

Untersuchungen zum Genexpressionsprofil von Neuroblastomzellen unter dem Einfluss von Retinoiden und Identifikation neuer Zielstrukturen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dipl.-Biochemiker Ingo Neumann

geboren am 13.12.1975 in Perleberg

Gutachter:

1. PD Dr. R. Golbik
2. PD Dr. M.S. Staeger
3. Prof. Dr. M. Stanulla

Halle (Saale), 23.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Neuroblastom	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Pathologie und Stadieneinteilung	1
1.1.4	Genetik eines Neuroblastoms	2
1.1.4.1	<i>1p-Deletion</i>	2
1.1.4.2	<i>17q-Chromosomen-Rearrangement</i>	2
1.1.4.3	<i>MYCN-Amplifizierung</i>	3
1.1.4.4	<i>Neurotrophine und Neurotrophin-Rezeptoren</i>	3
1.1.4.5	<i>Telomerase-Aktivität</i>	3
1.1.5	Lokalisation von Primärtumoren und Metastasen	4
1.1.6	Diagnose	4
1.1.7	Therapie	5
1.1.7.1	<i>Chirurgische Therapie</i>	5
1.1.7.2	<i>Radiotherapie</i>	5
1.1.7.3	<i>Chemotherapie</i>	5
1.1.7.4	<i>Anti-GD2 Antikörper-Therapie</i>	6
1.2	Retinoide	6
1.2.1	Historie	6
1.2.2	Definition	7
1.2.3	Metabolisierung und Retinoidrezeptoren	7
1.2.3.1	<i>Transport von Retinoiden</i>	7
1.2.3.2	<i>Regulierung des Retinsäurehaushaltes</i>	8
1.2.3.3	<i>Nukleäre Retinoidrezeptoren</i>	8
1.2.3.4	<i>Anwendung von natürlichen Retinoiden</i>	9
1.2.3.5	<i>4-HPR, ein synthetisches Retinoid</i>	10
1.2.3.6	<i>Nebenwirkung von Retinoiden</i>	10
1.3	DNA-Microarray-Technologie	10
2	ZIELSTELLUNG	12
3	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	Material	13
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	13
3.1.2	Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer, Lösungen und Nährmedien	14
3.1.3	Verwendete Zelllinien, Gewebe und Medien für eukaryontische Zellkulturen	15
3.1.4	Sequenzen verwendeter siRNA- und miRNA-Oligonukleotide sowie RT-PCR-Primer	18
3.1.5	Antikörper für die Western Blot-Analyse	20
3.1.6	Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	20
3.2	Molekularbiologische Methoden	22
3.2.1	Agarosegelelektrophorese	22
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von RNA- und DNA-Nukleinsäuren	22
3.2.3	Affymetrix DNA-Microarrays als Werkzeug der Genexpressions-Analyse	22

3.2.3.1	<i>Isolation der Gesamt-RNA</i>	23
3.2.3.2	<i>Aufreinigung der präparierten Gesamt-RNA</i>	24
3.2.3.3	<i>Erst-Strang cDNA-Synthese</i>	24
3.2.3.4	<i>Zweit-Strang-Synthese</i>	24
3.2.3.5	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion der cDNA</i>	24
3.2.3.6	<i>In-vitro-Transkription (IVT)</i>	25
3.2.3.7	<i>IVT-Aufreinigung</i>	25
3.2.3.8	<i>Fragmentierung der cRNA</i>	25
3.2.3.9	<i>Hybridisierung</i>	25
3.2.3.10	<i>Waschen und Färben des Microarrays</i>	26
3.2.3.11	<i>Scan-Vorgang des Microarrays</i>	26
3.2.3.12	<i>Waschen und Zweitfärbung mit Antikörperverstärkung</i>	26
3.2.3.13	<i>Scanvorgang des Microarrays nach Antikörperverstärkung</i>	27
3.2.3.14	<i>Computer-vermittelte Auswertung und Analyse der Genexpression</i>	27
3.2.4	Reverse Transkriptase und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	27
3.2.4.1	<i>Isolation und Aufreinigung der präparierten Gesamt-RNA</i>	27
3.2.4.2	<i>Reverse Transkription von mRNA</i>	27
3.2.4.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	27
3.2.4.4	<i>real-time RT-PCR-Amplifikation</i>	28
3.2.4.5	<i>$2^{-\Delta\Delta Ct}$-Methode</i>	29
3.3	Zellbiologische Methoden	29
3.3.1	Kultivierung und Passagieren eukaryontischer Zellen	29
3.3.2	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	30
3.3.3	RNA-Interferenz (RNAi)	30
3.3.3.1	<i>Transfektion mit kationischen Lipiden</i>	31
3.3.3.2	<i>RNA-Interferenz durch Transfektion von siRNAs mittels AMAXA-Technologie</i>	31
3.3.3.3	<i>miRNA basierende RNA-Interferenz von ASCL1</i>	32
3.3.4	Durchflusszytometrische Analyse von Zellen	33
3.3.4.1	<i>Analyse transfizierter eukaryontischer Zellen</i>	34
3.3.4.2	<i>Analyse fluoreszenzmarkierter Oberflächenantigene</i>	34
3.3.5	Separation von Tumorzellen	34
3.3.6	Fluoreszenzmikroskopie von Zellen	35
3.3.7	Untersuchungen zur Zellviabilität	35
3.3.7.1	<i>MTT-Proliferationstest</i>	35
3.3.7.2	<i>LDH-Test</i>	36
3.3.8	Zellgenerationsanalyse	36
3.3.9	Zellzyklusanalyse	37
3.3.10	Bystander-Lyse von Tumorzellen	38
3.3.11	Analyse zur Invasivität von Tumorzellen	38
3.4	Proteintechnologische Methoden	39
3.4.1	Proteinisolation durch Zell-Aufschluss mit RIPA	39
3.4.2	Proteinisolation aus TRIzol	39
3.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	39
3.4.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	40
3.4.5	Färbung eines SDS-Polyacrylamidgels mit Coomassie Brilliant Blue	40
3.4.6	Western Blot	40
4	ERGEBNISSE	42

4.1	Vorbemerkung	42
4.2	DNA-Microarrays als Werkzeug zur Typisierung von Tumoren peripheren neuroektodermalen Ursprungs	42
4.3	Biologische Wirkung von Retinoiden	44
4.3.1	Antiproliferative Wirkung von ATRA und 4-HPR auf Neuroblastomzellen	44
4.3.2	Generationsanalyse von Retinoid-behandelten Neuroblastomzellen	46
4.3.3	Zellzyklusanalyse der Neuroblastomzellen SH-SY5Y nach Retinoid-Kultivierung	48
4.4	Genexpressionsanalyse von Retinoid-behandelten Neuroblastomzellen	49
4.4.1	Differentielle Antigenexpression auf Neuroblastomzellen nach Behandlung mit natürlichen und synthetischen Retinoiden	49
4.4.2	Differentielle Genexpression in den Neuroblastomzellen SH-SY5Y durch ATRA	50
4.4.3	Untersuchung zur differentiellen Genexpression in SH-SY5Y-Zellen durch 4-HPR	52
4.4.4	Delta-Notch-vermittelte Differenzierung von Neuroblastomzellen	54
4.4.4.1	<i>Retinoid-induzierte und Delta-Notch-regulierte Differenzierung von Neuroblastomzellen</i>	54
4.4.4.2	<i>Neuritenbildung in ASCL1-supprimierten und ausdifferenzierten Neuroblastomzellen</i>	56
4.4.4.3	<i>Verteilung der ASCL1 und DLK1 mRNA-Expression in humanen Geweben</i>	57
4.4.4.4	<i>RNA-Interferenz des proneuronalen Transkriptionsfaktors ASCL1 in SH-SY5Y-Zellen</i>	58
4.4.4.5	<i>Differentielle Genexpression von transient ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen</i>	60
4.4.4.6	<i>Expressionsprofil von stabil ASCL1-inaktivierten und reifenden Neuroblastomzellen</i>	62
4.4.5	Expression von Genen des Retinsäure-Stoffwechsels	64
4.4.6	CD54 (ICAM-1) Expression in Neuroblastomzellen	65
4.4.6.1	<i>Überexpression von CD54 in Neuroblastomzellen nach Behandlung mit ATRA</i>	65
4.4.6.2	<i>Zellzyklusanalyse CD54^{+/-}-differenzierter Neuroblastomzellen</i>	67
4.4.6.3	<i>CTLs-vermittelte Bystanderlyse von CD54-differenzierten Neuroblastomzellen</i>	68
4.4.6.4	<i>Vergleich des Genexpressionsprofils von CD54^{+/-}-differenzierten SH-SY5Y-Zellen</i>	69
4.4.6.5	<i>Vergleich des Expressionsprofils von Genen des Retinoidstoffwechsels und Regulatoren des Zellzyklus in CD54⁺ und CD54⁻-differenzierten Neuroblastomzellen</i>	71
4.4.6.6	<i>Neuronen- und Gliazell-spezifische Typisierung von CD54^{+/-}-differenzierten Neuroblastomzellen</i>	73
4.4.7	CD184 Expression von Retinoid-kultivierten Neuroblastomzellen	74
4.4.7.1	<i>Herunterregulierung der CD184 Expression in Neuroblastomzellen nach Behandlung mit all-trans Retinsäure</i>	75
4.4.7.2	<i>Migrationseigenschaften von Retinoid-differenzierten Neuroblastomzellen</i>	77
4.4.7.3	<i>Verteilung des Rezeptors CD184 und Liganden SDF-1 in humanen Geweben</i>	79
4.4.8	Expression und therapeutische Relevanz von CD117 bei Neuroblastomzellen	79
4.4.8.1	<i>Untersuchung zur regulierten Expression von CD117 und SCF in Neuroblastomzellen nach Retinoid-Behandlung</i>	80
4.4.8.2	<i>CD117 Expression in Neuroblastomzellen nach Dauerbehandlung mit Retinoiden</i>	82
4.4.8.3	<i>Antiproliferative Wirkung und Induktion von Apoptose in ATRA-kultivierten und CD117 überexprimierenden Neuroblastomzellen durch STI-571</i>	83

4.4.8.4	<i>Zusammenhang zwischen quantitativer CD117 Expression und der STI-571-vermittelten Zytotoxizität an Neuroblastomzellen</i>	87
4.4.9	Expression hämatopoetischer Stammzellmarker auf Neuroblastomzellen	88
4.4.9.1	<i>CD34 Expression auf Neuroblastomzellen</i>	88
4.4.9.2	<i>Expression des HSZ-spezifischen Antigens CD133 auf Neuroblastomzellen</i>	89
4.4.9.3	<i>CD133 Proteinexpression von Retinsäure-differenzierten Neuroblastomzellen</i>	90
4.4.9.4	<i>Gewinnung tumorreduzierter CD133-positiver hämatopoetischer Stammzellen</i>	92
5	DISKUSSION	94
5.1	Genchipanalysen zur Diskriminierung eines Neuroblastoms von anderen neuroektodermalen Tumoren	94
5.2	Biologische Wirkung von Retinoiden	95
5.2.1	Antiproliferative Wirkung und therapeutischer Einsatz von Retinoiden	96
5.2.2	Retinoid-induzierte Arretierung von Neuroblastomzellen	98
5.2.3	Intrazelluläre Homöostase und Signalwege von Retinoiden	100
5.3	Retinoid-vermittelte Differenzierung von Neuroblastomzellen	103
5.3.1	Delta-Notch-vermittelte Inaktivierung von ASCL1 in differenzierten Neuroblastomzellen	104
5.3.2	CTLs-induzierte Bystanderlyse von CD54-differenzierten Neuroblastomzellen	108
5.3.3	Phänotypisierung von CD54-differenzierten Neuroblastomzellen	109
5.3.4	Differentielle Genexpression in ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen	110
5.4	CD184 (CXCR4) Expression in Neuroblastomzellen	113
5.4.1	Regulierung von CD184 in Retinoid-differenzierten Neuroblastomzellen	113
5.4.2	CD184-abhängige Migrationseigenschaften differenzierter Neuroblastomzellen	114
5.5	Nachweis und Anwendung von CD117 in Neuroblastomzellen	115
5.5.1	Induktion von CD117 in Retinoid-differenzierten Neuroblastomzellen	115
5.5.2	Verstärkung der Wachstumshemmung von Neuroblastomzellen durch Kombination von ATRA und STI-571	117
5.6	Neuroblastomzellen und deren Expression HSZ-spezifischer Antigene	120
5.6.1	Differentielle Expression von CD34 und CD133 in Neuroblastomzellen	120
6	ZUSAMMENFASSUNG	122
7	LITERATURVERZEICHNIS	125
8	ANHANG	153
8.1	Individueller Heilversuch durch kombinierte Therapie von Retinsäure mit STI-571	153
8.2	Genübersicht	156
8.3	Abkürzungsverzeichnis	157
8.4	Danksagung	159
8.5	Lebenslauf	160
8.6	Eidesstattliche Erklärung	162

1 EINLEITUNG

1.1 Das Neuroblastom

1.1.1 Definition

Das histopathologische Erscheinungsbild eines Neuroblastoms wurde erstmals 1864 durch R.L.K. Virchow beschrieben und der Begriff des „Neuroblastoms“ 1910 durch J.H. Wright geprägt ¹. Das Neuroblastom ist ein pädiatrischer extrakranieller solider Tumor des peripheren sympathischen Nervensystems, der aus primitiven neuroektodermalen Vorläuferzellen der Neuralleiste hervorgeht. Das Neuroblastom ist neben dem Rhabdomyosarkom, Ewing-Tumor und einigen Lymphomen den kleinen, blau und rundzelligen Tumoren (*SRBCT*; *small round blue cell tumours*) zuzuordnen. In Abhängigkeit von der Differenzierung lässt sich das Neuroblastom weiterhin in klassische Neuroblastome, Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome unterteilen ².



Abbildung 1-1: Rudolf Virchow (1821-1902) beschrieb 1864 erstmalig das Neuroblastom (Quelle: www.charite.de)

1.1.2 Epidemiologie

Das Neuroblastom ist die dritthäufigste maligne Erkrankung im Kindesalter ³. Dieser Tumor ist für 8% aller Krebserkrankungen ⁴ und 15% der Krebstodesfälle ⁵ im Kindesalter verantwortlich. Laut dem Deutschen Kinderkrebsregister (Stand 09.2008) liegt die Inzidenz bei 1,2 pro 100.000 der unter 15 jährigen Kinder. Das Inzidenzverhältnis zwischen männlichen und weiblichen Neuroblastom-Patienten beträgt 1,1. Eine Besonderheit sind die Neuroblastome *in-situ*, die sich morphologisch nicht von den symptomatisch diagnostizierten Neuroblastomen unterscheiden und vornehmlich in der Nebennierenrinde kleine Knoten bilden. Im Durchschnitt findet man bei 5 von 6000 mittels Autopsie untersuchten Kindern unter dem ersten Lebensjahr, die an anderen Ursachen gestorben sind, unreife Neuroblastome im Nebennierenmark. Die Inzidenz solcher *in-situ* Neuroblastome ist somit 50 mal größer als die Inzidenz der Neuroblastome, die erst nach einer Manifestierung diagnostiziert werden. Die meisten dieser *in-situ* Neuroblastome unterliegen spontanen Regressionen und differenzieren zu benignen Zellen aus ^{6; 7}. Diese spontane Regression ist im Vergleich zu den anderen Tumoren beim Neuroblastom besonders stark ausgeprägt ⁸.

1.1.3 Pathologie und Stadieneinteilung

Im Wesentlichen besteht dieser Tumor des sympathischen Nervensystems aus den Neuroblastom- und den Schwannzellen, die das Stützgerüst des Tumors ausbilden ⁹. Im Jahre 1997 wurde das Neuroblastom aufbauend auf der Klassifikation von Shimada durch die *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC 1997) nach morphologischen Eigenschaften eingeteilt und definiert ¹⁰. Die Stadieneinteilung eines Neuroblastoms richtet sich vorrangig nach den histologischen und chirurgischen Kriterien. Die Einteilung erfolgt nach dem *International Neuroblastoma Staging System* (INSS), die zuletzt 1993 durch Brodeur ¹¹ modifiziert wurde. Demnach unterteilt man den Entwicklungsstand eines Neuroblastoms in die Stadien I, II, III, IV und IVs (Tabelle 1-1).

Stadium	Merkmal
I	- lokalisierter Tumor mit Option auf vollständig chirurgischer Entfernung - kein Tumorbefall der ipsi- und kontralateralen Lymphknoten - Tumoradhärente Lymphknoten dürfen positiv sein
Ila	- unilateraler Tumor mit unvollständiger chirurgischer Entfernung - ipsi- und kontralaterale Lymphknoten sind histologisch tumorfrei
IIb	- unilateraler Tumor mit regionalem, ipsilateralem Tumorbefall - kontralaterale Lymphknoten sind histologisch unauffällig
III	- nichtresektabler unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie - positiver oder negativer Lymphknotenbefall - nichtresektabler Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltrierung oder Lymphknotenbefall
IV	- Tumordisseminierung in Knochen, Knochenmark, entfernte Lymphknoten, Leber, Haut und andere Organe
IVs	- lokaler Primärtumor wie in Stadium I, Ila und IIb - ausschließliche Disseminierung in Leber, Haut und (oder) Knochenmark - prädestiniert für Säuglinge des ersten Lebensjahres

Tabelle 1-1: Stadieneinteilung eines Neuroblastoms durch die INSS (Brodeur *et al.*, 1993)

1.1.4 Genetik eines Neuroblastoms

Durch Maris und Matthay¹² werden eine Vielzahl an somatischen und zytogenetischen Veränderungen des Neuroblastoms beschrieben, die beispielsweise zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Überexpression von Onkogenen oder Veränderungen im Genexpressionsprofil führen können. Einige davon sind in den nächsten Abschnitten kurz erläutert.

1.1.4.1 1p-Deletion

Mit 30 bis 50% ist die Deletion des kurzen Arms am Chromosom 1 (1p36) eine der häufigsten beschriebenen Mutationen beim primären Neuroblastom^{13; 14}. Nach Brodeur könnte der 1p-Deletion eine fehlende Expression eines Tumorsuppressorgens zu Grunde liegen, die zur Bildung und Progression eines Tumors führt¹⁵. Die prognostischen Auswirkungen einer 1p-Deletion sind bis heute noch umstritten¹⁶. Die 1p-Deletion korreliert zudem mit einer verstärkten MYCN-Amplifizierung^{17; 18}. In den meisten MYCN exprimierenden Neuroblastomen kann gehäuft eine 1p-Deletion detektiert werden, die umgekehrt jedoch nicht stets von einer MYCN-Expression begleitet wird¹⁵.

1.1.4.2 17q-Chromosomen-Rearrangement

Die wohl häufigste genetische Veränderung beim Neuroblastom ist die Umlagerung am langen Arm des Chromosoms 17 (17q)¹⁹. Als Donor dieser Chromosomenumlagerung hat man das Chromosom 1p identifiziert. Die Folge ist das unbalancierte Translokationsprodukt t(1p; 17q). Neben der Amplifizierung von MYCN und der 1p-Deletion stellt auch das *Rearrangement* des Chromosoms 17q einen wichtigen prognostischen Faktor dar²⁰. In der Tat existieren keine MYCN exprimierenden Neuroblastome, die nicht eine 1p-Deletion, 17q-Chromosomenumlagerung oder eine Kombination aus beidem aufweisen. Daher muß die MYCN-Amplifizierung ein späteres Ereignis genetischer Veränderungen sein, die zur Pathologie des Neuroblastoms führt²⁰.

1.1.4.3 MYCN-Amplifizierung

Die Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte ist eine häufige Form der Veränderungen auf chromosomaler Ebene. Zytogenetisch lassen sich solche Genamplifikationen als zusätzliche extrachromosomale DNA-Partikel, den sogenannten *double minutes*-Chromosomen (DMs)²¹, und als homogen gefärbte Region HRSs (*homogeneously-stained regions*), die das gewöhnliche Chromosomen-Bandenmuster unterbrechen, identifizieren²². Das auf dem kurzen Arm des Chromosom 2 lokalisierte und 67 kDa große nukleäre Proto-Onkogen MYCN ist verstärkt in Neuroblastomen vorzufinden²³. Die MYCN-Amplifikation kann in unbehandelten primären Neuroblastomen in einer 3 bis 300-fachen genomischen Kopie des MYCN-Gens pro haploidem Genom vorliegen und korreliert stets mit einer schnellen Tumorprogression und einer schlechten Prognose des Patienten, unabhängig von Tumorstadium und Alter^{24; 25}. Dieses Proto-Onkogen lässt sich in etwa einem Drittel aller Neuroblastome besonders im fortgeschrittenem Tumorstadium detektieren und steht damit in direkten Zusammenhang mit aggressivem Wachstum und schlechter Prognose^{26; 27}. Mit einer Halbwertszeit von nur 30 min reguliert es die Expression von Genen, die die Differenzierung, Angiogenese und Proliferation von Zellen in der Phase der neuronalen Entwicklung steuern¹². In einigen Patienten konnte auch bei den eigentlich prognostisch vorteilhaften Stadien I, II und IVs eine MYCN-Amplifizierung nachgewiesen werden. Diese MYCN-positiven Neuroblastom-Patienten besitzen ebenfalls schlechte prognostische Eigenschaften¹⁵. Auf Grund der hohen prognostischen Aussagekraft gilt allein die MYCN-Amplifizierung als gesicherter zytogenetischer Marker für die gezielte Therapie von Patienten mit einem Neuroblastom²⁸. Fehlt die Amplifikation von MYCN zum Diagnosezeitpunkt, so kann sich diese im späteren Verlauf der Erkrankung in der Regel ebenfalls nicht entwickeln²⁹. In der Vergangenheit sind zudem Neuroblastome im fortgeschrittenem Stadium und mit aggressivem Wachstum beschrieben worden, die statt einer mehrfachen genomischen Kopie des Gens MYCN (MYCN-Amplifizierung) verstärkt MYCN exprimierten^{30; 31}.

1.1.4.4 Neurotrophine und Neurotrophin-Rezeptoren

Unreife sympathische Neuroblasten werden in der Proliferation und Differenzierung unter anderem durch die Neurotrophine (NT) NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived nerve growth factor*) sowie NT-3, -4 und -5 reguliert. Diese Neurotrophine binden spezifisch an einen Rezeptorkomplex, der aus dem 140 kDa großen, hochaffinen Tyrosin-Kinase Rezeptor A (TrkA) und dem 75 kDa großen, niedrig affinen p75NGFR Rezeptor (ohne Kinaseaktivität) besteht³². Aus der TrkA Superfamilie werden neben TrkA auch in einigen Fällen die Rezeptoren TrkB und TrkC exprimiert, die sich ohne Kinase-Aktivität (*truncated*-Rezeptoren) auszeichnen. In Anwesenheit von TrkA existiert keine Co-Expression des prognostisch relevanten MYCN, umgekehrt lässt sich in MYCN-negativen Neuroblastomen eine TrkA Expression nachweisen^{33; 34}. Somit ist eine mRNA-Expression von TrkA und p75NGFR mit einer guten Prognose von Neuroblastom-Patienten assoziiert^{35; 36}. Tumore mit einer Expression von BDNF können über eine autokrine oder parakrine Aktivierung einen Wachstumsvorteil von MYCN-positiven Neuroblastomen erzielen³⁷. Benigne, ausdifferenzierte Tumore exprimieren hingegen verstärkt die inaktiven Tyrosinkinase-Rezeptoren TrkB und TrkC.

1.1.4.5 Telomerase-Aktivität

Eine Telomerase ist für den Erhalt und die Integrität der Telomere am Ende der Chromatiden verantwortlich³⁸. Im Gegensatz zu den somatischen Zellen kann man in Tumorzellen eine erhöhte Telomerase-Aktivität beobachten, die mit der verstärkten Zellteilung von Tumoren einhergeht. Den Verlust der Telomerenden am Chromosom versucht die Tumorzelle aufgrund

der gesteigerten Teilungsrate durch eine erhöhte Telomerase-Aktivität zu kompensieren³⁹. Am Beispiel des Neuroblastoms wurde die erhöhte Telomerase-Aktivität mit einer schlechteren Prognose⁴⁰ und einer MYCN-Amplifizierung sowie 1p-Deletion⁴¹ assoziiert. Allerdings werden die Telomerase-Aktivität und die Prognose von Neuroblastom-Patienten kontrovers diskutiert⁴².

1.1.5 Lokalisation von Primärtumoren und Metastasen

Theoretisch könnte ein Neuroblastom durch den histogenetischen Ursprung des sympathischen Nervensystems aus den verschiedensten Geweben eines Organismus hervorgehen. Vorwiegend ist dieser Tumor jedoch im Retroperitoneum entlang des Grenzstranges und der Nebennierenrinde vorzufinden⁴³. Das Neuroblastom besitzt die Eigenschaft im fortgeschrittenem Tumorstadium häufig zu metastasieren. Die Metastasierung kann sich unter anderem durch die klinischen Symptome einer lokalen Schwellung und Spannung, Schmerzen, hinkender Gang oder eines paraneoplastischen Syndroms äußern. In Tabelle 1-2 sind die häufigsten Lokalisationen eines Primärtumors und von Metastasen aus dem Stadium IV dargestellt.

Primärtumor		Metastasen	
Region	Häufigkeit (%)	Region	Häufigkeit (%)
Nebenniere	50	Knochenmark	81
Restliches Abdomen	28	Skelettsystem	69
Thorax	13	Lymphknoten	22
Hals	5	Leber	19
Unbekannt	3	ZNS	8
Kombination	1	Haut	8
		Andere	5

Tabelle 1-2: Lokalisation des Primärtumors in 779 Neuroblastom-Patienten und Verteilung von Metastasen bei Patienten mit Stadium IV⁴³.

1.1.6 Diagnose

Da der Tumor zwar insgesamt selten aber unter den Säuglingen die häufigste maligne Erkrankung darstellt, liegt die Frage nach einer möglichen Früherkennung auf der Hand. Charakteristischerweise sind beim Neuroblastom einige biochemische Marker im Serum und Urin im Vergleich zu gesunden Kindern erhöht. Unter anderem empfiehlt sich die labordiagnostische Bestimmung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin im Urin, der sauren Katecholamin-Metabolite Homovanillinmandelsäure (HVS) und Vanillinmandelsäure (VMS) im Urin, der basischen Katecholamin-Metabolite Metanephrin und Normetanephrin im Urin, der Tyrosinhydroxylase, des Dopamins, des Neuropeptid Y (NPY), des vasoaktiven intestinalen Peptid, der Neuronen-spezifischen Enolase (NSE), der Laktat-Dehydrogenase (LDH) und des Ferritins⁴⁴. Zur Sicherung der Diagnose sind histopathologische und molekulargenetische Untersuchungen (MYCN, 1p-Deletion) unerlässlich⁴⁵. In der bildgebenden Diagnostik können Primärtumore und regionaler Lymphknotenbefall mittels der Sonographie oder Kernspin- und Computertomographie ermittelt werden. Mittels des Technetium 99 und Metajodbenzylguanidin (MIBG), einem Analogon des Adrenalins, das in über 90% der Neuroblastome gespeichert wird, lassen sich besonders in das Skelettsystem metastasierte Tumorzellen szintigraphisch darstellen.

