekte ausgeschlossen, die größtenteils nicht zu den gewünschten Zellen gehören.

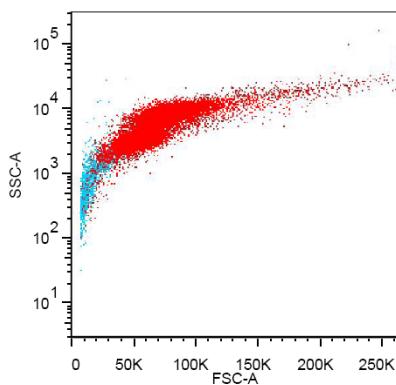


Abbildung 7 – Gefärbte PI Probe aus Abbildung 6 im Vorwärts- (FSC, X-Achse) und Seitenstreulichtscatter (SSC, Y-Achse). Als PI negative abgegrenzte Zellen sind blau, PI positive rot eingezeichnet. Man sieht, dass Größtenteils nur kleine, und schwach granuliert Objekte als PI negativ ausgeschlossen wurde und keine Objekte, die den größeren, granulierten Zellen entsprechen.

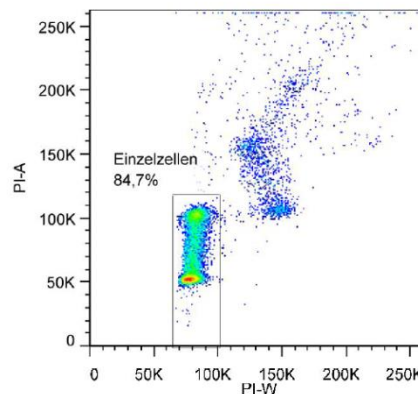


Abbildung 8 – PI positive Zellen wurden im PI Width Kanal (X-Achse) und PI-Area Kanal (Y-Achse) dargestellt und Einzelzellen durch ein Box-Gate ausgewählt. Die restlichen Events entsprechen zusammenhängenden Zellen, da sie mehr DNS und größer sind als möglich.

Die PI positive Zellpopulation wurde weiterhin nach Einzelzellen selektioniert. Dies geschah in einer Darstellung des PI-Width Kanals (PI-W) zum PI-Area Kanal (PI-A). Diese Einstellung ist ersichtlich in Abbildung 8 auf Seite 38. Hier wurden die Einzelzellen gewählt und Dubletten ausgeschlossen.

Anschließend wurde von der Auswertungssoftware FlowJo 7.5.6. von den Einzelzellen der Zellzyklus nach dem Watson Modell berechnet. Ein Beispiel einer Berechnung zeigt Abbildung 9 auf Seite 39. Die berechneten Zellanteile für die G0/G1, S, G2/M und subG1 Phase wurden für alle Proben berechnet und es wurden aus fünf unabhängigen Experimenten die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

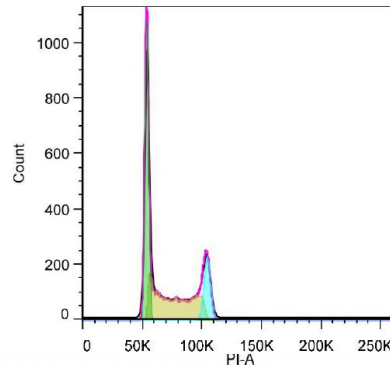


Abbildung 9 – Bei den ausgewählten Zellen wurde der Zellzyklus mit der Software FlowJo nach dem Watson Modell berechnet. Die einzelnen Phasen wurden mathematisch berechnet und der Anteil der Zellen als Prozent ausgegeben. Die G0/G1 Phase (grün), S-Phase (gelb) und G2/M- Phase (blau).

Annexin V Färbung

Die Annexin V Färbung erfolgte mit dem ApoAlert® Annexin V Kit von Clonetech Laboratories. Die Durchführung hielt sich an das vom Hersteller mitgelieferte Protokoll.

Von den ausgezählten Proben wurden 80.000 Zellen abgenommen und der Rest zur PI-Färbung verwendet. Die Färbung der abgenommenen Zellen erfolgte in einem Volumen von 250 µl Binding Puffer und wurde entsprechend aufgefüllt. Es wurden 7,5 µl AnnexinV und 7,5 µl Propidium Iodid dazugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation in Dunkelheit wurde zusätzlich 250 µl Binding Puffer zu den Proben gegeben und es erfolgte die Messung am FACS-Gerät im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht und im FITC- und PerCP-Kanal, der dem PI Signal entspricht. Es wurden jeweils 10.000 Ereignisse erfasst. Hierfür wurde die vom Hersteller bereit gestellte Software DIVA 6.1.3 verwendet.

Eine Färbung von toten Zellen erfolgte über Propidium Iodid, das sich bei Zellwanddefekten an die DNS anlagert. Apoptotische Zellen zeigen einen Flip von Phospholipiden, welche durch AnnexinV gebunden werden.

Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo 7.5.6. Es wurden alle Zellen im FITC- und PI-Kanal betrachtet und in eine von 3 Kategorien eingeteilt. Als lebende Zellen mit geringem FITC und PI Signal, als tote Zellen mit einem hohen FITC und PI Signal und als früh apoptotische Zellen mit einem hohen FITC aber nur einem geringen PI Signal. Zwischen diesen Populationen wurde, wie beispielhaft in Abbildung 10 auf Seite 40 zu sehen, ein Vier-Quadranten-Gate gelegt, das die Zellen in die genannten Kategorien einteilt. Die Gategrenzen wurde entsprechend der eindeutig erkennbaren Populationen für die Proben eingestellt und daraus der Prozentanteil der darin enthaltenen Zellen von der Software

ermittelt. Insgesamt wurden fünf Testreihen durchgeführt von denen wenige Einzelmessungen aufgrund der biologischen Varianz nicht die ausreichende Güte aufweisen konnten. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Zellzahl wurden aus mindestens drei Messwerten errechnet und grafisch aufgetragen.

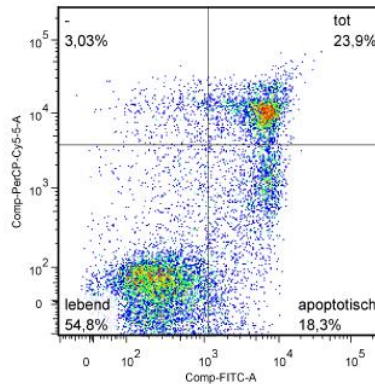


Abbildung 10 – Darstellung des FITC-PI-Plotes einer Beispiel Probe mit eingezeichneten Vier-Quadranten-Gate und entsprechender Zuordnung der jeweiligen Populationen.

Statistische Auswertung, Grafik- und Textbearbeitung

Wenn nicht anders angegeben erfolgte eine Auswertung und Aufarbeitung der gewonnenen Daten wie folgt:

Eine statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 20 unter Verwendung des Student T- Testes für unabhängige Variablen und Microsoft Office Excel 2010

Grafiken wurden erstellt mit GIMP portable Version 2.8. und mit Microsoft Office PowerPoint 2010.

Die Auswertungen der FACS Analysen erfolgten am Gerät mittels der Herstellersoftware DIVA 6.1.3 und eine nachträgliche Auswertung und Erstellung der Grafiken mittels der Software FlowJo 7.5.6. Die Textverarbeitung erfolgte mit Microsoft Office Word 2010.

Die verwendeten Programme sind unter freier Lizenz oder wurden verwendet mit einer Lizenz des Universitätsklinikum Leipzig AÖR bzw. mit einer Lizenz des IZKF Fluoreszenzlabores.

Zur Literaturverwaltung wurde Citavi 3.4.0 mit einer Campuslizenz der Universität Leipzig verwendet.

ERGEBNISSE

Die Expression von TC1 ist prognostisch hochsignifikant mit einem Überlebensvorteil im Neuroblastom verbunden

TC1 (C8orf4) wurde in der Versteeg Datenbank von 88 Patienten mit Neuroblastomen getestet (Jan Koster und Rogier Versteeg). Im Vergleich aller Datensätze in einer Kaplan-Meier-Kurve zeigte sich ein besseres Überleben bei hoher Expression von TC1. Dabei verdoppelt sich die Überlebenswahrscheinlichkeit von knapp 44% bei Patienten mit wenig, auf ca. 82% bei Patienten mit hoher TC1 Expression innerhalb des Neuroblastoms. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 dargestellt.

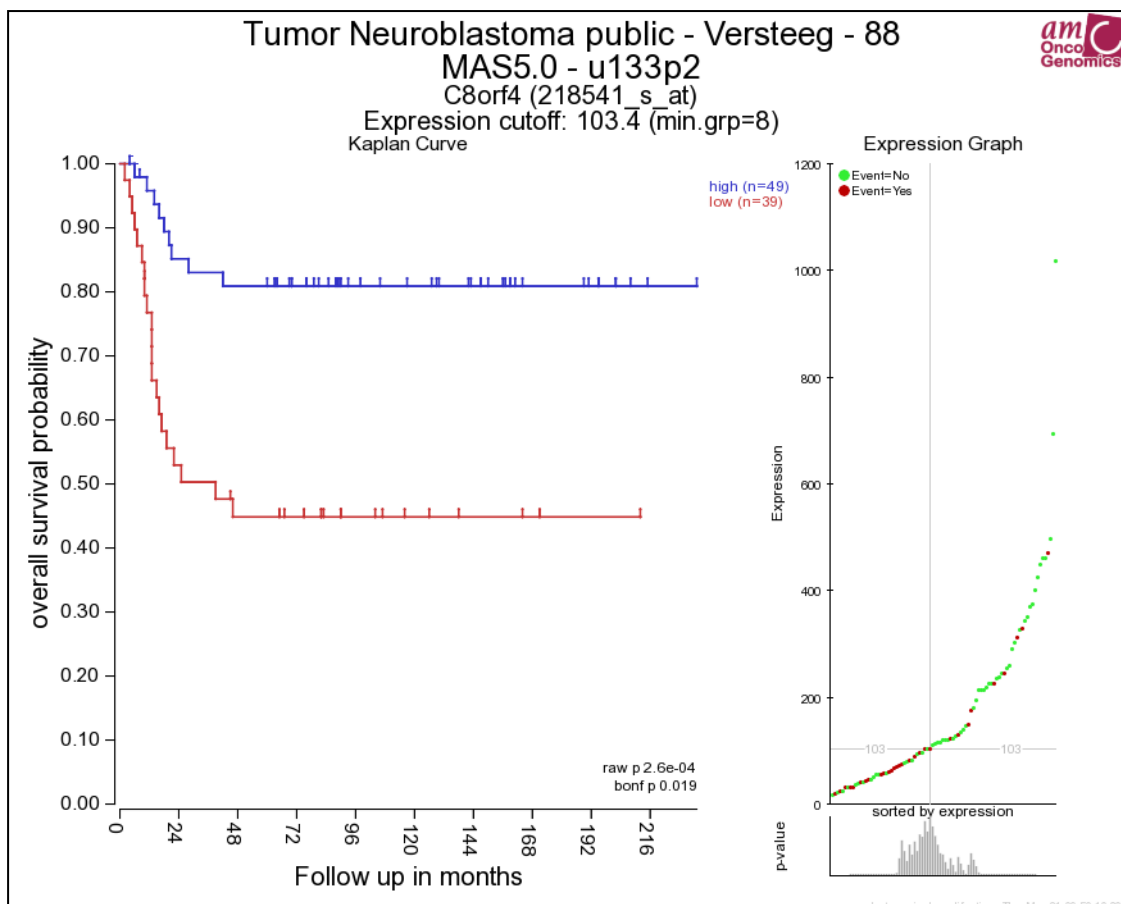


Abbildung 11 - Kaplan Meier Analyse der Versteeg Datenbank zur Überlebenswahrscheinlichkeit mit hoher (blau) und niedriger (rot) Expression von TC1 (C8orf4). Es zeigt sich eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit hoher TC1 Expression als mit niedriger TC1 Expression.

Bei einer Subgruppenanalyse von 16 MYCN amplifizierten Proben ergibt sich kein Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit nach TC1 Expression, siehe Abbildung 12.

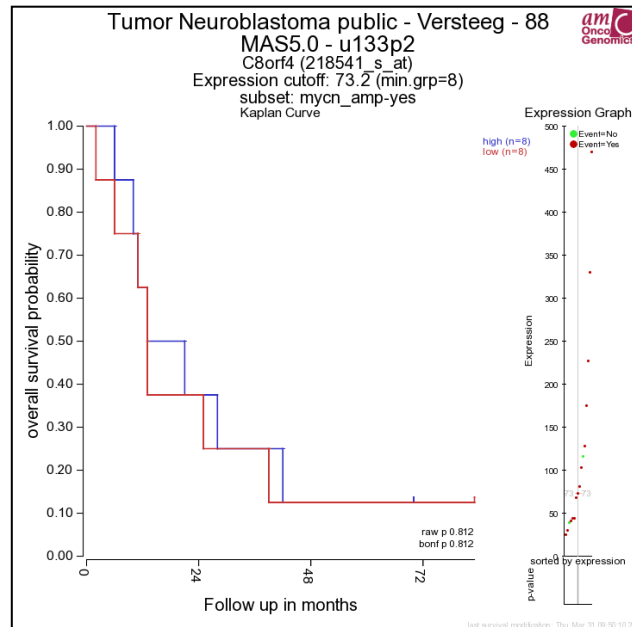


Abbildung 12 – Datenbank Analyse von *MYCN*-amplifizierten Proben aus der Versteeg Datenbank bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit bei *MYCN* Amplifikation und hoher (blau) und niedriger (rot) TC1- Expression. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Expressionsstärken in *MYCN*-amplifizierten Proben bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit.

Bei Exklusion der *MYCN*-amplifizierten Datensätze bleiben 72 Proben zurück. In Analyse dieser ergibt sich eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit, wenn TC1 erhöht exprimiert wird. Ersichtlich in Abbildung 13.

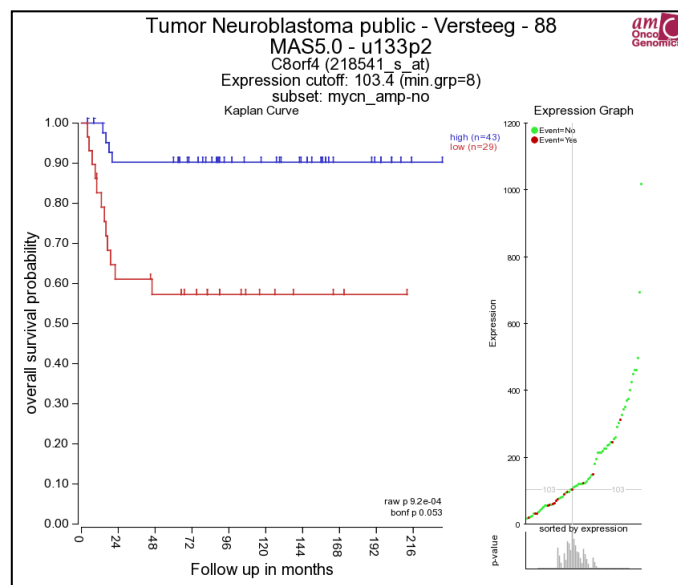


Abbildung 13 – Datenbank Analyse von nicht *MYCN*-amplifizierten Proben aus der Versteeg Datenbank bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit bei *MYCN* Amplifikation und hoher (blau) und niedriger (rot) TC1- Expression. Es zeigt sich eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit hoher TC1 Expression und ohne *MYCN* Expression als mit niedriger TC1 Expression.

Die Expression von TC1 korreliert nicht mit der MYCN Expression und ist in einem Panel von neun Neuroblastozelllinien unabhängig vom MYCN Amplifikationsstatus

In fünf *MYCN*-amplifizierten und vier *MYCN*-nicht-amplifizierten Zelllinien wurde die *TC1*- sowie *MYCN*- mRNA Expression im Vergleich zu BETA2Mikroglobulin- mRNA mittels RTD-PCR bestimmt (Tabelle 9 auf Seite 45).

Die *MYCN*- amplifizierten Zelllinien weisen im Mittel eine signifikant höhere *MYCN*- Expression auf als die *MYCN*- nicht amplifizierten Zelllinien (ΔC_t 0,56 amplifiziert und 13,76 nicht-amplifiziert, Signifikanz 0,002). Es besteht kein signifikanter Unterschied der *TC1* Expression zwischen *MYCN*- amplifizierten Zelllinien und *MYCN*- nicht amplifizierten Zelllinien (ΔC_t 12,6 *MYCN*- amplifiziert und 14,33 *MYCN*-nicht-amplifiziert, Signifikanz $p=0,322$). Im Trend ist die *TC1* Expression in den *MYCN*- amplifizierten Zelllinien ca. 3,3fach erhöht. Eine Korrelation zwischen *MYCN*- und *TC1*- mRNA Expression besteht nicht.

Die Expression von *TC1* schwankt zwischen einem ΔC_t von 10,01 bei SMS-KCN bis zu 16,41 bei SK-N-BE. Die ΔC_t Werte der *TC1* Expression lassen zwei Subgruppen in den vorliegenden Zelllinien differenzieren. SMS-KCN, Kelly, IMR-32 und SY5Y haben eine mittlere Expression von *TC1*- mRNA um ein ΔC_t von 10,98, während SK-N-BE, IMR-5, NB69, SK-N-AS sowie SH-EP wt eine Expression um ein ΔC_t von 15,28 aufweisen. Darin unterscheiden sich diese beiden Gruppen signifikant mit einem Niveau von $p=0,001$ voneinander.

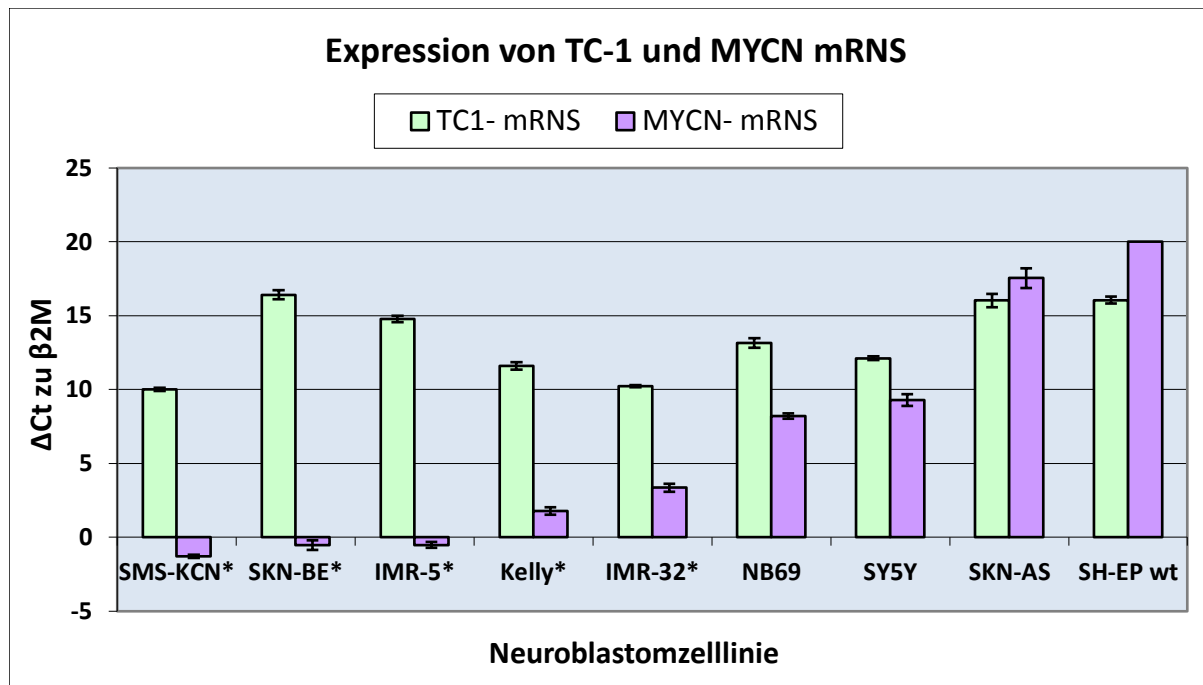


Abbildung 14 – Grafische Darstellung der ΔC_t Werte zu $\beta 2M$ in der RTD-PCR Messung zu TC1 und MYCN. Aufsteigend nach der MYCN Expression sortiert. Es zeigt sich keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MYCN bzw. dem Amplifikationsstatus und der TC1 Expression. Im Trend ist die TC1 Expression in MYCN amplifizierten Zellen (*) gering erhöht.