1.1.7 Therapie

Die Therapie des Neuroblastoms richtet sich in Deutschland nach der aktuellen multizentrischen Therapiestudie NB2004 der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). Die Behandlung eines Neuroblastoms ist multimodal, risikoadaptiert und abhängig vom genau definierten Stadium¹¹, dem Alter, der MYCN-Amplifizierung, dem Tumolvolumen, der Symptomatik und des *in-situ* belassenen Tumorrestes. Hierbei kann die alleinige operative Entfernung eines Tumors im Stadium I ausreichend sein. In den höheren, fortgeschrittenen Tumorstadien ist hingegen eine Chemotherapie unumgänglich⁴⁶. Daher werden die Patienten in Beobachtungs-, Standardrisiko- und Hochrisikopatienten klassifiziert (Neuroblastomstudie NB2004).

1.1.7.1 Chirurgische Therapie

Ein initialer chirurgischer Eingriff ist für die genauere Bestimmung des Stadiums und dem Befall der Lymphknoten immer von Vorteil. Gut lokalisierte und klar strukturierte Tumore sind in der Regel stets operativ zu entfernen. Bei den Tumoren der Stadien I, II und III ohne MYCN-Amplifizierung kann eine alleinige chirurgische Resektion eine vollständige Heilung bedeuten. Tumore des Stadium IVs werden aufgrund der häufigen Spontanremission nur selten operiert.

1.1.7.2 Radiotherapie

Neuroblastome reagieren auf eine Bestrahlung sensitiv. Laut der Neuroblastomstudie NB2004 ist jedoch die Bestrahlung ausschließlich für Patienten mit Neuroblastom-Residualtumor vorgesehen, der trotz einer Chemotherapie positiv für eine Aufnahme von MIBG ist.

1.1.7.3 Chemotherapie

Die Behandlung von Neuroblastomen mit Zytostatika erfolgt in Blöcken und schwankt bei Standardrisikopatienten zwischen einer 3 und 4 monatigen Therapiedauer und bei Hochrisikopatienten zwischen 5 bis 7 Therapiemonaten. Nach der Neuroblastomstudie NB 2004 kommen folgende Zytostatika zum Einsatz: Adriamycin, Carboplatin, Cisplatin, Cyclophosphamid, Decarbazin, Etoposid, Ifosfamid, Melphalan, Vincristin und Vindesin. Das Ziel der Behandlung ist sehr unterschiedlich und kann eine dauerhafte Remission des metastasierten Tumors oder eine Teilremission mit anschließender postoperativer Resektion beinhalten. Eine weitere Ausreifung von Tumorresten und eine palliative Therapie zur Symptomminderung können ebenfalls das Ziel einer Chemotherapie sein. Sehr häufig findet bei verbleibenden Tumorresten oder Rezidiven von soliden pädiatrischen Tumoren eine myeloablative Megatherapie, eine Kombination aus Hochdosischemo- und Strahlentherapie, mit einer anschließenden autologen Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) statt⁴⁷. Eine zusätzliche Behandlung mit G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) dient der Verkürzung der Granulozytopenie nach myeloablativer Megatherapie (NB 2004). Diese Art der Behandlung erfolgt neben Hochrisiko-Neuroblastomen⁴⁸ auch bei peripheren neuroektodermalen Tumoren der Ewing-Familie^{49; 50}. Wie schon zuvor beschrieben wurde, unterliegen einige Neuroblastome einer spontanen Ausreifung durch Differenzierung und Transformation eines unreifen Neuroblasten in mature neuronale Zellstrukturen. Als einer der potentesten Induktoren für die Reifung und Differenzierung von Neuroblasten zu neuronalen Zellen *in-vitro* und *in-vivo* wurde die Retinsäure beschrieben⁵¹. Bereits 1982 erkannte Sidell anhand von *in-vitro* Untersuchungen die wachstumshemmende und Differenzierung-induzierende Wirkung von Retinsäure auf Neuroblastome⁵². Bei der Maturierung von unreifen Neuroblastomen kommt es vorrangig zur Ausbildung von neuronalen Schwanzzellen². Die Differenzierung-fördernden Eigenschaften von natürlichen und synthetischen Retinoiden stellen hierbei einen entscheidenden therapeutischen

Ansatz bei der Behandlung von nicht regredienten Tumoren dar. Besonders vielversprechende Ansätze ergeben sich daher bei der Behandlung von Neuroblastomen nach der meylablativen Megatherapie und hämatopoetischer Stammzelltransplantation in Kombination mit einer anschließenden Erhaltungstherapie anhand der verschiedenen Retinoide *all-trans* Retinsäure (ATRA), N-(4-hydroxy-phenyl)-Retinamid (4-HPR) und 13-*cis*-Retinsäure (13-*cis* RA), die eine erhöhte Heilungs- und Überlebensrate von Neuroblastom-Patienten beinhaltet^{53; 54; 55; 56; 57; 58}.

1.1.7.4 Anti-GD2 Antikörper-Therapie

In der Therapie von Neuroblastom-Patienten kommt es auch zum Einsatz von Antikörper-Behandlungen. Das Gangliosid GD2 ist ein Glykolipidantigen, das verstärkt und vornehmlich auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen exprimiert wird. Aufgrund dieses tumorspezifischen Markers werden monoklonale Anti-GD2 Antikörper in der Tumorthherapie von Neuroblastom-Patienten eingesetzt. GD2 findet man neben Neuroblastomen ausschließlich in normalen Geweben des peripheren Nervensystems und im Cerebellum. Eine unspezifische Wirkung durch eine Ausbreitung des Anti-GD2 Immunglobulins wird durch die Blut-Hirnschranke unterbunden. Ein monoklonaler Neuroblastom-spezifischer Anti-GD2 Antikörper ist ch14.18⁵⁹, der aufgrund des hohen immunstimulatorischen Potenzials bereits für den klinischen Einsatz etabliert wurde⁶⁰. ch14.18 ist ein chimeres Konstrukt und besteht aus einer murinen variablen Region des Anti-GD2 Antikörpers 14G2a und einer konstanten Region des humanen IgG₁-Moleküls. Durch ch14.18 kommt es zu einer Antikörper-vermittelten Zellyse von Neuroblastomen durch Bindung von Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen⁶¹. In einem zweiten Signalweg wird über ch14.18 das Komplementsystem aktiviert und die Zellyse von Neuroblastomzellen initiiert⁵⁹. Weiterhin wird ein dritter Effektormechanismus aus einer ch14.18-induzierten Zellyse über die Theorie des sogenannten „anti-idiotypischen Netzwerkes“ postuliert⁶². Die antigenen Determinanten jedes Immunglobulins lassen sich in Isotyp, Allotyp und Idiotyp unterteilen. Während die isotypische Spezifität alle Immunglobuline der selben Klasse (A, D, E, G und M) der schweren Kette umfasst und die allotypische Spezifität polymorphe individualspezifische Determinanten des konstanten Immunglobulinbereichs (Fc-Fragment) beschreibt (vergleichbar anderen Blutgruppenmerkmalen), bezieht sich die idiotypische Spezifität auf die variable antigenbindende Region des Immunglobulins (Fab-Fragment). Nach der Theorie des idiotypischen Netzwerkes stimuliert ein Antigen X die Synthese eines Antikörpers Ab1 (Idiotyp), der seinerseits antigene Wirkung zeigt und einen zweiten Klon zur Produktion eines Antikörpers Ab2 (sogenannter Anti-Idiotyp) anregt, der zu Ab1 komplementär ist. In weiteren Folgereaktionen stimuliert Ab2 die Generierung eines dritten Klons Ab3, der wiederum die Bildung weiterer anti-idiotypischer Antikörper anregt. Diese Form der Generierung von anti- und anti-anti-idiotypischen Antikörpern verstärkt in einem Netzwerk die Immunantwort durch klonale Selektion gegen die Tumorzelle⁶³.

1.2 Retinoide

1.2.1 Historie

Schon die Griechen der Antike waren mit der medizinischen Praxis der Ägypter vertraut und verabreichten bei Nachtblindheit verschiedene Leberextrakte und -säfte⁶⁴. Mit Beginn des 20. Jahrhunderts entdeckten Mc Collum und Davis (1913) einen für Ratten wachstumsfördernden Faktor aus der Butter und dem Eigelb, den sie „*fat-soluble A*“ bezeichneten. Die Struktur des Vitamin A wurde schließlich durch P. Karrer aufgeklärt⁶⁵. In den 40er Jahren gelang ebenfalls die Identifikation zur Beteiligung des Retinal als Chromophor am Sehprozess⁶⁶. Weitere

fundamentale historische Entdeckungen zeigten den Einfluss von Vitamin A in der Embryonalentwicklung⁶⁷, der Erhaltung des Immunsystems⁶⁸ und der Reproduktion⁶⁹. Vor 81 Jahren entdeckten Wolbach und Howe, dass Stammzellen unter Retinoidmangel nur unvollständig ausdifferenzierten⁷⁰. Sporn führte in den siebziger Jahren den Begriff der Chemoprävention in Zusammenhang mit Retinoiden ein⁷¹. Eine tertiäre Chemoprävention soll dabei das Krebsrisiko gefährdeter Personen für Zweitumore durch nicht toxische Substanzen auf der Ebene der Tumorentstehung, -promotion und -progression senken⁷².

1.2.2 Definition

Das fettlösliche Vitamin A ist ein allgemeiner Begriff, der jedes natürliche und synthetische Retinoid umschreibt, das ähnliche biologische Aktivität vergleichbar mit dem des Retinol besitzt⁷³. Vitamin A ist für den Sehvorgang, die Embryonalentwicklung und dem Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung von Zellen unentbehrlich. Laut der IUPAC-UAB (*International Union of Pure and Applied Chemistry – International Union of Biochemistry*) wird der Begriff eines Retinoids wie folgt definiert: „Retinoide gehören zu einer Klasse von Komponenten, die aus vier Isopreneinheiten bestehen, die in einer Kopf-Schwanz-Verbindung stehen; alle Retinoide können formell von einer monozyklischen Elternkomponente abgeleitet werden, die fünf C-C Doppelbindungen und eine funktionelle Gruppe am azyklischen Ende des Moleküls enthalten.“. Der Familie der Retinole (Vitamin A) gehören auch die Retinylester der Linol-, Öl-, Palmitin- und Stearinsäure an. Eine stufenweise Oxidation des Retinol bildet über das *all-trans* Retinaldehyd (*all-trans* Retinal) letztlich die *all-trans* Retinsäure (ATRA), die die eigentliche aktive Form darstellt. Diese drei Retinoide stellen die wichtigsten natürlichen Vertreter dar (Abbildung 1-2). Durch Umwandlung insbesondere der *all-trans* Retinsäure lassen sich durch Isomerasen und nicht enzymatische Reaktionen diverse Retinoid-Isomere, wie die 9-*cis*-, 11-*cis*-, 13-*cis*- und 9,13-di-*cis*-Retinsäure bilden⁷⁴. Mit Ausnahme der Sehfunktion sind die Retinsäure-Moleküle für alle biologischen Funktionen des Vitamin A verantwortlich⁷⁵.

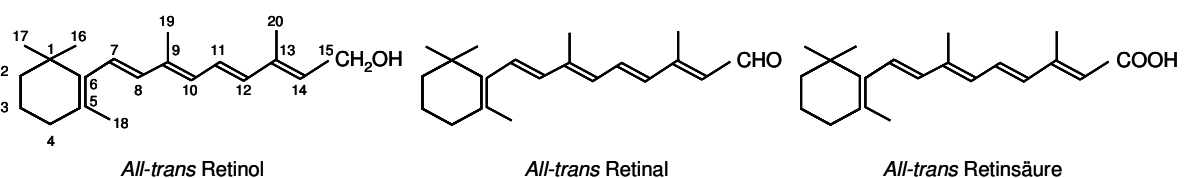


Abbildung 1-2: Strukturformeln wichtiger natürlicher Retinoide.

1.2.3 Metabolisierung und Retinoidrezeptoren

1.2.3.1 Transport von Retinoiden

Die über die Nahrung aufgenommenen Retinoide oder dessen Vorstufe (β -Carotin) werden in der Leber als Retinyl-Ester gespeichert. Im Blutkreislauf werden durch Bindung an Albumin alle lipophilen Komponenten transportiert. Für den vornehmlichen Transport des fettlöslichen Retinol existiert im Serum ein spezielles Retinol-Bindeprotein (RBP)⁷². Neben den extrazellulären Bindeproteinen existieren ebenfalls vier intrazelluläre Trägerproteine für den Transport von Retinoiden, die der Familie der Fettsäure-bindenden Proteine FABP (*fatty acid-binding protein*) angehören. Intrazellulär existieren zwei Retinol-bindende Proteine CRBPI und CRBP II (*cellular retinol-binding protein*). CRBPI und CRBP II sind in der Lage, intrazellulär *all-trans* Retinol, 13-*cis*-Retinol und *all-trans* Retinaldehyd zu binden^{76; 77}. Die zwei weiteren intrazellulären Retinsäure-Bindeproteine CRABPI und CRABP II (*cellular retinoic acid-binding protein*) binden

mit hoher Affinität die *all-trans* Retinsäure⁷⁷ und mit geringer Kapazität auch die Isomere 9-*cis*- und 13-*cis*-Retinsäure⁷⁸.

1.2.3.2 Regulierung des Retinsäurehaushaltes

Die biologisch aktive Form des Retinols stellt die *all-trans* Retinsäure dar. Die Regulierung und Balancierung des Retinsäuregehalts ist in der Zelle für die Erfüllung pluripotenter Funktionen entscheidend und erfolgt über die enzymatische Biosynthese und die Metabolisierung⁷⁴. Bei der Biosynthese von *all-trans* Retinsäure kommt es zunächst durch die Alkohol-Dehydrogenasen ADH-1, -2, -3 und -4 zu einer Oxidation des *all-trans* Retinol zu den *all-trans* und 9-*cis*-Retinaldehyden^{79; 80}. Hierbei wird durch die Alkohol-Dehydrogenasen bevorzugt an CRBPI gebundenes Retinol als Substrat bevorzugt. In einem zweiten Oxidationsschritt wird das *all-trans* Retinaldehyd durch Klasse 1 Aldehyd-Dehydrogenasen ALDH1A1, ALDH1A2 und ALDH1A3 zu *all-trans* und 9-*cis*-Retinsäure prozessiert^{81; 82}. Der Gegenspieler zur Biosynthese von biologisch aktivem ATRA ist der Metabolismus und die Inaktivierung des Retinoids. In einem Phase-I-Metabolismus von Retinsäuren kommt es durch die Expression von Cytochrom P450-Proteinen aus der CYP26-Familie⁸³ zur Bildung biologisch weniger aktiver und leichter ausscheidbarer Metabolite⁸⁴. Inzwischen sind aus der CYP26-Familie drei Cytochrom P450-Proteine bekannt, das Cytochrom P450RAI-1 (CYP26A1)⁸⁵, das Cytochrom P450RAI-2 (CYP26B1)⁸⁶ sowie das kürzlich klonierte Cytochrom P450 CYP26C1⁸⁷. Alle drei Cytochrome senken den intrazellulären Gehalt an biologisch aktiver *all-trans* Retinsäure durch Prozessierung des an CRABPI gebundenen ATRA⁸⁸ in 4-*oxo*-, 4-*hydroxy*- und 18-*hydroxy*-Intermediate. Ein weiterer abbauender Schritt ist der Phase-II-Metabolismus von Retinsäuren durch die Konjugation mit Glucoroniden. Durch eine β -Glucoronidierung mittels einer mikrosomalen UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) kommt es zur Bildung des besser wasserlöslichen Metaboliten *all-trans* Retinoyl- β -D-Glucoronid (*all-trans* RAG) aus *all-trans* Retinsäure⁸⁹. Die ausgeschiedenen Metabolite an Retinoid-Glucoroniden lassen sich endogen im Serum sowie im Urin nachweisen.

1.2.3.3 Nukleäre Retinoidrezeptoren

Die pluripotente Wirkung von Retinoiden, insbesondere von *all-trans* Retinsäure, erfolgt über spezifische nukleäre Rezeptoren⁷⁴, die als Ligand-aktivierte Transformationsfaktoren fungieren und an bestimmte DNA-Sequenzen (Response-Elemente) in der Promoterregion eines Gens binden und die Expression regulieren. Diese nukleären Rezeptoren bestehen aus einer DNA-bindenden und einer Ligand-bindenden Domäne. 1987 wurde erstmalig durch Petkovich⁹⁰ und Giguere⁹¹ die Existenz eines Retinsäure-Rezeptors beschrieben, der heute unter dem Namen RARA existiert. Unter den Rezeptoren unterscheidet man zwischen den Retinsäure-Rezeptoren RAR (*retinoic acid receptor*) und den Retinoid-X-Rezeptoren RXR (*retinoid x receptor*). Beide Retinoid-Rezeptoren gehören einer Superfamilie der steroidalen Hormonrezeptoren an, die den Vitamin D- und Thyroidhormon-Rezeptor mit einschließt⁹². Für die Retinoid-Rezeptoren RAR und RXR existieren jeweils ein α (RXRA, RARA), β (RXRB, RARB) und γ - (RXRG, RARG) Protein⁹³. Aus der Klasse der Retinsäure-Rezeptoren konnten bisher das RARA^{90; 91}, RARB^{94; 95} und RARG^{96; 97} identifiziert werden. *All-trans* Retinsäure bindet ausschließlich den RAR-Rezeptor. Im Gegensatz zu *all-trans* Retinsäure bindet 9-*cis*-Retinsäure an beide Rezeptorfamilien⁹⁸. Nach Bindung von ATRA an RAR kommt es durch Bindung dieses Komplexes an RXR zur Ausbildung eines RAR-RXR Heterodimers. In diesem Heterodimer fungiert RXR als auxiliäres Protein, dessen Aktivität vom Ligand unabhängig ist⁹⁹. Im Vergleich zu RAR erhält RXR auch als Homodimer die Bindungskapazität zum Liganden aufrecht. Da 9-*cis*-Retinsäure über RXR-Homodimere und RXR-Heterodimere mit anderen RXR-Rezeptoren ausbilden kann, könnte das biologische Wirkungsspektrum im Vergleich zu ATRA größer sein.

Nach Bindung des Liganden (Retinoid) an die nukleären Rezeptoren und der Ausbildung von Homo- und Heterodimeren wird die Funktion des Transkriptionsfaktors induziert. Durch diese Transaktivierung der sogenannten Retinsäure-Rezeptor-Response-Elemente RARE (*retinoic acid receptor response elements*) oder Retinoid-X-Response-Elemente RXRE (*retinoid x receptor response elements*) wird durch Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA die Regulation von Genen beeinflusst¹⁰⁰. Die meisten RARE und RXRE bestehen aus sich wiederholenden Halbelementsequenzen A(G)GGTCA mit einem Abstand von 1, 2 oder 5 Basenpaaren¹⁰¹. *All-trans* Retinsäure kann über die Bindung mit dem RARA-Rezeptor auch mit AP-1, einem allgemeinen Transkriptionsfaktor, über eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung an der AP-1 *binding site* interagieren und eine Transrepression hervorrufen. Durch Reduktion der AP-1 Expression und den damit gekoppelten und veränderten membranassoziierten Signalen für Hormone, Onkogene und Tumorsuppressoren wird eine mögliche Anti-Tumorwirkung durch Retinoide diskutiert¹⁰⁰.

1.2.3.4 Anwendung von natürlichen Retinoiden

Die Tatsache das Retinoide die Proliferation und Differenzierung von Zellen beeinflussen, macht sie zu interessanten Molekülen in der therapeutischen Anwendung bei Neuroblastom-Erkrankungen. Schon in den siebziger Jahren berichtete Sporn über die chemopräventiven Eigenschaften von Retinoiden⁷¹. Durch die Retinoid-vermittelte Induktion einer Ausdifferenzierung von blastoiden Zellen entstehen neuronale Zellstrukturen (Ganglioneurome), die mit einem Verlust der Malignität einhergehen. Bereits Anfang der 80er Jahre zeigten erste *in-vitro* Versuche mit Retinoiden eine antiproliferative Wirkung und Differenzierung von Neuroblastomzellen^{52; 102; 103}. Durch die Retinoid-induzierte Differenzierung in Neuroblastomzellen kommt es zur Ausbildung von Axon-, Gliazell- und neuronalen Strukturen¹⁰⁴. Weiterhin stimuliert *in-vitro* eine Behandlung von Neuroblastomzellen mit *all-trans* Retinsäure die Expression der Zelladhäsionsmoleküle HCAM, ICAM-1, NCAM, PECAM-1, VCAM-1 und HLA-A,B,C¹⁰⁵. Hinsichtlich der Differenzierung und antiproliferativen Wirkung auf Neuroblastomzellen wird der 9-*cis*-Retinsäure im Vergleich zu 13-*cis*- und *all-trans* Retinsäure ein größeres Potenzial zugeschrieben^{106; 107}. Durch Photoisomerisierung wurde die Differenzierung induzierende Wirkung zwischen *all-trans* Retinsäure und 9-*cis*-, 11-*cis*-, 13-*cis*- und 9,13-di-*cis*-Retinsäure anhand von embryonalen Karzinomzellen verglichen. Im Vergleich zu ATRA beträgt hier hingegen die Differenzierungsaktivität von 9-*cis*-, 11-*cis*-, 13-*cis*-Retinsäure nur 1/10, die der 9,13-di-*cis*-Retinsäure 1/100¹⁰⁸. Demnach besitzen die verschiedenen Tumortypen unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber den Retinoiden. Neben der Behandlung von Neuroblastomen^{53; 109} kommt es auch bei der akuten myeloischen Leukämie AML¹¹⁰, dem Brustkrebs¹¹¹, dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom¹¹², dem Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*)¹¹³, dem Schilddrüsenkarzinom¹¹⁴, den embryonalen Tumoren¹¹⁵ und dem Zervixkarzinom¹¹⁶ zu einer klinischen Anwendung von Retinoiden. Aufgrund einer höheren Toxizität sind 9-*cis*-Retinsäure und *all-trans* Retinsäure durch schlechtere pharmakokinetische Eigenschaften für eine *in-vivo* Behandlung im Vergleich zu 13-*cis*-Retinsäure weniger geeignet⁹⁹. Nachdem erste klinische Studien wenig Erfolg bei Patienten mit rezidivierendem Neuroblastom zeigten¹¹⁷, konzentriert man sich auf die Behandlung mit 13-*cis*-Retinsäure für eine Rezidivprophylaxe nach erfolgreicher myeloablativer Megatherapie und anschließender Stammzelltransplantation^{53; 118}. Neuroblastom-Patienten, die zusätzlich mit hohen Dosen an 13-*cis*-Retinsäure behandelt werden, zeigen dadurch deutlich höhere Überlebensraten⁵³.

1.2.3.5 4-HPR, ein synthetisches Retinoid

Das in der Tumorbilogie wohl populärste synthetische Retinoid ist das 4-HPR (N-(4-hydroxyphenyl)-Retinamid), das ebenfalls unter dem Namen Fenretinid bekannt ist. 4-HPR wurde durch R. Gander in den 60er Jahren synthetisiert und 1976 durch Sporn näher biologisch charakterisiert⁷¹.

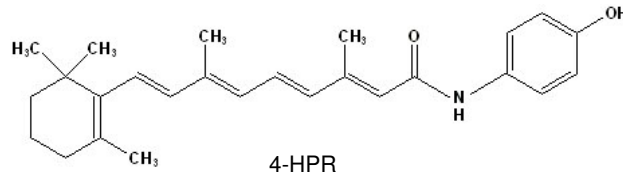


Abbildung 1-3: Strukturformel des durch R. Gander synthetisierten 4-HPR.

In einer Vielzahl von Tiermodellen ist die inhibitorische Wirkung von 4-HPR gegenüber den Tumoren der Brust¹¹⁹, Blase¹²⁰, Lymphknoten¹²¹, Prostata¹²² und Lunge¹²³ beschrieben. Klinische Anwendungen mit geringen 4-HPR Serum-Konzentrationen von 1 bis 3 μM zeigen ebenfalls chemopräventive Eigenschaften beim Brust-¹²⁴, Blasen-¹²⁵ und Mundhöhlenkarzinom¹²⁶. Gegenwärtig befindet sich die Anwendung von 4-HPR zur Behandlung von Neuroblastom-Patienten in einer laufenden Phase I-Studie^{127; 128}. Zunächst wurde *in-vitro* anhand von Zelllinien und *in-vivo* an gesunden Patienten die Toxizität von 4-HPR bestimmt. *In-vitro* kann bereits an verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien die Anti-Tumorwirkung von 4-HPR gezeigt werden^{109; 129}. Im Gegensatz zu den natürlichen Retinoiden, die das Tumorstadium über die Induktion von Differenzierung und antiproliferativer Wirkung beeinflussen, wirkt 4-HPR auf die Zellen zytotoxisch durch die Aktivierung einer Apoptose^{109; 129; 130}. Die Wirkung von 4-HPR kann im Vergleich zu den natürlichen Retinoiden über Retinsäure-Rezeptoren (RAR) und RAR-unabhängige Mechanismen vermittelt werden^{131; 132}.

1.2.3.6 Nebenwirkung von Retinoiden

Durch Retinsäuren werden multiple unerwünschte Nebenwirkungen erzeugt. Dosislimitierend werden unter anderem Anämie, Exantheme, Hyperkalzämie, Übelkeit, Thrombozytopenie, die nach Therapieabbruch sistierten, beobachtet. Viele Patienten leiden unter gewisser Hauttoxizität, die sich in Form von trockener und schuppender Haut, Cheilitis, Konjunktivitis und erythematöse makulopapulöse Effloreszenz äußert¹¹⁸. Im Vergleich zu den natürlichen Retinoiden besitzt 4-HPR *in-vivo* eine geringere Toxizität und damit auch eine bessere Verträglichkeit bei den Patienten¹³³.

1.3 DNA-Microarray-Technologie

Basierend auf der vollständigen Genomsequenzierung seit dem Jahr 2001 und der daraus resultierenden Menge an genetischen Informationen eröffneten sich unerwartete Dimensionen in der molekularbiologischen Forschung. Für die darauf basierenden Anwendungen entstand der Begriff der funktionellen Genomik¹³⁴. Hinter dem Begriff der funktionellen Genomik verbirgt sich die Untersuchung aller exprimierten Gene in einer Zelle zu einem Zeitpunkt in Abhängigkeit von verschiedenen Zuständen wie Krankheit, Wachstum und schwankenden Umweltbedingungen¹³⁵. Die Technologie des DNA-Microarrays entwickelte sich ursprünglich aus dem klassischen Southern und Northern Blot zur Detektion spezifischer DNA und RNA^{136; 137}. Die DNA-Array-Technologie basiert auf der Hybridisierung zwischen markierten Oligonukleotid-Populationen mit immobilisierten DNA-Sequenzen (Sonden, Oligonukleotide), die sich auf der Oberfläche von

Nylonmembranen ¹³⁸, Glas ¹³⁹ oder Silizium ¹⁴⁰ befinden können. Ein DNA-Microarray besteht aus vielen einzelnen DNA-Sonden (*probes*), die an definierte Positionen (*spots*) eines Rasters (*array*) an eine feste Oberfläche gebunden sind. Die fortschreitende Automatisierung ermöglicht gegenwärtig das Aufbringen von über 500.000 DNA-Sonden auf einen Träger ^{141; 142}. Zusätzlich kann nach Markierung von zwei unterschiedlichen Oligonukleotid-Populationen mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen eine simultane Hybridisierung durchgeführt werden ¹⁴³. Ähnlich wie der DNA-Microarray ist die SAGE-Analyse (*Serial Analysis of Gene Expression*) eine weitere Methode zur simultanen Untersuchung des Genexpressionsmusters verschiedener Gewebe oder Zellen ¹⁴⁴. Die DNA-Microarray-Analyse beginnt zunächst mit einer Extraktion der Gesamt-RNA. Nach Synthese der komplementären cDNA durch eine Reverse Transkriptase erfolgt mittels einer *In-vitro*-Transkription (IVT) die Bildung einer Biotin-markierten cRNA. Im Anschluß wird die fragmentierte cRNA mit dem DNA-Microarray hybridisiert, mit Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) gefärbt und das SAPE-vermittelte Signal im Scanner gemessen. Durch einen Anti-Streptavidin Antikörper lässt sich zusätzlich eine Verstärkung des Messsignals erzielen.