„*“ markiert MYCN amplifizierte Zellreihen. Der Wert der MYCN Messung für SH-EP wt lag außerhalb des Messbereichs und wurde auf den festen Wert von „20“ eingetragen.

Tabelle 9 – Zahlenwerte der RTD-PCR Messungen der mRNS Expression von TC1 und MYCN in neun verschiedenen Neuroblastomzelllinien. Als Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen. Sortiert wurde nach der Amplifikation von MYCN. Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Expression von MYCN- mRNS, aber keiner in der TC1- mRNS Expression in MYCN- amplifizierten und nicht amplifizierten Zelllinien. Signifikanzniveau nach dem T-Test für unabhängige Stichproben. (n.m. nicht messbar)

Zelllinie	MYCN Amplifikation	ΔC_t TC1	Stdabw. ΔC_t TC1	ΔC_t MYCN	Stdabw. ΔC_t MYCN
SMS-KCN	Ja	10,01	0,16	-1,29	0,15
SK-N-BE	Ja	16,41	0,35	-0,53	0,37
IMR-5	Ja	14,77	0,28	-0,52	0,26
Kelly	Ja	11,59	0,35	1,77	0,35
IMR-32	Ja	10,21	0,09	3,35	0,31
Mittelwert (Standardabweichung)		12,60 (2,86)		0,56 (1,94)	
NB69	Nein	13,15	0,44	8,20	0,27
SY5Y	Nein	12,11	0,18	9,30	0,44
SK-N-AS	Nein	16,02	0,51	17,54	0,74
SH-EP wt	Nein	16,04	0,29	n.m.	
Mittelwert (Standardabweichung)		14,33 (2,01)		13,76 (5,89)	
Signifikanz Amp. – keine Amp.		0,322		0,002	

Expressionssteigerung von TC1 nach Aktivierung von MYCN in der durch 4OHT stimulierbaren Zelllinie SH-EP.mycnER

Die Expression von TC1 in Abhängigkeit von der MYCN Aktivierung wurde im zeitlichen Verlauf bestimmt. Es wurde die NBL Zelllinie SH-EP verwendet, in der MYCN durch die Gabe von Tamoxifen (4OHT) aktiviert werden kann. Dadurch ist es möglich, die Wirkung von MYCN auf die Expression von TC1 zu untersuchen.

Um eine Aktivierung von MYCN zu bestätigen wurden parallel als Kontrolle die Expressionslevel der beiden etablierten direkten MYCN- Targets *HTERT* (Hiyama et al. 1999; Krams et al. 2004) und *TRAP1* (Sven Starke, unpublizierte Daten, persönliche Kommunikation) (Berwanger et al. 2002) bestimmt.

Nach Aktivierung von MYCN durch Hinzugabe von 4OHT zeigt sich eine Steigerung der mRNS beider MYCN- Targetgene innerhalb von 12 Stunden anhaltend bis 72 Stunden.

Zur Vergleichbarkeit der gleichen Zeitwerte wurden die Messungen auf das Referenzgen BETA2Mikroglobulin standardisiert.

Insgesamt wurde der gesamte Versuchsaufbau dreimalig wiederholt mit inhaltlich gleichen Ergebnissen. Zur Darstellung wurde ein repräsentatives Experiment mit Messung eines Triplikates ausgewählt, welches in Abbildung 15 abgebildet ist. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 10 notiert.

In den ersten sechs Stunden sind keine Veränderungen weder zum Zeitpunkt 0 noch zur Kontrolle zu bemerken. Nach Ablauf von zwölf Stunden steigen die Expressionsraten von TRAP1 und HTERT über die Rate der jeweiligen Kontrolle und auch über die der Ausgangsexpression.

Nach 24 Stunden zeigt sich eine verstärkte Expression von TC1 welche im weiteren Verlauf bis zum Endpunkt mit 72 Stunden anhält. Es zeigt sich im Schnitt eine 3fach höhere mRNS Expression von TC1 mit einer maximalen Expression im Vergleich zur Kontrolle nach 24h.

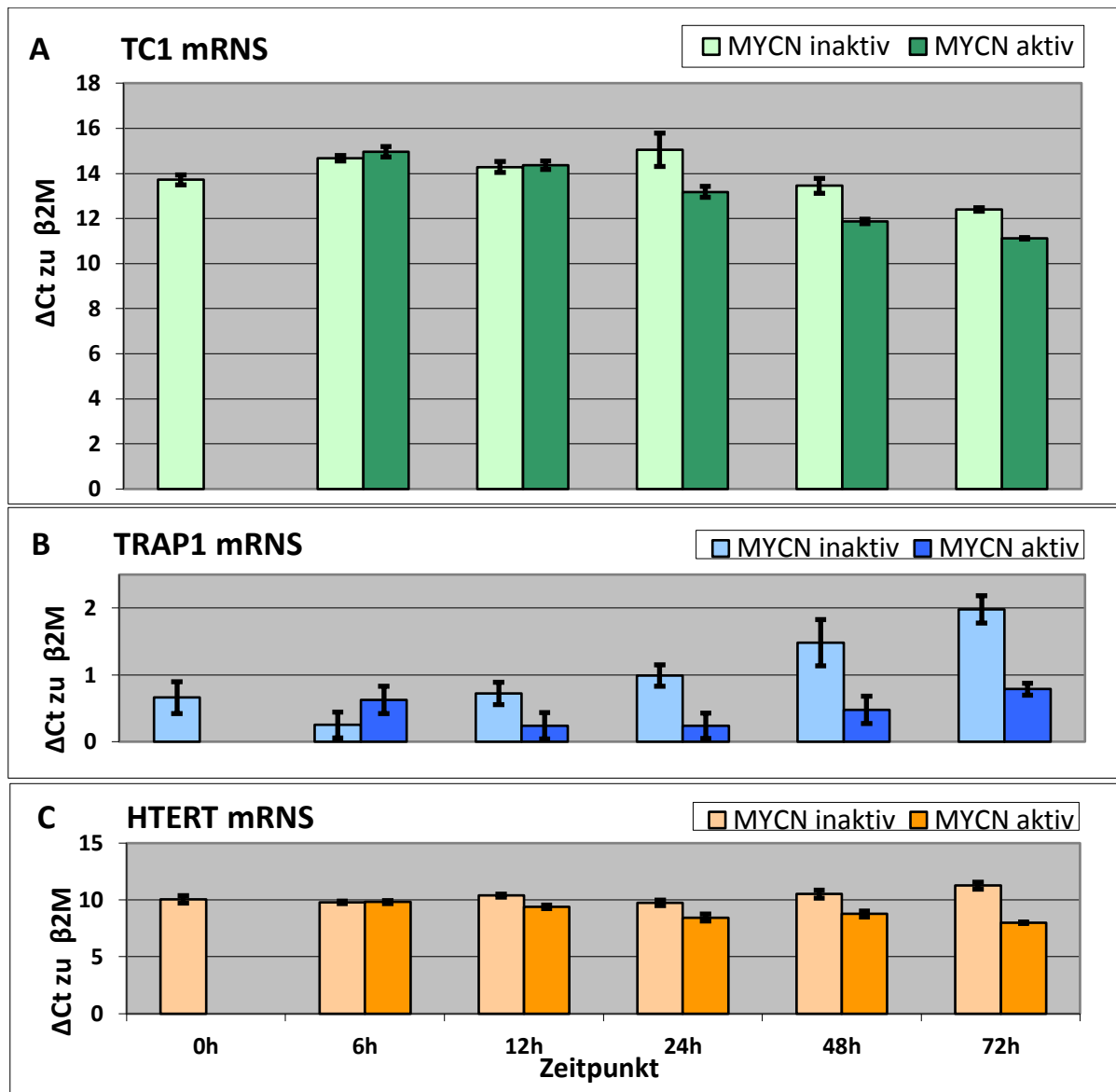


Abbildung 15 – Darstellung der mRNA Expression des jeweiligen Zielgens mit und ohne Aktivierung von MYCN zum Zeitpunkt 0. Wie erwartet steigt die Expression von TRAP1- und HTERT- mRNA. Die Expression von TC1- mRNA wird ebenfalls nach 24h bis 72h nach Aktivierung von MYCN gesteigert. Darstellung eines Experimentes mit Triplikaten.

Tabelle 10 – Mittelwerte und Standardabweichung der mRNA Bestimmungen von TC1, TRAP1 und HTERT zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 48 und 72h nach MYCN Aktivierung. Darstellung von Δ Ct Werten zu β 2-Mikroglobulin als Referenzgen.

Stunde	TC1 mRNA		TRAP1 mRNA		HTERT mRNA	
	Δ Ct Wert zu β 2M, Mittelwert (Standardabweichung)					
	MYCN inaktiv	MYCN aktiv	MYCN inaktiv	MYCN aktiv	MYCN inaktiv	MYCN aktiv
0h	13,72 (0,22)		0,66 (0,24)		10,05 (0,34)	
6h	14,67 (0,13)	14,97 (0,23)	0,25 (0,19)	0,63 (0,20)	9,78 (0,11)	9,81 (0,15)
12h	14,29 (0,24)	14,36 (0,20)	0,72 (0,17)	0,24 (0,20)	10,39 (0,12)	9,41 (0,15)
24h	15,06 (0,74)	13,18 (0,24)	0,99 (0,16)	0,24 (0,19)	9,73 (0,24)	8,45 (0,32)
48h	13,45 (0,34)	11,87 (0,10)	1,48 (0,35)	0,48 (0,21)	10,53 (0,35)	8,76 (0,26)
72h	12,40 (0,07)	11,11 (0,04)	1,98 (0,21)	0,79 (0,09)	11,26 (0,30)	8,00 (0,07)

Erhöhte Expression von TC1- mRNA in der Zelllinie SH-EP.mycnER.TC1

Es erfolgte eine Bestimmung der Expression von TC1- mRNA durch die Polymerase Ketten Reaktion nach der dritten Passage post infectionem. Als Vergleich wurde sowohl die Mutterzelllinie SH-EP.mycnER als auch die Zelllinie SH-EP.mycnER.LV mit dem Plasmid ohne TC1 Gen verwendet. Es zeigt sich eine deutliche Bande im Bereich der zu erwartenden Größe für das Produkt des Primers für die TC1 – mRNA in der Zelllinie SH-EP.mycnER.TC1, welche in den anderen beiden Zelllinien nicht vorhanden ist. Siehe dazu Abbildung 16.

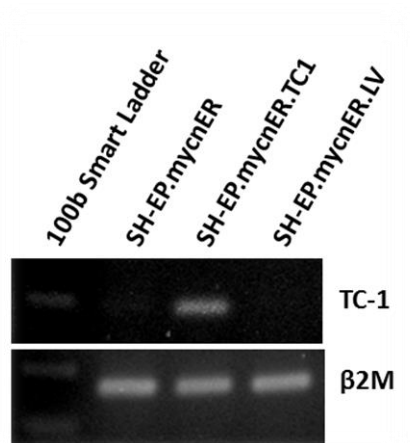


Abbildung 16 – Gellauf der PCR mit Primern für TC1- mRNA und β 2M- mRNA in Mutter-, Überexpressions- und Kontrollzelllinie in Passage 3 nach Infektion.

Weitere Messungen zur Bestätigung erfolgten durch RTD-PCR nach der 4., 13. und 17. Passage. Die Expression in der Überexpressionszelllinie SH-EP.mycnER.TC1 ist initial rechnerisch 119fach höher als in der Kontrolle und steigert sich bis zu einem 300 bis knapp 900fachen Wert in der 17. Passage. Siehe dazu Abbildung 17 und die dazugehörige Tabelle 11.

Diese hohen Expressionsraten konnten auch nach Kryokonservierung und Auftauen gefunden werden und betragen das knapp 130fache im Vergleich zur Kontrolle, dargestellt in den bereits genannten Abbildungen und Diagrammen.

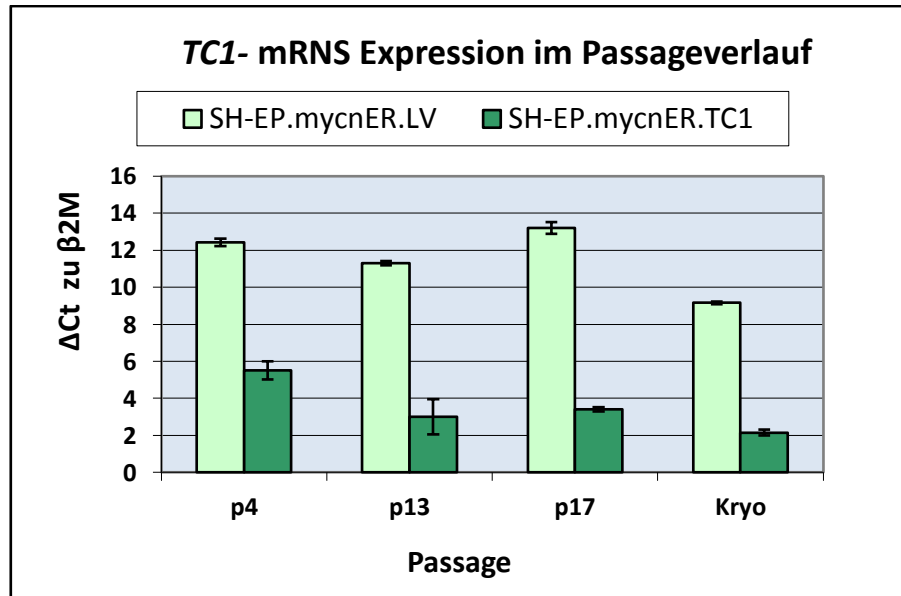


Abbildung 17 – RTD-PCR Bestimmung der TC1- mRNA Expression von SH-EP.mycnER.LV und der Überexpressionszelllinie SH-EP.mycnER.TC1 nach Passage 4 (p4), 13 (p13) und 17 (p17) sowie nach Kryokonservierung (Kryo) und Wiederauftauen. Die Überexpressionszelllinie SH-EP.mycnER.TC1 exprimiert mehr TC1- mRNA als die Kontrollzelllinie SH-EP.mycnER.LV. Dargestellt sind ΔC_t Werte zu beta2Mikroglobulin mRNA.

Tabelle 11 – TC1 mRNA Expression der drei Passage- Stadien. Die Tabelle zeigt die dazugehörigen Werte zur Abbildung 17. Zusätzlich sind die $\Delta\Delta C_t$ und die $2^{\Delta\Delta C_t}$ Werte errechnet. Die TC1 - mRNA Expression in der Überexpressionszelllinie SH-EP.mycnER.TC1 ist stets höher als in der Kontrollzelllinie SH-EP.mycnER.LV und erreicht fast das 900fache der mRNA Expression in Passage 17. Auch nach dem Auftauen ist die Expression stark erhöht auf knapp das 130fache zur Kontrolle.

	SH-EP.mycnER.TC1	Std.abw.	SH-EP.mycnER.LV	Std.abw.	$\Delta\Delta C_t$	$2^{\Delta\Delta C_t}$ TC1 zur Kontrolle
p4	5,52	0,20	12,41	0,48	6,90	119
p13	2,99	0,11	11,30	0,95	8,31	318
p17	3,40	0,32	13,21	0,11	9,81	897
Nach Kryo	9,16	0,07	2,15	0,15	7,01	129

Eine stabile Expression des gewünschten Gens TC1 ist durch die Infektion in der Zelllinie SH-EP.mycnER.TC1 erreicht worden. Eine dauerhafte Kultivierung dieser Überexpressionszelllinie ist, wie auch eine Kryokonservierung der Zellen, über einen langen Zeitraum möglich ohne dass die Überexpression der TC1 - mRNA verloren geht.

Überexpression von TC1- mRNS führt zur verminderten Proliferation

Mikroskopische Auszählung

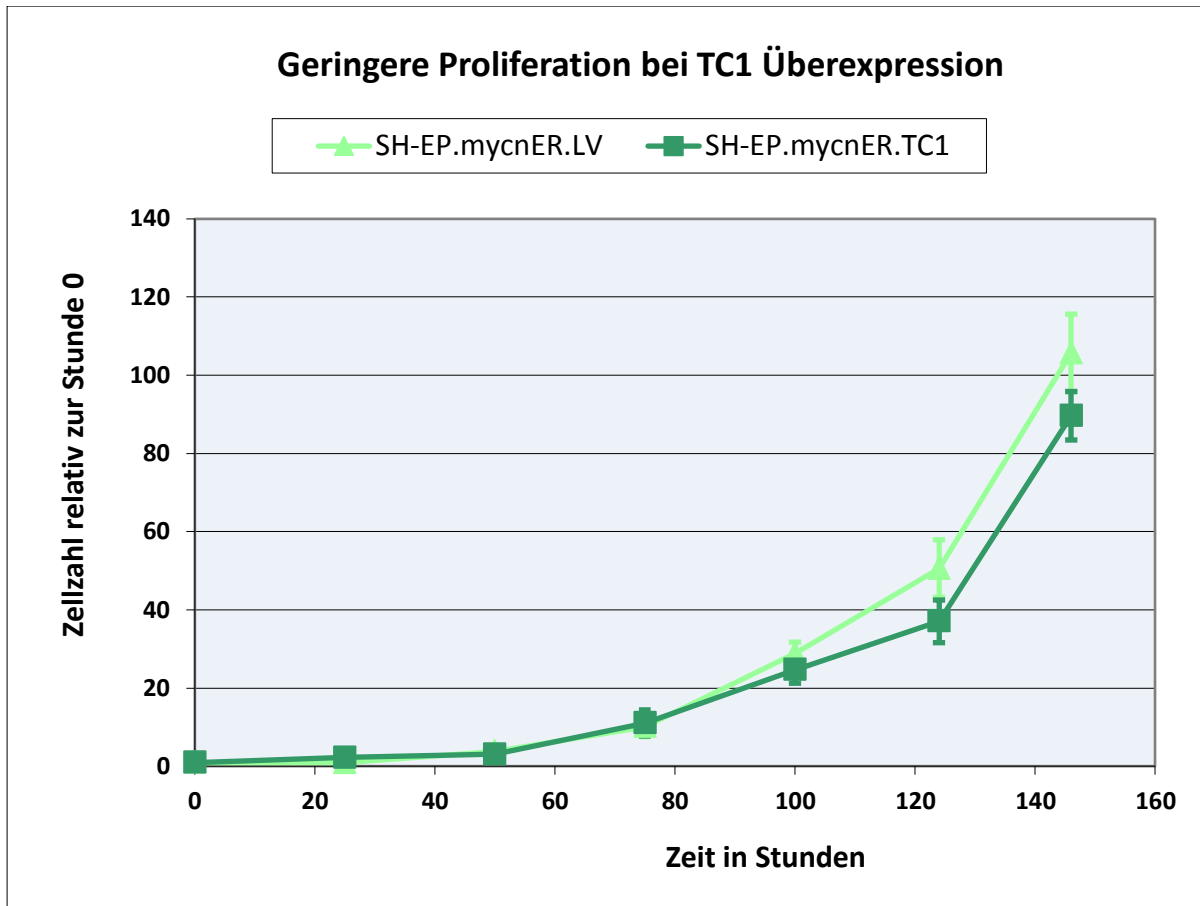


Abbildung 18 - Mikroskopische Auszählung des Wachstums der TC1 Überexpressions- und der Kontrollzelllinie über 7 Tage. Die TC1 Überexpressionszelllinie (grün) zeigt ein geringeres Wachstum gegenüber der Kontrollzelllinie (hellgrün).

Zum Vergleich des Proliferationsverhaltens von SH-EP.mycnER.TC1 Zellen wurden diese mit der Leervektorkontrolle über sechs Tage beobachtet. Dazu wurde die Zellzahl täglich von drei der 24 gleich behandelten Wells durch eine Neubauer Zählkammer ausgezählt. Es konnten täglich Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet werden. Um eine bessere Vergleichbarkeit mit der eingesetzten Zellzahl zu erreichen, wurde die Zellzahl als Vielfaches der gemessenen Zellzahl in Bezug zur ersten Auszählung dargestellt.

Beide Zellpopulationen zeigen einen exponentiellen Wachstumsverlauf, der bis zu circa 168 Stunden nach dem Aussetzen der Zellen anhält. Während nach 75 Stunden, etwa drei Tagen, noch kein Unterschied zwischen beiden Zellpopulationen besteht, wird anschließend das langsamere Wachstum der Zellen mit TC1 Überexpression deutlich. Der Unterschied ist

größer als die Standardabweichung, wird aber mit Ende des Messzeitraumes, mit Erreichen der kompletten Konfluenz, geringer.

TC1 überexprimierende Zellen erreichen später Konfluenz in der Zellkultur

In einer täglichen Färbung von Zellkulturen mit Kristallviolett ist das Wachstum der Zellen optisch darstellbar. Hier zeigt die TC1-überexprimierende Zelllinie ein langsames Erreichen der Konfluenz auf der Zellkulturplatte im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Erste deutliche Kolonien zeigen sich ab Tag 5 mit Verzögerung um ca. einen Tag im Vergleich zur Kontrolle.

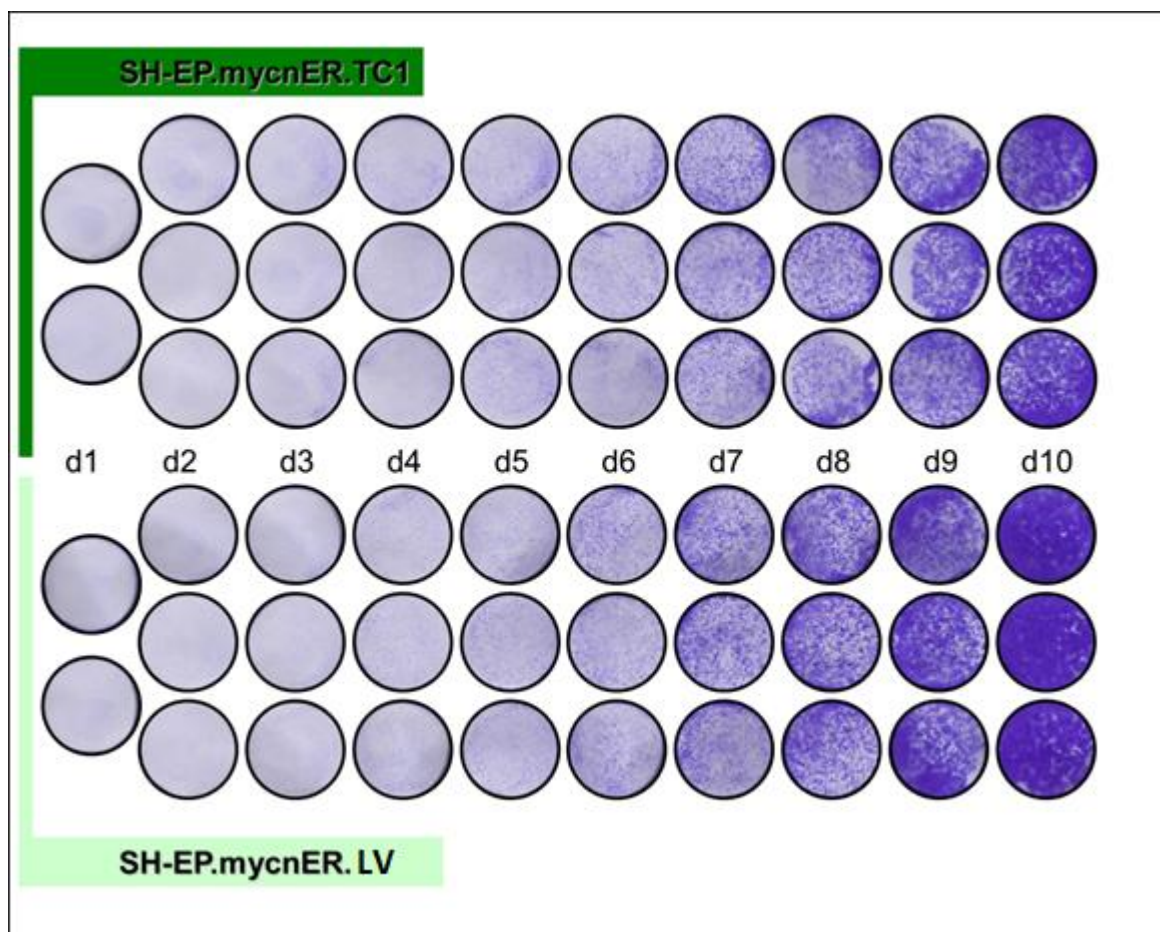


Abbildung 19 – Darstellung des Wachstums der TC1 Überexpressionszelllinie mit späterem Erreichen der Konfluenz im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Färbungen mit Kristallviolett innerhalb von zehn Tagen.

Verringerte Zellviabilität in TC1 überexprimierenden Zellen im Water Soluble Tetrasoliumsalt (WST) – Assay

Um das Ergebnis objektiv zu verifizieren und einen längeren Zeitraum zu verfolgen, wurde eine Bestimmung der Zellaktivität durch den Water-Soluble-Tetrasoliumsalt-Assay durchgeführt.

Damit war es möglich die Zellaktivität über neun Tage zu verfolgen und Rückschlüsse auf die vorhandene Zellzahl zu ziehen.

Dazu wurden täglich sechs der 96 gleich behandelten Wells mit dem WST-Assay ausgemessen. Es konnten so tägliche Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet werden. Wie erwartet, liegt in den ersten zwei Tagen die Zellzahl unter der minimal messbaren Zellaktivität. Ein messbares Signal innerhalb des Messbereiches konnte dafür bis zum neunten Tag erhalten werden. Beide Kurven der Zellpopulationen zeigen einen exponentiellen Anstieg, der bis zum siebten Tag nach dem Aussetzen der Zellen anhält und dann abflacht. Dabei zeigt die Zelllinie mit TC1 Überexpression einen deutlich abgeflachten und langsameren Anstieg.

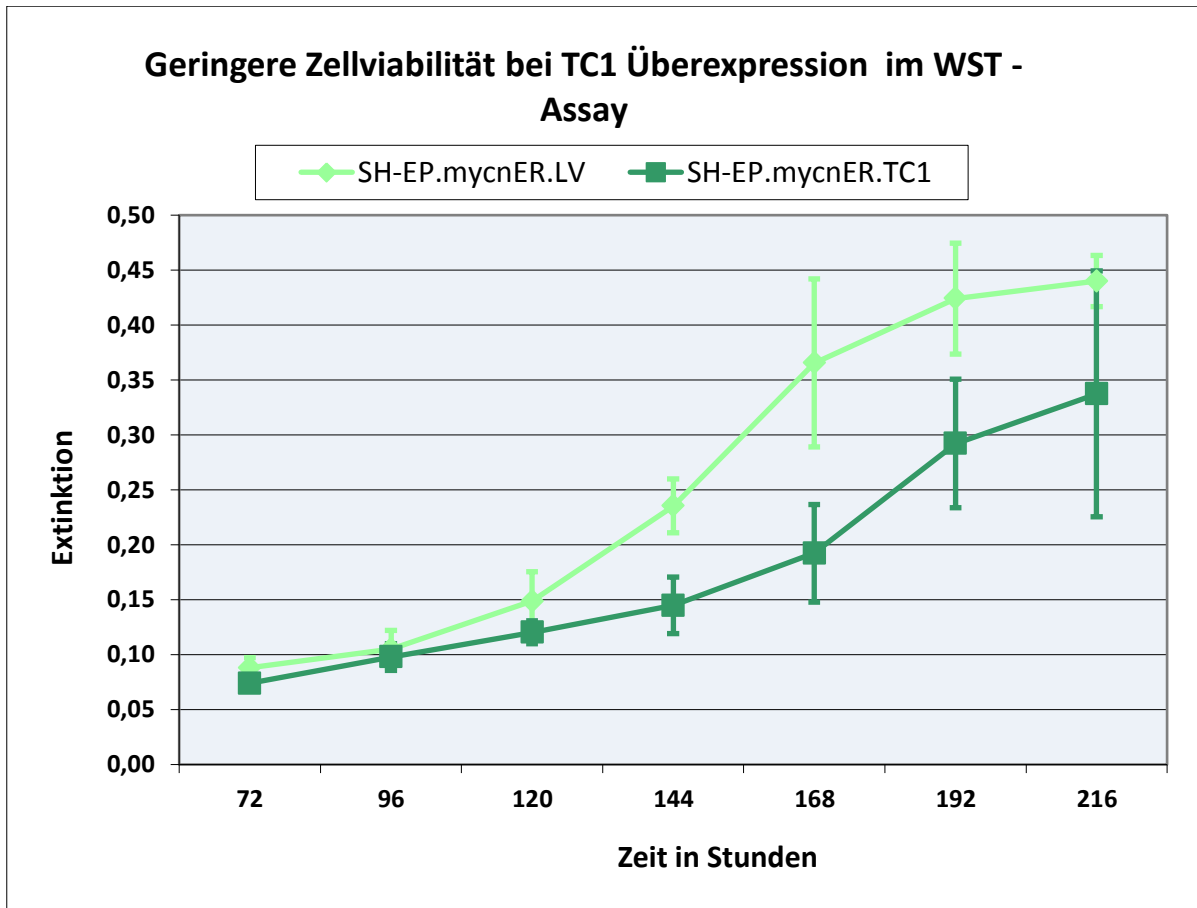


Abbildung 20 - Ausmessung der Absorption bei 450nm der Wells im Water Soluble Tetrasoliumsalt (WST) – Assay, zur Quantifizierung der Zellviabilität. Vergleich des Wachstums der TC1 Überexpressionszelllinie (dunkelgrün) und der Kontrollzelllinie (hellgrün) von Tag 3 bis Tag 9. Es zeigt die Zelllinie mit TC1 Überexpression (dunkelgrün) eine geringere Viabilität im Vergleich zur Kontrolle (hellgrün).

Überexpression von TC1- mRNS und Aktivierung von MYCN führt mit synergistischem Effekt zu geringerer Koloniebildung von SH-EP.mycnER Zellen

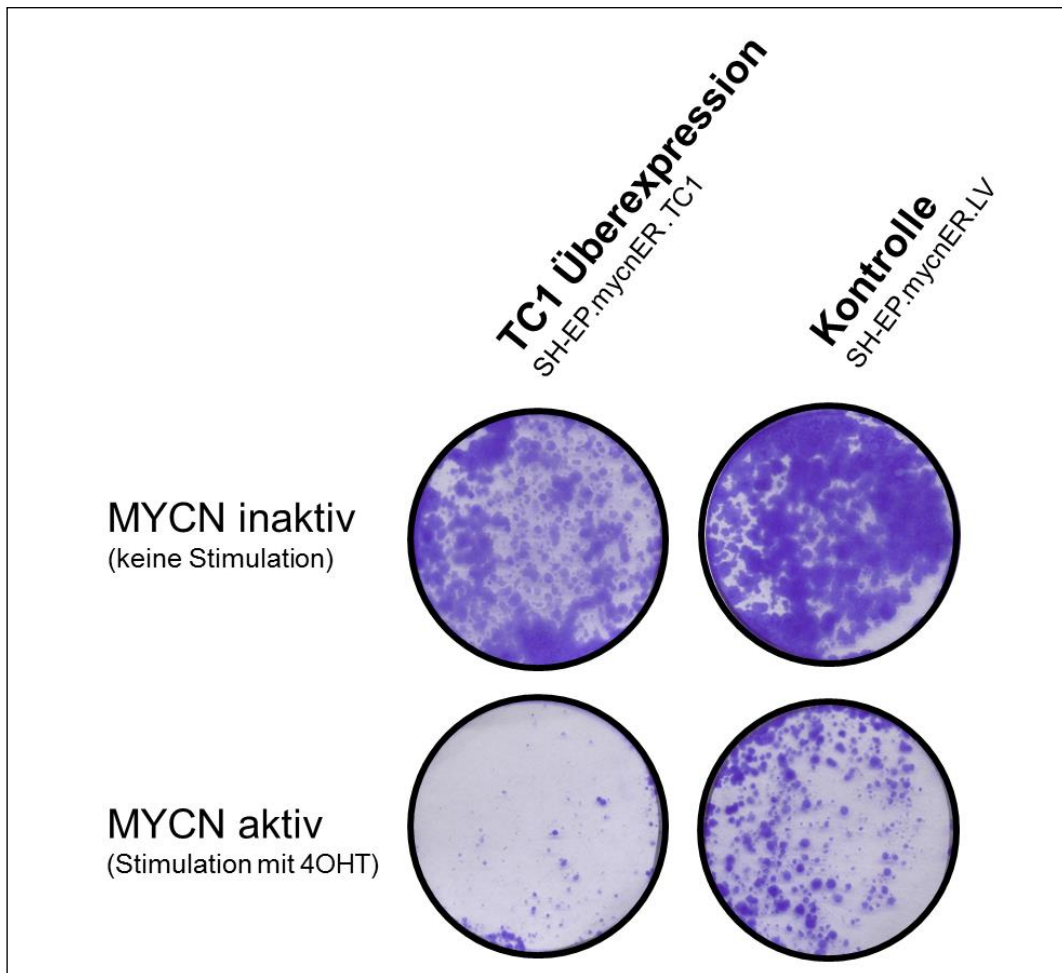


Abbildung 21 - Darstellung der Colony Forming Assays mit Zellen mit und ohne TC1 Überexpression (links mit und rechts ohne TC1 Vektor) und mit und ohne MYCN Stimulation (oben mit aktivem, unten mit inaktivem MYCN). Es zeigen sich weniger und kleinere Kolonien durch Aktivierung von MYCN, welche bei zusätzlicher Überexpression von TC1 noch geringer und kleiner ausfallen.

Die Colony Forming Assays wurden mehrfach wiederholt. Es wurden exemplarisch jeweils ein repräsentatives Well in Abbildung 21 dargestellt.

Die Konfluenz der TC1 überexprimierenden Zelllinie zur Kontrolle ist deutlich geringer. Durch Aktivierung von MYCN reduziert sich sowohl die Konfluenz als auch die Anzahl der Kolonien in beiden Zellkulturen. Durch Aktivierung von MYCN in der Überexpressionszelllinie sinkt die Anzahl und die Größe der Kolonien drastisch.

Überexpression von TC1 führt nicht zur Induktion von MYC- mRNS

Es wurden aus Triplikaten einer RTD-PCR Messung Mittelwerte und Standardabweichungen der Expression von MYC- und TC1- mRNS im Vergleich zu β 2Mikroglobulin- mRNS errechnet und in der Grafik verwendet. Die TC1 Überexpressionszelllinie zeigt eine deutlich höhere Expression von TC1 als die Kontrolle (ΔC_t -2,38 zu 8,02). Bei der MYC- mRNS ist kein Unterschied in der Expression festzustellen (ΔC_t 15,37 zu 15,35).

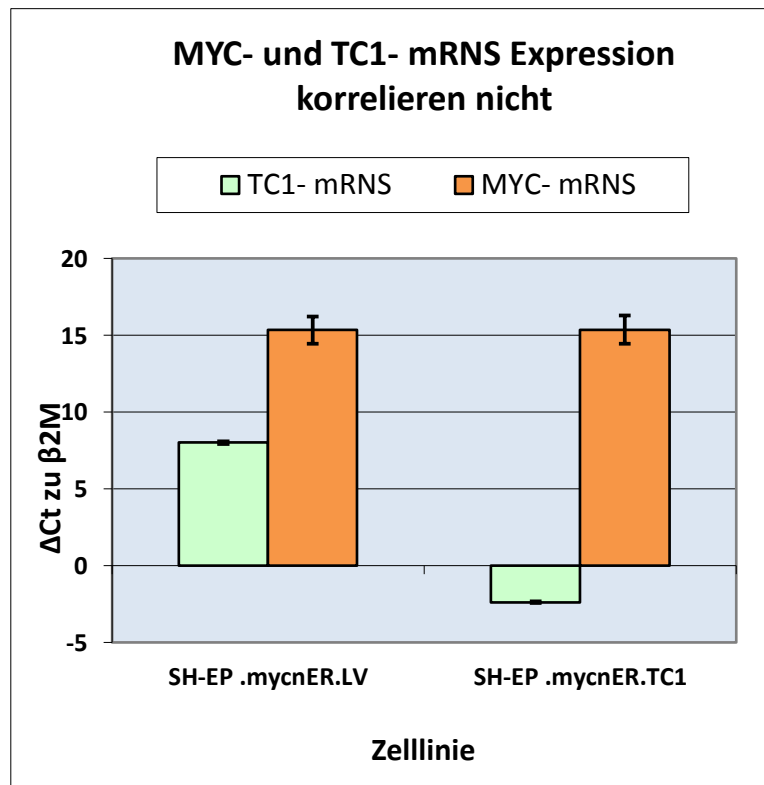


Abbildung 22 – Darstellung der Expressionslevel von MYC- und TC1 mRNS im Vergleich zu beta2Mikroglobulin mRNS. In der TC1 Überexpressionslinie ist eine höhere Expression von TC1 ohne Unterschied im MYC Niveau zu verzeichnen.

Tabelle 12 – ΔC_t Werte und Standardabweichung der Bestimmung von MYC- und TC1- mRNS im Vergleich zu β 2-Mikroglobulin-mRNS in der TC1 Überexpressionszelllinie und der Leervektorkontrolle.

	SH-EP.mycnER.LV		SH-EP.mycnER.TC1	
ΔC_t TC1	8,02	(0,35)	-2,38	(0,06)
ΔC_t MYC	15,35	(0,43)	15,37	(0,92)

Verringerter Anteil an Zellen in der S-Phase durch einen G0/G1 Arrest in Zellen mit TC1 Überexpression

Es wurde eine Zellzyklusanalyse der TC1 überexprimierenden Zelllinie im Vergleich zur Leervektorkontrolle unter jeweils der Bedingung MYCN-Aktivierung und MYCN-nicht-Aktivierung durchgeführt. Nach PI- Färbung wurde der DNS- Gehalt mittels FACS- Analyse ermittelt und ein Zellzyklusprofil unter o.g. Bedingungen erstellt.

Ohne Aktivität von MYCN zeigt die TC1 überexprimierende Zelllinie einen signifikant höheren Anteil an Zellen in der subG1- (9,77% gegenüber 6,68%, Signifikanz $p=0,031$) sowie einen im Trend höheren Anteil in der G0/G1- Phase (60,5% gegenüber 54,08%, Signifikanz $p=0,086$). Ein signifikanter Unterschied zeigt sich im Anteil an Zellen in der S- Phase, welcher bei TC1 Überexpression geringer ausfällt (23,06% gegenüber 31,53%, Signifikanz $p=0,001$). Die G2/M- Phase unterscheidet sich nicht (6,08% gegenüber 6,44%, Signifikanz $p=0,884$).

Durch Aktivierung von MYCN bleiben die qualitativen Unterschiede zwischen beiden Zelllinien bestehenden mit deutlicherer Ausprägung der quantitativen Unterschiede. Der Anteil von Zellen in der G0/G1- Phase ist nun in der TC1 Überexpressionszelllinie signifikant höher (38,98% gegenüber 28,26%, Signifikanz $p<0,001$) und der Anteil in der S- Phase nach wie vor niedriger (34,9% gegenüber 50,84%, Signifikanz $p<0,001$). Es bestehen im Anteil der Zellen in der subG1- (10,02% gegenüber 6,72%, Signifikanz $p<0,094$) und der G2/M- Phase (16,61% gegenüber 13,50%, Signifikanz $p<0,477$) keine signifikanten Unterschiede.

In der Zellreihe mit TC1 Überexpression zeigt sich sowohl mit als auch ohne Aktivität von MYCN ein geringerer Anteil an Zellen in der S- Phase mit konsekutiver Erhöhung der Zellen in der G0/G1- Phase. Durch Aktivierung von MYCN steigt der Anteil der Zellen in der S- und G2/M- Phase in beiden Zellreihen. In der Überexpressionszelllinie zeigt sich durch Aktivierung von MYCN ein Anstieg des Anteils der Zellen in der S- Phase um ca. 51,3% auf 34,9%. In der Leervektorkontrolle beträgt der beschriebene Anstieg ca. 61,2% auf 50,84%. Die G2/M- Phase ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen beiden Zellreihen, während die subG1- Phase im Trend erhöht bzw. teils signifikant in der TC1 Überexpressionzellreihe ist.