Diese Anwendung ermöglicht immer umfassendere Datenmengen von Genexpressionsprofilen in einem Experiment innerhalb kürzester Zeit zu generieren ¹⁴⁵. Diese Eigenschaften erklären die verstärkte Anwendung der DNA-Microarray-Technologie in der naturwissenschaftlichen und klinischen Forschung sowie deren Publikation in wissenschaftlichen Fachzeitschriften (Abbildung 1-4). Der Vorteil eines DNA-Microarrays liegt in der funktionellen Genomik. Durch Bestimmung des Transkriptoms, der Summe aller exprimierten Gene, lässt sich das Expressionsprofil einer Zelle identifizieren und vergleichen.

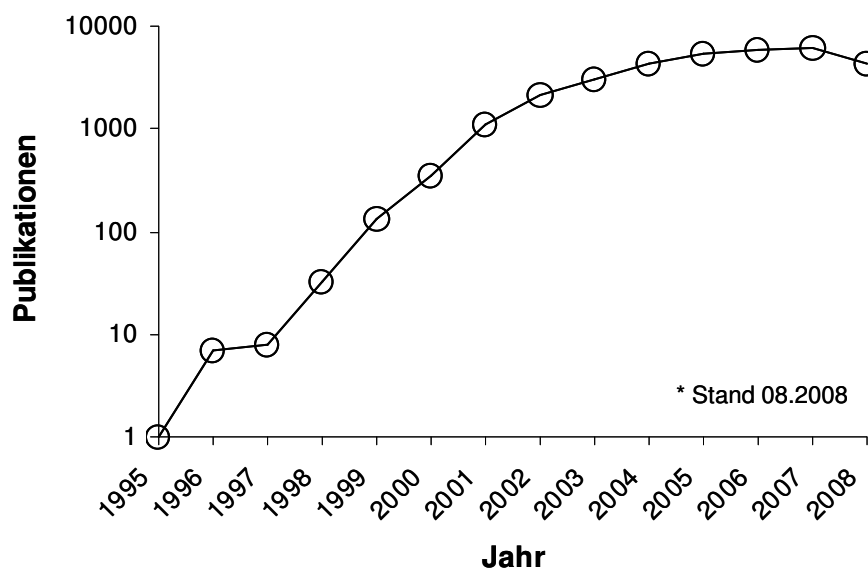


Abbildung 1-4: Anzahl der auf der Microarray-Technologie basierenden Publikationen. Die logarithmisch dargestellte Zahl an Publikationen, welche unter Verwendung von Microarrays erstellt wurden, wurde durch Eingabe der Suchkriterien „Microarr“ und „Jahreszahl“ in die Entrez-Metasuchmaschine der biomedizinischen Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov) gewonnen.

Das Transkriptom ist im Vergleich zum Genom dynamisch und ständigen Änderungen unterworfen ¹⁴⁶. Anhand des Microarrays ließen sich trotz dieser schwankenden Eigenschaften in der Vergangenheit diverse Tumore durch ihr charakteristisches Expressionsprofil von anderen abgrenzen, klinisch genauer definieren und vor allem gezielter therapieren ¹⁴⁷.

2 ZIELSTELLUNG

Das Neuroblastom, ein extrakranieller, solider und maligner Tumor im Kindesalter¹⁴⁸, ist von der Histologie wie der Ewing-Tumor, das Rhabdomyosarkom und einige Lymphome der Familie der kleinen, rund und blauzelligen Tumore (*SRBCT; small round blue cell tumours*) zuzuordnen¹⁴⁹. Momentan orientiert sich die Behandlung an der Therapiestudie „NB 2004“ der Gesellschaft für Pädiatrie und onkologische Hämatologie (GPOH). Die vielversprechendsten Behandlungsmethoden sind die myeloablative Chemotherapie in Kombination mit einer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen^{47; 48} sowie die immunologische Therapie mit einem Anti-GD2 Antikörper⁶⁰. Da insbesondere Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium häufig ein Rezidiv erleiden, sind die aktuellen Behandlungsformen noch unbefriedigend und zu verbessern^{148; 150}. Aus diesem Grund ist man bemüht, neue und effektivere Behandlungsstrategien zu entwickeln^{151; 152; 153}. Das Neuroblastom entspricht einer unreifen, blastoiden Zelle, die aus einer neuroepithelialen Vorläuferzelle der Neuralleiste hervorgeht^{103; 154; 155; 156; 157; 158; 159}. Dieser niedrige Entwicklungsfortschritt macht das nur unvollständig ausdifferenzierte Neuroblastom für eine Behandlung mit Differenzierung-induzierenden Derivaten des Vitamin A besonders empfänglich. Das Ziel dieser Arbeit lag in der Untersuchung der differentiellen Genexpression von Retinoid-behandelten Neuroblastomzellen mittels der DNA-Microarray-Analyse. Da Retinsäure bereits routinemäßig in der Therapie angewendet wird, sollten die Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen einer Wachstumshemmung und Differenzierungs-Induktion durch die natürliche *all-trans* Retinsäure und das synthetische Retinoid 4-HPR anhand von Neuroblastom-Zelllinien näher charakterisiert und verglichen werden. Aufgrund des gemeinsamen neuroektodermalen Ursprungs wurden sowohl Zelllinien aus der Familie der Neuroblastome als auch der Ewing-Tumore mit Retinoiden behandelt und bezüglich der Sensitivität und der Differenzierungs-Eigenschaften verglichen. Ein weiterer Bestandteil der Untersuchungen war, das Potenzial zur Induktion einer Differenzierung und die damit verbundene Änderung des Expressionsprofils sowohl zwischen den verschiedenen Neuroblastomzellen als auch dem 4-HPR und der *all-trans* Retinsäure zu vergleichen. Als synthetisches Retinoid rückt besonders 4-HPR in den Blickpunkt, da es sich laut einer neueren Studie durch eine besonders gute Verträglichkeit auszeichnet. *All-trans* Retinsäure ist im Gegensatz zu 4-HPR weniger verträglich. Jedoch ist die direkt in die Zelle aufgenommene oder über die *de-novo*-Synthese gebildete *all-trans* Retinsäure eine natürliche Variante des Vitamin A, die intrazellulär die biologisch aktivste Form unter den Retinoiden darstellt. Eine anschließende Verifizierung der differentiell exprimierten Gene durch RT-PCR, quantitative *real-time* RT-PCR, Western Blot und Durchflusszytometrie sollte neben einer näheren Charakterisierung der Differenzierung auch neue therapeutische Zielstrukturen identifizieren, um die Wirksamkeit der Behandlungsmethoden zu verbessern. Die *in-vitro* Untersuchungen zur gezielten Ausdifferenzierung eines Neuroblastoms zu neuronalen Strukturen, die zugleich mit dem Verlust der Malignität einhergeht, sollte letztlich auch zum besseren Verständnis der bisher ungeklärten Regression von spontan differenzierten Neuroblastomen dienen, wie sie beispielsweise bei Patienten des Stadium IVs zu beobachten ist.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den Firmen VWR (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck Eurolab (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München) bezogen.

2 nd -Strand-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid-Bis-Lösung (37, 5:1)	Merck KGat, Darmstadt
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Antifoam	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Biotin-CTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Biotin-UTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Biotin-Anti-Streptavidin-AK	Vector Laboratories, Burlingame, USA
BSA	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth Chemie, Karlsruhe
Control Oligonucleotide B2	Affymetrix, Inc., Santa Clara, USA
DEPC-Wasser	Ambion, Austin, USA
DMSO	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
DNA-Ligase (<i>E. coli</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Polymerase I (<i>E. coli</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Probenpuffer	MBI Fermentas
dNTP-Mix (10 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol (96%)	Sigma Aldrich, Steinheim
Eucaryotic Hybridization Controls	Affymetrix, Inc., Santa Clara, USA
Hering-Sperma DNA	Promega, Mannheim
Humanes Serum-Albumin	Bayer, Wuppertal
MEGAscript T7 Kit	Ambion, Austin, USA
Milchpulver, fettarm (Sucofin)	TSI-Trade Service International
PBS	Biochrom, Berlin
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Phycoerythrin Streptavidin	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
RNaseH	Invitrogen, Karlsruhe
RNaseZap®	Ambion, Austin, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SSPE	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Superscript Choice System	Invitrogen, Karlsruhe
T7-(dT)24-Primer	Invitrogen, Karlsruhe

Tris-gepuffertes Phenol	Fluka (Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim)
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Tween-20	Pierce Chemicals, Rockford, USA

3.1.2 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer, Lösungen und Nährmedien

Wenn nicht anders angegeben, wurden sämtliche Puffer, Lösungen und Nährmedien mit deionisiertem (bidestilliertem) Wasser hergestellt.

10x PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

80 g/l NaCl; 2 g/l KCl; 11,5 g/l Na₂HPO₄; 2,4 g/l KH₂PO₄; pH 7,4

MACS (*Magnetic Cell Sorting*)-Puffer

1x PBS; 2 mM EDTA; 0,5% BSA

RIPA (*Radioimmunoprecipitation*)-Puffer

1% Igepal CA-300; 0,1% SDS in PBS; 0,5% Natriumdesoxycholat; 10% Protease- und 10% Phosphataseinhibitorcocktail (Fa. Sigma)

5x SDS-PAGE-Probenpuffer

250 mM Tris; 10 mM EDTA; 5% (w/v) SDS; 0,005% β-Mercaptoethanol; pH 6,8

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer

1,5 M Tris/HCl; pH 6,8

SDS-PAGE-Trenngelpuffer

1,0 M Tris/HCl; pH 6,8

SDS-PAGE-Laufpuffer

25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,6

Western Blot-Transferpuffer

25 mM Tris/HCl; 150 mM Glycerol; 20% (v/v) Methanol; pH 8,3

TBST (*Tris Buffered Saline + Tween*)

50 mM Tris; 150 mM NaCl; 1% Tween-20; pH 7,5

Stripping-Puffer

62,5 mM Tris; 2% (w/v) SDS; 100 mM β-Mercaptoethanol; pH 6,8

50x TAE (*Tris-Acetat-EDTA*)

2,0 M Tris; 50 mM EDTA; 1M Eisessig; pH 8,3

5x Fragmentierungspuffer

0,25 M Tris/Acetat; 32,4 g/l MgOAc; 49 g/l KOAc; pH 8,1

5x RNA-Probenpuffer

50% Glycerol; 1 mM EDTA; 0,4% Bromphenolblau

5x DNA-Probenpuffer

250 mM Tris-HCl; 0,2% Bromphenolblau; 40% Glycerol; pH 7,5

2x Hybridisierungspuffer

200 mM MES; 2 M NaCl; 40 mM EDTA; 0,02% Tween-20

12x MES (2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure)-Lösung

1,22 M MES; 0,89 M MES-Natriumsalz; pH 6,5

Non Stringent Wash A-Puffer

6x SSPE (20x SSPE-Stock: 3 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 0,02 M EDTA); 0,1% Tween-20; 0,005% Antifoam

Stringent Wash B-Puffer

100 mM MES; 0,1 M NaCl; 0,01% Tween-20

2x Färbepuffer

200 mM MES; 2 M NaCl; 0,1% Tween-20; 0,01% Antifoam

LB-Medium

8g/l NaCl; 10g/l Pepton; 5g/l Hefeextrakt; pH 7,0

S.O.C.-Medium

2% Trypton; 0,5% Hefe-Extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glukose; pH 7,0

Minipräp-Lösung I

50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM TRIS HCl; pH 8,0

Minipräp-Lösung II

0,2 M NaOH; 1 % SDS; pH 12,5–13

Minipräp-Lösung III

3 M KOAc

TE (1x)

1 M TRIS-HCl; 0,5 M EDTA

3.1.3 Verwendete Zelllinien, Gewebe und Medien für eukaryontische Zellkulturen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) oder der American Type Culture Collection (ATCC, Maryland, USA) bezogen. Für Expressionsuntersuchungen wurde die Gesamt-RNA verschiedener humaner Gewebeproben der Fa. Becton Dickinson (Heidelberg) verwendet.

SH-SY5Y

Beschreibung: humanes Neuroblastom
Anmerkung: dreifach klonierte Unterzelllinie der 1970 etablierten neuroepithelialen Zelllinie SK-N-SH aus der Knochenmarksbiopsie eines 4-jährigen Mädchens mit einem metastasierten Neuroblastom ¹⁶⁰
Herkunft: DSMZ
ID: DSMZ ACC 209
Kulturmedium: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM); 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 20% Fetales Kälberserum (FKS)

SIMA

Beschreibung: humanes Neuroblastom
Anmerkung: Adrenaler Tumor eines 20-monatigen männlichen Neuroblastom-Patienten mit Tumorstadium III ¹⁶¹
Herkunft: DSMZ
ID: DSMZ ACC 164
Kulturmedium: *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI1640); 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 10% FKS

CHP-126

Beschreibung: humanes Neuroblastom
Anmerkung: Etablierung aus einer großen retroperitonealen Masse einer 14 Monate alten weiblichen Neuroblastom-Patientin ¹⁶²
Herkunft: DSMZ
ID: DSMZ ACC 304
Kulturmedium: RPMI1640-Medium; 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 20% FKS

CHP-134

Beschreibung: humanes Neuroblastom
Anmerkung: 1976 etabliert durch Schlesinger *et al.* ¹⁶²
Herkunft: Prof. Dr. F. Berthold (Klinikum der Universität zu Köln)
Kulturmedium: DMEM; 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 10% FKS

IMR-5

Beschreibung: humanes Neuroblastom
Anmerkung: Etabliert aus Biopsie eines männlichen Tumorpatienten ¹⁶³
Herkunft: Prof. Dr. F. Berthold (Klinikum der Universität zu Köln)
Kulturmedium: RPMI1640-Medium; 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FKS

IMR-32

Beschreibung: humanes Neuroblastom
Anmerkung: Abdominale Masse eines mit Neuroblastom diagnostizierten 1 Jahr alten männlichen Patienten ¹⁶⁴
Herkunft: DSMZ
ID: DSMZ ACC 165
Kulturmedium: RPMI1640-Medium; 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FKS

KELLY

Beschreibung: humanes Neuroblastom

Anmerkung: Neuroblastom-Patient mit 100-facher MYCN Amplifikation²³
Herkunft: DSMZ
ID: DSMZ ACC 355
Kulturmedium: RPMI1640-Medium; 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FKS

SK-N-MC

Beschreibung: humaner Ewing-Tumor (initial als Neuroblastom beschrieben)
Anmerkung: Etablierung aus einer Metastase¹⁶⁰
Herkunft: DSMZ
ID: DSMZ ACC 203
Kulturmedium: DMEM; 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 10% FKS

A673

Beschreibung: humaner Ewing-Tumor
Herkunft: ATCC
ID: ATCC CRL-1598
Kulturmedium: DMEM; 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 10% FKS

HEK293

Beschreibung: humane embryonale Nierenzelllinie
Anmerkung: Zellen aus primären humanen embryonalen Nierenzellen, transfiziert mit fragmentierter Adenovirus (AD 5)-DNA¹⁶⁵
Herkunft: ATCC
ID: ATCC CRL-1573
Kulturmedium: DMEM; 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 10% FKS

HT-1080

Beschreibung: humanes Fibrosarkom
Anmerkung: Fibrosarkom-Biopsie eines 35 jährigen männlichen Patienten ohne Chemo- oder Strahlentherapie¹⁶⁶
Herkunft: DSMZ
ID: DSMZ ACC 315
Kulturmedium: DMEM; 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 10% FKS

NALM-6

Beschreibung: humane akute lymphoblastische Pre-B-Zell-Leukämie (B-ALL)
Anmerkung: Etablierung aus dem peripherem Blut eines 19 jährigen männlichen Patienten mit Rezidiv einer ALL¹⁶⁷
Herkunft: DSMZ
ID: DSMZ ACC 128
Kulturmedium: RPMI1640-Medium; 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FKS

Jurkat

Beschreibung: humane akute lymphoblastische T-Zell Leukämie (T-ALL)
Anmerkung: Etablierung aus dem peripherem Blut eines 14 jährigen männlichen Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL)¹⁶⁸
Herkunft: Prof. Dr. J. Langner (Universität Halle-Wittenberg)
Kulturmedium: RPMI1640-Medium; 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 10% FKS

CSIII

Beschreibung:	lymphoblastoide Zelllinie (LCL)
Anmerkung:	Epstein-Barr-Virus (EBV) immortalisierte B-Zelllinie
Herkunft:	PD Dr. M.S. Staeger (Universität Halle-Wittenberg)
Kulturmedium:	X-VIVO15-Medium

10BK.1

Beschreibung:	zytotoxischer T-Zellklon der Maus
Anmerkung:	T-Zell-Klon aus Ovalbumin (OVA) immunisierten (B10 x B10BR)F1 Mäusen etabliert ¹⁶⁹
Herkunft:	Prof. Dr. A.B. Reske-Kunz (Universität Mainz)
Kulturmedium:	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (IMDM); 2 mM L-Glutamin; 6 U/ml humanes IL-2; 5 x 10 ⁻⁵ M β -Mercaptoethanol; 1% Penicillin/Streptomycin; 50% FKS

Alle hier aufgeführten Zellkulturmedien und Zusätze wurden von den Firmen Biochrom AG (Berlin) und Cambrex (BioWhittaker; Walkersville; USA) bezogen. Das für die Bystanderlyse verwendete Interleukin-2 und Octapeptid SIINFEKL wurde von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim) bzw. WITA GmbH (Teltow) bezogen. Für die Induktion der Differenzierung wurden die Retinoide *all-trans* Retinsäure und 4-HPR der Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim) verwendet. Der Tyrosinkinase-Inhibitor STI-571 wurde freundlicherweise von M. Hehme und G. Hörning (Fa. Novartis) zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Sequenzen verwendeter siRNA- und miRNA-Oligonukleotide sowie RT-PCR-Primer**siRNA- und miRNA-Oligonukleotide**

Alle in der Arbeit verwendeten siRNA- und miRNA-Oligonukleotide wurden von den Firmen Qiagen (Hilden) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 3-1: Verwendung synthetischer siRNA- oder endogen synthetisierter miRNA-Oligonukleotide

Bezeichnung	Zielsequenz (5' → 3')	Hersteller
ASCL1 siRNA 1	CCC GAA CTG ATG CGC TGC AAA	Fa. Qiagen
ASCL1 siRNA 2	CTC CAA CGA CTT GAA CTC CAT	Fa. Qiagen
ASCL1 siRNA 3	CCG CGT CAA GTT GGT CAA CCT	Fa. Qiagen
ASCL1 siRNA 4	GGC CAA CAA GAA GAT GAG TAA	Fa. Qiagen
Kontroll-siRNA, FITC-markiert	AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT	Fa. Qiagen
Kontroll-siRNA, Alexa Fluor488 markiert	AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT	Fa. Qiagen
ASCL1 miRNA (<i>top strand ssOligo</i>)	TGC TGA GTT GGT GAA GTC GAG AAG CTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC AGC TTC TCC TTC ACC AAC T	Fa. Invitrogen
ASCL1 miRNA (<i>bottom strand ssOligo</i>)	CCT GAG TTG GTG AAG GAG AAG CTG TCA GTC AGT GGC CAA AAC AGC TTC TCG ACT TCA CCA ACT C	Fa. Invitrogen

RT-PCR-Primer**Tabelle 3-2: Verwendete Primer für die RT-PCR**

Genname	Sequenz	Produktgröße (bp)
ACTB	Sense: 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3'	613

Genname	Sequenz	Produktgröße (bp)
ASCL1	Antisense: 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3' Sense: 5'-TCGCACAACCTGCATCTTTA-3'	277
c-MYC	Antisense: 5'-CTTTTGCACACAAGCTGC AT-3' Sense: 5'-CCTACCCTCTCAACGACAGC-3'	248
CD34	Antisense: 5'-CTCTGACCTTTTGCCAGGAG-3' Sense: 5'-GCAAGCCACCAGAGCTATTC-3'	426
CD54	Antisense: 5'-AAGGGTTGGGCGTAAGAGAT-3' Sense: 5'-CAGAGGTTGAACCCACAGT-3'	486
CD117	Antisense: 5'-CATTGGAGTCTGCTGGGAAT-3' Sense: 5'-AGGTTGTGGAGGCAACTGCT-3'	650
CD133	Antisense: 5'-TCTTTGTGATCCGACCATGA-3' Sense: 5'-GCCACCGCTCTAGATACTGC-3'	280
CD184	Antisense: 5'-TGTTGTGATGGGCTTGCAT-3' Sense: 5'-CTGAGAAGCATGACGGACAA-3'	276
CDKN1C	Antisense: 5'-GACGCCAACATAGACCACCT-3' Sense: 5'-CACGATGGAGCGTCTTGTC-3'	256
CYP26B1	Antisense: 5'-CACCGTCTCGCGGTAGAAC-3' Sense: 5'-TGACAGGATCCCTGTGTTGT-3'	216
CCND1	Antisense: 5'-CCAACATCGAAAGTGCTTCA-3' Sense: 5'-CCACTTGAGCTTGTTACCA-3'	203
DLK1	Antisense: 5'-AACTACCTGGACCGCTTCCT-3' Sense: 5'-ACGATGGCCTCTATGAATGC-3'	298
EWS-FLI1	Antisense: 5'-CTGCAGGTCTTGTGCGATGAA-3' Sense: 5'-CCACTAGTTACCCACCCCAAAC-3'	331
GAPDH	Antisense: 3'-GTGATACAGCTGGCGTTG GCG-3' Sense: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'	194
GFAP	Antisense: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3' Sense: 5'-GCAGAGATGATGGAGCTCAATGACC-3'	265
HES-1	Antisense: 5'-GTTTCATCCTGGAGCTTCTGCCTCA-3' Sense: 5'-TGAGCCAGCTGAAAACACTG-3'	294
IGFBP2	Antisense: 5'-CATTGATCTGGGTCATGCAG-3' Sense: 5'-CCTCAAGTCGGGTATGAAGG-3'	268
IGFBP4	Antisense: 5'-GAGGTTGTACAGGCCATGCT-3' Sense: 5'-GTGACCACCCCAACAACAG-3'	299
IGFBP6	Antisense: 5'-ATCCAGAGCTGGGTGACACT-3' Sense: 5'-GCTGTTGCAGAGGAGAATCC-3'	259
LIPI	Antisense: 5'-GGTAGAAGCCTCGATGGTCA-3' Sense: 5'-TCCGAGAATAGAGACCATTCTGA-3'	653
MBP	Antisense: 5'-GCTCTCTGGTGGTTGCATTT-3' Sense: 5'-ACACGGGCATCCTTGACTCCATCGG-3'	386
MYCN	Antisense: 5'-TCCGGAACCAGGTGTTTTTCAGCG-3' Sense: 5'-CTTCGGTCCAGCTTTCTCAC-3'	200
NFH	Antisense: 5'-GTCCGAGCGTGTTCATTTT-3' Sense: 5'-CTGGACGCTGAGCTGAGGAA-3'	315
NFL	Antisense: 5'-CAGTCACTTCTCAGTCACT-3' Sense: 5'-TCCTACTACACCAGCCATGT-3'	283
NFM	Antisense: 5'-TCCCCAGCACCTTCAACTTT-3' Sense: 5'-TGGGAAATGGCTCGTCATTT-3'	332
NeuroD1	Antisense: 5'-CTTCATGGAAGCGGCCAATT-3' Sense: 5'-CCGACAGAGCCCAGATGTAGTTCTT-3'	522
NPY	Antisense: 5'-GCCCCAGGGTTATGAGACTATCACT-3' Sense: 5'-CCTCATCACCAGGCAGAGAT-3'	101
NOTCH-2	Antisense: 5'-AGCCGAGTTCTGGGAACATT-3' Sense: 5'-AGGATGCAATGGATTTGAGC-3'	151
RARA	Antisense: 5'-CTGCCTTTGGGGATAGGTTT-3' Sense: 5'-CTGAGAGCTACACGCTGACG-3'	262
RARB	Antisense: 5'-TTGAGGAGGGTGATCTGGTC-3' Sense: 5'-GGTTTCACTGGCTTGACCAT-3'	435
RXRA	Antisense: 5'-TGCACCTTTAGCACTGATGC-3' Sense: 5'-CCTTTCTCGGTCATCAGCTC-3'	207

Genname	Sequenz	Produktgröße (bp)
RXRB	Antisense: 5'-CTTGGTGAAGGAAGCCATGT-3' Sense: 5'-CAGCCCCCAGATTAAGTCAA-3'	438
SCF	Antisense: 5'-ATCCTGTCCACAGGCATCTC-3' Sense: 5'-TTTGCCAAGTCATTGTTGGA-3'	347
SDF-1	Antisense: 5'-GATTTTTGGCCTTCCCTTTC-3' Sense: 5'-GTGGTCGTGCTGGTCCTC-3'	215
SYP	Antisense: 5'-CTTAAACACGAACACAGGT-3' Sense: 5'-CTTCCTGCAGAACAAAGTACC-3'	295
Wnt1	Antisense: 5'-CCCCTCAGCTGTGCAGGATC-3' Sense: 5'-ATGGGGCTCTGGGCGCTGTTGC-3'	253
Vektor pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR (Ligation mit miRNA)	EmGFP <i>forward sequencing primer</i> 5'-GGCATGGACGAGCTGTACAA-3' miRNA <i>reverse sequencing primer</i> 5'-CTCTAGATCAACCACTTTGT-3'	282
Vektor pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR (Ligation ohne miRNA)	EmGFP <i>forward sequencing primer</i> 5'-GGCATGGACGAGCTGTACAA-3' miRNA <i>reverse sequencing primer</i> 5'-CTCTAGATCAACCACTTTGT-3'	218

Alle hier aufgeführten HPSF aufgereinigten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bzw. Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

3.1.5 Antikörper für die Western Blot-Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper für die Western Blot-Analyse wurden von den Firmen Santa Cruz Biotechnology (San Diego; USA) und Pharmingen (Heidelberg) geliefert.