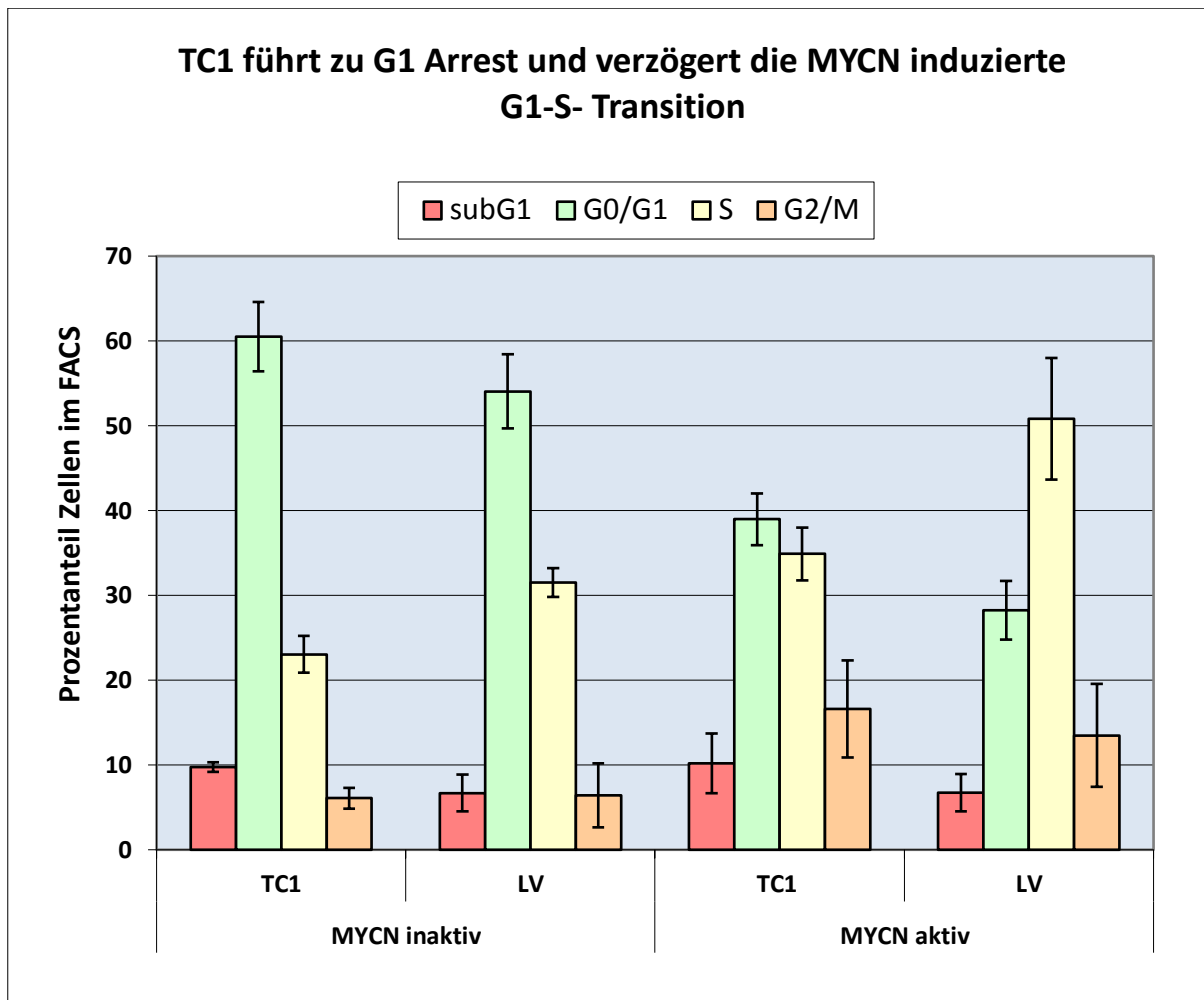


Abbildung 23 – Grafische Darstellung der Verteilung der Anteile auf die Zellzyklusphasen ermittelt durch Propidium Iodid Färbung, Mittelwerte in fünf unabhängigen Einzelmessungen mit Darstellung der Standardabweichung. Es ist ein kleinerer Anteil von Zellen in der S-Phase bei TC1 Überexpression im Vergleich zu der Kontrollzelllinie sowohl mit inaktivem als auch aktivem MYCN. Es zeigt sich ein erhöhter Anteil an Zellen in der G1 Phase bei TC1 Überexpression. Dies kommt einem G1 Arrest gleich.

Tabelle 13 – Zahlenwerte der Verteilung der Anteile auf die Zellzyklusphasen ermittelt durch Propidium Iodid Färbung, Mittelwerte in 5 unabhängigen Einzelmessungen mit (Standardabweichungen). Signifikanzniveaus auf der rechten Seite, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind farbig hinterlegt.

	Anteil Zellen - Mittelwerte (Standardabweichung)				Signifikanz zwischen			
	MYCN inaktiv		MYCN aktiv		TC1/LV in		MYCN aktiv/inaktiv	
	TC1	LV	TC1	LV	MYCN inaktiv	MYCN aktiv	TC1	LV
subG1	9,77 (0,58)	6,68 (2,17)	10,20 (3,51)	6,72 (2,22)	0,031	0,094	0,791	0,982
G0/G1	60,50 (4,09)	54,08 (4,38)	38,98 (3,07)	28,26 (3,45)	0,086	0,002	0,000	0,000
S	23,06 (2,17)	31,53 (1,70)	34,90 (3,12)	50,84 (7,20)	0,001	0,004	0,000	0,002
G2/M	6,08 (1,23)	6,44 (3,78)	16,61 (5,72)	13,50 (6,09)	0,884	0,477	0,020	0,117

Verringerter Anteil von apoptotischen Zellen bei TC1 Überexpression im AnnexinV Apoptose Assay

Um einen möglichen Einfluss der TC1 Überexpression auf Apoptose und Zelltod zu untersuchen, erfolgte parallel eine Färbung mit einem FITC markierten AnnexinV. Dadurch konnte zwischen lebenden Zellen, Zellen in der frühen Apoptose und spät apoptotischen bzw. toten Zellen unterschieden werden.

Grafisch ist dieser Sachverhalt in Abbildung 24 als Kumulation von jeweils mindestens vier Einzelmessungen zusammengefasst. Eine statistische Zusammenfassung dieser Daten liefert Tabelle 14.

In der Zellreihe mit TC1 Überexpression ist der Anteil an apoptotischen Zellen signifikant niedriger als in der Leervektorkontrolle. Dies trifft sowohl bei inaktivem MYCN (12,32% gegenüber 29,7%, Signifikanz $p < 0,001$) als auch bei aktivem MYCN (13,76% gegenüber 39,4%, Signifikanz $p < 0,001$) zu. Der Anteil lebender Zellen ist konsekutiv höher.

Durch Aktivierung von MYCN steigt der Anteil apoptotischer Zellen. Während in den TC1 überexprimierenden Zellen nur eine geringe, nicht signifikante Zunahme erfolgt, zeigt die Leervektorkontrolle einen signifikanten Anstieg um ca. 32,7% von MYCN inaktiven Zellen auf 39,4% bei MYCN aktiven Zellen.

Der Anteil toter Zellen liegt unter allen Bedingungen und Zellreihen bei ca. 4-5%.

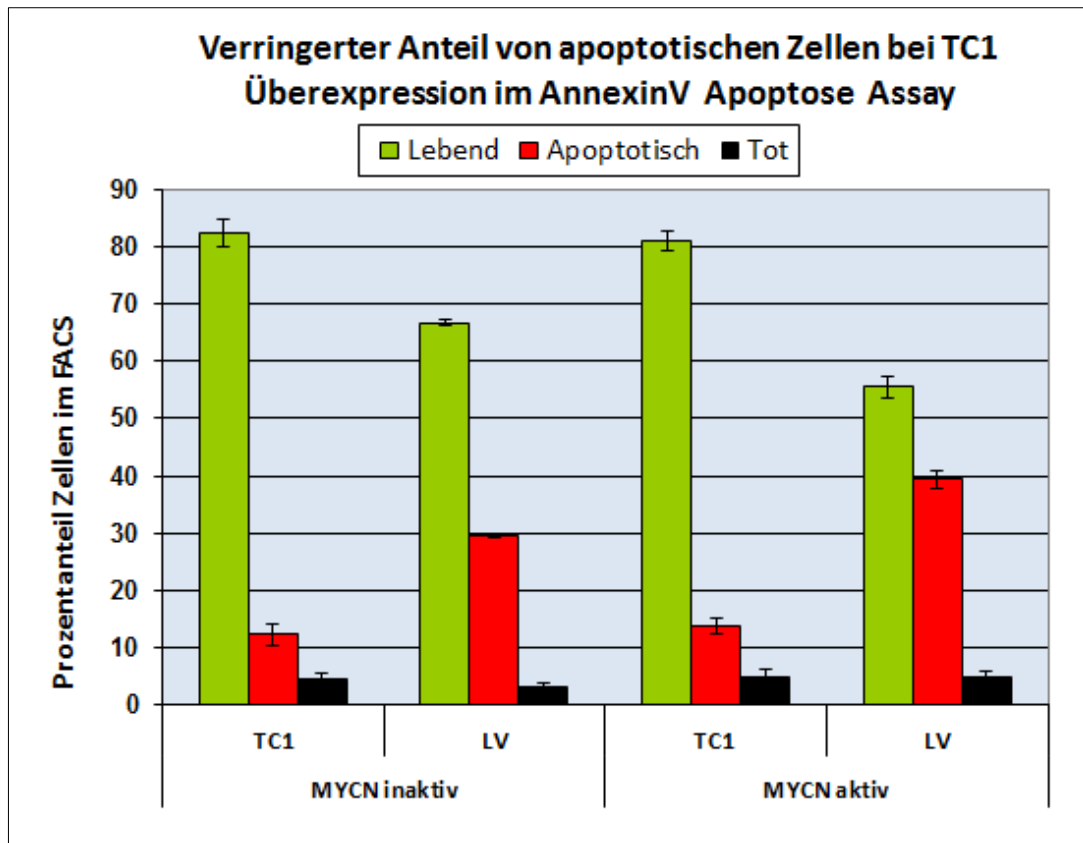


Abbildung 24 - Unterscheidung in lebende (grün), früh apoptotische (rot) und spät apoptotische Zellen (schwarz) durch Annexin V Markierung und Messung im FACS. Mit Tamoxifen stimulierte Zellen und die dazugehörige unstimulierte Kontrolle. Es zeigt sich eine Reduktion des Anteils von apoptotischen Zellen in den Proben mit TC1 Überexpression.

Tabelle 14 - Zahlenwerte des AnnexinV Apoptose Assays mit Unterteilung in lebende, früh apoptotische und spät apoptotische Zellen, Mittelwerte in 5 unabhängigen Einzelmessungen mit (Standardabweichungen). Signifikanzniveaus auf der rechten Seite, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind farbig hinterlegt.

	Anteil Zellen - Mittelwerte (Standardabweichung)				Signifikanz zwischen			
	MYCN inaktiv		MYCN aktiv		TC1/LV in		MYCN aktiv/inaktiv in	
	TC1	LV	TC1	LV	MYCN inaktiv	MYCN aktiv	TC1	LV
Lebend	82,4 (2,75)	66,63 (0,72)	80,9 (1,78)	55,43 (2,5)	<0,001	<0,001	0,336	0,002
Apoptotisch	12,32 (2,07)	29,7 (0,4)	13,76 (1,45)	39,4 (1,82)	<0,001	<0,001	0,238	0,009
Tot	4,72 (0,96)	3,2 (0,72)	4,82 (1,75)	4,8 (1,25)	0,057	0,987	0,914	0,127

Überexpression von TC1 führt nicht zur Induktion von P21

Es wurden aus Triplikaten einer RTD-PCR Messung Mittelwerte und Standardabweichungen der Expression von P21- und TC1- mRNA im Vergleich zu β 2Mikroglobulin- mRNA errechnet und in der Grafik verwendet. Die TC1 Überexpressionszelllinie zeigt eine deutliche höhere Expression von TC1 als die Kontrolle (ΔC_t -2,38 zu 7,65). Bei der P21- mRNA ist kein Unterschied in der Expression festzustellen (ΔC_t 10,13 zu 9,74).

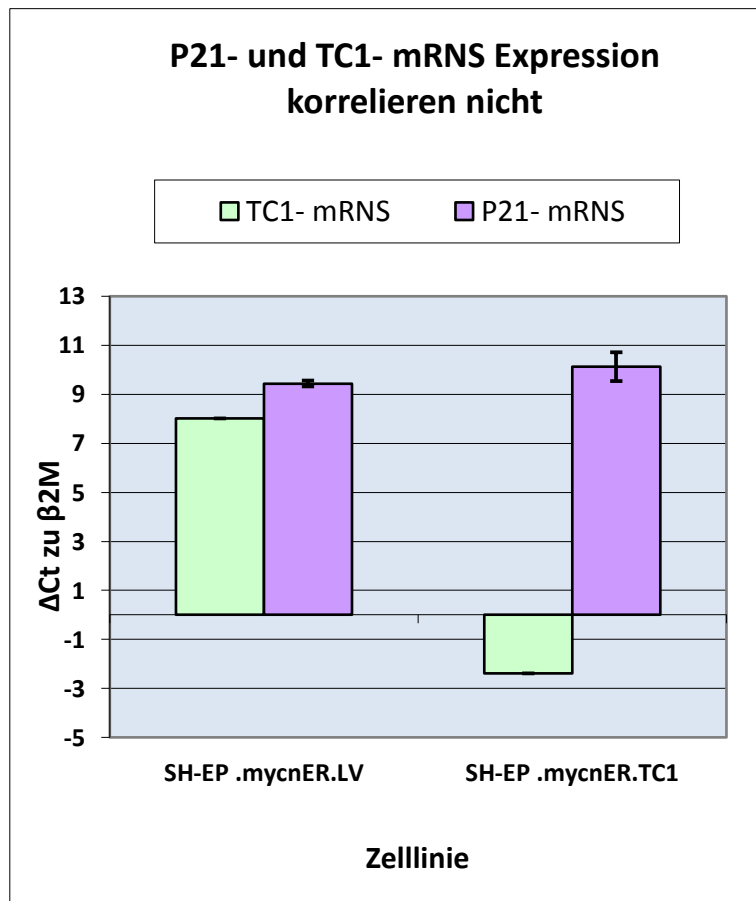


Abbildung 25 - Darstellung der Expressionslevel von P21- und TC1- mRNA im Vergleich zu β 2Mikroglobulin- mRNA. In der TC1 Überexpressionslinie ist eine höhere Expression von TC1 ohne Unterschied im P21 Niveau zu verzeichnen.

Tabelle 15 - ΔC_t Mittelwerte und (Standardabweichung) der Bestimmung von MYC- und TC1- mRNA im Vergleich zu β 2-Mikroglobulin-mRNA in der TC1 Überexpressionszelllinie und der Leervektorkontrolle.

	SH-EP.mycnER.LV		SH-EP.mycnER.TC1	
ΔC_t TC1	8,02	(0,35)	-2,38	(0,06)
ΔC_t P21	10,13	(0,12)	9,44	(0,58)

DISKUSSION

Neuroblastome sind Tumore, die sich klinisch äußerst heterogen verhalten. Die *MYCN*-Amplifikation ist der wichtigste genetische Prognoseparameter. Die untergeordneten Mechanismen, die zwischen aggressivem Tumorwachstum bei einem Teil und Wachstumsarrest bzw. spontaner Regression bei einem anderen Teil der Patienten unterscheiden, sind noch nicht vollständig geklärt.

Ausgehend von präliminären Daten, denen zufolge *MYCN* über Acetylierungsmechanismen zu einer Regulation von *TC1* in NBL-Zellen führt (unpubliziert E. Bergmann, AG Christiansen), soll in dieser Arbeit der Einfluss von *TC1* auf das Wachstumsverhalten von Neuroblastomzellen untersucht werden.

Im Gegensatz zu beschriebenen proliferationsfördernden Eigenschaften eines klassischen Onkogens für das papilläre Schilddrüsenkarzinom und auch für andere Malignome zeigte eine Auswertung von cDNA-Microarray-Daten (Molenaar et al. 2012) einen drastischen Überlebensvorteil von Patienten, deren Tumore hohe *TC1* Expressionslevel aufwiesen. Dieser Effekt zeigt sich insbesondere für Tumore ohne *MYCN* Amplifikation (siehe Abbildung 13). Bei vorhandener *MYCN* Amplifikation ist die Prognose unabhängig von der *TC1* Expression schlecht (siehe Abbildung 12). Damit könnte *TC1* ein neuer prognostischer Marker für eine höhere Überlebenschance und ggf. der Notwendigkeit einer weniger aggressiven Therapie von Patienten mit Neuroblastomen ohne *MYCN* Amplifikation sein.

In einem nächsten Schritt wurde eine mögliche Korrelation der *MYCN*- und *TC1*-Expression untersucht. In einem Panel von fünf *MYCN*-amplifizierten und vier *MYCN*-nicht-amplifizierten NBL-Zelllinien wurde mittels RTD-PCR die *TC1*- und die *MYCN*-Expression bestimmt. Wie erwartet, ist die *MYCN*-Expression in den amplifizierten Zellen im Vergleich zu den nicht-amplifizierten Zellen erhöht (Nisen et al. 1988; Souza et al. 2011).

Eine Literaturrecherche ergab, dass sich in den meisten bisher untersuchten Malignomen eine Zunahme der Expression von *TC1* mit steigendem Tumorstadium zeigt. Ausnahmen stellten das Kolonkarzinom (Friedman et al. 2004) sowie verschiedene hämatologische Malignome dar (Zhang et al. 2011), die eine Reduktion bzw. einen Verlust von *TC1* mit zunehmender Aggressivität bis hin zur immortalisierten Zellkultur zeigten.

Zwar konnte in den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien weder die *MYCN*-Expression, noch die *MYCN*-Amplifikation eindeutig mit der TC1 Expression korreliert werden, es zeigten sich jedoch zwei Auffälligkeiten:

Erstens haben die *MYCN*-amplifizierten Zellen im Trend eine höhere TC1 Expression. Dies spricht für einen möglichen Einfluss von *MYCN* auf *TC1*.

Zweitens zeigen sich zwei signifikant verschieden hohe Expressionslevel für TC1. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in dem histologischen Subtyp der jeweiligen NBL-Zelllinien liegen. Unter Einbeziehung von Angaben der Subtypen aus der Literatur (Kuçi et al. 2002; Hanada et al. 1993; Zhou et al. 2010) korreliert das höhere TC1- Expressionslevel mit N-Typ-Neuroblastomzellen. Die jeweiligen Subtypen unterscheiden sich in ihrer Genaktivität deutlich. TC1 unterliegt damit wahrscheinlich auch im Neuroblastom einer kontextabhängigen Aktivität. Eine spontane oder auch chemische Konversion ist zwischen beiden Subtypen jederzeit möglich (Dimitroulakos et al. 1994), so dass zukünftige Messungen der Expressionslevel unter Einbeziehung von Markern zur Unterscheidung des Subtyps interessant wären.

Der in den *MYCN*- amplifizierten Zellen gesehene Trend der Expressionssteigerung von TC1 wurde weiter untersucht, um eine vorhandene Beeinflussung von *MYCN* auf die TC1-Expression zu bestätigen bzw. auszuschließen. Dazu wurden RTD-PCR Messungen in einem *MYCN* induzierbaren System durchgeführt. Nach Induktion von *MYCN*, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Expression von TC1 sowie von zwei weiteren Genen als Positivkontrolle bestimmt. Es zeigte sich eine Hochregulation von TC1 durch *MYCN*.

Diese erfolgt nach etwa 24 Stunden, anhaltend bis zum Abschluss nach 72 Stunden (siehe Abbildung 15). Ursächlich kann die Hochregulation von TC1 bedingt sein durch eine direkte Regulation von *MYCN*, eine indirekte Regulation durch eine von *MYCN* induzierte Signalkaskade oder eine gegenregulatorische Steigerung auf einen von *MYCN* ausgelösten zellulären Vorgang. Hier wäre es sinnvoll, intensivere Untersuchungen an der genetischen Ursprungsregion von TC1, *C8orf4*, durchzuführen. Eine Chromatin-Immuno-Präzipitation könnte verifizieren, ob TC1 ein direktes Ziel- Gen von *MYCN* ist.

Um funktionelle Untersuchungen zum Einfluss von TC1 auf das Wachstum humaner NBL-Zellen durchführen zu können, wurde die NBL-Zelllinie SH-EP.mycnER gewählt. SH-EP ist eine humane NBL-Zelllinie ohne *MYCN*-Amplifikation und ohne messbare *MYCN* Expression (Otto

et al. 2009; Schramm et al. 2013). Die TC1-Level sind relativ niedrig (siehe Tabelle 9), so dass sie für die Etablierung eines TC1 Überexpressionsphänotyps qualifiziert ist. Um parallel den Einfluss von MYCN auf *TC1* in dieser Zelllinie zu untersuchen, enthält sie das Fusionsprotein mycnER.

Ein Plasmid mit der TC1 Sequenz wurde meiner Arbeitsgruppe freundlicherweise von Inchul Lee und ihren Kollegen aus Seoul, Korea, zur Verfügung gestellt und durch Dr. med. Eckhard Bergmann in einen pBAGE-Vektor umklontiert.

Eine erfolgreiche Infektion konnte durchgeführt werden und es wurde eine gepoolte Population kultiviert, um Effekte durch Einzelklonselektion zu vermeiden.

In der ersten RTD-PCRs zeigte sich eine deutlich gesteigerte Expression von *TC1*- mRNA, die auch nach mehreren weiteren kulturellen Passagen nachzuweisen blieb. Dieser Effekt konnte auch nach Einfrieren und wieder Auftauen der Zellen gezeigt werden, so dass hier von einer erfolgreichen Integration sowie Transkription der gewünschten Information auszugehen ist (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17). Ein Nachweis der nachfolgenden Translation des TC1 Proteins ist noch nicht erfolgt und sollte zur Vervollständigung und Bestätigung durchgeführt werden. Durch die eindeutigen Effekte im Vergleich zur Kontrollzelllinie ohne *TC1* Sequenz, ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass eine erfolgreiche Translation vorliegt.

So zeigen sich deutliche Unterschiede in einem Colony Forming Assay. Hier ist eine reduzierte Wachstumsdichte bei TC1 Überexpression zu erkennen (siehe Abbildung 21). Trotz vorhandener hoher biologischer Varianz und methodischen Grenzen konnte die verringerte Proliferation in mehreren verschiedenen Versuchsanordnungen reproduziert werden (siehe Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20).

Außerdem zeigte sich im Colony Forming Assay bei *MYCN* Aktivierung eine reduzierte Koloniebildung. Dies deckt sich mit der Beschreibung, dass die Klasse der *MYC* Gene die Apoptose steigern und eine Reduktion von Kolonien verursachen (Ushmorov und Debatin 2005). Die verringerte Kolonienzahl ist besonders eindrucksvoll bei den TC1 überexprimierenden Zellen zu beobachten (siehe Abbildung 21). Es lässt sich daher schlussfolgern, dass TC1 im verwendeten Neuroblastommodell sowohl die Proliferation, als auch die Bildung von Kolonien hemmt.

Die in dieser Arbeit in einem NBL- Zellsystem beobachteten Effekte zeigen eine inhibierende Wirkung einer hohen TC1 Expression auf das maligne Potential von Zellen. Es besteht ein

geringeres Wachstum und eine geringere Fähigkeit Kolonien zu bilden. Gleichsinnig zeigt sich bei hoher TC1 Expression eine höhere statistische Überlebenswahrscheinlichkeit in einer Subgruppe von Neuroblastompatienten.

Die in dieser Arbeit gezeigte antiproliferative Wirkung von TC1 im NBL steht im Gegensatz zu publizierten Effekten in anderen Tumorsystemen. Bisher ist ein positiver Effekt auf die Kolonienbildung durch TC1 in Mamma Karzinomen beschrieben (Yang et al. 2007). In anderen nicht NBL Zellsystemen konnte eine TC1 Überexpression mit einer erhöhten Proliferation, Invasivität und erniedrigten Apoptose korreliert werden (Kim 2006; Sunde et al. 2004). Ein Knock-down führte entsprechend zu einer Proliferationshemmung und einer reduzierten Invasivität (Yang et al. 2007). Als nativ ungeordnetes Protein besteht bei TC1 eine hohe evolutionäre Konservierung. Aufgrund dessen wurden mögliche Beeinflussungen des Zellzyklus sowie von intrazellulären Signalwegen postuliert. Ein positiver Einfluss von TC1 auf den G1- S- Phase Übergang wurde beschrieben (Wang et al. 2008).

Zur Abklärung, wodurch das verringerte Wachstum und die geringere Ausbildung von Kolonien in den NBL-Zellkulturen ausgelöst worden sein könnten, wurden daher Analysen des Zellzyklus durch eine Propidiumiodidfärbung sowie Untersuchungen der Apoptoserate durch einen AnnexinV Assay durchgeführt.

Es zeigte sich, dass MYCN eine Transition von Zellen in der G1- in die S- Phase induziert. Dieser Effekt ist beschrieben (Lutz et al. 1996; Paffhausen et al. 2007). Jedoch hemmte eine TC1 Überexpression den G1- S- Phase Übergang und die von MYCN induzierte verstärkte Transition der SH-EP Zellen (siehe Abbildung 23). Der dazu im Kontrast stehende, beschriebene positive Effekt auf den G1- S- Phase Übergang durch TC1 Überexpression wurde in Maus- Fibroblasten an einem Wirkungskreislauf über ERK1/2 gezeigt (Wang et al. 2008). Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit hat die Arbeitsgruppe von Wang keine malignen Zellen, die eine gute Stimulierbarkeit ihres Zellzyklus zeigen, verwendet. In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde eine immortalisierte, nicht MYCN- amplifizierte Zelllinie eines Neuroblastoms verwendet. Damit zeigt sich erneut die deutliche kontextabhängige biologische Wirkung von TC1 auf das jeweilige Zellsystem.

Als ursächlich für die Steigerung des G1- S- Phase Überganges durch MYCN wird eine Induktion von CyclinD durch verschiedene Signalwege angesehen. Unter anderem besteht der Verdacht einer Aktivierung über WNT-Signale (Bell et al. 2007). Außerdem wird P21 gehemmt (Bell et al. 2006). In dieser Arbeit konnte keine Beeinflussung von P21 durch TC1

gezeigt werden (siehe Abbildung 25). Schlussfolgernd ist eine von P21 unabhängige Zellzyklusbeeinflussung durch TC1 zu vermuten.

Im AnnexinV Apoptose Assay konnte eine durch TC1 verringerte Apoptose mit Hemmung der von MYCN induzierten pro-apoptotischen Wirkung demonstriert werden (siehe Abbildung 24). Eine geringere Apoptoserate durch TC1 wurde in einer Arbeit für Schilddrüsenkarzinome gezeigt (Sunde et al. 2004). TC1 wird bei zellulärem Stress und bei Entzündungen induziert (Park et al. 2007; Kim et al. 2009). Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen wurden vor Analyse im Zellsorter in einem serumarmen Medium stimuliert, wodurch eine Stresssituation ausgelöst wurde. Eine anti-apoptotische Wirkung von unter Stress stehenden Zellen wird auch in dieser Arbeit gesehen und bestätigt die in der Literatur beschriebenen Effekte.

Insgesamt zeigt sich bei TC1- überexprimierenden Zellen eine reduzierte Apoptoserate, die im Hinblick auf den erhöhten Anteil von Zellen in der G0/G1 Phase für einen dortigen Arrest spricht. Ein P21 abhängiger G1 Arrest ist in den meisten Zellsystemen typisch (Sandor et al. 2000; Armstrong et al. 2012). In den vorliegenden Experimenten ergibt sich keine Änderung der P21 mRNA Expression, so dass es sich um einen P21-unabhängigen G0/G1 Arrest ohne Steigerung der Apoptose handelt. Ein Apoptosearrest ohne Beeinflussung von P21 ist möglich. In der Literatur ist ein Apoptosearrest z.B. auch über Dephosphorylierung von Mitgliedern der Retinoblastom Familie beschrieben (Dou et al. 1995; Okamura et al. 2013). Eine exaktere Beschreibung der Art des Apoptosearrestes wäre ebenfalls eine interessante Fortsetzung der Experimente.

Um die Effekte von TC1 erfassen zu können, ist ein Verständnis der Interaktionspartner und deren Bedeutung im jeweiligen Zellsystem unerlässlich. Es gibt Hinweise, dass gerade einige der am intensivsten untersuchten Partner von TC1 eine geringe bis keine Rolle im Neuroblastom spielen.

Wichtige Erklärungsversuche zur tumorigenen Wirkung von TC1 greifen die Beeinflussung des canonical WNT/ β -catenin Signalwegs auf. Über diesen Wirkmechanismus wurde eine Steigerung von verschiedenen Zielgenen des WNT/ β -catenin Signalwegs, wie z.B. MYC, CyclinD1, MMP7 oder CD44 beschrieben und die erhöhte Proliferation und Invasivität damit zum Teil erklärt (Jung 2006).

Der canonical-WNT/ β -catenin-Weg zeigt in Neuroblastomzellen deutlich unterschiedliche Bedeutungen (Liu et al. 2007). Es bestehen zwei Argumente, die eine geringe Aktivität nahe

legen. Zum einen sind die entsprechenden Rezeptormoleküle kaum vorhanden. Bisherige Untersuchungen zeigen eine Beeinflussung des canonical Signalweges für WNT1, WNT3a und WNT8 (Cadigan und Liu 2006; Du et al. 1995). Eine Screeninguntersuchung in Neuroblastomen aller Risikostufen auf die verschiedenen WNT Unterklassen zeigt gerade für diese Untereinheiten eine geringe Expression und eine verstärkte Bildung von WNT3 und WNT5a (Revet et al. 2010). Diese werden eher für Wirkungen des non-canonical-Signalweges verantwortlich gemacht. In-vitro Untersuchungen zeigten zudem in Hochrisiko Neuroblastomen sowie einer Zellkultur die geringere Expression von WNT5a (Blanc et al. 2005a).

Zum anderen scheint keine intranukleäre Genaktivierung stattzufinden. Die Endstrecke des canonical Signalweges läuft über Genaktivierung von β -catenin mit TCF/LEF im Zellkern. Es konnte in verschiedenen Neuroblastomkulturen eine nur sehr geringe Aktivität des β -catenin/TCF Reporters in einem TOPflash System detektiert werden (Liu et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden in einem IMR-32 Zellsystem mit induzierbarem Dickkopf-1 und Dickkopf-3 Gen erbracht werden. Dickkopf-1 und -3 sind bekannte Hemmer des WNT Signalweges. Durch deren Induktion zeigte sich in der IMR-32 Zelllinie keine Änderung der bereits sehr geringen Aktivität von β -catenin/TCF im TOPflash Assay (Koppen et al. 2007; Koppen et al. 2008). Eine Studie bei Mammakarzinomen bestätigt die geringe Aktivität des β -catenin/TCF System und zeigt, dass nicht alle β -catenin assoziierten Gene durch TC1 Überexpression aktiviert werden (Yang et al. 2007).

Als Beleg für eine Bedeutung des WNT/ β -catenin Signalweges im Neuroblastom ist eine aktuelle Studie erschienen, die eine verringerte Viabilität von Neuroblastomzellen zeigt, die mit einem Hemmer für das zum WNT- Signalweg zugehörige Protein GSK3 behandelt wurden (Duffy et al. 2013). Auffällig ist hierbei, dass nur N-Typ Neuroblastomzellen zur Testung Verwendung fanden. Dies bestätigt eine ältere Studie, die zeigt, dass durch Knock down von WNT1 in der N-Typ Neuroblastomzelllinie SY5Y eine reduzierte Proliferation beobachtet wurde (Zhang et al. 2009).

Die Steigerung der Expression von MYC wurde in allen bisherigen Arbeiten, die TC1 mit einer Wirkung auf β -catenin zeigen, beschrieben. Was die Vermutung unterstreicht, dass für das in dieser Arbeit untersuchte Zellmodell der canonical Signalweg über β -catenin eine geringe Relevanz hat, da sich eine fehlende Beeinflussung von MYC durch eine veränderte TC1 Expression zeigt (siehe Abbildung 22). Als Ursache wäre die verwendete Zelllinie SH-EP als

eine S-Typ Zellkultur denkbar. Womöglich ist eine Wirkung in N-Typ Neuroblastomzellen zu finden, in denen man Effekte durch Hemmung verschiedener Teile des WNT-Signalweges beobachtet hat. Sie könnten ebenfalls eine höhere Grundexpression von TC1 aufweisen. Hier sollten fortsetzende Experimente anknüpfen. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse würden zu einem besseren Verständnis für die Bedeutung des WNT/ β -catenin Signalwegs im Neuroblastom führen.

In Untersuchungen an epithelialen Zellen mit Induktion einer Cisplatin-Resistenz gehörte TC1 zu einem Panel von sechs Genen, welche durch Cisplatin induziert werden und die Viabilität mindern. Konsekutiv ist der Genbereich von TC1 in Cisplatin resistenten Tochterzelllinien durch Hypermethylierung stumm (Chang et al. 2010). Cisplatin stellt ein Standardmedikament in der Behandlung des Neuroblastoms dar und birgt das Risiko von Folgeschäden, wie Nephrotoxizität oder Schäden am Erbgut (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) 2011). Es wäre vorstellbar, dass Untersuchungen der Expression von TC1 innerhalb von Patienten mit Neuroblastom sowohl zu einer Verbesserung der Einschätzung der Prognose als auch der Effektivität einer Cisplatin Therapie mit daraus resultierender Verbesserung der Therapieplanung beitragen kann. Die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion von Proliferation und Kolonienbildung durch eine TC1 Überexpression zeigt die repressive Wirkung von TC1 und bestätigt die durch Cisplatin gesehene verminderte Viabilität. Weiterhin könnte zum Teil die Hypermethylierung bei einer Cisplatinresistenz durch die in dieser Arbeit gesehenen Effekten erklärt werden.

Die ambivalenten Wirkungen sowohl von TC1 als auch MYCN zeugen von den tiefgreifenden molekularen Veränderungen in Tumorzellen. Weitere Forschungen verbessern unser Verständnis über die in dem jeweiligen System deregulierten Vorgänge und ermöglichen eine bessere Einschätzung der Prognose und eine bessere Therapieplanung.

Für diese Arbeit lässt sich zusammenfassend feststellen:

TC1 stellt einen potentiell neuen prognostisch günstigen Marker für nicht *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome dar.

Ursächlich zeigt diese Arbeit eine durch TC1 ausgelöste P21 unabhängige Hemmung der G1-S- Phasen Transition mit konsekutiver Reduktion der Proliferation. Es besteht eine positive Beeinflussung der TC1 Expression durch MYCN ohne signifikante Korrelation mit dem Amplifikationsstatus oder der Expression von MYCN in Zellkulturlinien. Eine durch MYCN

induzierte Apoptose wird durch TC1 partiell inhibiert. Durch synergistische Effekte beider Gene kommt es zur Verringerung von Proliferation und der Fähigkeit Kolonien zu bilden. Dieser experimentell gesehene Effekt spiegelt sich in Analyse einer Datenbank mit 88 Patientenproben wieder, bei der sich eine deutlich höhere Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit hoher TC1 Expression zeigte. Die kontextabhängige Wirkung von TC1 wurde bisher noch nicht gezeigt und stellt ebenfalls die erste Betrachtung im Neuroblastom und in Interaktion mit MYCN dar.

Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Inhibition MYCN- vermittelter Zellzyklustransition durch Thyroid Cancer 1 (TC1) im Neuroblastom – Etablierung und Charakterisierung des TC1-Überexpressionsphänotyps in humanen SH-EP Neuroblastomzellen unter dem Einfluss von MYCN

eingereicht von: Moritz Adrian Weiher

angefertigt an der:

Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, Universitätskinderklinik, Selbstständige Abteilung für Pädiatrische Onkologie, Hämatologie und Hämostaseologie

betreut von Prof. Dr. med. Holger Christiansen

Dr. med. Sven Starke

Februar 2015

Das Neuroblastom ist der dritthäufigste maligne Tumor im Kindesalter und ist für 15% der Krebstodesfälle im Kindesalter verantwortlich. Bei einem Teil der Patienten spricht der Tumor selbst auf intensive Therapiemaßnahmen nicht an, während bei einem anderen Teil das Malignom spontan regredient ist. Viele molekularbiologische Vorgänge, die zu der heterogenen Prognose der Patienten beitragen, sind noch nicht verstanden. Als Hauptrisikomerkmak stellt sich die Amplifikation von *MYCN* dar.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Holger Christiansen zeigt *MYCN* Einfluss auf die Genregion von Thyroid Cancer 1 (TC1). Ein hohes TC1 Level ist ein prognostisch ungünstiger Marker in malignen Schilddrüsenkarzinomen. TC1 zeigt proliferationsfördernde, onkogene Eigenschaften in verschiedenen Tumor- und Zellsystemen.

In dieser Arbeit wurden erste Untersuchungen zur prognostischen Relevanz von TC1 im Neuroblastom durchgeführt. Eine In-silico Recherche in der Versteeg

Neuroblastomdatenbank ergab eine deutlich höhere Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit hoher TC1 Expression ohne MYCN Amplifikation.

Durch In-Vitro Analysen in einem Panel von neun Neuroblastomzelllinien konnte gezeigt werden, dass MYCN Amplifikation und Expression nicht mit der TC1 Expression korreliert. Eine Aktivierung von MYCN in einem MYCN induzierbaren System führt jedoch zu einer Expressionssteigerung von TC1.

Um die biologische Wirkung von TC1 im Neuroblastom zu charakterisieren, wurde ein Überexpressionsvektor von TC1 in die Neuroblastomzelllinie SH-EP eingebracht, welche über ein aktivierbares MYCN-Konstrukt, in dem MYCN an einen durch Tamoxifen aktivierbaren Östrogenrezeptor gekoppelt ist, verfügt. Dieser neue Phänotyp wurde bezüglich der Proliferation, des Zellzyklus und der Apoptose im Vergleich zu einer Kontrollzelllinie ohne Überexpression und mit und ohne MYCN Aktivität untersucht.

Es zeigte sich, dass TC1 die Proliferation hemmt und in gemeinsamer Wirkung mit MYCN ein massiver Rückgang der Kolonienbildung zu sehen ist. Als Ursache lässt sich eine P21 unabhängige Inhibition der MYCN- induzierten G1-S-Phasen Transition im Propidium Iodid FACS nachweisen. Im Rahmen eines Annexin Apoptose Assay wird durch TC1 Überexpression der von MYCN induzierte proapoptotische Effekt aufgehoben.