Tabelle 3-3: Verwendete Western Blot-Antikörper

Bezeichnung	Wirt	Hersteller
Anti-human β -Aktin (C2), monoklonal	Maus	Fa. Santa Cruz Biotechnology
Anti-human MYCN (C-19), polyklonal	Kaninchen	Fa. Santa Cruz Biotechnology
Anti-human c-MYC, monoklonal	Maus	Fa. Pharmingen
Anti-human FLI1 (C-19), polyklonal	Kaninchen	Fa. Santa Cruz Biotechnology
Anti-human CD184 (H-118), polyklonal	Kaninchen	Fa. Santa Cruz Biotechnology
Anti-human CD117 (M14), polyklonal	Ziege	Fa. Santa Cruz Biotechnology
Anti-Maus, HRP-konjugiert	Ziege	Fa. Santa Cruz Biotechnology
Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	Ziege	Fa. Santa Cruz Biotechnotogy
Anti-Ziege, HRP-konjugiert	Kaninchen	Fa. Santa Cruz Biotechnology

3.1.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Tabelle 3-4: Verwendete Fluoreszenz-markierte Antikörper in der Durchflusszytometrie

Spezifität	Marker	Klon	Isotyp	Hersteller	Spezifität	Marker	Klon	Isotyp	Hersteller
Isotyp	PE	X40	IgG ₁	BD	CD49b	FITC	10G11	IgG ₁	Immunotools
Isotyp	PE	X39	IgG _{2a}	BD	CD49f	FITC	NKI-GoH3	IgG _{2a}	Immunotools
Isotyp	FITC	X40	IgG ₁	BD	CD52	PE	CF1D12	IgG ₃	Caltag
Isotyp	FITC	MOPC-21	IgG _{1, κ}	BD	CD53	PE	HI29	IgG _{1, κ}	BD
Isotyp	FITC	713	IgG _{2a}	Immunotools	CD54	PE	HA58	IgG _{1, κ}	BD

Spezifität	Marker	Klon	Isotyp	Hersteller	Spezifität	Marker	Klon	Isotyp	Hersteller
Isotyp	FITC	G155-178	IgG _{2a} , κ	BD	CD54	FITC	MEM-111	IgG _{2a}	Immunotools
Isotyp	FITC	G155-228	IgM, κ	BD	CD56	PE	B159	IgG ₁ , κ	BD
CD1a	PE	HI149	IgG ₁ , κ	BD	CD57	FITC	NK-1	IgM, κ	BD
CD2	FITC	RPA-2.10	IgG ₁ , κ	BD	CD58	PE	(AICD58.6)	IgG _{2a} , κ	BD
CD3	FITC	HIT3a	IgG _{2a} , κ	BD	CD59	PE	p282 (H19)	IgG _{2a} , κ	BD
CD4	PE	SK3	IgG ₁ , κ	BD	CD61	FITC	VI-PL2	IgG ₁ , κ	BD
CD5	FITC	IC12	IgG ₁	Immunotools	CD63	FITC	MEM-259	IgG ₁	Immunotools
CD6	FITC	MEM-98	IgG ₁	Immunotools	CD64	FITC	10. Jan	IgG ₁ , κ	BD
CD7	FITC	7F3	IgG ₁	Immunotools	CD65w	FITC	88H7	IgG ₁ , κ	Immunotech
CD8	FITC	HIT8a	IgG ₁ , κ	BD	CD65	FITC	88H7	IgM, κ	Immunotools
CD9	PE	M-L13	IgG ₁ , κ	BD	CD66b	FITC	B13.9	IgG ₁	Immunotools
CD10	FITC	W8E7	IgG _{2a}	BD	CD66acde	FITC	IH4Fc	IgG ₁	Immunotools
CD11a	FITC	TB-133	IgG ₁	Immunotools	CD69	PE	L78	IgG ₁	BD
CD11b	FITC	B2	IgM, κ	Immunotools	CD71	FITC	L01.1	IgG _{2a}	BD
CD11c	PE	B-ly6	IgG ₁ , κ	BD	CD72	FITC	J4-117	IgG _{2b} , κ	BD
CD13	PE	L138	IgG ₁	BD	CD77	FITC	5B5	IgM, κ	BD
CD14	FITC	MOP9	IgG _{2b}	BD	CD79a	PE	HM47	IgG ₁ , κ	BD
CD15	FITC	MMA	IgM, κ	BD	CD79b	PE	CB3.1	IgG ₁ , κ	BD
CD16	PE	3G8	IgG ₁ , κ	BD	CD80	PE	L307.4	IgG ₁	BD
CD18	PE	06. Jul	IgG ₁ , κ	BD	CD81	PE	JS-81	IgG ₁ , κ	BD
CD19	FITC	4G7	IgG ₁ , κ	BD	CD83	PE	HB15e	IgG ₁ , κ	BD
CD20	FITC	2H7	IgG _{2b} , κ	BD	CD86	FITC	2331	IgG ₁ , κ	BD
CD21	PE	B-ly4	IgG ₁ , κ	BD	CD95	FITC	DX2	IgG ₁	BD
CD23	PE	M-L233	IgG ₁ , κ	BD	CD99	PE	TÜ12	IgG _{2a} , κ	BD
CD22	PE	S-HCL-1	IgG _{2b}	BD	CD101	PE	V7.1	IgG ₁ , κ	BD
CD24	PE	ML5	IgG _{2a} , κ	BD	CD103	FITC	2G5	IgG _{2a}	Immunotools
CD25	FITC	2A3	IgG ₁	BD	CD106	PE	51-10C9	IgG ₁ , κ	BD
CD26	FITC	M-A261	IgG ₁ , κ	BD	CD116	FITC	S-50	IgG ₁	BD
CD27	FITC	9F4	IgG _{2a}	Immunotools	CD117	PE	104D2	IgG ₁	BD
CD28	PE	L293	IgG ₁	BD	CD122	FITC	MIK-beta1	IgG _{2a}	Immunotools
CD29	PE	HUTS-21	IgG _{2a} , κ	BD	CD123	FITC	S-12	IgG ₁	BD
CD30	FITC	BerH8	IgG ₁ , κ	BD	CD131	FITC	S-16	IgG _{2b}	BD
CD31	FITC	HEC-75	IgG ₁	Immunotools	CD133	PE	AC133	IgG ₁	Miltenyi
CD33	PE	P67.6	IgG ₁	BD	CD137	PE	4B4-1	IgG ₁ , κ	BD
CD34	FITC	581	IgG ₁ , κ	BD	CD137L	PE	C65-485	IgG ₁ , κ	BD
CD35	FITC	E11	IgG ₁	Immunotools	CD140b	PE	28D4	IgG _{2a} , κ	BD
CD36	FITC	CB38	IgM, κ	BD	CD151	PE	14A2.H1	IgG ₁ , κ	BD
CD37	FITC	NMN46	IgG _{2a}	Immunotools	CD154	PE	89-76	IgG ₁	BD
CD38	FITC	HIT2	IgG ₁ , κ	BD	CD184	PE	12G5	IgG _{2a} , κ	BD
CD40	PE	5C3	IgG ₁ , κ	BD	CD209	FITC	DCN46	IgG _{2b} , κ	BD
CD41	FITC	SK3	IgG ₁ , κ	BD	CD210	PE	3F9	IgG _{2a} , κ	BD
CD41a	FITC	6C9	IgG ₁	Immunotools	CD235a	PE	JC159	IgG ₁ , κ	DAKO
CD42b	FITC	MB45	IgG ₁	Immunotools	HER2/neu	PE	Neu 24.7	IgG ₁	BD
CD43	FITC	1G10	IgG ₁ , κ	BD	HLA-A,B,C	FITC	G46-2.6	IgG ₁ , κ	BD
CD44	PE	G44-26	IgG _{2b} , κ	BD	HLA-A2	FITC	BB7.2	IgG _{2b} , κ	BD
CD45	FITC	HI30	IgG ₁ , κ	BD	HLA-I	FITC	W6/32	IgG _{2a}	Sigma
CD45RA	FITC	FB-11-13	IgG ₁	Immunotools	HLA-DR	FITC	L243	IgG _{2a}	BD
CD45RB	FITC	MEM-55	IgG ₁	Immunotools	Anti-PE	Magnet-partikel	-	IgG ₁	Miltenyi
CD45RO	PE	UCHL-1	IgG _{2a}	BD					

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Agarosegelelektrophorese

In Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht lassen sich lineare DNA- und RNA-Fragmente im Agarosegel durch unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten in einem Gleichspannungsfeld präparativ auftrennen. Dazu wurden je nach Größenbereich Agarosegele zwischen 1,0 und 2,2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer für die DNA-Analytik und MOPS-Puffer für die RNA-Analytik mit 0,0001% Ethidiumbromid hergestellt. Als Laufpuffer wurden ebenfalls TAE- und MOPS-Puffer verwendet. Im Anschluss wurden die Proben mit den Ladepuffern gemischt und aufgetragen. Bei einer Spannung von ca. 10 V/cm (60-140 V) erfolgte die Elektrophorese. Nach abgeschlossener elektrophoretischer Auftrennung ließ sich die DNA und RNA mittels Interkalation mit Ethidiumbromid in einem UV-Transilluminator visualisieren. Die Aufnahme der Agarosegele erfolgte mit einem Geldokumentationssystem der Firma Bio-Rad (München).

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA- und DNA-Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei 260 und 280 nm in einer Quarzküvette. Als Referenz wurde H₂O bzw. Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes H₂O (H₂O_{DEPC}) für RNA-haltige Proben verwendet. Eine optische Dichte (OD) OD₂₆₀ von 1 entspricht bei einer Küvettentiefe von 10 mm einer Konzentration von 50 µg/ml (DNA) bzw. 40 µg/ml (RNA). Durch Bildung des Quotienten von OD_{260 nm}/OD_{280 nm} konnte die Reinheit der Nukleinsäuren durch mögliche Verunreinigungen mit Proteinen bestimmt werden. Dieser Quotient sollte sich für einen hohen Reinheitsgrad möglichst zwischen 1,8 und 2,2 befinden.

3.2.3 Affymetrix DNA-Microarrays als Werkzeug der Genexpressions-Analyse

Mit Hilfe der Affymetrix DNA-Microarray-Analyse ist man in der Lage, in einem Experiment die Expression von Genen im genomischen Maßstab durchzuführen und dabei eine oder mehrere Proben gleichzeitig untersuchen und vergleichen zu können. Auf diese Weise lassen sich die verschiedensten Tumorarten durch ihr spezifisches Expressionsmuster genauer diagnostizieren und voneinander abgrenzen. Hierbei ergeben sich auch in der pädiatrischen Onkologie neue therapeutische Anätze und Strategien für die Behandlung von kindlichen Tumoren. Aus diesem Grund ist auch die stetig ansteigende wissenschaftliche Anwendung dieser Technologie auf einem breitem Forschungsspektrum zu erklären. Neben den Genen, die als DNA-Sequenz über eine Boten-RNA (mRNA; *messenger* RNA) bekannte Proteine codieren, gelingt auch der Nachweis von sogenannten EST`s (*expressed sequence tags*). Hierbei handelt es sich um mRNA-Transkriptionsprodukte, deren Sequenz bekannt ist, aber keinem funktionellen Gen bzw. Protein definiert zuzuordnen ist^{170; 171}. Bei den hier beschriebenen Untersuchungen wurde der DNA-Microarray HG-U133A und HG-U133Plus2.0 der Fa. Affymetrix (Santa Clara; USA) verwendet. Nachfolgend ist die Bezeichnung Genchip als Synonym zum DNA-Microarray zu verstehen. Das Prinzip der hier verwendeten Genchips beruht auf der Immobilisierung von genspezifischen Sequenzen (DNA-Sonden), die direkt auf einer Matrix synthetisiert werden und mit deren Hilfe sich durch Hybridisierung mit markierten RNAs (an Biotin gekoppelt) diese nachweisen lassen. Vereinfacht gesehen, stellt diese Form der mRNA-Expressionsanalyse eine Umkehrung zum Northern Blot dar, da stattdessen die mRNA nach dem Blot-Vorgang auf einer Membran immobilisiert wird und sich anschließend die mRNA mit frei markierten DNA-Sonden nachweisen lässt. Die immobilisierten Oligonukleotide der DNA-Sonden auf den Affymetrix Genchips sind 25 Basenpaare lang und erlauben somit keine hochspezifische Bindung mit der zu

analysierenden RNA. Daher werden mehrere möglichst nicht überlappende Sonden (in der Summe je Gen als *probe set* genannt) auf dem Genchip gleichmäßig verteilt, um die Spezifität der Hybridisierung zu steigern. Durch gezielte Positionierung der *in-situ* synthetisierten Oligonukleotide lassen sich bis zu 1×10^7 Kopien eines Oligonukleotides je Sonde auf dem Microarray platzieren^{140; 172; 173}. Diese *probe sets* unterteilen sich zur Hälfte zusätzlich in genspezifische SONDENSÄTZE (*perfect match probe*, PM) und genunspezifische SONDENSÄTZE (*mismatch probe*, MM). Jeweils eine genunspezifische und genspezifische Sonde bilden ein SONDENPAAR, wobei sich die genunspezifische Sonde nur durch den Austausch einer Base an Position 13 unterscheidet. Durch den Einbezug und Vergleich von *perfect match*- und *mismatch*-SONDENSÄTZEN lassen sich unerwünschte Effekte, wie das Hintergrundrauschen des Scanners, Kreuzhybridisierungen sowie unspezifische Hybridisierungen minimieren und die Qualität der *high density* Oligonukleotid-Microarrays steigern. Das Microarray-System der Firma Affymetrix besteht im Wesentlichen aus 4 Komponenten. Zum einen steuert ein zentraler Rechner alle Geräte des Systems und speichert alle aus dem Scan-Vorgang gemessenen Rohdaten ab. Weiterer Bestandteil des Systems ist der Hybridisierungsofen, in dem sich unter isothermen Bedingungen und durch Rotation die beladenen Untersuchungsproben mit den SONDENSÄTZEN des Genchips spezifisch hybridisieren lassen. Mit Hilfe einer Färbe- und Waschstation (*Affymetrix GeneChip Fluidics Workstation*) lassen sich gleichzeitig mehrere Genchips durch verschiedene Programme mit Farbstofflösungen beziehungsweise Waschprogrammen behandeln. Die letzten wichtigen Gerätekomponenten stellen die Laserscanner *GeneArray Scanner 2500* der Fa. Hewlett Packard (Palo Alto; CA; USA) für den Affymetrix-Microarray HG-U133A und *GeneChip Scanner 3000* der Fa. Affymetrix für den Microarray HG-U133Plus2.0 dar. Aufbereitung und Analyse des Genexpressionmusters von den Patientenproben und Zelllinien ist Bestandteil der nächsten methodischen Abschnitte.

3.2.3.1 Isolation der Gesamt-RNA

Die zu untersuchenden Tumorzellen (1 bis 5×10^6 Zellen) wurden in 1 ml TRIzol-Reagenz aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in einer Kanüle ($20 \times$ *gauche*) homogenisiert, in ein $1,5$ ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei $12.000 \times g$ (10 min, 4°C) zentrifugiert. Alle Zentrifugationen mit $1,5$ ml und $2,0$ ml Reaktionsgefäßen erfolgten stets in der BIOFUGE *fresco* der Fa. Heraeus (Hanau). Bei der Aufbereitung von nativen Patientenproben wurde die entnommene Biopsie (50 – 100 mg) ebenfalls in 1 ml TRIzol aufgenommen und durch ein mit kleinen Kügelchen beladenes Reaktionsgefäß (*fast RNA pulverizer*) im dafür vorgesehenen Gerät (*fast prep*) aufgeschlossen. Der von Zelltrümmern befreite Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit $0,5 \mu\text{l}$ linearem Acrylamid (5 min, RT) inkubiert. Im Anschluß wurde $0,2$ ml Chloroform/ 1 ml TRIzol zur Probe hinzugegeben, kräftig geschüttelt und für 3 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei $12.000 \times g$ (15 min, 4°C) wurde die obere, klare, wässrige und RNA-haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit $0,5$ ml Isopropanol/ 1 ml TRIzol gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Optionell kann das restliche Probenmaterial (DNA- und Protein-Anteil) der Inter- und Unterphase ebenfalls verwendet werden. Durch eine Zentrifugation ($12.000 \times g$, 10 min, 4°C) wurde die RNA pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 75 - 80% Ethanol/ 1 ml TRIzol gewaschen. Im Anschluss wurde die RNA erneut zentrifugiert ($7.500 \times g$, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet unter einem Abzug für maximal 10 min vorsichtig getrocknet und in $50 \mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ resuspendiert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde auf deren Konzentration und Qualität im Photometer und in einem $1,2\%$ MOPS-Agarosegel anhand der 5s , 18s und 28s ribosomalen RNA untersucht.

3.2.3.2 Aufreinigung der präparierten Gesamt-RNA

Die präparierte Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit der Fa. Qiagen gereinigt. Dazu wurde das Probenvolumen mit H₂O_{DEPC} auf 100 µl eingestellt. Die weitere Aufarbeitung der Probe erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls. In zwei getrennten Schritten wurde die RNA mit jeweils 25 µl H₂O_{DEPC} aus den Waschsäulen eluiert und vereint. Die somit gereinigte RNA-Lösung (50 µl) wurde hinsichtlich Konzentration und Qualität in einem RNA-MOPS-Agarosegel untersucht.

3.2.3.3 Erst-Strang cDNA-Synthese

Die aufgereinigte RNA wurde auf eine Konzentration von 15 µg/10 µl eingestellt. Für die Primer-Hybridisierung wurde 1 µl T7-(dT)₂₄-Primer (100 pmol/µl) mit der Sequenz 5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3' zu 10 µl RNA-Lösung gegeben, für 10 min bei 70°C inkubiert, für 5 s zentrifugiert und bei 4°C gelagert. Im Anschluss wurden 7 µl Erst-Strang Master-Mix zu dem 11 µl RNA-Primer-Mix hinzugegeben.

Reagenzien (Master-Mix)	(1x)
Erst-Strang-Puffer (5x)	4
DTT (0,1M)	2
dNTP (10 mM)	1
Gesamtvolumen	7 µl

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C für 2 min inkubiert. Durch weitere Zugabe von 2 µl Reverse Transkriptase Superscript RT II wurde der Reaktionsansatz (20 µl Endvolumen) für 60 min bei 37°C inkubiert.

3.2.3.4 Zweit-Strang-Synthese

Aus dem zuvor synthetisierten cDNA-Strang wird in der Zweit-Strang-Synthese ein Doppelstrang produziert. Für diesen Reaktionsschritt wurden 130 µl Zweit-Strang Master-Mix mit den 20 µl des Erst-Strang-Reaktionsgemisches vereint. Die Zweit-Strang-Synthese inkubierte für 2 h bei 16°C und wurde durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Reagenzien (Master Mix)	(1x)
H ₂ O	91
Zweit-Strang-Puffer (5x)	30
dNTP (10 mM)	3
<i>E. coli</i> DNA-Ligase (10 U/µl)	1
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (10 U/µl)	4
RNase H (2 U/µl)	1
Gesamtvolumen	130 µl

3.2.3.5 Phenol-Chloroform-Extraktion der cDNA

Die in der Erst- und Zweitstrang-Synthese entwickelte doppelsträngige cDNA wurde durch eine weitere Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Durch eine Gelschicht im Reaktionsgefäß ließen sich die wässrige und organische Phase leichter voneinander trennen. Zunächst wurden diese mit Gel gefüllten Reaktionsgefäße (*phase lock gel tubes*) zentrifugiert (12.000 x g, 1 min). Im Anschluss wurde der komplette cDNA-Syntheseansatz in die *phase lock gel*-Reaktionsgefäße überführt und mit 160 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:21) versetzt, geschüttelt und bei maximaler Drehzahl für 2 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde entnommen und mit 1 Volumen 5 M NH₄OAc vermischt. Nach der weiteren Zugabe von 2,5 Volumenanteilen Ethanol

und 0,5 µl Glykogen wurde der Ansatz für 10 min bei -20°C inkubiert. Im darauffolgenden Schritt wurde der Ansatz zentrifugiert (12.000 x g, 30 min, 16°C), das Pellet zweimal mit 500 µl kaltem Ethanol gewaschen und letztlich erneut bei 12.000 x g (5 min, 16°C) zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zu allerletzt in 3 µl Rnase-freiem Wasser resuspendiert.

3.2.3.6 *In-vitro-Transkription (IVT)*

In der sich nun anschließenden *In-vitro*-Transkription (IVT-Reaktion) wurde die doppelsträngige cDNA wieder in eine cRNA umgeschrieben. In diesem Synthese-Schritt wurden neben unmarkierten auch Biotin-markierte Nukleotide mit in die cRNA eingebaut, die später für die Detektion essentiell waren. Während der IVT kommt es bis zu einer 100-fachen Amplifikation von cRNA-Transkripten, die durch eine T7-Polymerase katalysiert wird und erstmalig durch Van Gelder *et al.* (1990) beschrieben wurde. In dieser experimentellen Analyse wurde für die IVT das MEGAscript T7 Kit benutzt. Dazu wurden 1,5 µl der frisch hergestellten cDNA mit 18,5 µl des IVT-Master-Mix vermischt und für 6 h bei 37°C inkubiert.

Reagenzien (Master-Mix)	(1x)
Ambion T7 ATP (75 mM)	2
Ambion T7 GTP (75 mM)	2
Ambion T7 CTP (75 mM)	1,5
Ambion T7 UTP (75 mM)	1,5
Biotin-CTP (10 mM)	3,75
Biotin-UTP (10 mM)	3,75
T7-Puffer Mix (10x)	2
T7-Enzym Mix (10x)	2
Gesamtvolumen	18,50 µl

3.2.3.7 *IVT-Aufreinigung*

Nach Beendigung der IVT-Reaktion wurde die synthetisierte cRNA mittels des RNeasy Mini Kit gereinigt, deren Konzentration photometrisch bestimmt und die Qualität in einer MOPS-Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

3.2.3.8 *Fragmentierung der cRNA*

Um eine optimale Hybridisierung der Biotin-markierten cRNA mit der DNA des Microarrays zu gewährleisten, muß zunächst die cRNA in etwa 35 bis 200 Basenpaare (bp) große Fragmente prozessiert werden. Dazu wurde eine cRNA-Konzentration von 16 µg/16 µl eingestellt. Die Prozessierung der cRNA erfolgte durch Zugabe eines Fragmentierungspuffers (0,25 M Tris/Acetat pH 8,1; 150 mM MgOAc; 500 mM KOAc) und inkubierte für 35 min bei 95°C. Die Güte der fragmentierten cRNA wurde erneut in einer MOPS-Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

3.2.3.9 *Hybridisierung*

Zu Beginn der Hybridisierungsreaktion wurde die fragmentierte cRNA für 2 min bei 65°C erhitzt. Im Anschluss wurden 20 µl cRNA mit 280 µl eines Hybridisierungs-Master-Mix zu einem Hybridisierungscocktail vermengt.

Reagenzien (Master-Mix)	(1x)
H ₂ O	104
Eukaryontische Bio Hybr. Kontrolle (20x)	15
B2 Oligonukleotid Kontrolle (3 nM)	5
Hering Sperma DNA (10 mg/ml)	3
Acetyliertes BSA (50 mg/ml)	3
MES-Hybridisierungs-Puffer (2x)	150
Gesamtvolumen	280 µl

Weiterhin wurde dieser Hybridisierungscocktail für 5 min bei 99°C und im Anschluss für 5 min bei 45°C inkubiert. Eine darauffolgende Zentrifugation (12.000 x g; 2 min) verhinderte das Auftreten von unlöslichen Schwebpartikeln in dieser Lösung. Bevor die Genchips befüllt wurden, erfolgte zunächst eine Erwärmung auf RT. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Genchips (HG-U133A, HG-U133Plus2.0) mit 200 µl des Hybridisierungspuffers (1x) befüllt und für 15 min bei 45°C unter Rotation in einem Hybridisierungssofen präinkubiert. Nach dieser Vorinkubation wurden die Genchips entleert und mit 200 µl des Hybridisierungscocktails befüllt und rotierend für 16 h bei 45°C inkubiert.

3.2.3.10 Waschen und Färben des Microarrays

Nach Abschluss der Hybridisierung wurde die Lösung aus den Microarrays entnommen (optionell bei -80°C lagerbar) und mit 200 µl Puffer (*Non-Stringent-Wash A*) neu zur weiteren Aufbewahrung (RT; dunkel) befüllt. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die SAPE (Streptavidin-Phycoerythrin)-Lösung unter lichtgeschützten Bedingungen hergestellt.

Reagenzien (SAPE-Lösung)	(1x)
Färbepuffer (2x)	400
H ₂ O	360
Acetyliertes BSA (50 mg/ml)	32
SAPE (1 mg/ml)	8
Gesamtvolumen	800 µl

In der Fluidics-Station des Affymetrix Microarray-Systems wurden mittels des Waschprogramms „EukGE-WS1“ die in die Module eingepassten Genchips bei 25°C für 30 min inkubiert und automatisch mit den hergestellten Puffern *Non-Stringent-Wash A* und *Stringent-Wash B* gewaschen.

3.2.3.11 Scan-Vorgang des Microarrays

Die nun zur Verfügung stehenden Microarrays wurden bei einer Wellenlänge von 570 nm (Anregungswellenlänge 488 nm) zweimal im *GeneArray Scanner 2500* (Fa. Hewlett Packard) bzw. *GeneChip Scanner 3000* (Fa. Affymetrix) analysiert. Die dabei entstehenden Fluoreszenzsignale wurden automatisch als Bild im gekoppelten Computer gespeichert.

3.2.3.12 Waschen und Zweitfärbung mit Antikörperverstärkung

Durch weitere Zugabe eines biotinylierten Anti-Streptavidin Antikörpers und erneuter Färbung mit der SAPE-Lösung kommt es zu einer Verstärkung des emittierten Fluoreszenzsignals. Dazu wurden die hybridisierten und bereits einmal gefärbten Microarrays zuerst mit der SAPE-Lösung (10 min; 25°C), darüber hinaus mit der Anti-Streptavidin Antikörper-Lösung (10 min; 25°C) und zuletzt mit der SAPE-Lösung (10 min; 25°C) in der Fluidics-Station unter der Steuerung des Waschprogramms „EukGE-WS2“ behandelt.

Reagenzien (Anti-Streptavidin Ak-Lösung)	(1x)
Färbe-Puffer (2x)	400
H ₂ O	355,2
Acetyliertes BSA (50 mg/ml)	32
Ziegen-IgG (10 mg/ml)	8
Anti-Streptavidin (0,5 mg/ml)	4,8
Gesamtvolumen	800 µl

3.2.3.13 Scanvorgang des Microarrays nach Antikörperverstärkung

Wie zuvor beschrieben, wurden die Microarrays erneut bei einer Emissionswellenlänge von 570 nm und einer Exikationswellenlänge von 488 nm gescannt. Das aus den Fluoreszenzsignalen resultierende Bild wurde automatisch in dem am System gekoppelten Computer gespeichert.

3.2.3.14 Computer-vermittelte Auswertung und Analyse der Genexpression

Nach Bindung der fluoreszenzmarkierten cRNA-Fragmente an die einzelnen Sonden des Microarrays wurde das vom *GeneArray*-Scanner aufgenommene Bild der Fluoreszenzsignale als Lichtsignal in ein 16 Bit-Computersignal transformiert und im Zentralrechner gespeichert.

3.2.4 Reverse Transkriptase und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

3.2.4.1 Isolation und Aufreinigung der präparierten Gesamt-RNA

Die Durchführung zur Isolation der Gesamt-RNA mittels TRIzol und Aufreinigung mit Hilfe des RNeasy Mini Kit ist aus der zuvorigen Beschreibung zur Aufarbeitung der Proben für die Microarray-gestützte Expressionsanalyse zu entnehmen.