Diese Arbeit ist die erste, die sich mit der Bedeutung von TC1 im Neuroblastom beschäftigt. Sie zeigt TC1 als Marker für eine günstigere Überlebensprognose von Patienten mit Neuroblastom. Diese könnte durch die in dem hier verwendeten Neuroblastommodell beobachtete antiproliferative Wirkung von TC1 erklärt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Akiyama, Tetsu (2000): Wnt/ β -catenin signaling. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11 (4), S. 273–282. DOI: 10.1016/S1359-6101(00)00011-3.
- Ambros, I. M.; Zellner, A.; Roald, B.; Amann, G.; Ladenstein, R.; Printz, D. et al. (1996): Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. In: *N. Engl. J. Med.* 334 (23), S. 1505–1511. DOI: 10.1056/NEJM199606063342304.
- Amin, C.; Wagner, A. J.; Hay, N. (1993): Sequence-specific transcriptional activation by Myc and repression by Max. In: *Mol. Cell. Biol.* 13 (1), S. 383–390.
- Armstrong, Michael J.; Stang, Michael T.; Liu, Ye; Gao, Jinbo; Ren, Baoguo; Zuckerbraun, Brian S. et al. (2012): Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1) induces p21(WAF1/CIP1) dependent cell cycle arrest and p21(WAF1/CIP1) independent modulation of survivin in cancer cells. In: *Cancer Lett.* 319 (1), S. 56–65. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.027.
- Bell, Emma; Chen, Lindi; Liu, Tao; Marshall, Glenn M.; Lunec, John; Tweddle, Deborah A. (2010): MYCN oncoprotein targets and their therapeutic potential. In: *Cancer Letters* 293 (2), S. 144–157. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.01.015.
- Bell, Emma; Lunec, John; Tweddle, Deborah A. (2007): Cell cycle regulation targets of MYCN identified by gene expression microarrays. In: *Cell Cycle* 6 (10), S. 1249–1256.
- Bell, Emma; Premkumar, Rakesh; Carr, Jane; Lu, Xiaohong; Lovat, Penny E.; Kees, Ursula R. et al. (2006): The role of MYCN in the failure of MYCN amplified neuroblastoma cell lines to G1 arrest after DNA damage. In: *Cell Cycle* 5 (22), S. 2639–2647.
- Berwanger, Bernd; Hartmann, Oliver; Bergmann, Eckhard; Bernard, Sandra; Nielsen, Dirk; Krause, Michael et al. (2002): Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. In: *Cancer Cell* 2 (5), S. 377–386.
- Bian, X. (2002): Constitutively Active NF-kappa B Is Required for the Survival of S-type Neuroblastoma. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (44), S. 42144–42150. DOI: 10.1074/jbc.M203891200.
- Bian, X.; McAllister-Lucas, L. M.; Shao, F.; Schumacher, K. R.; Feng, Z.; Porter, A. G. et al. (2001): NF-kappa B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. In: *J. Biol. Chem.* 276 (52), S. 48921–48929. DOI: 10.1074/jbc.M108674200.
- Biedler, J. L.; Helson, L.; Spengler, B. A. (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. In: *Cancer Res.* 33 (11), S. 2643–2652.
- Blanc, Etienne; Goldschneider, David; Douc-Rasy, Sétha; Bénard, Jean; Raguénez, Gilda (2005a): Wnt-5a gene expression in malignant human neuroblasts. In: *Cancer Lett.* 228 (1-2), S. 117–123. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.11.061.
- Blanc, Etienne; Le Roux, Gwenaëlle; Bénard, Jean; Raguénez, Gilda (2005b): Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma. In: *Oncogene* 24 (7), S. 1277–1283. DOI: 10.1038/sj.onc.1208255.

- Bonifacino, Juan S.; Dasso, Mary; Harford, Joe B.; Lippincott-Schwartz, Jennifer; Yamada, Kenneth M. (Hg.) (2001): *Current Protocols in Cell Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Boon, K.; Caron, H. N.; van Asperen, R.; Valentijn, L.; Hermus, M. C.; van Sluis, P. et al. (2001): N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. In: *EMBO J.* 20 (6), S. 1383–1393. DOI: 10.1093/emboj/20.6.1383.
- Bouchard, C. (1999): Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. In: *The EMBO Journal* 18 (19), S. 5321–5333. DOI: 10.1093/emboj/18.19.5321.
- Bourdeaut, F.; Ribeiro, A.; Paris, R.; Pierron, G.; Couturier, J.; Peuchmaur, M.; Delattre, O. (2007): In neuroblastic tumours, Schwann cells do not harbour the genetic alterations of neuroblasts but may nevertheless share the same clonal origin. In: *Oncogene* 27 (21), S. 3066–3071. DOI: 10.1038/sj.onc.1210965.
- Bourdeaut, Franck; Carli, Emilie de; Timsit, Sandra; Coze, Carole; Chastagner, Pascal; Sarnacki, Sabine et al. (2009): VIP hypersecretion as primary or secondary syndrome in neuroblastoma: A retrospective study by the Société Française des Cancers de l'Enfant (SFCE). In: *Pediatr. Blood Cancer* 52 (5), S. 585–590. DOI: 10.1002/pbc.21912.
- Brodeur, G. M.; Pritchard, J.; Berthold, F.; Carlsen, N. L.; Castel, V.; Castelberry, R. P. et al. (1993): Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. In: *J. Clin. Oncol.* 11 (8), S. 1466–1477.
- Brodeur, G. M.; Seeger, R. C.; Schwab, M.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M. (1984): Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. In: *Science* 224 (4653), S. 1121–1124.
- Brodeur, Garrett M. (2003): Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. In: *Nat Rev Cancer* 3 (3), S. 203–216. DOI: 10.1038/nrc1014.
- Cadigan, Ken M.; Liu, Yan I. (2006): Wnt signaling: complexity at the surface. In: *J. Cell. Sci.* 119 (Pt 3), S. 395–402. DOI: 10.1242/jcs.02826.
- Carr-Wilkinson, Jane; Griffiths, Rebecca; Elston, Rebecca; Gamble, Laura D.; Goranov, Bojidar; Redfern, Christopher P. F. et al. (2011): Outcome of the p53-mediated DNA damage response in neuroblastoma is determined by morphological subtype and MYCN expression. In: *Cell Cycle* 10 (21), S. 3778–3787. DOI: 10.4161/cc.10.21.17973.
- Chang, X.; Monitto, C. L.; Demokan, S.; Kim, M. S.; Chang, S. S.; Zhong, X. et al. (2010): Identification of Hypermethylated Genes Associated with Cisplatin Resistance in Human Cancers. In: *Cancer Research* 70 (7), S. 2870–2879. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3427.
- Chen, Lin-Feng; Greene, Warner C. (2004): Shaping the nuclear action of NF-kappaB. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (5), S. 392–401. DOI: 10.1038/nrm1368.
- Cheung, Nai-Kong V.; Cohn, Susan L. (2005): *Neuroblastoma*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Pediatric Oncology). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/b137762>.
- Christiansen, H.; Lampert, F. (1988): Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. In: *Br. J. Cancer* 57 (1), S. 121–126.

- Christiansen, H.; Lampert, F. (1989): Tumorcytogenetik und Prognose beim Neuroblastom. In: *Monatsschr Kinderheilkd* 137 (10), S. 666–671.
- Christiansen, H.; Sahin, K.; Berthold, F.; Hero, B.; Terpe, H. J.; Lampert, F. (1995): Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. In: *Eur. J. Cancer* 31 (4), S. 541–544.
- Chua, E. L.; Young, L.; Wu, W. M.; Turtle, J. R.; Dong, Q. (2000): Cloning of TC-1 (C8orf4), a novel gene found to be overexpressed in thyroid cancer. In: *Genomics* 69 (3), S. 342–347. DOI: 10.1006/geno.2000.6348.
- Ciccarone, V.; Spengler, B. A.; Meyers, M. B.; Biedler, J. L.; Ross, R. A. (1989): Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. In: *Cancer Res.* 49 (1), S. 219–225.
- Cliff, J. F.; Newman, L.; Malone, M.; Brady, G.; Crean, S. J. (2001): Facial features of widespread neuroblastoma: a case report. In: *Int J Paediatr Dent* 11 (3), S. 215–220.
- Cohn, S. L.; Pearson, A. D.J; London, W. B.; Monclair, T.; Ambros, P. F.; Brodeur, G. M. et al. (2009): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. In: *Journal of Clinical Oncology* 27 (2), S. 289–297. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.6785.
- Cole, M. D.; McMahon, S. B. (1999): The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. In: *Oncogene* 18 (19), S. 2916–2924. DOI: 10.1038/sj.onc.1202748.
- Cory, S.; Vaux, D. L.; Strasser, A.; Harris, A. W.; Adams, J. M. (1999): Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. In: *Cancer Res.* 59 (7 Suppl), S. 1685s-1692s.
- Dahms, Julian (2008): Proliferation und Apoptose in Abhängigkeit der N-Myc-Amplifikation im humanen Neuroblastom und ihre prognostische Bedeutung. Inaugural Dissertation. Universität Marburg, Marburg. Fachbereich Medizin. Online verfügbar unter <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2009/0014/pdf/djd.pdf>, zuletzt geprüft am 30.12.2013.
- Davidoff, Andrew M. (2012): Neuroblastoma. In: *Semin. Pediatr. Surg.* 21 (1), S. 2–14. DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2011.10.009.
- De, A. (2011): Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. In: *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43 (10), S. 745–756. DOI: 10.1093/abbs/gmr079.
- Dimitroulakos, J.; Squire, J.; Pawlin, G.; Yeager, H. (1994): NUB-7: a stable I-type human neuroblastoma cell line inducible along N- and S-type cell lineages. In: *Cell Growth Differ.* 5 (4), S. 373–384.
- Dou, Q. P.; An, B.; Will, P. L. (1995): Induction of a retinoblastoma phosphatase activity by anticancer drugs accompanies p53-independent G1 arrest and apoptosis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (20), S. 9019–9023.
- Du, S. J.; Purcell, S. M.; Christian, J. L.; McGrew, L. L.; Moon, R. T. (1995): Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. In: *Mol. Cell. Biol.* 15 (5), S. 2625–2634.

- DuBois, S. G.; Kalika, Y.; Lukens, J. N.; Brodeur, G. M.; Seeger, R. C.; Atkinson, J. B. et al. (1999): Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. In: *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 21 (3), S. 181–189.
- Duffy, David J.; Krstic, Aleksandar; Schwarzl, Thomas; Higgins, Desmond G.; Kolch, Walter (2013): GSK3 inhibitors regulate MYCN mRNA levels and reduce neuroblastoma cell viability through multiple mechanisms including p53 and Wnt signalling. In: *Mol. Cancer Ther.* DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0560-T.
- Eilers, Martin; Picard, Didier; Yamamoto, Keith R.; Bishop, J. Michael (1989): Chimaeras of Myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. In: *Nature* 340 (6228), S. 66–68. DOI: 10.1038/340066a0.
- Esiashvili, Natia; Goodman, Michael; Ward, Kevin; Marcus, Robert B.; Johnstone, Peter A.S (2007): Neuroblastoma in adults: Incidence and survival analysis based on SEER data. In: *Pediatr. Blood Cancer* 49 (1), S. 41–46. DOI: 10.1002/psc.20859.
- Evan, G.; Littlewood, T. (1998): A matter of life and cell death. In: *Science* 281 (5381), S. 1317–1322.
- Evans, A. E.; D'Angio, G. J.; Randolph, J. (1971): A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A. In: *Cancer* 27 (2), S. 374–378.
- Fink, Anthony L. (2005): Natively unfolded proteins. In: *Current Opinion in Structural Biology* 15 (1), S. 35–41. DOI: 10.1016/j.sbi.2005.01.002.
- Flahaut, M.; Meier, R.; Coulon, A.; Nardou, K. A.; Niggli, F. K.; Martinet, D. et al. (2009): The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through activation of the Wnt/beta-catenin pathway. In: *Oncogene* 28 (23), S. 2245–2256. DOI: 10.1038/onc.2009.80.
- Fong, C. T.; Dracopoli, N. C.; White, P. S.; Merrill, P. T.; Griffith, R. C.; Housman, D. E.; Brodeur, G. M. (1989): Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (10), S. 3753–3757.
- Friedman, Joshua B.; Brunschwig, Elaine B.; Platzer, Petra; Wilson, Keith; Markowitz, Sanford D. (2004): C8orf4 is a transforming growth factor B induced transcript downregulated in metastatic colon cancer. In: *Int. J. Cancer* 111 (1), S. 72–75. DOI: 10.1002/ijc.20235.
- Fulda, S.; Lutz, W.; Schwab, M.; Debatin, K. M. (1999): MycN sensitizes neuroblastoma cells for drug-induced apoptosis. In: *Oncogene* 18 (7), S. 1479–1486. DOI: 10.1038/sj.onc.1202435.
- Gall, Chris; Xu, Hanyu; Brickenden, Anne; Ai, Xuanjun; Choy, Wing Yiu (2007): The intrinsically disordered TC-1 interacts with Chibby via regions with high helical propensity. In: *Protein Sci.* 16 (11), S. 2510–2518. DOI: 10.1110/ps.073062707.
- Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) (2011): Leitlinie Neuroblastom. Registriernummer 025/008. Hg. v. AWMF. Online verfügbar unter http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-008l_S1_Neuroblastom_2011-08_01.pdf, zuletzt geprüft am 09.09.2014.
- Gilmore, T. D. (2006): Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. In: *Oncogene* 25 (51), S. 6680–6684. DOI: 10.1038/sj.onc.1209954.

- Grumont, R. J.; Gerondakis, S. (1989): Structure of a mammalian c-rel protein deduced from the nucleotide sequence of murine cDNA clones. In: *Oncogene Res.* 4 (1), S. 1–8.
- Guo, C.; White, P. S.; Weiss, M. J.; Hogarty, M. D.; Thompson, P. M.; Stram, D. O. et al. (1999): Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. In: *Oncogene* 18 (35), S. 4948–4957. DOI: 10.1038/sj.onc.1202887.
- Hanada, M.; Krajewski, S.; Tanaka, S.; Cazals-Hatem, D.; Spengler, B. A.; Ross, R. A. et al. (1993): Regulation of Bcl-2 oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells. In: *Cancer Res.* 53 (20), S. 4978–4986.
- Hayashi, Y.; Kanda, N.; Inaba, T.; Hanada, R.; Nagahara, N.; Muchi, H.; Yamamoto, K. (1989): Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1. In: *Cancer* 63 (1), S. 126–132.
- Hiyama, E.; Hiyama, K.; Yokoyama, T.; Fukuba, I.; Yamaoka, H.; Shay, J. W.; Matsuura, Y. (1999): Rapid detection of MYCN gene amplification and telomerase expression in neuroblastoma. In: *Clin. Cancer Res.* 5 (3), S. 601–609.
- Hockenbery, D.; Nuñez, G.; Millman, C.; Schreiber, R. D.; Korsmeyer, S. J. (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. In: *Nature* 348 (6299), S. 334–336. DOI: 10.1038/348334a0.
- Hogarty, Michael D. (2003): The requirement for evasion of programmed cell death in neuroblastomas with MYCN amplification. In: *Cancer Letters* 197 (1-2), S. 173–179. DOI: 10.1016/S0304-3835(03)00103-4.
- Hopkins-Donaldson, S.; Bodmer, J. L.; Bours, K. B.; Brognara, C. B.; Tschopp, J.; Gross, N. (2000): Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. In: *Cancer Res.* 60 (16), S. 4315–4319.
- Husain, Khaled; Thomas, Elizabeth; Demerdash, Zeinab; Alexander, Susan (2011): Mediastinal ganglioneuroblastoma-secreting vasoactive intestinal peptide causing secretory diarrhoea. In: *Arab Journal of Gastroenterology* 12 (2), S. 106–108. DOI: 10.1016/j.ajg.2010.10.006.
- Isaacs, J. S.; Hardman, R.; Carman, T. A.; Barrett, J. C.; Weissman, B. E. (1998): Differential subcellular p53 localization and function in N- and S-type neuroblastoma cell lines. In: *Cell Growth Differ.* 9 (7), S. 545–555.
- Jan Koster; Rogier Versteeg: R2: Genomics analysis and visualization platform. Unter Mitarbeit von Piet Molenaar Danny Zwijnenburg Jan Molenaar Marcel Kool Linda Valentijn Richard Volckmann. Department of Oncogenomics, Academic Medical Center. Amsterdam. Online verfügbar unter <http://r2.amc.nl>, zuletzt geprüft am 30.12.2013.
- Jasty, R.; van Golen, C.; Lin, H. J.; Solomon, G.; Heidelberger, K.; Polverini, P. et al. (2001): Bcl-2 and M-Myc coexpression increases IGF-IR and features of malignant growth in neuroblastoma cell lines. In: *Neoplasia* 3 (4), S. 304–313. DOI: 10.1038/sj/neo/7900171.
- Jung, Y. (2006): TC1 (C8orf4) Enhances the Wnt/ -Catenin Pathway by Relieving Antagonistic Activity of Chibby. In: *Cancer Research* 66 (2), S. 723–728. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3124.

- Kaatsch, Peter (2010): Epidemiology of childhood cancer. In: *Cancer Treatment Reviews* 36 (4), S. 277–285. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.02.003.
- Karim, Rooshdiya Z.; Tse, Gary M. K.; Putti, Thomas C.; Scolyer, Richard A.; Lee, Soon C. (2004): The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. In: *Pathology* 36 (2), S. 120–128. DOI: 10.1080/00313020410001671957.
- Kim, B. (2006): TC1(C8orf4) Correlates with Wnt/ -Catenin Target Genes and Aggressive Biological Behavior in Gastric Cancer. In: *Clinical Cancer Research* 12 (11), S. 3541–3548. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-05-2440.
- Kim, J.; Kim, Y.; Kim, H.-T.; Kim, D. W.; Ha, Y.; Kim, C.-H et al. (2009): TC1(C8orf4) Is a Novel Endothelial Inflammatory Regulator Enhancing NF- B Activity. In: *The Journal of Immunology* 183 (6), S. 3996–4002. DOI: 10.4049/jimmunol.0900956.
- Kim, Youngmi; Kim, Jungtae; Park, Juhee; Bang, Seunghyun; Jung, Yusun; Choe, Jongseon et al. (2006): TC1(C8orf4) is upregulated by IL-1 β /TNF- α and enhances proliferation of human follicular dendritic cells. In: *FEBS Letters* 580 (14), S. 3519–3524. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.05.036.
- Kitanaka, Chifumi; Kato, Keisuke; Ijiri, Rieko; Sakurada, Kaori; Tomiyama, Arata; Noguchi, Kohji et al. (2002): Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 94 (5), S. 358–368.
- Kluck, R. M.; Bossy-Wetzell, E.; Green, D. R.; Newmeyer, D. D. (1997): The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. In: *Science* 275 (5303), S. 1132–1136.
- Koppen, Arjen; Ait-Aissa, Rachida; Hopman, Saskia; Koster, Jan; Haneveld, Franciska; Versteeg, Rogier; Valentijn, Linda J. (2007): Dickkopf-1 is down-regulated by MYCN and inhibits neuroblastoma cell proliferation. In: *Cancer Letters* 256 (2), S. 218–228. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.06.011.
- Koppen, Arjen; Ait-Aissa, Rachida; Koster, Jan; Øra, Ingrid; Bras, Johannes; van Sluis, Peter G. et al. (2008): Dickkopf-3 expression is a marker for neuroblastic tumor maturation and is down-regulated by MYCN. In: *Int. J. Cancer* 122 (7), S. 1455–1464. DOI: 10.1002/ijc.23180.
- Krams, M.; Rudolph, P.; Harms, D. (2004): Proliferationskinetik und hTERT-Expression beim Neuroblastom Untersuchungen zum Zusammenhang. In: *Pathologe* 25 (4), S. 317–323. DOI: 10.1007/s00292-004-0703-8.
- Krug, Pauline; Schleiermacher, Gudrun; Michon, Jean; Valteau-Couanet, Dominique; Brisse, Hervé; Peuchmaur, Michel et al. (2010): Opsoclonus–myoclonus in children associated or not with neuroblastoma. In: *European Journal of Paediatric Neurology* 14 (5), S. 400–409. DOI: 10.1016/j.ejpn.2009.12.005.
- Kuçi, Zyrafete; Bruchelt, Gernot; Seitz, Gabriele; Karov, Yocheved; Or, Reuven; Handgretinger, Rupert et al. (2002): Bone marrow-derived factors support growth of N-type, but not of melanocytic neuroblastoma cells. In: *Anticancer Res.* 22 (6C), S. 4325–4329.