3.2.4.2 Reverse Transkription von mRNA

Für einen 20 µl Reaktionsansatz wurde 1 µg RNA in 11 µl H₂O_{DEPC} gelöst und mit 1 µl Oligo-dT₍₁₂₋₁₈₎-Primer für 10 min bei 70°C präinkubiert. Im Anschluss wurden zu dem RNA-Primer Gemisch die restlichen Reagenzien in Form von 9 µl eines Master-Mix hinzugegeben und für 60 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Gesamtansatz von 20 µl durch Erhitzen (90°C, 5 min) inaktiviert.

Reagenzien (Master-Mix)	(1x)
RT-Puffer (5x)	4
DTT (0,1 M)	2
dNTP (10 mM)	1
SuperScript Reverse Transkriptase II	1
Gesamtvolumen	8 µl

3.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die RT-PCR (*polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zum Nachweis der mRNA-Expression durch Umschreibung (Reverse Transkription) und Vervielfältigung der cDNA mittels einer DNA-Polymerase¹⁷⁴. Dazu wurden 2 µl der synthetisierten cDNA zu 23 µl eines PCR-Master-Mix hinzugegeben.

Reagenzien (Master-Mix)	(1x)
PCR-Puffer (10x)	2,50
MgCl ₂ (25 mM)	1,50
dNTP (10 mM)	0,50
<i>forward</i> -Primer (25 pmol/μl)	0,25
<i>reverse</i> -Primer (25 pmol/μl)	0,25
Taq-Polymerase	0,20
H ₂ O	17,80
Gesamtvolumen	23,00 μl

Zu Beginn einer jeden PCR wurde bei 95°C für 5 min die cDNA denaturiert. Im Anschluss setzte sich ein wiederholendes Programm fort, das aus den Schritten der Denaturierung (95°C, 30 s), der Anlagerung des Primers (*annealing*; 60°C, 30 s) und der Verlängerung (*elongation*; 72°C, 45 s) bestand. Dieser Zyklus wurde in Abhängigkeit von der mRNA-Expressionsrate in 18 bis 34 Wiederholungen fortgesetzt. Im Anschluss an den letzten PCR-Zyklus kam es zu einer einmaligen Verlängerungsreaktion von 7 min bei 72°C. Die Auswertung der amplifizierten PCR-Produkte erfolgte in der Agarosegel-Elektrophorese und Betrachtung im UV-Transilluminator.

3.2.4.4 *real-time RT-PCR-Amplifikation*

Die *real-time* RT-PCR ist eine Methode, die es dem Anwender erlaubt, eine Vervielfältigung des mRNA-Transkriptes jeder Zeit zu verfolgen und zu quantifizieren. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der ein DNA-bindendes Fluorophor darstellt. Dieser interkalierende Farbstoff bindet sequenzunabhängig an die kleine Furche doppelsträngiger DNA. Durch die Bindung wird die Fluoreszenz um das etwa 200-fache verstärkt. Am Ende jeder Elongationsphase, wenn die gesamte DNA doppelsträngig vorliegt, wurde die Intensität der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen, so dass die zunehmende Menge an PCR-Produkt Zyklus für Zyklus beobachtet werden konnte. Das Signal war der Menge des gebildeten PCR-Produkts proportional. Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse. Hierbei wurde durch langsamen Temperaturanstieg und kontinuierliche Messung der Fluoreszenz die für das PCR-Produkt spezifische Schmelztemperatur ermittelt. Die spezifische Schmelztemperatur ist als die Temperatur definiert, bei der 50% der DNA einzelsträngig vorliegt. Sie ermöglicht die Identifikation des PCR-Produktes und die Differenzierung von unspezifischen Produkten wie zum Beispiel Primer-Dimeren. Die Durchführung der *real-time* RT-PCR erfolgte mit dem Rotor Gene RG-3000 (Fa. Corbett Research; Sydney; Australien). Die Auswertung erfolgte anhand des Programms Rotor Gene 6.0. Mit Ausnahme der Primer stammen alle Reagenzien aus der Produktserie QuantiTect SYBR Green PCR der Fa. Qiagen ab. Für jeden Reaktionsansatz wurden 2 μl cDNA in 18 μl eines Master Mix hinzugegeben, der sich wie folgt zusammensetzte:

Reagenzien (Master-Mix)	(1x)
Mix (1x)	10,00
<i>forward</i> -Primer (25 pmol/μl)	1,00
<i>reversed</i> -Primer (25 pmol/μl)	1,00
H ₂ O	6,00
Gesamtvolumen	18,00 μl

Anschließend wurde die cDNA mit folgendem Programm im Rotor Gene RG-3000 vervielfältigt:

95 °C	15 min	Vordenaturierung	39 Zyklen
95 °C	30 s	Denaturierung	
62 °C	30 s	Primer-Anlagerung	
72 °C	45 s	Elongation	
72 °C	5 min	Elongation	

3.2.4.5 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode

Die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode wurde bei der Berechnung von relativen Veränderungen der Gen-Expression angewandt. Für die in der *real-time* RT-PCR erhaltenen Rohdaten wurde der *Threshold Cycle* (Ct-Wert) durch die Verlagerung der Basislinie in die exponentielle Phase der PCR ermittelt. Der *Threshold Cycle* ist der Zyklus der PCR, in dem die Fluoreszenz einer Probe erstmals signifikant über ihre Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt. Damit Proben vergleichbar werden, musste eine einheitliche Basislinie festgelegt werden. Um eine Aussage über relative Expressionsverhältnisse zu erhalten, mussten die erhaltenen Expressionsdaten der untersuchten Zielgene mit einer internen Kontrolle, zum Beispiel einem Haushaltsgen (GAPDH, β -Aktin), normalisiert werden. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen oder Fehler der RT-Reaktion gleichermaßen das untersuchte Zielgen und die interne Kontrolle betreffen. Wurde eine normalisierte experimentelle Probe mit einer normalisierten Kontrollprobe kalibriert, erhielt man relative Expressionswerte in Form eines Fold Change (FC) ¹⁷⁵.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung und Passagieren eukaryontischer Zellen

Alle für die Zellkultur verwendeten Materialien waren steril verpackte Einmalartikel oder wurden vor Benutzung autoklaviert (120 °C, 30 min). Zur Rekultivierung von Zellen, die in flüssigem Stickstoff lagerten, wurden die im Kryoröhrchen befindlichen Zellen im Wasserbad bei 37 °C langsam aufgetaut. Nach der Überführung in ein 50 ml Röhrchen wurde unter sehr langsamer Zugabe von kaltem Medium, die DMSO-haltige Zellsuspension zunehmend verdünnt. Im Anschluß erfolgte eine Zentrifugation (210 x g, 10 min, RT), die Entfernung des DMSO-haltigen Überstandes und die Rekultivierung der Zellen in dem entsprechenden Medium. Sämtliche Zentrifugationen von 15 ml und 50 ml Probengefäße wurden mit der Multifuge 1S-R der Fa. Heraeus (Hanau) durchgeführt. Die Kultivierung aller aufgelisteten Zelllinien erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank der Fa. Heraeus (Hanau). Sämtliche Kultivierungsarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank (Fa. Heraeus) durchgeführt. Um Kontaktinhibition während einer hohen Zelldichte zu vermeiden, wurden adhärent wachsende Zellen zweimal wöchentlich passagiert, bevor deren Kultur konfluent war. Dazu wurde der Zellkulturüberstand einer 25 oder 75 cm²-Kulturflasche abgenommen und mit 5 ml PBS, zur Entfernung von toten Zellen und Mediumrückständen, gewaschen. Mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung (7 min, 37 °C, 5% CO₂) wurden die adhären Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst, in 10 ml Medium resuspendiert und anschließend entsprechend der Proliferationsrate 1:6 bis 1:12 verdünnt und in maximal 10 ml (25 cm²-Flasche) und 20 ml (75 cm²) weiter kultiviert. Für eine optimierte Proliferation der eigentlichen Suspensions-Zelllinie CHP-126 wurde die Oberfläche der Kulturflaschen mit Poly-L-Lysin behandelt, daraufhin wuchs

diese Zelllinie jedoch adhären. Bei den weiteren Suspensions-Zelllinien (NALM-6, Jurkat und 10.BK1) konnten die Zellen direkt durch eine Verdünnung in frischem Medium weiter kultiviert und vermehrt werden. Für Experimente mit definierter Zellzahl erfolgte vor dem Ausplattieren eine Zellzählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer der Fa. Brandt (Ludwigshafen). Dazu wurde die Zellsuspension mit Trypanblau 1:5 bis 1:20 verdünnt und die Zellzahl in den vier Eckquadraten (bestehend jeweils aus 16 Kleinquadraten) der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte anschließend gemäß der Formel:

$$\text{Zellen pro ml} = a \times b \times c$$

a = gezählte Zellzahl (Z)
 b = Kammerfaktor (2.500/ml)
 c = Verdünnungsfaktor

3.3.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Zur Konservierung von adhären oder Suspensionszellen wurden jeweils $1-2 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium, einem zellspezifischen Medium mit 10% DMSO und 20% FKS versetzt, resuspendiert und in 1,5 ml Kryoröhrchen verteilt. Mit Hilfe eines mit Isopropanol gefüllten Kryoeinfrierbehälters wurden die Zellen langsam ($-1^\circ\text{C}/\text{min}$) auf -80°C abgekühlt. Die Lagerung erfolgte letztlich in flüssigem Stickstoff bei -180°C .

3.3.3 RNA-Interferenz (RNAi)

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist in Eukaryonten eine Methode, die die Expression von Genen posttranskriptionell hemmt¹⁷⁶. Durch den Einsatz von 21-22 Nukleotid großen doppelsträngigen, linearen siRNAs (*short interfering RNAs*), shRNAs (*short hairpin RNAs*) oder miRNAs (MicroRNAs) wird durch Bindung an den komplementären *antisense*-Strang die Inhibierung und der Abbau des mRNA-Transkriptes initiiert (Abbildung 3-1). Zum Auslösen eines selektiven sequenzspezifischen mRNA-Abbaus durch RNAi muß zunächst die doppelsträngige RNA-Vorstufe in 21 bis 23 lange Nukleotidfragmente durch einen Dicer (RNase III) prozessiert werden. Als Ergebnis werden 21 bis 23 Nukleotid lange einzelsträngige siRNAs, miRNAs bzw. shRNAs in einem RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut. RISC ist ein RNA-haltiger Multiproteinkomplex, der sich an die Ziel-mRNA sequenzspezifisch anlagert und das Transkript selbst in weitere 21 bis 23 Nukleotid lange RNA-Stücke prozessiert. Diese Fragmente dienen in weiteren Folgezyklen erneut als inhibitorische RNA-Moleküle und verstärken somit den Prozess der posttranskriptionellen Hemmung.

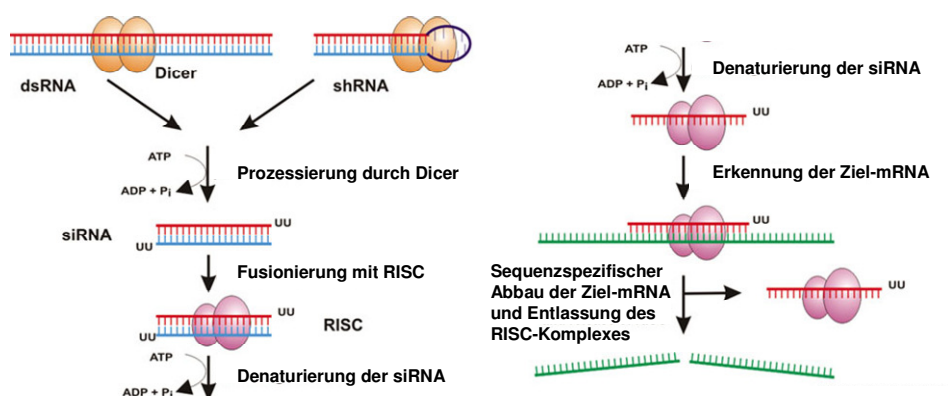


Abbildung 3-1: Vereinfachte Darstellung der RNA-Interferenz (RNAi) in Eukaryonten (Quelle: www.chemie.uni-hamburg.de; modifiziert).

3.3.3.1 Transfektion mit kationischen Lipiden

Für die Zelltransfektion von siRNA-Molekülen mit kationischen Lipiden wurde mit den Reagenzien Lipofectamine 2000 (Fa. Invitrogen), Oligofectamine (Fa. Invitrogen) und RNAi-FECT (Fa. Qiagen) gearbeitet. 24 Stunden vor Transfektionsbeginn wurden die Zellen in einer 6-Lochplatte so ausplattiert, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz zwischen 50 und 60% aufwiesen. Zur Ausbildung der siRNA-Lipofectamine 2000 (Oligofectamine; RNAi-FECT)-Komplexe wurden im ersten Schritt 100-500 pmol siRNA in 180 µl serumfreien Opti-MEM-Medium (Fa. Invitrogen) gelöst. Im zweiten Schritt wurden 3 µl Lipofectamine (Oligofectamine) in 20 µl serumfreien Opti-MEM-Medium gelöst. Beide Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur getrennt präinkubiert, anschließend gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur serumfreien Transfektion der Zellen wurden diese mehrmals mit PBS gewaschen und mit 800 µl Opti-MEM überschichtet. Im Anschluß wurden die 200 µl siRNA-Lipid-Komplexe direkt auf die Zellen gegeben und unter leichten rotierenden Bewegungen vermischt. Nach 4 bis 8 Stunden Inkubationzeit im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) erfolgte ein Mediumwechsel mit 2 ml serumhaltigen Medium. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde neben den genspezifischen siRNAs auch FITC oder ALEXA-Fluor488-markierte *non-silencing* (genunspezifische) siRNAs der Fa. Qiagen verwendet.

3.3.3.2 RNA-Interferenz durch Transfektion von siRNAs mittels AMAXA-Technologie

Die Nucleofector-Technologie der Fa. AMAXA (Köln) ist im klassischen Sinne an eine Elektroporation angelehnt. Bei dieser nichtviralen Transfektionsmethode sind dem Anwender sowohl die elektrophysikalischen Eigenschaften als auch die Zusammensetzung der zellspezifischen Pufferlösungen für die Elektroporation unbekannt. Mit Hilfe des AMAXA *Cell Line Optimization Nucleofector-Kits* wurde die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y, die das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte humane Gen *achaete-scute complex, drosophila, homolog 1* (ASCL1) konstitutiv exprimiert, auf die Effizienz bezüglich einer Transfektion mit linearen doppelsträngigen siRNAs untersucht. Bei dieser RNA-Interferenz (RNAi) sollte die Expression des ASCL1 mRNA-Transkriptes durch komplementäre siRNAs inhibiert werden. Als Reporter für die Effizienz der Transfektion von Nucleinsäuren fungierten ALEXA Fluor488-markierte unspezifische *non-silencing* siRNAs. Zur Optimierung wurden zunächst $2,5 \times 10^6$ Zellen in jeweils 100 µl *Nucleofector-Supplement-Solution-R (-T, -V)* resuspendiert und mit 2 µg ALEXA Fluor488-markierten *non-silencing* siRNAs vermischt. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette hinzugegeben und mit 3 verschiedenen starken Programmen (A23 = mild; G16 = mittel und T27 = stark) elektroporiert. Die genauen elektrophysikalischen Eigenschaften der Elektroporations-Programme wurden von der Herstellerfirma nicht veröffentlicht. Nach der Elektroporation wurden die Zellen innerhalb von 15 min aus der Küvette in eine 6-Lochplatte überführt und rekultiviert. Nach einer 24 stündigen Kultivierung (37 °C; 5% CO₂) wurde die Transfektion im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Mittels der Durchflusszytometrie am FACScan der Fa. BD Biosciences (Heidelberg) konnte die Transfektionsrate über die Fluoreszenz von ALEXA Fluor488 quantifiziert und verglichen werden. Die höchste Transfektionsrate, die sich durch Optimierung der Elektroporations-Bedingungen herauskristallisiert hatte, wurde für die weiteren Untersuchungen zur RNA-Interferenz genutzt. Dazu wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y in 100 µl der Elektroporationslösung *Nucleofector-Supplement-Solution-V* resuspendiert und mit 2 µg ASCL1-siRNA oder *non-silencing* siRNA der Fa. Qiagen vermischt. Nach der Elektroporation und Rekultivierung für maximal 72 h (37 °C; 5% CO₂) wurden die Zellen im FACS analysiert und die Gesamt-RNA für die Genexpressionsanalyse isoliert.

3.3.3.3 miRNA basierende RNA-Interferenz von ASCL1

Die durch MicroRNAs (miRNAs) vermittelte RNA-Interferenz ist ebenfalls eine posttranskriptionelle Inhibition der Expression eines Gens durch gezielten Abbau des komplementären mRNA-Transkriptes¹⁷⁷. miRNAs sind über einen Vektor endogen synthetisierte 22 Nukleotid lange Oligonukleotide, die ihre Wirkung über den beschriebenen Mechanismus der RNAi ausüben¹⁷⁸. Die zu einer *hairpin*-Struktur transkribierten miRNAs werden durch die RNA-Polymerase II gebildet¹⁷⁹. Die zunächst als pri-miRNAs exprimierten Oligonukleotide werden durch eine nukleäre RNase III (*Drosha*) in 70 Nukleotid große miRNA-Vorstufen (pre-miRNAs) prozessiert¹⁸⁰. Anschließend werden die prozessierten pre-miRNAs durch das doppelsträngige RNA-bindende Protein Exportin 5 vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert¹⁸¹. Anhand eines Dicers werden nach dem Transport die pre-miRNAs in 22 Nukleotid lange reife miRNAs prozessiert und in einen *RNA-induced silencing*-Komplex (miRISC) vereinigt¹⁸².

Die miRNA vermittelte RNA-Interferenz wurde anhand des *BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit* der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt. Zunächst wurden die beiden einzelsträngigen Oligonukleotide (*ssOligo*; *single stranded Oligo*) in DNase/RNase-freies H₂O mit einer Endkonzentration von 200 µM gelöst. Im nächsten Arbeitsschritt wurden durch Anlagerung (*Annealing*) die beiden einzelsträngigen Oligonukleotide zu doppelsträngigen Oligonukleotide hybridisiert. Hierfür wurden in jedem Reaktionsansatz folgende Reagenzien hinzugegeben und für 4 min bei 95 °C inkubiert:

Reagenz	Volumen (µl)
<i>top strand ssOligo</i> (200 µM)	5
<i>bottom strand ssOligo</i> (200 µM)	5
<i>Oligo-Annealing</i> -Puffer (10x)	2
DNase/RNase-freies H ₂ O	8
Totalvolumen	20

Durch das langsame Abkühlen der Reaktionsansätze bei Raumtemperatur (10 min) erfolgte die Anlagerung zu doppelsträngigen Oligonukleotiden (dsOligos). Nach einer kurzen Zentrifugation (5 s) wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide in zwei Schritten verdünnt. Im ersten Verdünnungsschritt (1:100) wurde 1 µl der doppelsträngigen Oligonukleotide (50 µM) mit 99 µl DNase/RNase-freiem H₂O gemischt. Die nun auf eine Konzentration von 500 nM reduzierten doppelsträngigen Oligonukleotide wurden in einem zweiten Verdünnungsschritt (1:50), bestehend aus 5 µl *Oligo-Annealing*-Puffer (10x), 44 µl DNase/RNase-freiem H₂O und 1 µl doppelsträngigen Oligonukleotiden, auf eine Endkonzentration von 10 nM verdünnt. Als Qualitätskontrolle für die erfolgreiche Aneinanderlagerung wurden jeweils 5 µl der 500 nM doppelsträngigen Oligonukleotide und 5 µl der 1:400 verdünnten einzelsträngigen Oligonukleotide (200 µM) auf ein 4%iges Agarosegel aufgetragen und verglichen. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte die Ligation der dsOligos in den Expressionsvektor, der als Transfektionskontrolle das Grün-fluoreszierende Protein (EmGFP) enthielt. Für einen Ligations-Ansatz wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz	Volumen (µl)
Ligations-Puffer (5x)	4
linearisierter Vektor pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR	2
miR-ds Oligo (10 nM)	4
DNase/RNase-freies H ₂ O	9
T4 DNA-Ligase	1
Totalvolumen	20

Nach Zugabe aller Reagenzien wurde der Reaktionsansatz durch Vortexen gut vermischt. Die Ligation erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur und wurde durch Inkubation auf Eis gestoppt. Für die anschließende Transformation in *Escherichia coli* (TOP10 cells) wurden 2 µl des Ligations-Ansatzes mit 100 µl des Reagenz *One Shot[®] TOP10 chemically component E. coli* gemischt und auf Eis für 5 min inkubiert. Die Transformation der Zellen erfolgte mittels der Hitzeschock-Methode (45 s, 42°C) und wurde durch Inkubation auf Eis gestoppt. Als nächstes wurden die Zellen in 250 µl S.O.C.-Medium im Schüttler (250 rpm) für 60 min bei 37°C inkubiert. Innerhalb dieser Zeit wurden in den Bakterien die Gene für die erforderliche Resistenz gegenüber dem Antibiotika transkribiert. 250 µl jedes Transformations-Ansatzes wurden auf eine LB-Agarplatte inklusive 100 µg/ml des Antibiotika Blastidicin überführt und für 24 h bei 37°C kultiviert. Nach der Isolation eines Blastidicin-resistenten Klons wurden Übernachtskulturen mit 4 ml LB-Medium angeimpft und im Schüttelinkubator (37°C, 250 rpm) vervielfältigt. Im Anschluß wurde die Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation isoliert. Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte erfolgten stets bei 4°C. Von der Übernachtskultur wurden 2 ml der Bakterien durch Zentrifugation (3 min, 4.600 x g) pelletiert, der Überstand möglichst vollständig entfernt und das Pellet in 100 µl Minipröp-Lösung I resuspendiert. Weiterhin wurden 200 µl der Minipröp-Lösung II hinzugegeben, gemischt und für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Minipröp-Lösung III. Nach dem Mischen wurde für 5 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, mit 400 µl Isopropanol versetzt und für 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde durch kurze Zentrifugation der restliche Alkohol mit der Pipette abgenommen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 30 µl TE+RNase (1:500) aufgenommen und für 15 min bei 37°C gelöst. In einer RT-PCR wurde die erfolgreiche Ligation der doppelsträngigen Oligonukleotide in den Vektor (pcDNA[™] 6.2-GW/EmGFP-miR) anhand von spezifischen Nachweis-Primern kontrolliert. Mittels des EmGFP *forward sequencing primer* und des miRNA *reverse sequencing primer* konnte im Agarosgel zwischen Klonen mit ligierter miRNA und einer Basenpaargröße von 282 bp sowie Klonen mit Leervektor und einer Basenpaargröße von 218 bp unterschieden werden. Die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y wurde mit 3 µg in TE-Puffer gelöster Plasmid-DNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels der Elektroporations-Methode der Fa. AMAXA. Die Selektionierung der Plasmid-haltigen und nicht Plasmid-haltigen Neuroblastomzellen erfolgte durch Anwesenheit von 100 µg/ml Blastidicin im Kulturmedium.

3.3.4 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen

1953 wurde erstmals die Durchflusszytometrie durch P.J. Crosland-Taylor beschrieben¹⁸³. Die ersten fluoreszenzaktivierten Zellsortierungen im FACS (*fluorescence activated cell sorter*) beschrieb 1969 Hulett *et al.*¹⁸⁴. Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ist eine Methode zur automatisierten individuellen Differenzierung und Zählung von Zellen und Mikropartikeln. Das Durchflusszytometer ist in der Lage, spezielle Zellmerkmale wie Größe, Granularität und verschiedene Fluoreszenzen (FITC, PerCP, PE, PI, Cy3, etc.) zu detektieren. Ein mit Puffer gefülltes Leitungssystem nimmt die Zellen auf, um sie dann als feine Tröpfchen an einem Laserstrahl vorbei zu leiten. Die hochempfindliche Interaktionszone ist hierbei der Schnittpunkt zwischen dem Probenstrom und einem bzw. mehreren fokussierten Lichtstrahlen (Laser, UV-Lampe) oder einem elektrischen Feld. Das hier verwendete durchflusszytometrische System FACScan der Fa. BD Biosciences (Heidelberg) besteht aus einem Argon-Laser. Optische (Streulicht, Fluoreszenz) oder elektrische Signale werden sequentiell für jeden einzelnen Partikel bzw. einzelne Zelle generiert. Diese Signale werden optoelektronisch detektiert und in Form einer Zellverteilungsanalyse (Histogramm, Dot Plot) angezeigt. Diese Zytogramme geben

beispielsweise im Dot Plot mit FSC (*forward sight scatter*) und SSC (*side scatter*) Angaben über die Größe und Zellgranularität. Bei der Darstellung im Dot Plot, der auch als Punktgraph bezeichnet wird, werden ebenfalls zwei Fluoreszenzparameter gegeneinander aufgetragen und jede Schnittstelle als Punkt angezeigt (korrelierte Zweiparameterdarstellung). Bei der Darstellung im Histogramm (Einparameterdarstellung) bezieht sich die Abzisse auf den Fluoreszenzkanal, während die Ordinate die Anzahl der Messsignale in diesem Kanal darstellt. Durch Setzen eines Auswertungsfensters (engl. „*gate*“) lassen sich bestimmte Teilpopulationen von Zellen isoliert und gezielt untersuchen.

3.3.4.1 Analyse transfizierter eukaryontischer Zellen

Für die Untersuchungen zur Transfereffizienz von Nukleinsäuren (siRNAs) durch kationische Lipide oder durch die AMAXA Nucleofection-Technologie wurden anfänglich zur Optimierung FITC- und ALEXA Fluor488-markierte siRNAs oder GFP als sogenannter Reporter im FACS verwendet. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, mit PBS gewaschen, zentrifugiert und 1×10^6 Zellen in 1 ml PBS resuspendiert. In der darauffolgenden FACS-Analyse wurden 10.000 Zellen detektiert und die Fluoreszenz (FI-1) von FITC-, ALEXA Fluor488- oder GFP-positiven Zellen ermittelt.

3.3.4.2 Analyse fluoreszenzmarkierter Oberflächenantigene

Es sind zahlreiche Oberflächenantigene bekannt, die neben Signaltransduktion-gekoppelten Rezeptoren auch als membranständige Proteine (Glykoproteine) mit enzymatischer Aktivität fungieren können. Diese Oberflächenmoleküle werden je nach Funktion auf Zellen in unterschiedlicher Menge und Zusammensetzung exprimiert. Damit ermöglichen sie eine genauere Differenzierung von Zellpopulationen im Vergleich zu morphologischen Charakteristika. Der Nachweis der Oberflächenantigene erfolgt über fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper. Aufgrund des Reaktionsverhaltens der Antikörper gegenüber den Zelloberflächenmolekülen werden diese einem sogenannten *cluster of differentiation* (CD) zugeordnet.

Für die Untersuchung zur Expression von bestimmten Oberflächenantigenen wurden die Zellen schonend von der Kulturflaschenoberfläche mit 0,5 mM EDTA/PBS gelöst, zentrifugiert (300 x *g*, 10 min, RT) und mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen (0,5 bis 1×10^6 Zellen) wurden in 100 μ l PBS im FACS-Röhrchen vorgelegt und anschließend mit 10 μ l des entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpers (FITC, PE, PerCP, Cy3 etc.) inklusive der dazugehörigen Isotyp-Kontrollen (IgG₁, IgG₂, etc.) für 30 min (4°C, im Dunkeln) direkt gefärbt. Nach der Direktfärbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert (300 x *g*, 10 min, RT), in 1 ml PBS resuspendiert und bei 4°C im Dunkeln für die FACS-Messung für maximal 3 h gelagert. Durch Fixierung der fluoreszenzgefärbten Zellen in 3% (w/v) Paraformaldehyd (4°C, dunkel) wurden die Proben konserviert und standen bis zu 14 Tage für eine spätere FACS-Messung zur Verfügung.