- Kumar, Vinay; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson; Robbins, Stanley L.; Cotran, Ramzi S. (2005): Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7. Aufl. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Lablife: Vector Database > pBABE-puro > Vector Sequence. Online verfügbar unter https://www.lablife.org/g?a=seqa&id=vdb_g2.B2soCHW5iLlFhTEhdm5lc4sNKI-_sequence_e66ac2cddd6525480d35003cd8e8bdedca2257d2_10, zuletzt geprüft am 01.02.2014.
- Landschulz, W. H.; Johnson, P. F.; McKnight, S. L. (1988): The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. In: *Science* 240 (4860), S. 1759–1764.
- Liu, Shuqing; Tian, Yufeng; Chlenski, Alexandre; Yang, Qiwei; Zage, Peter; Salwen, Helen R. et al. (2005): Cross-talk between Schwann cells and neuroblasts influences the biology of neuroblastoma xenografts. In: *Am. J. Pathol.* 166 (3), S. 891–900. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62309-7.
- Liu, X.; Mazanek, P.; Dam, V.; Wang, Q.; Zhao, H.; Guo, R. et al. (2007): Deregulated Wnt/ β -catenin program in high-risk neuroblastomas without MYCN amplification. In: *Oncogene* 27 (10), S. 1478–1488. DOI: 10.1038/sj.onc.1210769.
- Logan, Catriona Y.; Nusse, Roel (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, S. 781–810. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
- London, Wendy B.; Boni, Luca; Simon, Thorsten; Berthold, Frank; Twist, Clare; Lou Schmidt, Mary et al. (2005): The role of age in neuroblastoma risk stratification: the German, Italian, and children's oncology group perspectives. In: *Cancer Letters* 228 (1-2), S. 257–266. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.12.054.
- Longo, Luca; Panza, Emanuele; Schena, Francesca; Seri, Marco; Devoto, Marcella; Romeo, Giovanni et al. (2007): Genetic Predisposition to Familial Neuroblastoma: Identification of Two Novel Genomic Regions at 2p and 12p. In: *Hum Hered* 63 (3-4), S. 205–211. DOI: 10.1159/000099997.
- Lutz, W.; Stöhr, M.; Schürmann, J.; Wenzel, A.; Löhr, A.; Schwab, M. (1996): Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. In: *Oncogene* 13 (4), S. 803–812.
- Mac, S. M.; D'Cunha, C. A.; Farnham, P. J. (2000): Direct recruitment of N-myc to target gene promoters. In: *Mol. Carcinog.* 29 (2), S. 76–86.
- Malynn, B. A.; Alboran, I. M. de; O'Hagan, R. C.; Bronson, R.; Davidson, L.; DePinho, R. A.; Alt, F. W. (2000): N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. In: *Genes Dev.* 14 (11), S. 1390–1399.
- Maris, John M.; Hogarty, Michael D.; Bagatell, Rochelle; Cohn, Susan L. (2007): Neuroblastoma. In: *Lancet* 369 (9579), S. 2106–2120. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60983-0.
- Melo Martins, Poliana Cristina de; Parise Junior, Orlando; Pereira Hors, Cora; Villela Miguel, Roberto Elias; da Costa Andrade, Valéria Cristina; Garicochea, Bernardo

- (2007): *C8orf4/TC-1(Thyroid Cancer-1)* Gene Expression in Thyroid Cancer and Goiter. In: *ORL* 69 (2), S. 127–130. DOI: 10.1159/000097980.
- Molenaar, Jan J.; Koster, Jan; Zwijnenburg, Danny A.; van Sluis, Peter; Valentijn, Linda J.; van der Ploeg, Ida et al. (2012): Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes. In: *Nature* 483 (7391), S. 589–593. DOI: 10.1038/nature10910.
- Monclair, T.; Brodeur, G. M.; Ambros, P. F.; Brisse, H. J.; Cecchetto, G.; Holmes, K. et al. (2009): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report. In: *Journal of Clinical Oncology* 27 (2), S. 298–303. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.6876.
- Moon, Randall T.; Kohn, Aimee D.; Ferrari, Giancarlo V. de; Kaykas, Ajamete (2004): WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. In: *Nat. Rev. Genet.* 5 (9), S. 691–701. DOI: 10.1038/nrg1427.
- Morgenstern, J. P.; Land, H. (1990): Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. In: *Nucleic acids research* 18 (12), S. 3587–3596.
- Morin, P. J. (1999): beta-catenin signaling and cancer. In: *Bioessays* 21 (12), S. 1021–1030. DOI: 10.1002/(SICI)1521-1878(199912)22:1<1021::AID-BIES6>3.0.CO;2-P.
- Mosialos, G.; Hamer, P.; Capobianco, A. J.; Laursen, R. A.; Gilmore, T. D. (1991): A protein kinase-A recognition sequence is structurally linked to transformation by p59v-rel and cytoplasmic retention of p68c-rel. In: *Mol. Cell. Biol.* 11 (12), S. 5867–5877.
- Munemitsu, S.; Albert, I.; Souza, B.; Rubinfeld, B.; Polakis, P. (1995): Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (7), S. 3046–3050.
- Murre, C.; McCaw, P. S.; Baltimore, D. (1989): A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. In: *Cell* 56 (5), S. 777–783.
- Musarella, M. A.; Chan, H. S.; DeBoer, G.; Gallie, B. L. (1984): Ocular involvement in neuroblastoma: prognostic implications. In: *Ophthalmology* 91 (8), S. 936–940.
- Nisen, P. D.; Waber, P. G.; Rich, M. A.; Pierce, S.; Garvin, J. R.; Gilbert, F.; Lankowsky, P. (1988): N-myc oncogene RNA expression in neuroblastoma. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 80 (20), S. 1633–1637.
- Nusse, Roel; Lim, Xinhong (2013): the Wnt homepage. Stanford University. Online verfügbar unter <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>, zuletzt aktualisiert im Juni 2013, zuletzt geprüft am 05.02.2014.
- Okamura, Kazuyuki; Miki, Daisuke; Nohara, Keiko (2013): Inorganic arsenic exposure induces E2F-dependent G0/G1 arrest via an increase in retinoblastoma family protein p130 in B-cell lymphoma A20 cells. In: *Genes Cells* 18 (10), S. 839–849. DOI: 10.1111/gtc.12079.
- Otto, Tobias; Horn, Sebastian; Brockmann, Markus; Eilers, Ursula; Schüttrumpf, Lars; Popov, Nikita et al. (2009): Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. In: *Cancer Cell* 15 (1), S. 67–78. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.12.005.

- Paffhausen, Tobias; Schwab, Manfred; Westermann, Frank (2007): Targeted MYCN expression affects cytotoxic potential of chemotherapeutic drugs in neuroblastoma cells. In: *Cancer Letters* 250 (1), S. 17–24. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.09.010.
- Park, A. K.; Lee, S.-J.; Phi, J. H.; Wang, K.-C; Kim, D. G.; Cho, B.-K et al. (2012): Prognostic classification of pediatric medulloblastoma based on chromosome 17p loss, expression of MYCC and MYCN, and Wnt pathway activation. In: *Neuro-Oncology* 14 (2), S. 203–214. DOI: 10.1093/neuonc/nor196.
- Park, Juhee; Jung, Yusun; Kim, Jungtae; Kim, Ka-Young; Ahn, Sang-Gun; Song, Kyuyoung; Lee, Inchul (2007): TC1 (C8orf4) is upregulated by cellular stress and mediates heat shock response. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360 (2), S. 447–452. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.06.077.
- Perez-Roger, I.; Kim, S. H.; Griffiths, B.; Sewing, A.; Land, H. (1999): Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). In: *EMBO J.* 18 (19), S. 5310–5320. DOI: 10.1093/emboj/18.19.5310.
- Perkins, N. D.; Gilmore, T. D. (2006): Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. In: *Cell Death Differ.* 13 (5), S. 759–772. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401838.
- Perkins, Neil D. (2007): Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (1), S. 49–62. DOI: 10.1038/nrm2083.
- Piacentini, M.; Piredda, L.; Starace, D. T.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Mattei, M.; Oliverio, S. et al. (1996): Differential growth of N- and S-type human neuroblastoma cells xenografted into scid mice. correlation with apoptosis. In: *J. Pathol.* 180 (4), S. 415–422. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199612)180:4<415::AID-PATH684>3.0.CO;2-A.
- Pohl, K. R.; Pritchard, J.; Wilson, J. (1996): Neurological sequelae of the dancing eye syndrome. In: *Eur. J. Pediatr.* 155 (3), S. 237–244.
- Posadas, Inmaculada; Santos, Pablo; Ceña, Valentín; Foulkes, Nicholas S. (2012): Acetaminophen Induces Human Neuroblastoma Cell Death through NFKB Activation. In: *PLoS ONE* 7 (11), S. e50160. DOI: 10.1371/journal.pone.0050160.
- Qing, Yan; Liang, Yanfang; Du, Qingqing; Fan, Pan; Xu, Hangong; Xu, Yiping; Shi, Nian (2013): Apoptosis induced by trimethyltin chloride in human neuroblastoma cells SY5Y is regulated by a balance and cross-talk between NF-κB and MAPKs signaling pathways. In: *Arch. Toxicol.* 87 (7), S. 1273–1285. DOI: 10.1007/s00204-013-1021-9.
- Rettig, W. J.; Spengler, B. A.; Chesa, P. G.; Old, L. J.; Biedler, J. L. (1987): Coordinate changes in neuronal phenotype and surface antigen expression in human neuroblastoma cell variants. In: *Cancer Res.* 47 (5), S. 1383–1389.
- Revet, Ingrid; Huizenga, Gerda; Koster, Jan; Volckmann, Richard; van Sluis, Peter; Versteeg, Rogier; Geerts, Dirk (2010): MSX1 induces the Wnt pathway antagonist genes DKK1, DKK2, DKK3, and SFRP1 in neuroblastoma cells, but does not block Wnt3 and Wnt5A signalling to DVL3. In: *Cancer Lett.* 289 (2), S. 195–207. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.08.019.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2013): Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Berlin (978-3-89606-221-5). Online verfügbar unter

- http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf?__blob=publicationFile.
- Ross, Robert A.; Biedler, June L.; Spengler, Barbara A. (2003): A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. In: *Cancer Letters* 197 (1-2), S. 35–39. DOI: 10.1016/S0304-3835(03)00079-X.
- Sandor, V.; Senderowicz, A.; Mertins, S.; Sackett, D.; Sausville, E.; Blagosklonny, M. V.; Bates, S. E. (2000): P21-dependent g(1)arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. In: *Br. J. Cancer* 83 (6), S. 817–825. DOI: 10.1054/bjoc.2000.1327.
- Schramm, Alexander; Köster, Johannes; Marschall, Tobias; Martin, Marcel; Schwermer, Melanie; Fielitz, Kathrin et al. (2013): Next-generation RNA sequencing reveals differential expression of MYCN target genes and suggests the mTOR pathway as a promising therapy target in MYCN- amplified neuroblastoma. In: *Int. J. Cancer* 132 (3), S. E106. DOI: 10.1002/ijc.27787.
- Schulte, Johannes H.; Horn, Sebastian; Otto, Tobias; Samans, Birgit; Heukamp, Lukas C.; Eilers, Ursula-Christa et al. (2008): MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. In: *Int. J. Cancer* 122 (3), S. 699–704. DOI: 10.1002/ijc.23153.
- Schwab, M.; Alitalo, K.; Klempnauer, K. H.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M.; Gilbert, F. et al. (1983): Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. In: *Nature* 305 (5931), S. 245–248.
- Schwab, M.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M. (1985): Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. In: *Nature* 316 (6024), S. 160–162.
- Seeger, Robert C.; Brodeur, Garrett M.; Sather, Harland; Dalton, Andree; Siegel, Stuart E.; Wong, Kwan Y.; Hammond, Denman (1985): Association of Multiple Copies of the N-myc Oncogene with Rapid Progression of Neuroblastomas. In: *N Engl J Med* 313 (18), S. 1111–1116. DOI: 10.1056/NEJM198510313131802.
- Sen, Ranjan; Baltimore, David (2006): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986. 46: 705-716. In: *J. Immunol.* 177 (11), S. 7485–7496.
- Shimada, Hiroyuki; Ambros, Inge M.; Dehner, Louis P.; Hata, Jun-ichi; Joshi, Vijay V.; Roald, Borghild (1999): Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. In: *Cancer* 86 (2), S. 349–363. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19990715)86:2<349::AID-CNCR20>3.0.CO;2-Y.
- Singh, H.; Sen, R.; Baltimore, D.; Sharp, P. A. (1986): A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. In: *Nature* 319 (6049), S. 154–158. DOI: 10.1038/319154a0.
- Slamon, D. J.; Boone, T. C.; Seeger, R. C.; Keith, D. E.; Chazin, V.; Lee, H. C.; Souza, L. M. (1986): Identification and characterization of the protein encoded by the human N-myc oncogene. In: *Science* 232 (4751), S. 768–772.
- Souza, Daniela Ragner Valadão de; Sanabani, Sabri Saeed; Souza, Ana Carolina Mamana Fernandes de; Filho Odone, Vicente; Epelman, Sidnei; Bendit, Israel (2011):

- Prognostic impact of MYCN, DDX1, TrkA, and TrkC gene transcripts expression in neuroblastoma. In: *Pediatr Blood Cancer* 56 (5), S. 749–756. DOI: 10.1002/pbc.22823.
- Spengler, B. A.; Lazarova, D. L.; Ross, R. A.; Biedler, J. L. (1997): Cell lineage and differentiation state are primary determinants of MYCN gene expression and malignant potential in human neuroblastoma cells. In: *Oncol. Res.* 9 (9), S. 467–476.
- Su, Kai; Huang, Lijun; Li, Wenhai; Yan, Xiaolong; Li, Xiaofei; Zhang, Zhipei et al. (2013): TC-1 (c8orf4) enhances aggressive biologic behavior in lung cancer through the Wnt/ β -catenin pathway. In: *J. Surg. Res.* 185 (1), S. 255–263. DOI: 10.1016/j.jss.2013.05.075.
- Sunde, Margaret; McGrath, Kristine C. Y.; Young, Lei; Matthews, Jacqueline M.; Chua, Elizabeth L.; Mackay, Joel P.; Death, Alison K. (2004): TC-1 is a novel tumorigenic and natively disordered protein associated with thyroid cancer. In: *Cancer Res.* 64 (8), S. 2766–2773.
- Takemaru, Ken-Ichi; Yamaguchi, Shinji; Lee, Young Sik; Zhang, Yang; Carthew, Richard W.; Moon, Randall T. (2003): Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. In: *Nature* 422 (6934), S. 905–909. DOI: 10.1038/nature01570.
- Tang, Xiao X.; Zhao, Huaqing; Kung, Bing; Kim, David Y.; Hicks, Sakeenah L.; Cohn, Susan L. et al. (2006): The MYCN enigma: significance of MYCN expression in neuroblastoma. In: *Cancer Res.* 66 (5), S. 2826–2833. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0854.
- Teitz, T.; Wei, T.; Valentine, M. B.; Vanin, E. F.; Grenet, J.; Valentine, V. A. et al. (2000): Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. In: *Nat. Med.* 6 (5), S. 529–535. DOI: 10.1038/75007.
- Then, Cornelia; Ebelt, Kathleen; Langer, Alexandra; Mayr, Doris; Schmidmaier, Ralf; Oduncu, Fuat (2010): Neuroblastoma in a 55-Year-Old Patient: A Case Report. In: *Case Rep Oncol* 3 (3), S. 458–462. DOI: 10.1159/000322863.
- Tumilowicz, J. J.; Nichols, W. W.; Cholon, J. J.; Greene, A. E. (1970): Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. In: *Cancer Res.* 30 (8), S. 2110–2118.
- Ueda, K.; Ganem, D. (1996): Apoptosis is induced by N-myc expression in hepatocytes, a frequent event in hepadnavirus oncogenesis, and is blocked by insulin-like growth factor II. In: *J. Virol.* 70 (3), S. 1375–1383.
- Ushmorov, A.; Hogarty, M. D.; Liu, X.; Knauß, H.; Debatin, K. M.; Beltinger, C. (2008): N-myc augments death and attenuates protective effects of Bcl-2 in trophically stressed neuroblastoma cells. In: *Oncogene* 27 (24), S. 3424–3434. DOI: 10.1038/sj.onc.1211017.
- Ushmorov, Alexey; Debatin, Klaus-Michael (2005): Growth inhibition of murine neuroblastoma cells by C-Myc with cell cycle arrest in G2/M. In: *cbt* 4 (2), S. 181–186. DOI: 10.4161/cbt.4.2.1439.
- Uversky, Vladimir N. (2002): What does it mean to be natively unfolded? In: *Eur. J. Biochem.* 269 (1), S. 2–12.
- van Noesel, Max M.; Versteeg, Rogier (2004): Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'. In: *Gene* 325, S. 1–15.
- Vandesompele, Jo; Speleman, Frank; van Roy, Nadine; Laureys, Geneviève; Brinkschmidt, Christian; Christiansen, Holger et al. (2001): Multicentre analysis of patterns of DNA

- gains and losses in 204 neuroblastoma tumors: How many genetic subgroups are there? In: *Med. Pediatr. Oncol.* 36 (1), S. 5–10. DOI: 10.1002/1096-911X(20010101)36:1<5::AID-MPO1003>3.0.CO;2-E.
- Varlakhonova, Natalia V.; Cotterman, Rebecca F.; deVries, Wilhelmine N.; Morgan, Judy; Donahue, Leah Rae; Murray, Stephen et al. (2010): myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. In: *Differentiation* 80 (1), S. 9–19. DOI: 10.1016/j.diff.2010.05.001.
- Wada, R. K.; Seeger, R. C.; Brodeur, G. M.; Einhorn, P. A.; Rayner, S. A.; Tomayko, M. M.; Reynolds, C. P. (1993): Human neuroblastoma cell lines that express N-myc without gene amplification. In: *Cancer* 72 (11), S. 3346–3354.
- Walton, Jeanette D.; Kattan, David R.; Thomas, Sharon K.; Spengler, Barbara A.; Guo, Hong-Fen; Biedler, June L. et al. (2004): Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. In: *Neoplasia* 6 (6), S. 838–845. DOI: 10.1593/neo.04310.
- Wang, Yi-Dong; Bian, Guo-Hui; Lv, Xiao-Yan; Zheng, Rong; Sun, Huan; Zhang, Zheng et al. (2008): TC1 (C8orf4) is involved in ERK1/2 pathway-regulated G(1)- to S-phase transition. In: *BMB Rep* 41 (10), S. 733–738.
- Wenzel, A.; Schwab, M. (1995): The mycN/max protein complex in neuroblastoma. Short review. In: *Eur. J. Cancer* 31 (4), S. 516–519.
- Westermarck, Ulrica K.; Wilhelm, Margareta; Frenzel, Anna; Henriksson, Marie Arsenian (2011): The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. In: *Seminars in Cancer Biology* 21 (4), S. 256–266. DOI: 10.1016/j.semcancer.2011.08.001.
- Wu, Jinling; Saint-Jeannet, Jean-Pierre; Klein, Peter S. (2003): Wnt–frizzled signaling in neural crest formation. In: *Trends in Neurosciences* 26 (1), S. 40–45. DOI: 10.1016/S0166-2236(02)00011-5.
- Xu, Hong-Tao; Liu, Yang; Liu, Shu-Li; Miao, Yuan; Li, Qing-Chang; Wang, En-Hua (2013): TC-1 (C8orf4) expression is correlated with differentiation in ovarian carcinomas and might distinguish metastatic ovarian from metastatic colorectal carcinomas. In: *Virchows Arch* 462 (3), S. 281–287. DOI: 10.1007/s00428-013-1375-7.
- Yang, Hai-Jie; Wang, Lei; Xia, Yin-Yan; Chang, Piek-Ngoh; Feng, Zhi-Wei (2010): NF-kappaB mediates MPP+-induced apoptotic cell death in neuroblastoma cells SH-EP1 through JNK and c-Jun/AP-1. In: *Neurochem. Int.* 56 (1), S. 128–134. DOI: 10.1016/j.neuint.2009.09.010.
- Yang, J.; Liu, X.; Bhalla, K.; Kim, C. N.; Ibrado, A. M.; Cai, J. et al. (1997): Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. In: *Science* 275 (5303), S. 1129–1132.
- Yang, Z. Q.; Streicher, K. L.; Ray, M. E.; Abrams, J.; Ethier, S. P. (2006): Multiple Interacting Oncogenes on the 8p11-p12 Amplicon in Human Breast Cancer. In: *Cancer Research* 66 (24), S. 11632–11643. DOI: 10.1158/0008-5472.can-06-2946.
- Yang, Zeng-Quan; Moffa, Allison B.; Haddad, Ramsi; Streicher, Katie L.; Ethier, Stephen P. (2007): Transforming properties of TC-1 in human breast cancer: Interaction with FGFR2 and β -catenin signaling pathways. In: *Int. J. Cancer* 121 (6), S. 1265–1273. DOI: 10.1002/ijc.22831.