3.3.5 Separation von Tumorzellen

Aus einer Zellsuspension wurde die Zellpopulation angereichert und isoliert, die einen bestimmten Oberflächenmarker (CD) exprimiert. Alle anderen Zellen, die dieses Antigen nicht exprimierten, wurden depletiert. Für die Separation der antigenexprimierenden Zellen wurde das magnetaktivierende Verfahren MACS (*Magnetic Activating Cell Sorting*) der Fa. Milteniy Biotech (Bergisch Gladbach) angewendet. Hierbei wird zunächst das Oberflächenantigen von einem primären monoklonalen PE-markierten Antikörper gebunden. Im zweiten Schritt erfolgt die Bindung zum primären Antikörper über einen mit paramagnetischen Partikeln (*microbeads*)-

gekoppelten sekundären Anti-PE Antikörper. Die mit den Magnetpartikeln-markierten Zellen lassen sich mit einer im Magnetfeld angebrachten Säule immobilisieren und anreichern. Für die Durchführung der Separation wurden die Zellen durch Trypsinierung gewonnen, zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (300 x g, 10 min, RT). Anschließend wurden 1 x 10⁷ Zellen pro 1 ml PBS mit 100 µl eines PE-markierten Anti-CD54, Anti-CD34 oder Anti-CD133 Antikörpers vermischt und für 30 min (4°C, dunkel) inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen und jeweils für 10 min zentrifugiert (300 x g, RT). Nach Verwerfen des Waschüberstandes wurden die Zellen in 160 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 40 µl eines mit Magnetkugeln-gekoppelten Anti-PE Antikörpers für 15 min (4°C, im Dunkeln) inkubiert. Als nächstes wurde der Ansatz mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (300 x g, 10 min, RT). Durch Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Ein Teil der Probe (50 µl) wurde für die durchflusszytometrische Bestimmung des Verhältnisses von vorseparierten zu separierten Zellen im FACS entnommen. Nach Equilibrierung der LS-MACS-Säule mit 3 ml MACS-Puffer wurde die Säule in eine MACS-Standapparatur mit Magnetblock platziert. Nach Verwerfen des Eluats wurde die mit Magnetpartikeln gekoppelte Zellsuspension (450 µl) auf die Säule gegeben und das Eluat (CD54-, CD34- bzw. CD133-negative Zellen) gesammelt. Durch dreimaliges Waschen mit je 3 ml MACS-Puffer wurden die nicht magnetbindenden CD54-, CD34- bzw. CD133-depletierten Zellen als Durchfluss gesammelt. Nach der Depletion und Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld wurden durch Zugabe von 5 ml MACS-Puffer unter Druck des Säulenstempels alle CD54-, CD34- bzw. CD133-positiven Zellen eluiert. Die separierten bzw. depletierten Zellen wurden sowohl rekultiviert als auch im FACS auf deren Antigenexpression untersucht.

3.3.6 Fluoreszenzmikroskopie von Zellen

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von FITC- oder GFP-markierten Zellen erfolgte am Axiovert 25 der Fa. Zeiss (Jena). Das Prinzip liegt in der Absorption von kurzwelligem und der Emission von längerwelligem Licht. Dieser als Stokes-Differenz bezeichnete Effekt entsteht, wenn monochromatisches Licht auf Fluorochrom-markierte Zellen gerichtet wird. Viele Fluorochrom-Farbstoffe (Quinin, Fluorescein, Rhodamin und Acridinorange) haben oft aromatische Ringsysteme mit delokalisierten Elektronensystem. Diese Elektronen werden durch das kurzwellige Licht in energetisch höhere Elektronenschalen (Energiezustände) angehoben und geben durch den Rückfall in den ursprünglichen Zustand langwelliges Licht ab. Dieses schwache Fluoreszenzlicht der Fluorochrome kann vom hellen Anregungslicht im Strahlengang des Mikroskops durch eine Auswahl an Filtern getrennt und kompensiert werden. Dadurch gelangt nur das Fluoreszenzlicht zur Bildentstehung.

3.3.7 Untersuchungen zur Zellviabilität

3.3.7.1 MTT-Proliferationstest

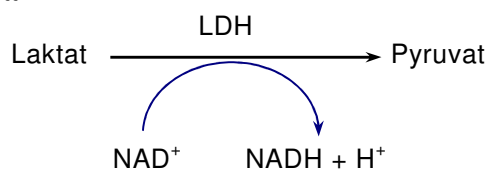
Der MTT-Proliferationstest (Fa. Roche Applied Science) dient zur Analyse der Proliferation bzw. Vitalität von Zellen. Der Test beruht auf der Proportionalität aus Farbstoffbildung und Aktivität von Dehydrogenasen in vitalen Zellen^{185; 186}. Die Analytik basiert auf der Umwandlung des schwach gelben MTT-Farbstoffes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromids) durch die in den Mitochondrien lokalisierten Dehydrogenasen vitaler Zellen zu Formazan. Vorbereitend wurden 5.000 Zellen in 100 µl Kulturmedium in jedes Loch einer 96-Loch-Kulturplatte verteilt und für 24 h in einem Zellinkubator (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Im Anschluss wurden die auf ihre Zytotoxizität bzw. antiproliferative Wirkung zu untersuchenden Reagenzien mit einer Mehrkanalpipette in 1:4 Verdünnungsschritten austitriert und für 96 h im Brutschrank

(37°C, 5% CO₂) kultiviert. Durch Inkubation der Zellen mit 10 µl einer MTT-Lösung (5mg/ml in PBS) im Brutschrank (4 h, 37°C, 5% CO₂) wurde durch die zellulären Dehydrogenasen das wasserunlösliche, dunkelblaue Formazansalz gebildet. Zur Bestimmung der Absorption mußten die Formazan-Salzkristalle durch Zugabe von 100 µl einer 10% SDS-Lösung (je Loch der 96-Loch-Platte) gelöst werden. Hierbei erfolgte die Inkubation über Nacht ebenfalls bei 37°C im Brutschrank. Letztlich wurde die Extinktion der zu untersuchenden Proben in einem ELISA-Plattenlesegerät (Fa. Bio-Rad) bei einer Wellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen.

3.3.7.2 LDH-Test

Der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Test wurde mit dem *Cytotoxicity Detection*-Kit der Fa. Roche Applied Science durchgeführt und diente zur Untersuchung einer Zell-vermittelten Zytotoxizität im Maßstab einer 96-Lochplatte. Das angewandte Grundprinzip lag in der Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. Während der gerichteten Zerstörung einer Zielzelle durch eine Effektorzelle wird aus dem zytoplasmatischen Raum der lysierten Zelle die Laktat-Dehydrogenase in den Zellkulturüberstand sezerniert. Dieses gewonnene Enzym katalysiert in einer Nachweisreaktion (Abbildung 3-2) das Laktat zu Pyruvat unter gleichzeitiger Bildung von NADH und freiem H⁺.

1. Reaktionsschritt:



2. Reaktionsschritt:

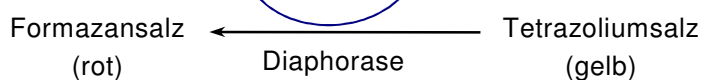


Abbildung 3-2: Vereinfachte Darstellung eines LDH-Tests.

In einer zweiten durch die Diaphorase katalysierten Reaktion wurde das hellgelbe Tetrazoliumsalz unter Beteiligung von NADH und H⁺ in das zu messende Formazansalz (rot) synthetisiert. Die Intensität der Absorption ist dabei proportional zur Anzahl der toten Zellen. Wichtige Zusatzparameter in der Berechnung der Zellyse stellten auch die Kontrollen bestehend aus Medium-kultivierten Zellen für den Hintergrund und mit 0,1% Triton X-100 behandelte Zellen zur Bestimmung der maximalen Zellyse dar. Zur Gewinnung des LDH-haltigen Kulturüberstandes wurden die Zellen herunterzentrifugiert (300 x g, 10 min, RT) und 100 µl Zellkulturüberstand der verschiedenen zu untersuchenden Ansätze mit 100 µl Reaktionsmix bestehend aus Farbstoff (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) und Diaphorase gemischt und für 30 min (RT) im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption der Proben mittels eines ELISA-Plattenlesers der Fa. Bio-Rad (München) bei 493 nm gemessen.

3.3.8 Zellgenerationsanalyse

Die Generationsanalyse wurde mit dem *Cell Census Plus*TM System der Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim) durchgeführt und diente der Bestimmung der aufeinanderfolgenden Tochtergenerationen von Tumorzellen. Dieses System basiert auf dem rotfluoreszierenden, lipophilen Membranfarbstoff PKH26, der in der Durchflusszytometrie (Kanal FI-2) als Reporter für

die Generationsanalyse der Zellen fungiert. Dazu bestimmt man zunächst die charakteristische Fluoreszenzintensität der PKH26-markierten, parentalen (elterlichen, ursprünglichen) Generation zum Zeitpunkt Null. Im Verlauf einer Kinetik reduziert sich mit jeder Zellteilung und Bildung einer neuen Tochtergeneration das PKH26-Fluoreszenzsignal. Die Reduktion der PKH26-Dichte und die damit verbundene verringerte Fluoreszenz ist dabei parallel mit der Bildung darauffolgender Tochtergeneration verbunden.

Für die Untersuchungen wurden die entsprechenden Zellen durch eine Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, mit PBS gewaschen, zentrifugiert und 5×10^6 Zellen in 1 ml PBS resuspendiert. Als nächstes wurde 1 ml PKH26-Lösung (4×10^{-6} M) zu den Zellen hinzupipettiert und für 3 min (RT) inkubiert. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde 5 ml FKS-haltiges Medium hinzugegeben und zentrifugiert ($300 \times g$, 10 min, RT). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen für eine kinetische Untersuchung erneut in Kulturflaschen verteilt und rekultiviert. Am Tag 8 wurden die Zellen erneut trypsiniert, gewaschen und in 3% PFA (in PBS) fixiert. Nach der Fixierung erfolgte die Messung der PKH26-Fluoreszenz von 10.000 Zellen im FACScan. Die Auswertung der PKH26-abhängigen Fluoreszenz und die damit verbundene Verteilung der Zellgenerationen erfolgte mittels des Computer-Programms ModFit LT 4.0 (Verity Software House, Inc.; Topsham; USA).

3.3.9 Zellzyklusanalyse

Nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Reagenzien wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Diese Analyse gewinnt Erkenntnisse über den Proliferationsstatus und erlaubt einen Einblick in die Verteilung der Zellen in die einzelnen Phasen des Zellzyklus, bestehend aus G_1 -, S- und G_2 -Phase (Abbildung 3-3). Dabei nutzt man den unterschiedlichen Gehalt der zellulären DNA in jeder einzelnen Phase des Zellzyklus aus. So liegt in der G_1 -Phase die einfache und in der G_2 -Phase, nach Durchlaufen der DNA-Replikation (S-Phase), die doppelte Chromatidenmenge vor, solange der doppelte Chromatidensatz sich durch die anschließende mitotische Zellteilung (M) nicht halbiert hat. In Abhängigkeit des durchlaufenden Abschnittes einer Zelle im Zellzyklus interkaliert Propidium-Iodid (PI) mit unterschiedlichen DNA-Mengen und erzeugt in der Durchflusszytometrie zwei unterschiedlich starke Fluoreszenzsignale (Kanal FI-2). Diese beiden im Histogramm ersichtlichen G_1 - und G_2 -Peaks werden von der Fluoreszenz der S-Phase miteinander verbunden. Für die Zellzyklusuntersuchung wurde das Analysesystem *DNA Staining Reagents* der Fa. Sigma verwendet. Hierfür wurden die Zellen durch Trypsinierung (10 min, 37°C , 5% CO_2) gelöst, mit PBS gewaschen, zentrifugiert ($300 \times g$, 10 min, RT) und ca. 1×10^6 Zellen pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200 μl eines Citrat-Puffers resuspendiert und durch Zugabe von 900 μl Lösung A (Trypsin-Lösung) unter Schütteln (10 min, RT) permeabilisiert.

Danach wurde zu dem Gemisch 750 μl einer Lösung B (Trypsin-Inhibitor, RNase A-Lösung) hinzugegeben und für 10 min unter Schütteln inkubiert. Am Ende wurden weitere 750 μl einer Propidium-Iodid Lösung (Lösung C) hinzupipettiert und unter Lichtausschluss für weitere 10 min geschüttelt. Schließlich wurden 10.000 mit Propidium-Iodid gefärbte Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Mittels des Computerprogramms *Cell Cycle Analysis CYLCHRED1.0.2* (Universität Cardiff; Wales, England) konnte die Verteilung der Zellpopulationen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus ermittelt werden.

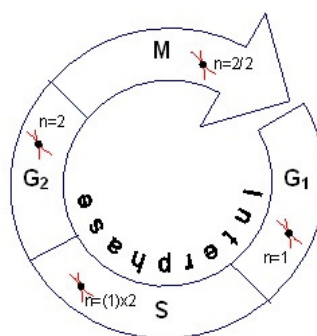


Abbildung 3-3: Vereinfachte Darstellung des Zellzyklus.

3.3.10 Bystander-Lyse von Tumorzellen

CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) werden über ein an HLA-Klasse I gebundenes Antigen auf der Oberfläche einer Zielzelle aktiviert. Durch Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen können unter bestimmten Umständen sich in direkter Nachbarschaft befindende Zellen lysiert werden, ohne dabei für die ursprüngliche Antigen-induzierte Reaktion verantwortlich zu sein. Eine solche durch zytotoxische T-Zellen-vermittelte Zelllyse bezeichnet man als Bystanderlyse^{187; 188; 189; 190; 191}. Die Untersuchung zur Bystander-Lyse von Neuroblastom-Zellen erfolgte mit Hilfe des CTL-Klones 10BK.1^{169; 187; 191}. Hierbei handelt es sich um einen murinen zytotoxischen T-Zell-Klon, der den CD8⁺ T-Lymphozyten angehört. Weiterhin ist dieser T-Zellklon in der Lage, sich über HLA-Klasse I Antigene untereinander zu präsentieren und somit auch gegenseitig zu aktivieren. Dieser generierte murine T-Zellklon wächst in Abwesenheit antigenpräsentierender Zellen (APC) ausschließlich in Anwesenheit eines speziellen Epitopes, dem prozessierten Ovalbumin (OVA)-spezifischen Octapeptid SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄). Für die Untersuchungen zur 10BK.1-vermittelten Bystanderlyse von Neuroblastomzellen wurden 20.000 Tumorzellen mit 100.000 Zellen des 10BK.1 T-Zellklons (Verhältnis 1:5) in FKS-freiem X-VIVO Medium mit einem Gesamtvolumen von 150 µl in einer 96-Lochplatte inkubiert. Je nach Ansatz wurden zusätzlich das Octapeptid SIINFEKL (30 ng/ml), Interleukin-2 (100 U/ml) und Triton X-100 (0,1%) zur Bestimmung der Maximallyse hinzugegeben. Für jede der unterschiedlich behandelten Tumorzelllinien (TZ) SH-SY5Y, SK-N-MC und A673 mit Medium, DMSO und ATRA ergaben sich folgende Reaktionsansätze:

Ansätze mit Tumorzellen (TZ)	Kontroll-Ansätze
TZ	10BK.1
TZ + 10BK.1	10BK.1 + Peptid
TZ + 10BK.1 + Peptid	10BK.1 + IL-2
TZ + 10BK.1 + IL-2	Medium
TZ + Peptid	
TZ + IL-2	
TZ + TX-100	

Im Anschluss wurden die 96-Lochplatten zur Erhöhung des Zellkontaktes mittels der Variofuge 3.0 der Fa. Heraeus (Hanau) zentrifugiert (5 min, 80 x g) und für 4 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Als nächstes wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 80 x g) der Kulturüberstand gewonnen, bei 4°C gelagert und im LDH-Test die eingetretene Zelllyse untersucht.

3.3.11 Analyse zur Invasivität von Tumorzellen

Das System *BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber* wurde von der Fa. BD Biosciences bezogen und diente zur näheren Untersuchung der individuellen Invasivität von Tumorzellen. Dieses *in-vitro* System dient zur Bestimmung der Migrationseigenschaften von Tumorzellen, welche aufgrund eines chemotaktischen Botenstoffgradienten durch eine Matrix (sogenanntes Matrigel) hindurch wandern. Die PET-Membran eines Matrigels ist von 8 µm großen Poren durchzogen und selektioniert somit invasive (maligne) von nicht-invasiven (niedrig maligne) Zellen. Die Matrigel-Matrix wurde ursprünglich aus einem Maussarkom (Engelbreth-Holm-Swarm) extrahiert und beinhaltet Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykan, Entactin, TGF-β (*transforming growth factor-β*) und basischer FGF (*fibroblastic growth factor*)^{192; 193}. Für die Untersuchungen wurde im Maßstab einer 6-Lochplatte mit 10 cm² großen Matrigel-Einsätzen gearbeitet. Dazu wurden die Platten mit den Matrigel-Einsätzen nach

der Lagerung bei -20°C auf RT erwärmt und anschließend mit je 2 ml Kulturmedium im äußeren und inneren Kompartiment für 120 min im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) rehydratisiert. Nach anschließender sorgsamer Entfernung des Mediums wurde das äußere Kompartiment (6-Lochplatte mit Matrigelunterseite) mit 2,5 ml frischem Medium in An- und Abwesenheit des chemotaktischen Botenstoffes SDF-1 (200 ng/ml) befüllt. In das innere Kompartiment (Matrigeloberseite) wurden die zu untersuchenden Tumorzellen ($1,25 \times 10^5$ Zellen/ml/Einsatz) mit und ohne zuvoriger Retinoid-Behandlung in 2 ml Kulturmedium ausgesetzt. Nach einer Inkubation von 48 h im Zellinkubator (37°C , 5% CO_2) wurden die migrierten Zellen, die sich an der Matrigelunterseite befanden, gezählt. Im Phasenkontrastmikroskop wurden die sich an der Unterseite des Matrigels befindenden invasiven Zellen in je 8 horizontalen und vertikalen Gesichtsfeldern bestimmt.

3.4 Proteintechnologische Methoden

3.4.1 Proteinisolation durch Zell-Aufschluss mit RIPA

Zunächst wurden die kultivierten Zellen trypsinisiert, mit PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert ($300 \times g$, 10 min, RT). Das daraus resultierende Zellpellet wurde in $100 \mu\text{l}$ RIPA-Puffer pro 1×10^6 Zellen resuspendiert. Durch ein anschließendes Auf- und Abziehen mit einer Kanüle (22x *gauche*) wurden die Zellen vollständig lysiert. In einer anschließenden Zentrifugation ($10.000 \times g$, 10 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Proteinlysate von Zelltrümmern befreit.

3.4.2 Proteinisolation aus TRIzol

Nach der Präzipitation der DNA (siehe TRIzol-Protokoll) wurde der Überstand mit 1,5 ml Isopropanol pro 1 ml TRIzol gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proteine präzipitiert und abzentrifugiert ($12.000 \times g$, 10 min, 4°C). Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit 2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid für 20 min inkubiert und gewaschen. Durch eine anschließende Zentrifugation ($9.000 \times g$, 10 min, 4°C) wurde der Waschüberstand erneut verworfen und das Pellet mit 96% Ethanol für 20 min inkubiert. Durch erneute Zentrifugation ($9.000 \times g$, 10 min, 4°C) wurden die Proteine pelletiert und für 10 min unter dem Abzug getrocknet. Im letzten Schritt wurde das Proteinpellet in etwa $200 \mu\text{l}$ 0,2 M NaOH gelöst und für die Analytik in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei -20°C gelagert.

3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten erfolgte nach der Methode von Bradford¹⁹⁴. Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau R-250 bindet an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm des freien Farbstoffes nach 595 nm des gebundenen Farbstoffes verschiebt. Mittels verschiedener BSA-Konzentrationen (10-100 $\mu\text{g/ml}$) wurde eine Eichkurve erstellt, die die Berechnung der Proteinkonzentration erlaubte. Dafür wurden $100 \mu\text{l}$ einer Probe vorgelegt und mit 1 ml Bradford-Lösung vermischt. Nach einer anschließenden Inkubation (5 min, RT) wurde die Konzentration bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

3.4.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur elektrophoretischen Auftrennung von unterschiedlich großen Proteinen aus einem Proteingemisch^{195; 196}. In einer Giessapparatur wurde das sich in der Acrylamidkonzentration und dem pH-Wert unterscheidende Sammel- und Trenngel vorsichtig und luftblasenfrei zwischen zwei Glasplatten übereinander geschichtet. Nach der vollständigen Polymerisierung wurden die Gele in eine Laufapparatur eingespannt und mit SDS-PAGE Laufpuffer bedeckt. Die im RIPA-Puffer enthaltenen Proteinproben wurden in SDS-PAGE Denaturierungspuffer (5x) aufgenommen und für 5 min (95°C) unter reduzierenden Bedingungen denaturiert. Nachdem die denaturierten Proben zusammen mit dem Größenstandard *SeeBlue Plus Pre-Stained Standard* (Fa. Invitrogen) aufgetragen wurden, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel.

Tabelle 3-5: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele (Angaben in ml)

Reagenz	Sammelgel (5%)	Trenngel (10-15%)
30% Acrylamid-Bis-Lösung (37, 5:1)	0,500	1,700-2,500
1,0 M Tris-HCl, pH 6,8	0,380	-
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	1,300
10% SDS	0,030	0,050
10% APS	0,030	0,050
TEMED	0,003	0,003
H ₂ O	ad 3,0	ad 5,0

3.4.5 Färbung eines SDS-Polyacrylamidgels mit Coomassie Brilliant Blue

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mit dem Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue R-250* angefärbt. Das Gel wurde für 1 h in einer Coomassie-Färbelösung (2,5 g/l *Coomassie Brilliant Blue R250*, 50% Methanol, 40% Wasser, 10% [v/v] Eisessig) geschwenkt und anschließend mit einer Entfärbelösung (50% [v/v] Methanol, 40% [v/v] H₂O, 10% [v/v] Eisessig) zur Verringerung des Hintergrundes gewaschen.

3.4.6 Western Blot

In einer Western Blot-Analyse werden Proteine, die in einem SDS-Polyacrylamidgel nach ihrer Größe (kDa) aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (geblottet) und mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Übertragung der Proteine im *semi dry*-Verfahren erfolgte in einer Blotapparatur der Fa. Bio-Rad (München). Hierfür wurden drei Lagen Whatmann Papier der Fa. BioRAD in Blot-Puffer getränkt und luftblasenfrei übereinander auf der Anodenplatte platziert. Als nächstes wurde die Nitrozellulosemembran (Fa. BioRad) auf das Whatmann Papier gelegt. Auf die Membran wurde das aus den Glasplatten ausgespannte und zugeschnittene Proteingel platziert, das daraufhin mit drei weiteren Lagen mit Blot-Puffer getränkten Whatmann Papier überschichtet wurde. Diese bildeten letztlich den Kontakt zur Kathodenplatte aus. Bei einer Stromstärke von etwa 0,8-1,0 mA erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf jeweils 1 cm² der Nitrozellulosemembran. Nach dem Blotten wurde die Membran auf die gleichmäßige Verteilung der transferierten Proteine kontrolliert. Hierzu wurde die Membran mit einer Ponceau-S-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau-S, 3% [v/v] Trichloressigsäure) gefärbt. Dadurch konnten die übertragenen Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden. Durch eine anschließende dreimalige Wäsche (je 5 min, RT) mit TBST wurde die Membran

wieder entfärbt. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Nitrozellulosemembran, zwecks einer Absättigung mit unspezifischen Ladungen und Proteinbindungen, mit einer proteinhaltigen Blockierungs-Lösung (5% [w/v] Magermilchpulver Sucofin, Fa. TSI GmbH & Co KG in TBST) für mindestens 60 min bei RT oder 24 h bei 4°C inkubiert. Für den immunologischen Nachweis eines exprimierten Proteins wurde zunächst der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:300 bis 1:1.000 in der Blockierungs-Lösung mit der Membran für 2-3 h bei RT rotierend oder optionell für 24 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde die primäre Antikörper-Lösung verworfen und die Membran dreimal mit TBST (5 min, RT) rotierend gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe eines mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten sekundären Antikörpers (Verdünnung von 1:3.000 bis 1:5.000) in der Blockierungs-Lösung, der für 1 h bei RT mit der Membran unter Rotation inkubiert. Nach Behandlung der Membran mit dem Sekundärantikörper wurde dreimal mit TBST für jeweils 5 min rotierend gewaschen. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mittels dem ECL-System der Fa. Amersham Biosciences. Nach dem Einspannen der Membran in eine Kassette kam es unter Ausschluss von Licht zur Belichtung eines Autoradiographiefilmes.

4 ERGEBNISSE

4.1 Vorbemerkung

Das Neuroblastom ist ein heterogener Tumor des sympathischen Nervensystems und stellt mit 7,3% das häufigste solide, extrakranielle Malignom im Kindesalter dar. Die entartete unreife Zelle, das Neuroblastom, findet seinen Ursprung in der Neuralleiste. Da das sympathische Nervensystem auf alle inneren Organe eine Funktion ausübt, könnte im Prinzip aus allen Organen ein Neuroblastom hervorgehen. In der Praxis ist das Neuroblastom jedoch am häufigsten im Nebennierenmark und im Bereich der Nervengeflechte beidseits der Wirbelsäule (Grenzstrang) vorzufinden. Als prognostisch relevanter Marker ist das Protoonkogen MYCN zu erwähnen, dass vornehmlich im Verlauf eines fortgeschrittenen Tumorstadiums exprimiert wird. Somit korreliert sowohl die MYCN-Amplifikation als auch -Expression mit einer unvorteilhaften klinischen Prognose. Die Prognose ist vom Stadium und den zytogenetischen Eigenschaften des Tumors abhängig. Die allgemeine Heilungsrate liegt zwischen den Stadien I bis III bei etwa 55%. Bei disseminierten Tumoren stellt sich hingegen nur eine Rate von etwa 5% ein. Aus diesem Grund sind neben der Chirurgie, Chemo- und Strahlentherapie, der Megatherapie sowie der Behandlung mit Antikörpern weitere Therapieansätze erforderlich, die die Heilungschancen von Neuroblastom-Patienten verbessern.

Gegenwärtig findet besonders in der Phase der Erhaltungstherapie nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen eine erfolgreiche Behandlung von Neuroblastom-Patienten mit Retinoiden statt. Retinoide besitzen neben der antiproliferativen und Apoptose-induzierenden Wirkung auch die Fähigkeit, in unreifen Zellen eine Differenzierung zu initiieren. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des natürlich vorkommenden Retinoids *all-trans* Retinsäure und des synthetisch hergestellten Retinamids 4-HPR auf das Wachstum und die Differenzierung des Neuroblastoms anhand verschiedener Neuroblastom-Zelllinien untersucht. Dazu wurde mittels der Affymetrix DNA-Microarrays die differentielle Genexpression in Neuroblastomzellen nach Behandlung mit Retinoiden untersucht, um die Differenzierung-induzierende Wirkung und daraus resultierende therapeutisch relevante Zielstrukturen näher charakterisieren zu können.

4.2 DNA-Microarrays als Werkzeug zur Typisierung von Tumoren peripheren neuroektodermalen Ursprungs

Mit Hilfe der DNA Microarray-Analyse läßt sich in einem Experiment das mRNA-Expressionsprofil des humanen Genoms von Normal- und Tumorgewebe sowie Zelllinien nahezu vollständig analysieren. Durch Bestimmung eines tumorspezifischen Expressionsprofils lassen sich verschiedene Tumore miteinander vergleichen und voneinander abgrenzen. Am Beispiel der etablierten Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y, SIMA, CHP-126 und SK-N-MC, die ebenfalls initial als Neuroblastom beschrieben wurde, konnte mittels des DNA-Microarrays und der Bestimmung des Genexpressionsprofils mit dem Genchip HG-U133A die Zelllinie SK-N-MC als Ewing-Tumor statt Neuroblastom identifiziert werden¹⁹⁷. Der Ewing-Tumor SK-N-MC stellt einen primitiven Tumor peripheren neuroektodermalen Ursprungs (pPNET) dar. Histologisch lassen sich das Neuroblastom und der Ewing-Tumor den kleinen, blau und rundzelligen Tumoren (SRBCT) zuordnen. Ursprünglich wurden für diese Analyse native Proben von Ewing-Tumoren mit 133 Proben normalen Gewebes aus einer NBA (*normal body atlas*)-Datenbank verglichen. Dabei wurden 38 Gene (*probe sets*) mittels des EOS-Hu01 Genchips identifiziert, die im Vergleich zu Normalgewebe ausschließlich in den Ewing-Tumoren überexprimiert wurden.

Aufgrund des Genchip-Designs finden sich nur 19 dieser Ewing-Tumor-spezifischen Gene auf dem Affymetrix HG-U133A Genchip wieder, mit dem das Genexpressionsprofil der „vier“ Neuroblastom-Zelllinien erstellt wurde. Unter diesen Genen befanden sich BCL11B (*B-cell CLL/lymphoma 11B*), NPY1R (*Neuropeptide Y receptor Y1*), NPY5R (*Neuropeptide Y receptor Y5*), ADRB1 (*Adrenergic, beta-1-, receptor*), CCND1 (*Cyclin D1*), GDF10 (*Growth differentiation factor 10*), EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2, Drosophila*), SCGF (*C-type lectin domain family 11, member A*), RNF41 (*Ring finger protein 41*), PCDH11X (*Protocadherin 11 X-linked*), DKK2 (*Dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)*), EGR2 (*Early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)*), JAK1 (*Janus kinase 1*), STEAP (*Six transmembrane epithelial antigen of the prostata*), P450RAI2 (*Cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1*), CCK (*Cholecystokinin*), OFM (*Olfactomedin 1*), PCDH8 (*Protocadherin 8*) und LECT1 (*Leukocyte cell derived chemotaxin 1*). Um zu untersuchen, welche Gengruppen in den verschiedenen Expressionsmustern vertreten sind, wurden die Programme „Cluster“ und „Tree View“ verwendet, die auf der sogenannten Cluster-Analyse nach Eisen aufbauen¹⁹⁸. Die Programme Cluster und Tree View dienen der Erstellung von Clustern, der graphischen Darstellung sowie der Zuordnung der funktionellen Gene. In einer Cluster-Analyse werden ähnliche Expressionsmuster in einer verwandtschaftlichen Verzweigung in Form eines Stamm (Cluster)-baumes dargestellt. Nach einer Standardisierung wird die Expressionsstärke in der Falschfarbendarstellung simuliert. Eine rote Färbung symbolisiert eine starke Überexpression und eine dunkelgrüne Färbung eine Unterexpression eines Gens. Durch eine hierarchische Cluster-Analyse bildeten sich durch den Vergleich der Expressionsprofile von Ewing-Tumor-spezifischen Genen anhand der vier Zelllinien zwei Untergruppen im Stammbaum aus (Abbildung 4-1, A).

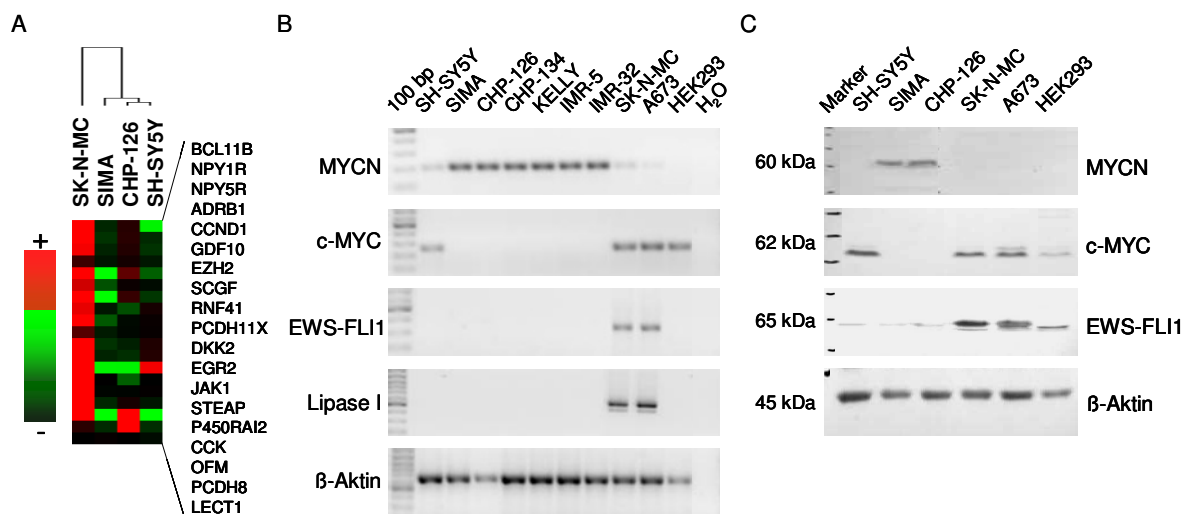


Abbildung 4-1: Vergleich des Expressionsprofils von Tumoren neuroektodermalen Ursprungs. (A) Cluster Analyse und Falschfarbendarstellung differenziell exprimierter Gene für den Vergleich der Ewing-Tumorzelllinie SK-N-MC, die ursprünglich als Neuroblastom klassifiziert wurde, mit weiteren drei etablierten Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y, SIMA und CHP-126. (B) RT-PCR zur Bestimmung des tumorspezifischen Expressionsprofils und Klassifizierung von Neuroblastom- und Ewing-Tumorzelllinien. (C) Western Blot-Analyse zur Identifikation des tumorspezifischen Proteins MYCN, c-MYC, EWS-FLI1 und β-Aktin.

Aus der Falschfarbendarstellung geht größtenteils eine ausbleibende Expression (grüne Farbe) von Ewing-Tumor-spezifischen Genen in der einen Untergruppe, bestehend aus den drei Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y, SIMA und CHP-126 hervor. Somit grenzten diese Neuroblastome sich aufgrund ihres Expressionsprofils von der anderen Untergruppe tumorspezifisch ab. Die zweite Untergruppe, die sich aus der initial beschriebenen Neuroblastom-Zelllinie SK-N-MC zusammensetzte, exprimierte hingegen fast alle Ewing-Tumor-charakteristischen Gene (rote Farbe) und wies in der Cluster-Analyse aufgrund des

differenziellen Expressionsprofils geringere Ähnlichkeiten im Vergleich zu den Neuroblastom-Zelllinien auf. Durch Identifizierung von 38 EFT-spezifischen Genen, die ursprünglich mit dem EOS-Hu01 Genchip ermittelt und mit 19 dieser Gene auf dem Affymetrix HG-U133A Genchip verifiziert wurden, kann aufgrund der Reproduzierbarkeit von Daten verschiedenen Genchip-Designs, die Microarray-Analyse zur besseren Typisierung von Tumoren eingesetzt werden. In einer RT-PCR wurden anhand weiterer Tumorzelllinien und HEK293 zusätzliche Neuroblastom- und Ewing-Tumor-spezifische Gene untersucht (Abbildung 4-1, B). Durch den Vergleich verschiedener Tumor-Zelllinien konnte ein „MYC-Dualismus“ analysiert werden. So konnte ausschließlich in den Neuroblastom-Zelllinien SIMA, CHP-126, CHP-134, KELLY, IMR-5 und IMR-32 die mRNA-Expression des Proto-Onkogens MYCN nachgewiesen werden. Die anderen MYCN-negativen Zelllinien SH-SY5Y und Ewing-Tumore SK-N-MC und A673 sowie die normalen Zellen HEK293 exprimierten stattdessen das Zellzyklus-regulierende Proto-Onkogen c-MYC. Die ausbleibende Expression eines MYC-Proteins vom Typ c-MYC oder MYCN schien somit stets durch Expression des anderen kompensiert zu werden. Proteine der MYC-Familie stellen ein essentielles Protein in allen Zellen mit hoch proliferierenden Eigenschaften dar. Ewing-Tumore zeichnen sich stets durch eine reziproke Fusion des EWS-Gens mit einem ETS-Gen aus. Zur weiteren genspezifischen Charakterisierung und Abgrenzung der Ewing-Tumore SK-N-MC und A673 von den Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y, SIMA, CHP-126, IMR-5, IMR-32, CHP-134 und KELLY wurde die Expression des Ewing-Tumor-spezifischen Fusionsgens EWS-FLI1 aus der reziproken Translokation der Gene EWS auf Chromosom 22 (q12) und FLI1 auf Chromosom 11 (q24) untersucht. Die Expression des reziproken EWS-FLI1 Fusionsgens wurde ausschließlich in den beiden Ewing-Tumor-Zelllinien SK-N-MC und A673 im Vergleich zu den sieben untersuchten Neuroblastom-Zelllinien und HEK293 nachgewiesen. Ein weiteres für Ewing-Tumore charakteristisches Gen stellt Lipase I (LIPI) dar. LIPI (UniGene Hs.139907) wurde ursprünglich als *Cancer Testis Antigen* (UniGene Hs.178062) beschrieben¹⁹⁹. Weitere Charakterisierungen identifizieren Lipase I als eine Membran-assoziierte Phospholipase A1 β ²⁰⁰. Mit Ausnahme des Hodens wird Lipase I ausschließlich in Tumoren der Ewing-Familie exprimiert und stellt somit ein interessantes und wichtiges Protein zur Identifizierung und Abgrenzung von anderen Tumoren dar. In der RT-PCR wurde eine Lipase I mRNA-Expression ausschließlich in beiden Ewing-Tumoren SK-N-MC und A673 im Vergleich zu den sieben Neuroblastom-Zelllinien und HEK293 nachgewiesen. Im Western Blot wurde die Expression der Neuroblastom- und Ewing-Tumor-spezifischen Proteine MYCN, c-MYC und EWS-FLI1 ebenfalls näher untersucht (Abbildung 4-1, C). Mittels eines Anti-MYCN Antikörpers wurde wie schon in der RT-PCR nur in den Neuroblastom-Zelllinien SIMA und CHP-126 im Vergleich zu SH-SY5Y das Proto-Onkogen MYCN exprimiert. In den anderen MYCN-negativen Neuroblastomzellen SH-SY5Y, den Ewing-Tumorzelllinien SK-N-MC und A673 sowie der Nicht-Tumorzelllinie HEK293 wurde die c-MYC Proteinexpression anhand eines monoklonalen Anti-c-MYC Antikörpers erfolgreich nachgewiesen. Die Expression des 65 kDa großen reziproken Fusionsproteins EWS-FLI1 ließ sich ebenfalls wie in der RT-PCR nur in den Ewing-Tumorzellen SK-N-MC und A673 detektieren.

4.3 Biologische Wirkung von Retinoiden

4.3.1 Antiproliferative Wirkung von ATRA und 4-HPR auf Neuroblastomzellen

Die biologische Wirkung des natürlich vorkommenden Retinoids *all-trans* Retinsäure und des durch R. Gander synthetisierten Fenretinides (4-HPR) wurde zunächst an sieben verschiedenen Neuroblastom- und zwei Ewing-Tumor-Zelllinien getestet. Hierzu wurde die antiproliferative Eigenschaft beider Retinoide in Abhängigkeit von der Konzentration auf das Wachstum von

Tumorzellen in einem MTT-Proliferationstest photometrisch untersucht. Der MTT-Test dient zur Bestimmung der Vitalität und des Wachstums von Zellen. Hierbei korreliert der mitochondriale Dehydrogenase-vermittelte Umsatz des prozessierten Tetrazoliumringes aus dem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) zum dunkelblauen Formazansalz mit der Anzahl vitaler Zellen. Die relative Viabilität der Tumorzelllinien gegenüber den Retinoiden wurde durch Titration bestimmt und in Form einer Dosis-Wirkungskurve dargestellt (Abbildung 4-2, A und C).

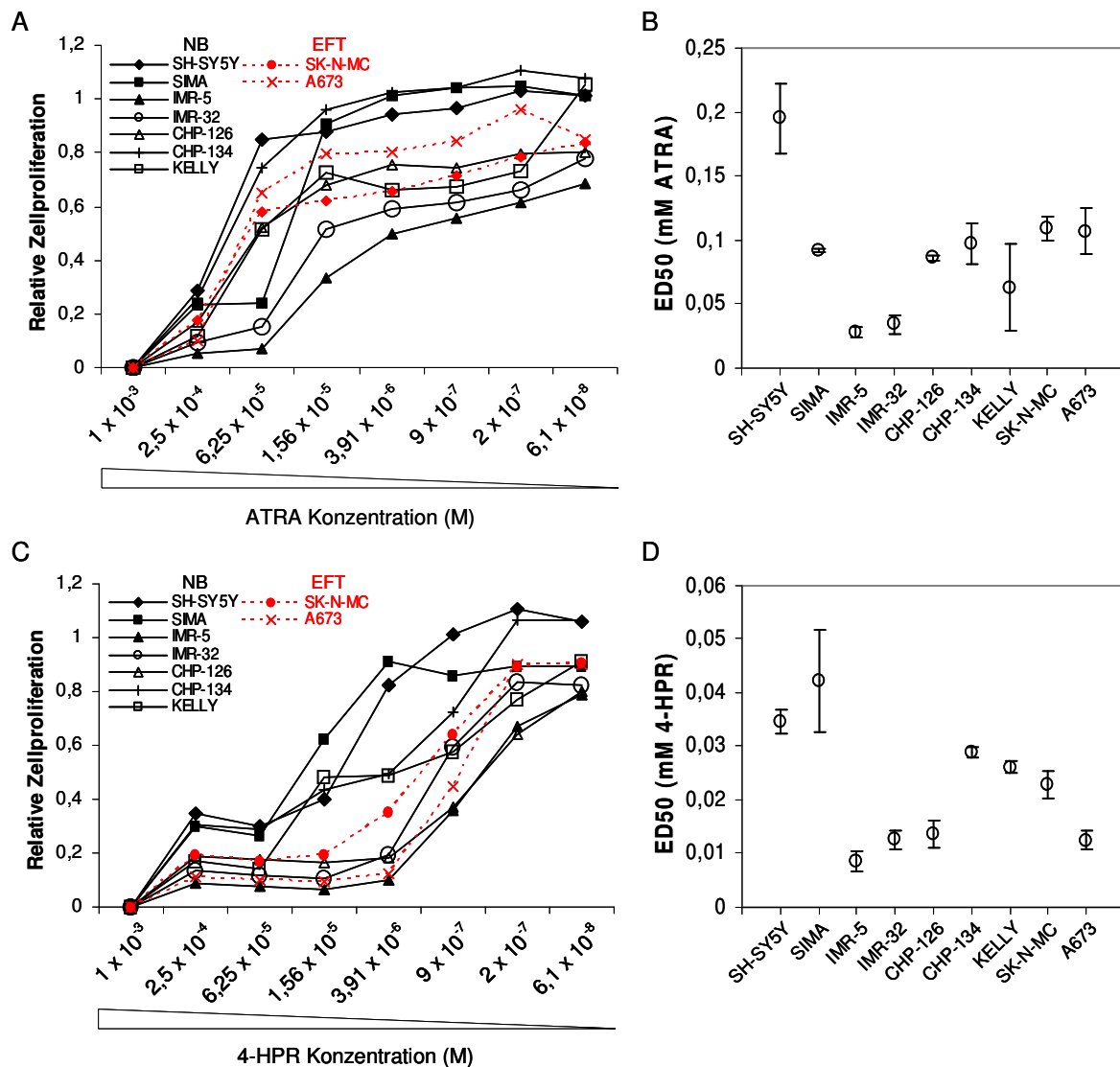


Abbildung 4-2: Dosis-Wirkungsanalyse und ED50-Werte von ATRA- und 4-HPR-behandelten Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien. (A,C) Für den MTT-Proliferationstest wurden 5.000 Zellen für 24 h (37°C, 5% CO₂) präinkubiert. Im Anschluß wurden die in DMSO gelösten Retinoide ATRA und 4-HPR in einem Konzentrationsbereich von 1×10^{-3} bis $6,1 \times 10^{-8}$ M titriert und mit den Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien für 96 h (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Die Viabilität der Zellen wurde photometrisch über die Bildung des Formazansalzes gemessen. (B,D) Bestimmung der ED50-Werte, diese entsprachen einer effektiven Dosis (Konzentration), bei der sich 50% aller ATRA- und 4-HPR-stimulierten Zellen noch immer in einem vitalen Zustand befanden. Die Berechnung der ED50-Werte erfolgte mittels des Computerprogramms ED50plus V1.0 (Entwicklung: M.H. Vargas; Forschungslabor, Nationales Institut für respiratorische Erkrankungen, Mexiko-Tlaplan).

Beide in DMSO gelösten Retinoide wurden in einem Konzentrationsbereich von $1,0 \times 10^{-3}$ bis $6,1 \times 10^{-8}$ M titriert und mit diversen Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien inkubiert. Nach Behandlung der Zelllinien fiel zunächst die stärkere antiproliferative Wirkung des synthetischen Retinamids 4-HPR gegenüber ATRA auf. Alle Zellen zeigten bei einer maximalen Retinoid-Konzentration von $1,0 \times 10^{-3}$ M ATRA oder 4-HPR keine Vitalität. Bei einer Dosis von $6,1 \times 10^{-8}$

M titrierten sich die beiden Retinoide so stark aus, dass die inhibitorische Wirkung größtenteils aufgehoben wurde. Die geringste Sensitivität gegenüber einer ATRA- als auch 4-HPR-vermittelten antiproliferativen Wirkung war bei der Zelllinie SH-SY5Y zu beobachten. Die größte Empfänglichkeit bezüglich einer Wachstumshemmung zeigte sich bei den Neuroblastom-Zelllinien IMR-5, IMR-32 und KELLY nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure (Abbildung 4-2, A). Durch 4-HPR wurden verstärkt die Neuroblastom-Zelllinien CHP-126, IMR-5, IMR-32 sowie im besonderem Maße die Ewing-Tumorzellen A673 und SK-N-MC im Wachstum inhibiert (Abbildung 4-2, C). Mittels Titration der Retinoide und der Dosis-Wirkungsanalyse ließ sich auch die effektive Dosis (ED50), eine Konzentration bei der 50% der Zellen nach Behandlung überlebten, für jede einzelne Zelllinie bestimmen (Abbildung 4-2, B und D). Auch hier zeigte sich insbesondere bei den Neuroblastomzellen SH-SY5Y die geringste Empfindlichkeit gegenüber einer antiproliferativen Wirkung mit ATRA und 4-HPR. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien war eine hohe Konzentrationen von 0,2 mM ATRA und 0,035 mM 4-HPR erforderlich, um die Rate an vitalen Zellen auf 50% zu reduzieren. Nur die Neuroblastom-Zelllinie SIMA erwies sich mit einem ED50-Wert von 0,042 M als noch resistenter gegenüber 4-HPR. Gegenüber ATRA zeigte SIMA hingegen mit einer ED50-Konzentration von 0,092 mM im Vergleich zu den Neuroblastomzellen SH-SY5Y eine deutlich höhere Empfindlichkeit. Ähnlich vergleichbare Konzentrationen von 0,086 mM und 0,097 mM ATRA wurde bei den Zelllinien CHP-126 und CHP-134 gemessen. Wie schon aus den Dosis-Wirkungskurven ersichtlich war, ergab auch die Ermittlung der effektiven Dosis für die Zelllinien IMR-5 und IMR-32 nach Kultivierung mit ATRA die geringsten ED50-Werte von 0,028 mM und 0,034 mM und somit die höchste Sensitivität gegenüber dem Einfluss der Retinsäure. Bei einer Kultivierung mit 4-HPR erwiesen sich neben den Neuroblastom-Zelllinien CHP-126 erneut IMR-5 und IMR-32 mit einem ED50-Wert von 0,0086 mM (IMR-5), 0,0126 mM (IMR-32) und 0,0137 mM (CHP-126) als besonders empfindlich gegenüber dem synthetischen Retinamid. Mit einem ED50-Wert von 0,109 mM und 0,107 mM waren beide Ewing-Tumor-Zelllinien SK-N-MC und A673 gegenüber einer Behandlung mit ATRA gleich empfindlich, jedoch weniger sensitiv als die Neuroblastom-Zelllinien IMR-5 und IMR-32. Ein Anstieg der Proliferationsrate auf mindestens 50% wurde bei einer Behandlung von A673 mit 4-HPR erst nach Verdünnung auf 0,0125 mM gegenüber 0,0299 mM bei SK-N-MC beobachtet. Die Empfindlichkeit der Ewing-Tumorzellen A673 gegenüber 4-HPR war höher als bei SK-N-MC und mit der von den Neuroblastom-Zelllinien IMR-32 und CHP-126 vergleichbar. Aus der Bestimmung der ATRA- und 4-HPR-abhängigen Viabilität von Tumorzellen wurde für weitere *in-vitro* Untersuchungen eine Konzentration von $6,25 \times 10^{-5}$ M ATRA und $3,9 \times 10^{-6}$ M 4-HPR ausgewählt. In diesem Konzentrationsbereich unterlagen die Zellen statt apoptotischen oder nekrotischen Prozessen einer wachstumshemmenden und Differenzierung-induzierenden Wirkung durch die beiden Retinoide.

4.3.2 Generationsanalyse von Retinoid-behandelten Neuroblastomzellen

Mittels des MTT-Proliferationstests wurde die Viabilität und der ED50-Wert diverser Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien gegenüber dem natürlichen Retinoid ATRA und dem synthetischen Retinamid 4-HPR bestimmt. Da in diesem Test die gemessene Viabilität beziehungsweise Proliferation auch die Stoffwechselaktivität in der Zelle beeinflussen kann, wurde eine weitere Analyse zur Bestimmung der Generationsfolge hinzugezogen. Hierzu wurde die mit Medium, DMSO, ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) und 4-HPR ($3,9 \times 10^{-6}$ M) behandelte Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y mit dem fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH26 (Fluoreszenz-2) markiert und die mit der Proliferation verbundene Generationsfolge im Durchflusszytometer am Tag 8 verfolgt. Diese quantitative Analyse basiert auf einer Halbierung und Reduktion des membranständigen Fluoreszenzfarbstoffes PKH26 mit jeder

abgeschlossenen Zellteilung. In der Abbildung 4-3 A sind die im Durchflusszytometer ermittelten parentalen und darauffolgenden Tochtergenerationen unterschiedlich behandelter Zellen für den Zeitraum von 8 Tagen dargestellt.

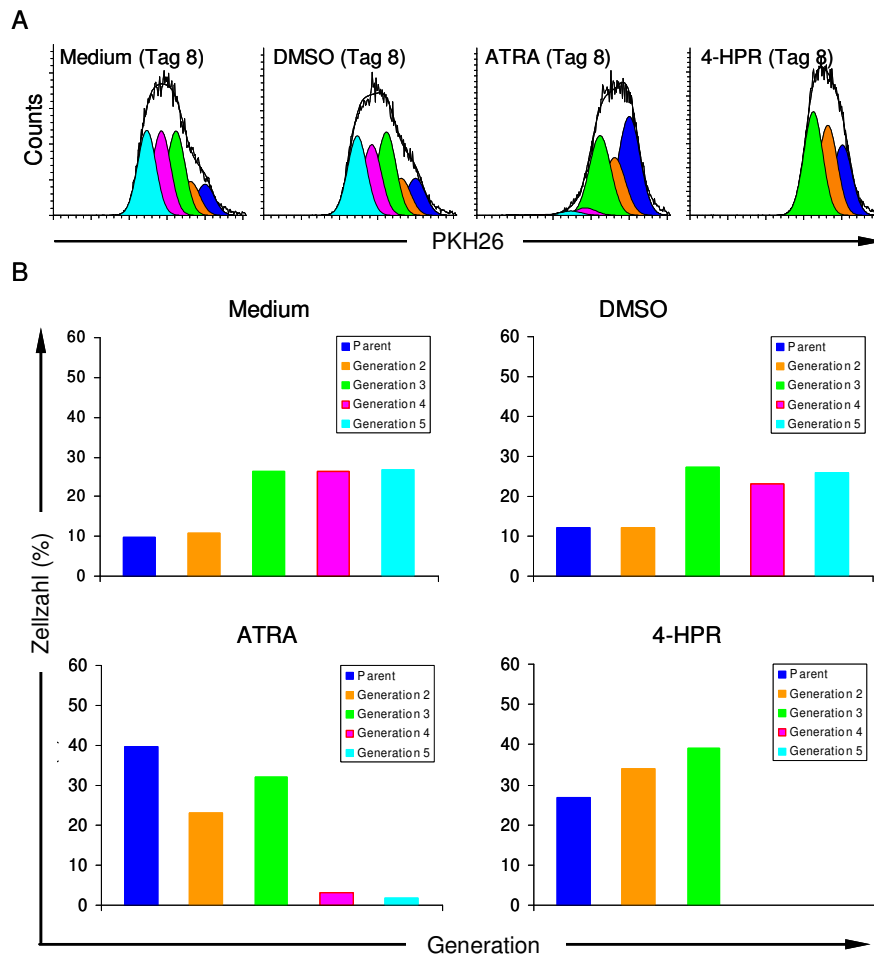


Abbildung 4-3: Proliferations- und Generationsanalyse der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y nach Behandlung mit synthetischen und natürlichen Retinoiden. (A) Durchflusszytometrische Analyse PKH26-markierter Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) nach der Behandlung mit Medium, DMSO, ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) und 4-HPR ($3,9 \times 10^{-6}$ M). Dazu wurden die PKH26-markierten und unterschiedlich kultivierten Zellen nach 8 Tagen isoliert, in 3% PFA fixiert und im FACScan (Fluoreszenz-2) gemessen. (B) Die quantitative Auswertung der Generationsanalyse erfolgte durch das Computerprogramm ModFit LT 4.0. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Tumorzellen aus den einzelnen Parental- und Tochtergenerationen an Tag 8.