- Zhang, Jiahao; Gao, Yan; Zhao, Xiaosu; Guan, Ming; Zhang, Wei; Wan, Jun; Yu, Bo (2011): Investigation of copy-number variations of C8orf4 in hematological malignancies. In: *Med. Oncol.* 28 Suppl 1, S. S647-52. DOI: 10.1007/s12032-010-9698-6.
- Zhang, Lihong; Li, Kai; Lv, Zhibao; Xiao, Xianmin; Zheng, Jicui (2009): The effect on cell growth by Wnt1 RNAi in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. In: *Pediatr. Surg. Int.* 25 (12), S. 1065–1071. DOI: 10.1007/s00383-009-2481-0.
- Zhou, Yunan; Dai, Ruolian; Mao, Ling; Xia, Yuanpeng; Yao, Yufang; Yang, Xue; Hu, Bo (2010): Activation of Sonic hedgehog signaling pathway in S-type neuroblastoma cell lines. In: *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 30 (3), S. 271–277. DOI: 10.1007/s11596-010-0342-7.

ANHANG**Verzeichnis der Tabellen**

TABELLE 1 – EINTEILUNG NACH INTERNATIONAL NEUROBLASTOMA RISK GROUP STAGING SYSTEM (INRGSS) 2009 (TABELLE NACH MONCLAIR, 2009)	6
TABELLE 2 – EINTEILUNG NACH DER INTERNATIONAL NEUROBLASTOMA RISK GROUP 2009 (TABELLE NACH COHN, 2009)	6
TABELLE 3 – EINTEILUNG VON NEUROBLASTOMZELLEN IN PROGNOTISCHE GRUPPEN ANHAND GENETISCHER MARKER (NACH BRODEUR 2003 UND VAN NOESEL UND VERSTEEG 2004)	8
TABELLE 4 – BISHERIGE ERGEBNISSE ZU TC1 IN VERSCHIEDENEN TUMORMODELLEN.	12
TABELLE 5 – ANTIBIOTIKA ZUSÄTZE ZU EINZELNEN ZELLKULTUREN	26
TABELLE 6 PCR BEDINGUNGEN	31
TABELLE 7 VERWENDETE PRIMER	34
TABELLE 8 – ÜBERSICHT ÜBER DIE KULTIVIERUNG	36
TABELLE 9 – ZAHLENWERTE DER RTD-PCR MESSUNGEN DER MRNS EXPRESSION VON TC1 UND MYCN IN NEUN VERSCHIEDENEN NEUROBLASTOMZELLINIEN. ALS MITTELWERTE AUS TRIPLIKATEN MIT STANDARDABWEICHUNGEN. SORTIERT WURDE NACH DER AMPLIFIKATION VON MYCN. ES BESTEHT EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED IN DER EXPRESSION VON MYCN- MRNS, ABER KEINER IN DER TC1- MRNS EXPRESSION IN MYCN- AMPLIFIZIERTEN UND NICHT AMPLIFIZIERTEN ZELLINIEN. SIGNIFIKANZNIVEAU NACH DEM T-TEST FÜR UNABHÄNGIGE STICHPROBEN. (N.M. NICHT MESSBAR)	45
TABELLE 10 – MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNG DER MRNS BESTIMMUNGEN VON TC1, TRAP1 UND HTERT ZU DEN ZEITPUNKTEN 0, 6,12, 24, 48 UND 72H NACH MYCN AKTIVIERUNG. DARSTELLUNG VON Δ CT WERTEN ZU B2-MIKROGLOBULIN ALS REFERENZGEN.	47
TABELLE 11 – TC1 MRNS EXPRESSION DER DREI PASSAGE- STADIEN. DIE TABELLE ZEIGT DIE DAZUGEHÖRIGEN WERTE ZUR ABBILDUNG 17. ZUSÄTZLICH SIND DIE $\Delta\Delta$ C _T UND DIE $2^{\Delta\Delta$ CT WERTE ERRECHNET. DIE TC1 - MRNS EXPRESSION IN DER ÜBEREXPRESSIONSZELLINIE SH-EP.MYCNER.TC1 IST STETS HÖHER ALS IN DER KONTROLLZELLINIE SH-EP.MYCNER.LV UND ERREICHT FAST DAS 900FACH DER MRNS EXPRESSION IN PASSAGE 17. AUCH NACH DEM AUFTAUEN IST DIE EXPRESSION STARK ERHÖHT AUF KNAPP DAS 130FACHE ZUR KONTROLLE.	49
TABELLE 12 – Δ CT WERTE UND STANDARDABWEICHUNG DER BESTIMMUNG VON MYC- UND TC1- MRNS IM VERGLEICH ZU B2-MIKROGLOBULIN-MRNS IN DER TC1 ÜBEREXPRESSIONSZELLINIE UND DER LEERVEKTORKONTROLLE.	55
TABELLE 13 – ZAHLENWERTE DER VERTEILUNG DER ANTEILE AUF DIE ZELLYKLUSPHASEN ERMITTELT DURCH PROPIDIUM IODID FÄRBUNG, MITTELWERTE IN 5 UNABHÄNGIGEN EINZELMESSUNGEN MIT (STANDARDABWEICHUNGEN). SIGNIFIKANZNIVEAUS AUF DER RECHTEN SEITE, SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE (P<0,05) SIND FARBIG HINTERLEGT.	57
TABELLE 14 - ZAHLENWERTE DES ANNEXINV APOPTOSE ASSAYS MIT UNTERTEILUNG IN LEBENDE, FRÜH APOPTOTISCHE UND SPÄT APOPTOTISCHE ZELLEN, MITTELWERTE IN 5 UNABHÄNGIGEN EINZELMESSUNGEN MIT (STANDARDABWEICHUNGEN). SIGNIFIKANZNIVEAUS AUF DER RECHTEN SEITE, SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE (P<0,05) SIND FARBIG HINTERLEGT.	59
TABELLE 15 - Δ CT MITTELWERTE UND (STANDARDABWEICHUNG) DER BESTIMMUNG VON MYC- UND TC1- MRNS IM VERGLEICH ZU B2-MIKROGLOBULIN-MRNS IN DER TC1 ÜBEREXPRESSIONSZELLINIE UND DER LEERVEKTORKONTROLLE.	60

Verzeichnis der Abbildungen

ABBILDUNG 1 - PROZENTUALE VERTEILUNG VERSCHIEDENER TUMORENTITÄTEN IM KINDESALTER ((ROBERT KOCH-INSTITUT (HRSG) UND DIE GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. (HRSG) 2013)	2
ABBILDUNG 2 – DARSTELLUNG DER ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT IN JAHREN NACH BEOBACHTUNGSBEGINN UNTERTEILT IN RISIKOGRUPPEN MIT NIEDRIGEM (LOW, GRÜN), MITTLEREM (INTERMEDIATE, BLAU) UND HOHEM (HIGH, ROT) RISIKO. ABBILDUNG NACH FIGURE 4 AUS (MARIS ET AL. 2007).	6
ABBILDUNG 3 – GRAFISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER IM TEXT BESCHRIEBENEN WECHSELWIRKUNGEN VON TC1 MIT ANDEREN ZELLULÄREN PROTEINEN UND SIGNALWEGEN. IN DEN KREISEN SIND DIE JEWEILIGEN LITERATURANGABEN: (1) (KIM ET AL. 2009) (2) (JUNG 2006) (3) (WANG ET AL. 2008) (4) (FRIEDMAN ET AL. 2004) (5) (PARK ET AL. 2007)	13
ABBILDUNG 4 – SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERWENDETEN PBABE-PURO VEKTORS. AUS (LABLIFE)	24
ABBILDUNG 5 – MESSUNG EINER UNGEFÄRBTEN PROBE IM PI KANAL, DARSTELLUNG ALS HISTOGRAMM. EINGEZEICHNETE GRENZE ZWISCHEN PI NEGATIVEN, AUSGESCHLOSSENEN UND PI POSITIVEN ZELLEN.	37
ABBILDUNG 6 – DARSTELLUNG DER NACHTRÄGLICH GEFÄRBTEN PROBE AUS ABBILDUNG 5. BLAU SIND DIE EREIGNISSE, WELCHE BEREITS OHNE FÄRBUNG EIN SIGNAL VERURSACHEN.	37
ABBILDUNG 7 – GEFÄRBTE PI PROBE AUS ABBILDUNG 6 IM VORWÄRTS- (FSC, X-ACHSE) UND SEITENSTREULICHTSCATTER (SSC, Y-ACHSE). ALS PI NEGATIVE ABGEGRENZTE ZELLEN SIND BLAU, PI POSITIVE ROT EINGEZEICHNET. MAN SIEHT, DAS GRÖßTENTEILS NUR KLEINE, UND SCHWACH GRANULIERTE OBJEKTE ALS PI NEGATIV AUSGESCHLOSSEN WURDE UND KEINE OBJEKTE, DIE DEN GRÖßEREN, GRANULIERTEN ZELLEN ENTSPRECHEN.	38
ABBILDUNG 8 – PI POSITIVE ZELLEN WURDEN IM PI WIDTH KANAL (X-ACHSE) UND PI-AREA KANAL (Y-ACHSE) DARGESTELLT UND EINZELZELLEN DURCH EIN BOX-GATE AUSGEWÄHLT. DIE RESTLICHEN EVENTS ENTSPRECHEN ZUSAMMENHÄNGENDEN ZELLEN, DA SIE MEHR DNS UND GRÖßER SIND ALS MÖGLICH.	38
ABBILDUNG 9 – BEI DEN AUSGEWÄHLTEN ZELLEN WURDE DER ZELLYKLUS MIT DER SOFTWARE FLOWJO NACH DEM WATSON MODELL BERECHNET. DIE EINZELNEN PHASEN WURDEN MATHEMATISCH BERECHNET UND DER ANTEIL DER ZELLEN ALS PROZENT AUSGEGEBEN. DIE G0/G1 PHASE (GRÜN), S-PHASE (GELB) UND G2/M- PHASE (BLAU).	39
ABBILDUNG 10 – DARSTELLUNG DES FITC-PI-PLOTES EINER BEISPIEL PROBE MIT EINGEZEICHNETEN VIER-QUADRANTEN-GATE UND ENTSPRECHENDER ZUORDNUNG DER JEWEILIGEN POPULATIONEN.	40
ABBILDUNG 11 - KAPLAN MEIER ANALYSE DER VERSTEEG DATENBANK ZUR ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT MIT HOHER (BLAU) UND NIEDRIGER (ROT) EXPRESSION VON TC1 (C8ORF4). ES ZEIGT SICH EINE SIGNIFIKANT HÖHERE ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT VON PATIENTEN MIT HOHER TC1 EXPRESSION ALS MIT NIEDRIGER TC1 EXPRESSION.	42
ABBILDUNG 12 – DATENBANK ANALYSE VON <i>MYCN</i> -AMPLIFIZIERTEN PROBEN AUS DER VERSTEEG DATENBANK BEZÜGLICH DER ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT BEI <i>MYCN</i> AMPLIFIKATION UND HOHER (BLAU) UND NIEDRIGER (ROT) TC1- EXPRESSION. ES ZEIGT SICH KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN EXPRESSIONSSTÄRKEN IN <i>MYCN</i> -AMPLIFIZIERTEN PROBEN BEZÜGLICH DER ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT.	43
ABBILDUNG 13 – DATENBANK ANALYSE VON NICHT <i>MYCN</i> -AMPLIFIZIERTEN PROBEN AUS DER VERSTEEG DATENBANK BEZÜGLICH DER ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT BEI <i>MYCN</i> AMPLIFIKATION UND HOHER (BLAU) UND NIEDRIGER (ROT) TC1- EXPRESSION. ES ZEIGT SICH EINE SIGNIFIKANT HÖHERE ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT VON PATIENTEN MIT HOHER TC1 EXPRESSION UND OHNE <i>MYCN</i> EXPRESSION ALS MIT NIEDRIGER TC1 EXPRESSION.	43
ABBILDUNG 14 – GRAFISCHE DARSTELLUNG DER ΔC_T WERTE ZU B2M IN DER RTD-PCR MESSUNG ZU TC1 UND <i>MYCN</i> . AUFSTIEGEND NACH DER <i>MYCN</i> EXPRESSION SORTIERT. ES ZEIGT SICH KEINE SIGNIFIKANTE KORRELATION ZWISCHEN DER EXPRESSION VON <i>MYCN</i> BZW. DEM AMPLIFIKATIONSSTATUS UND DER TC1 EXPRESSION. IM TREND IST DIE TC1 EXPRESSION IN <i>MYCN</i> AMPLIFIZIERTEN ZELLEN (*) GERING ERHÖHT.	45
ABBILDUNG 15 – DARSTELLUNG DER MRNS EXPRESSION DES JEWEILIGEN ZIELGENS MIT UND OHNE AKTIVIERUNG VON <i>MYCN</i> ZUM ZEITPUNKT 0. WIE ERWARTET STEIGT DIE EXPRESSION VON TRAP1- UND HTERT- MRNS. DIE EXPRESSION VON TC1- MRNS WIRD EBENFALLS NACH 24H BIS 72H NACH AKTIVIERUNG VON <i>MYCN</i> GESTEIGERT. DARSTELLUNG EINES EXPERIMENTES MIT TRIPLIKATEN.	47
ABBILDUNG 16 – GELLAUF DER PCR MIT PRIMERN FÜR <i>TC1</i> - MRNS UND <i>B2M</i> - MRNS IN MUTTER-, ÜBEREXPRESSIONS- UND KONTROLLZELLINIE IN PASSAGE 3 NACH INFektion.	48
	85

ABBILDUNG 17 – RTD-PCR BESTIMMUNG DER TC1- MRNS EXPRESSION VON SH-EP.MYCNER.LV UND DER ÜBEREXPRESSIONSZELLINIE SH-EP.MYCNER.TC1 NACH PASSAGE 4 (P4), 13 (P13) UND 17 (P17) SOWIE NACH KRYOKONSERVIERUNG (KRYO) UND WIEDERAUFTAUEN. DIE ÜBEREXPRESSIONSZELLINIE SH-EP.MYCNER.TC1 EXPRIMIERT MEHR TC1– MRNS ALS DIE KONTROLLZELLINIE SH-EP.MYCNER.LV. DARGESTELLT SIND Δ CT WERTE ZU BETA2MIKROGLOBULIN MRNS.	49
ABBILDUNG 18 - MIKROSKOPISCHE AUSZÄHLUNG DES WACHSTUMS DER TC1 ÜBEREXPRESSIONS- UND DER KONTROLLZELLINIE ÜBER 7 TAGE. DIE TC1 ÜBEREXPRESSIONSZELLINIE (GRÜN) ZEIGT EIN GERINGERES WACHSTUM GEGENÜBER DER KONTROLLZELLINIE (HELLGRÜN).	50
ABBILDUNG 19 – DARSTELLUNG DES WACHSTUMS DER TC1 ÜBEREXPRESSIONSZELLINIE MIT SPÄTEREM ERREICHEN DER KONFLUENZ IM VERGLEICH ZUR LEERVEKTORKONTROLLE. FÄRBUNGEN MIT KRISTALLVIOLETT INNERHALB VON ZEHN TAGEN.	51
ABBILDUNG 20 - AUSMESSUNG DER ABSORPTION BEI 450NM DER WELLS IM WATER SOLUBLE TETRASOLIUMSALT (WST) – ASSAY, ZUR QUANTIFIZIERUNG DER ZELLVIABILITÄT. VERGLEICH DES WACHSTUMS DER TC1 ÜBEREXPRESSIONSZELLINIE (DUNKELGRÜN) UND DER KONTROLLZELLINIE (HELLGRÜN) VON TAG 3 BIS TAG 9. ES ZEIGT DIE ZELLINIE MIT TC1 ÜBEREXPRESSION (DUNKELGRÜN) EINE GERINGERE VIABILITÄT IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE (HELLGRÜN).	53
ABBILDUNG 21 - DARSTELLUNG DER COLONY FORMING ASSAYS MIT ZELLEN MIT UND OHNE TC1 ÜBEREXPRESSION (LINKS MIT UND RECHTS OHNE TC1 VEKTOR) UND MIT UND OHNE MYCN STIMULATION (OBEN MIT AKTIVEM, UNTEN MIT INAKTIVEM MYCN). ES ZEIGEN SICH WENIGER UND KLEINERE KOLONIEN DURCH AKTIVIERUNG VON MYCN, WELCHE BEI ZUSÄTZLICHER ÜBEREXPRESSION VON TC1 NOCH GERINGER UND KLEINER AUSFALLEN.	54
ABBILDUNG 22 – DARSTELLUNG DER EXPRESSIONSLEVEL VON MYC- UND TC1 MRNS IM VERGLEICH ZU BETA2MIKROGLOBULIN MRNS. IN DER TC1 ÜBEREXPRESSIONSLINIE IST EINE HÖHERE EXPRESSION VON TC1 OHNE UNTERSCHIED IM MYC NIVEAU ZU VERZEICHNEN.	55
ABBILDUNG 23 – GRAFISCHE DARSTELLUNG DER VERTEILUNG DER ANTEILE AUF DIE ZELLZYKLUSPHASEN ERMITTELT DURCH PROPIDIUM IODID FÄRBUNG, MITTELWERTE IN FÜNF UNABHÄNGIGEN EINZELMESSUNGEN MIT DARSTELLUNG DER STANDARDABWEICHUNG. ES IST EIN KLEINERER ANTEIL VON ZELLEN IN DER S-PHASE BEI TC1 ÜBEREXPRESSION IM VERGLEICH ZU DER KONTROLLZELLINIE SOWOHL MIT INAKTIVEM ALS AUCH AKTIVEM MYCN. ES ZEIGT SICH EIN ERHÖHTER ANTEIL AN ZELLEN IN DER G1 PHASE BEI TC1 ÜBEREXPRESSION. DIES KOMMT EINEM G1 ARREST GLEICH.	57
ABBILDUNG 24 - UNTERSCHIEDUNG IN LEBENDE (GRÜN), FRÜH APOPTOTISCHE (ROT) UND SPÄT APOPTOTISCHE ZELLEN (SCHWARZ) DURCH ANNEXIN V MARKIERUNG UND MESSUNG IM FACS. MIT TAMOXIFEN STIMULIERTE ZELLEN UND DIE DAZUGEHÖRIGE UNSTIMULIERTE KONTROLLE. ES ZEIGT SICH EINE REDUKTION DES ANTEILS VON APOPTOTISCHEN ZELLEN IN DEN PROBEN MIT TC1 ÜBEREXPRESSION.	59
ABBILDUNG 25 - DARSTELLUNG DER EXPRESSIONSLEVEL VON P21- UND TC1- MRNS IM VERGLEICH ZU BETA2MIKROGLOBULIN- MRNS. IN DER TC1 ÜBEREXPRESSIONSLINIE IST EINE HÖHERE EXPRESSION VON TC1 OHNE UNTERSCHIED IM P21 NIVEAU ZU VERZEICHNEN.	60

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.

Leipzig, den 09. Februar 2015

Danksagung

Mein Dank dafür, dass ich die vorliegende Arbeit habe anfertigen können, gilt Herrn Professor Dr. med. Holger Christiansen, meinem Doktorvater, für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit in seinem Labor. Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe möchte ich nicht nur ihm, sondern auch Dr. rer. nat. Nina-Merete Christiansen, Dr. med. Eckhard Bergmann, Dr. med. Axel Weber und Dr. med. Sven Starke danken. Für die viele Zeit und Mühe mit Planung und Korrektur dieser Arbeit danke ich Dr. med. Starke vielmals.

Mein herzlichster Dank gilt unseren medizinisch-technischen Assistentinnen Sylvia Taube und Maïke Ziegler für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Hilfe bei kleinen und größeren Problemen im Laboralltag!

Ebenfalls bedanke ich mich bei Manuel Mai für die Korrekturen in der Dissertationsschrift. Meiner Freundin Isabel Michels kann ich gar nicht genug danken für die vielen Stunden akribischen Lesens und Lektorierens aller Versionen ohne dabei die Geduld zu verlieren.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie für deren unendliche Geduld und den Rückhalt während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation. Meine Eltern waren und sind mir eine große Motivation und kompetente Gesprächspartner in allen Fragen.

Ich danke allen Freunden, Kommilitonen, Kollegen und Doktoranden, die mich während meiner Arbeit durch Gespräche und Hinweise begleitet haben.