In den Histogrammen wurde die Zellzahl (Counts) gegen die PKH26-Fluoreszenz aufgetragen. Nach der quantitativen Auswertung der Histogramme mit dem Computerprogramm ModFit LT 4.0 wurde bei der Behandlung der Kontrollzellen (Medium und DMSO) neben der ursprünglichen parentalen Generation (blau), vier weitere Tochtergenerationen: Generation 2 (orange), 3 (grün), 4 (lila) und 5 (türkis) gemessen. Aus den mit den Retinoiden ATRA- und 4-HPR-behandelten Neuroblastomzellen SH-SY5Y waren über einen Zeitraum von maximal 8 Tagen neben der parentalen Generation nur 2 darauffolgende Tochtergenerationen (Generation 2 und 3) hervorgegangen. Durch die antiproliferative Wirkung der beiden Retinoide wurde das Wachstum und die Bildung von Folgegenerationen inhibiert. In Abbildung 4-3 B sind die mit dem Computerprogramm ModFit LT 4.0 ermittelten Tochtergenerationen der Zelllinie SH-SY5Y nach unterschiedlicher Behandlung am Tag 8 quantitativ dargestellt. Bei den Kontrollzellen (Medium und DMSO) nahm die Parentalgeneration von 100% am Tag 0 auf rund 10% am Tag 8 stetig ab. Die parentale Generation bei Retinoid-kultivierten Neuroblastomzellen nahm hingegen bei ATRA- und 4-HPR-behandelten Tumorzellen von 100% auf etwa 39% (ATRA) und 27% (4-HPR) bis Tag

8 deutlich weniger ab. Im Verlauf von 8 Tagen bildeten sich bei ATRA- und 4-HPR-stimulierten Neuroblastomzellen nur zwei darauffolgende Tochtergenerationen aus, die einen Anteil von 23% (ATRA) und 34% (4-HPR) in der Tochtergeneration 2 und 32% (ATRA) und 39% (4-HPR) in der Tochtergeneration 3 hatten. In beiden Kontrollansätzen wurde hingegen ein zellulärer Anteil von 12% in der Generation 2 und 27% in der Generation 3 gemessen. Ausschließlich bei den stärker proliferierenden Kontrollzellen konnte die Tochtergenerationen 4 und 5, jeweils mit einem Anteil von 25%, an Tag 8 gemessen werden. Unabhängig von Stoffwechseleinflüssen konnte mittels dieser Zellgenerationsanalyse die inhibitorische Aktivität der Retinoide ATRA und 4-HPR auf das Wachstum der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y nachgewiesen werden.

4.3.3 Zellzyklusanalyse der Neuroblastomzellen SH-SY5Y nach Retinoid-Kultivierung

In den vorherigen Experimenten wurde mittels eines Proliferationstests und einer Generationsanalyse die biologische, antiproliferative Wirkung von synthetischen und natürlichen Retinoiden auf das Wachstum von Neuroblastom- und vergleichenden Ewing-Tumor-Zelllinien bestimmt. Zur näheren Charakterisierung dieser inhibitorischen Aktivität von Retinoiden wurde zusätzlich eine Zellzyklusanalyse am Beispiel der Modellzelllinie SH-SY5Y durchgeführt. Über die Zellzyklusanalyse gewinnt man Erkenntnisse über die quantitative Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen eines Zellzyklus. Mittels des DNA-Interkalators Propidium-Iodid (PI) lässt sich der unterschiedliche DNA-Gehalt in den einzelnen Zyklusphasen einer Zelle im Durchflusszytometer bestimmen. Im FACS konnte durch Messung der PI-vermittelten Fluoreszenz-2 der einfache Chromatid-Gehalt der G1-Phase und der doppelte Chromatid-Gehalt der G2-Phase bestimmt werden. Beide Zyklusphasen wurden im FACS sichtbar mit der Replikations-Phase (S-Phase) miteinander verbunden. Die quantitative Verteilung der einzelnen Phasen eines Zellzyklus ist für die Kontrollzellen (Medium und DMSO) sowie ATRA und 4-HPR in Abbildung 4-4 dargestellt.

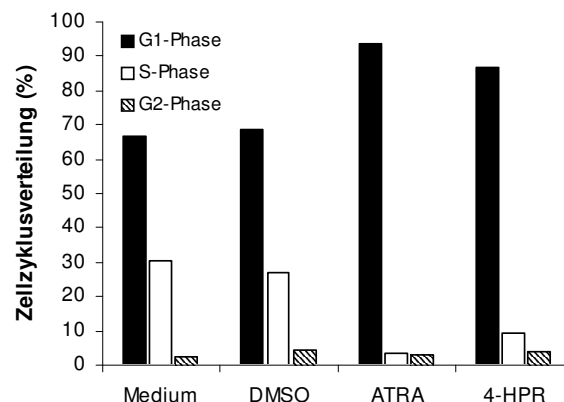


Abbildung 4-4: Zellzyklusanalyse von Retinoid-stimulierten Neuroblastomzellen. Die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y wurde für 96 h (37°C, 5% CO₂) in Anwesenheit von Medium, DMSO, ATRA (6,25 x 10⁻⁵ M) und 4-HPR (3,9 x 10⁻⁶ M) kultiviert und bei einer maximalen Zelldichte von 60-70% isoliert. Im Anschluß erfolgte die Färbung der Zellen mit Propidium-Iodid und die durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenz-2. Die Bestimmung der quantitativen Verteilung der unterschiedlich behandelten Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus erfolgte mittels des Computerprogramms *Cell Cycle Analysis*.

Demnach befanden sich 66% der Medium- und 68% der DMSO-behandelten Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Wurden die Neuroblastomzellen SH-SY5Y jedoch mit den beiden Retinoiden behandelt, so vergrößerte sich das Fluoreszenzsignal in der G1-Phase auf 93% (ATRA) und 87% (4-HPR). Gleichzeitig konnte man eine Reduktion des zellulären Anteils in der S-Phase auf 3% in ATRA- und 9% in 4-HPR-kultivierten Neuroblastomzellen beobachten.

Ursprünglich befanden sich 30% der Medium- und 27% der DMSO-behandelten Kontrollzellen in der S-Phase. Der Anteil, der sich in der G2-Phase befindenden Zellen, lag bei allen Ansätzen konstant zwischen 3 und 4%. Die wachstumsinhibierende Wirkung beider Retinoide begründete sich also durch eine Verschiebung des zellulären Anteils um etwa 30% Prozent von der S- in die G1-Phase. Somit arretierten ATRA- und 4-HPR-behandelte Neuroblastomzellen in der G1-Phase und der Anteil, der sich ursprünglich in der DNA-Replikation befindenden Zellen (S-Phase), wurde durch den Zyklus- und Zellteilungsstopp deutlich reduziert.

4.4 Genexpressionsanalyse von Retinoid-behandelten Neuroblastomzellen

Am Beispiel der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y wurde in An- und Abwesenheit der beiden Retinoide *all-trans* Retinsäure und 4-HPR das differentielle Genexpressionsprofil untersucht und das Differenzierung-induzierende Potenzial miteinander verglichen. Mittels RT-PCR, quantitativer *real-time* RT-PCR, dem Western Blot und der durchflusszytometrischen Analyse wurden die differentiell exprimierten Gene untersucht, die den Mechanismus einer Retinoid-vermittelten Differenzierung näher charakterisierten.

4.4.1 Differentielle Antigenexpression auf Neuroblastomzellen nach Behandlung mit natürlichen und synthetischen Retinoiden

Die Durchflusszytometrie dient zur automatisierten individuellen Differenzierung und Zählung von Zellen und Mikropartikeln. Die 1969 durch Hulett *et al.* erstmals beschriebene fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ist in der Lage, spezielle Merkmale der Zelle wie Größe, Granularität und verschiedene Fluoreszenzen (FITC, PE) differenziert zu analysieren. Anhand der in Tabelle 3-4 aufgeführten monoklonalen und polyklonalen Antikörper wurde zunächst im Durchflusszytometer der Retinoid-induzierte Entwicklungszustand der Neuroblastomzellen SH-SY5Y durch Bestimmung des differentiellen Proteinexpressionsmusters der CD-Oberflächenantigene untersucht (Abbildung 4-5, A). Die aus den PE- und FITC-markierten Antikörpern resultierende Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ergab nach Kultivierung mit ATRA eine besonders starke Expressionsänderung der Oberflächenantigene CD54, CD117, CD184 und HLA-A,B,C (HLA-Klasse I) im Vergleich zu den mit DMSO kultivierten Neuroblastomzellen SH-SY5Y. Mit einer Mittleren Fluoreszenzintensität von 279 und einem Fold Change von 91 führte eine Behandlung der SH-SY5Y-Zellen mit *all-trans* Retinsäure am stärksten bei dem Oberflächenantigen CD54 zu einer Heraufregulierung. Die im Durchflusszytometer detektierte Induktion der restlichen Oberflächenmoleküle durch ATRA im Vergleich zu DMSO besaß einen Fold Change von 3,6 (HLA-A,B,C; Klon G46-2.6), 3,5 (CD117) und 2,7 (HLA-A,B,C; Klon W6/32). Ausschließlich bei dem konstitutiv exprimierten Oberflächenantigen CD184 führte eine Behandlung mit ATRA zu einer Herunterregulierung des Fluoreszenzsignals um einen Fold Change von 0,039 und einer reduzierten Mittleren Fluoreszenzintensität von ursprünglich 25 auf 1. Durchflusszytometrisch wurde neben ATRA auch der Einfluss des synthetischen Retinoids 4-HPR auf die differentielle Antigenexpression der SH-SY5Y-Zellen untersucht (Abbildung 4-5, B). Durch 4-HPR wurden anhand PE- und FITC-markierter mono- und polyklonaler Antikörper deutlich weniger Oberflächenproteine reguliert als durch ATRA. Das durch 4-HPR am stärksten herunterregulierte Antigen stellte der Chemokinrezeptor CD184 dar. Im Vergleich zu DMSO reduzierte sich durch Anwesenheit von 4-HPR die basale CD184 Proteinexpression um eine Mittlere Fluoreszenzintensität von 25 auf 4 bzw. um einen Fold Change von 0,186. Nach Kultivierung mit 4-HPR wurde wie durch ATRA das Antigen CD54 induziert. Mit einem Fold

Change von 10,8 und einer Zunahme der Mittleren Fluoreszenzintensität von 1,65 auf 17,83 war CD54 das einzige heraufregulierte Oberflächenprotein.

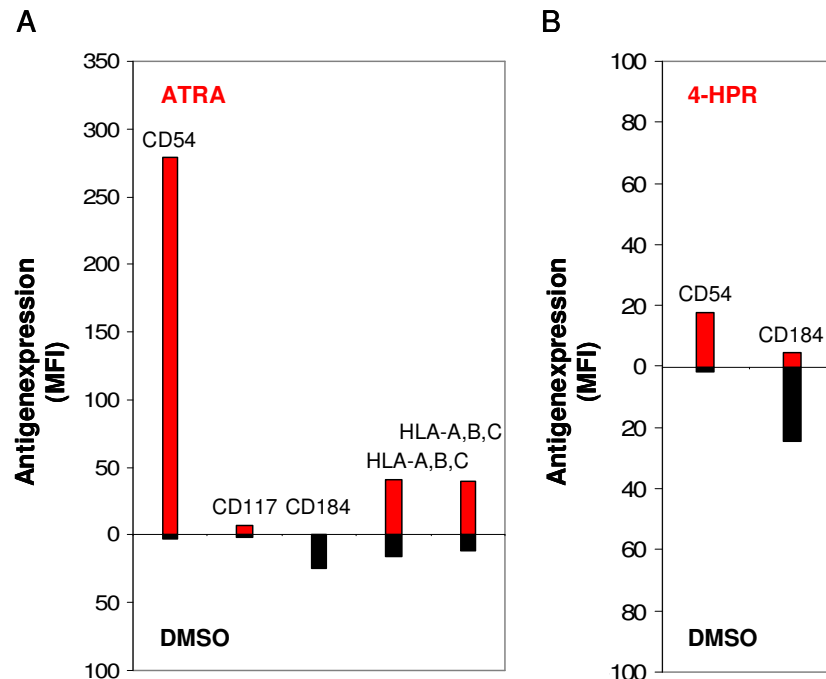


Abbildung 4-5: Differenzielle Proteinexpression von diversen Oberflächenantigenen auf SH-SY5Y-Zellen in Anwesenheit von ATRA und 4-HPR. SH-SY5Y-Zellen wurden jeweils in Anwesenheit von DMSO, ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) und 4-HPR ($3,9 \times 10^{-6}$ M) für 96 h (37°C , 5% CO_2) kultiviert. Jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen in 100 μl PBS wurden mit 50 μl der PE- oder FITC-markierten Antikörper für 30 min (4°C , dunkel) gefärbt und anschließend gemessen. Im Durchflusszytometer (FACSscan) wurde im Kanal für die Fluoreszenz-1 (FITC) und Fluoreszenz-2 (PE) von jeweils 10.000 Zellen die Fluoreszenz aufgenommen. Mittels des Computerprogramms Cell Quest Pro erfolgte die Auswertung und Darstellung der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI).

4.4.2 Differenzielle Genexpression in den Neuroblastomzellen SH-SY5Y durch ATRA

Im Anschluß an die durchflusszytometrische Analyse wurde auf molekularer Ebene die wachstumsinhibierende und Differenzierung-induzierende Wirkung von *all-trans* Retinsäure auf unreife Neuroblastome am Modell der Zelllinie SH-SY5Y im DNA-Microarray detaillierter untersucht. Dafür wurden auf den Affymetrix HG-U133A Genchips die aus zwei Experimenten stammenden Biotin-markierten cRNA-Proben aus SH-SY5Y, bestehend aus Medium (IN061803_01x, IV100804_01x), DMSO (IN061803_02x, IV100804_02x) und ATRA (IN061803_04x, IV100804_03x), aufgetragen und hybridisiert. Insgesamt wurde jeder Ansatz in Duplikaten aus zwei unabhängigen Experimenten mit dem HG-U133A Genchip vor und nach Antikörper-Verstärkung (x) untersucht. Die gewonnenen Expressionsdaten wurden mit dem Computerprogramm Microarray Analysis Suite (MAS, Version 5.0) ausgewertet und in Excel überführt. Für die Auswertung wurde aus den Duplikaten der einzelnen Gruppen (Medium, DMSO und ATRA) der Mittelwert gebildet. Zur Berechnung der differentiellen Genexpression wurde zunächst nur die Differenz und der Faktor eines über- oder unterexprimierten Gens (Fold Change) zwischen den ATRA- und Medium-behandelten Zellen herangezogen. Der Kontrollansatz mit DMSO stimulierten Zellen wurde in die Auswertung mit den als differentiell exprimierten Genen zwischen ATRA- und Medium-behandelten Zellen integriert. In Abbildung 4-6 (A und B) sind die 40 am stärksten differentiell über- und unterexprimierten Gene repräsentiert. In den Diagrammen wurden die differentiell exprimierten Gene inklusive den dazugehörigen Sondensatznummern gegen die Expressions-Signalstärken dargestellt. Die 40 am stärksten differentiell unterexprimierten Gene (Abbildung 4-6, A) mußten sich hierzu in einer

Expressionsstärke von ATRA im Vergleich zu Medium mindestens um einen Fold Change von 0,333 beziehungsweise um eine Differenz von -250 unterscheiden. Auf diese Weise wurden bei den durch ATRA herunterregulierten Genen DLK1 (209560), ASCL1 (209988, 209987, 213768), c-MYC (202431), CD184 (217028) sowie die Insulin-ähnlich bindenden Proteine IGFBP3 (210095), IGFBP5 (211959) und IGFBP7 (201163, 201162) identifiziert. Diese Gene wurden im Vergleich zu den restlichen herunterregulierten Genen aufgrund ihrer Funktion näher untersucht. Im Gegensatz zu den einfach detektierten SONDENSÄTZEN für die Gene DLK1, c-MYC und CD184 wurden für das Gen ASCL1 drei verschiedene SONDENSÄTZE auf dem HG-U133A Genchip gleichzeitig als unterexprimiert erkannt. Die Expressions-Signalstärken waren in den mit ATRA behandelten Zellen SH-SY5Y um einen Fold Change (FC) und einer Differenz (D) bei DLK1 (FC: 0,16/ D: -4500), ASCL1 (FC: 0,129/ D: -821) (FC: 0,024/ D: -515) (FC: 0,095/ D: -436), c-MYC (FC: 0,154/ D: -468), CD184 (FC: 0,294/ D: -340) IGFBP3 (FC: 0,183/ D: -1946), IGFBP5 (FC: 0,297/ D: -595) und IGFBP7 (FC: 0,259/ -636) (FC: 0,286/ D: -1030) gegenüber Medium erniedrigt. Besonders diese Kandidatengene waren für die weiterführenden Untersuchungen einer Retinoid-vermittelten Maturierung von Neuroblastomzellen von großem Interesse.

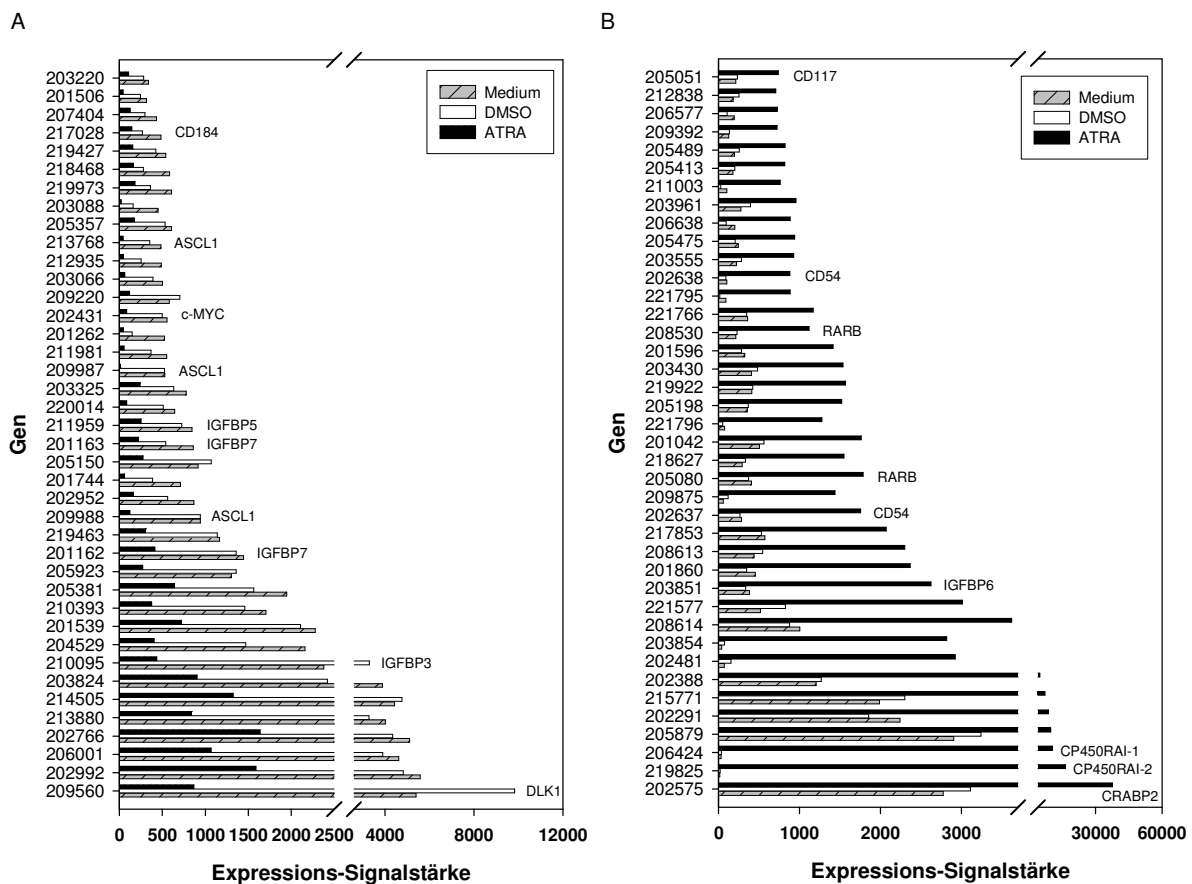


Abbildung 4-6: Untersuchung des differentiellen Genexpressionsprofils in den Neuroblastomzellen SH-SY5Y nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure. Nach Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen mit Medium, DMSO (1:640) und ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) für 96 h (37°C, 5% CO₂) wurde die Gesamt-RNA aus dem Trizol-Reagenz gewonnen. Im Anschluß erfolgte mittels einer Reversen Transkription die Umschreibung in eine komplementäre cDNA. Im darauffolgenden Schritt wurde in einer *in-vitro* Transkription (IVT) mittels des T7-Promoters eine mit Biotin markierte cRNA hergestellt. Zuletzt erfolgte die Hybridisierung der cRNA mit dem Affymetrix HG-U133A Genchip. Durch einen Scanner wurden die Expressionssignale mit und ohne Antikörperverstärkung (Anti-Streptavidin) gemessen. Dargestellt wurden die 40 stärksten in ATRA gegenüber Medium und DMSO differentiell unter- (A) und überexprimierten (B) Gene. Für diese Auswahl mußte sich die Expression mindestens in einer Differenz von 500 (-250) und um einen Fold Change von 3 (0,333) im Verhältnis von ATRA- zu Medium-behandelten Zellen unterscheiden.

Die Gene DLK 1 (*delta, drosophila, homolog-like 1*) und ASCL1 (*human achaete-scute complex, drosophila, homolog 1; HASH-1*), die ursprünglich in *Drosophila melanogaster* identifiziert wurden, üben über den Delta-Notch-Signalweg eine wichtige Funktion bei der Induktion der

neuronalen Differenzierung aus. Das Gen CD184 (CXCR4) codiert hingegen für ein Protein aus der Familie der Chemokin-Rezeptoren, dem pluripotente Funktionen sowohl auf normalen lymphatischen als auch Tumorzellen zugeschrieben wird. Das zelluläre Proto-Onkogen c-MYC ist ein Mitglied der MYC-Proteinfamilie und stellt ein zelluläres homologes Onkogen zum viralen v-MYC des *Avian Myelocytomatosis Virus* dar. c-MYC wird häufig in stark proliferierenden Zellen exprimiert vorgefunden und übt dort vielfältig einen Einfluss auf Proliferation, Apoptose und Differenzierung aus. Die ebenfalls durch ATRA differentiell exprimierten Gene für die IGF-Bindeproteine stehen in einem direkten Zusammenhang mit dem Transport und der Regulation der biologischen Aktivität von Wachstumsfaktoren des Insulin-Systems.

Die in Abbildung 4-6 (B) dargestellten Gene waren hingegen die 40 am stärksten überexprimierten Gene und unterschieden sich hinsichtlich ihres Expressionssignals von ATRA-gegenüber Medium-behandelten Zellen mindestens um den Faktor 3 und um eine Differenz von 500. Durch diese Auswahlkriterien konnten in der mit ATRA behandelten Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y die Gene mit den entsprechenden SONDENSATZNUMMERN für das Cytochrom P450RAI-2 (219825), Cytochrom P450RAI-1 (206424), CRABP II (202575), CD54 (202637), RARB (205080, 208530), CD117 (205051) und IGFBP6 (203851) gegenüber den Kontrollzellen (Medium und DMSO) als überexprimiert identifiziert werden. Diese sieben Gene wurden aus den weiteren 33 überexprimierten Genen aufgrund ihrer besonderen Funktion näher untersucht. Die Signalstärke der mRNA Expression war in den mit ATRA behandelten Zellen um den angegebenen Fold Change (FC) und der Differenz (D) bei dem Cytochrom P450RAI-2 (FC: 1084/ D: 16355), Cytochrom P450RAI-1 (FC: 359/ D: 10359), CRABP II (FC: 13,6/ D: 34900), RARB (FC: 4,4/ D: 1379) (FC: 5,3/ D: 904), CD54 (FC: 8,8/ D: 779), CD117 (FC: 3,5/ D: 524) und IGFBP6 (FC: 6,87/ D: 2243) gegenüber den mit Medium kultivierten Kontrollzellen erhöht.

Die Überexpression des zellulären Retinsäure-Bindeproteins CRABP II (*cellular retinoic acid-binding protein, II*), des Retinsäurerezeptors RARB (*retinoic acid receptor, beta*) sowie des Cytochroms P450RAI-2 (CYP26B1) und Cytochroms P450RAI-1 (CYP26A1), zwei Mitglieder der CYP26-Proteinfamilie (*cytochrome P450 retinoic acid-inactivating protein*), steht in direktem Zusammenhang mit der Regulierung des Retinsäurehaushalts. Das ebenfalls heraufregulierte Oberflächenantigen CD54 (ICAM-1) ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie, die als interzelluläre Adhäsionsmoleküle die Affinität bei der Wechselwirkung zwischen zwei Zellen verstärken. Das durch ATRA überexprimierte Oberflächenantigen CD117 (c-KIT) reguliert als transmembraner Tyrosinkinase-gekoppelter Rezeptor die Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Chemotaxis von Zellen. Ähnlich wie die IGF-Bindeproteine IGFBP3, 5 und 7 spielt auch das durch ATRA heraufregulierte IGFBP6 eine zentrale Rolle in der Regulation der Aktivität und dem Transport von Insulin und Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren.

4.4.3 Untersuchung zur differentiellen Genexpression in SH-SY5Y-Zellen durch 4-HPR

Neben der Genexpressionsanalyse *all-trans* Retinsäure-behandelter Neuroblastomzellen wurde auch das Expressionsprofil nach Stimulation mit dem synthetischen 4-HPR untersucht. Die SONDENSÄTZE auf dem Affymetrix Genchip HG-U133A wurden mit den Biotin-markierten cRNA-Proben bestehend aus Medium (IV100804_01x), DMSO (IV100804_02x) und 4-HPR (IV100804_04x) hybridisiert. Auch hier wurde zur Berechnung der differentiellen Genexpression zunächst nur die Differenz und der Fold Change zwischen den 4-HPR- und Medium-kultivierten SH-SY5Y-Zellen benutzt. DMSO-behandelte Kontrollzellen wurden am Ende in die Auswertung und Abbildung erneut mit integriert. Die 40 Gene, die durch 4-HPR gegenüber Medium am stärksten differentiell über- oder unterexprimiert wurden, sind in Abbildung 4-7 (A und B) repräsentiert. In den beiden Abbildungen wurden die differentiell exprimierten Gene inklusive der zu dem Affymetrix HG-U133A Genchip zugehörigen SONDENSATZNUMMERN gegen die

Expressions-Signalstärken aufgetragen. Die Abbildung 4-7 (A) präsentiert die 40 am stärksten unterexprimierten Gene. Zur Filterung der Daten musste sich hierfür die Fluoreszenz des Expressionssignals von 4-HPR- zu Medium-behandelten Zellen mindestens um einen Fold Change von 0,4 und um eine Differenz von -400 unterscheiden. Aus dieser Selektion ergaben sich 4 interessante Gene, die in weiteren Experimenten näher untersucht wurden. Durch 4-HPR wurden wie bei der Behandlung mit *all-trans* Retinsäure die Gene DLK1 (209560), ASCL1 (209988, 209987, 213768), c-MYC (202431) und CD184 (217028) im Vergleich zu Medium-kultivierten Zellen in der mRNA-Expression herunterreguliert. Wie schon im zuvorigen Microarray-Experiment mit ATRA zu beobachten war, wurden auch durch die Behandlung mit 4-HPR drei verschiedene SONDENSÄTZE für das Gen ASCL1 gleichzeitig auf dem Genchip HG-U133A als unterexprimiert erkannt. Die Expressionssignale waren bei 4-HPR um einen Fold Change (FC) und einer Differenz (D) bei DLK1 (FC: 0,28/ D: -7065), ASCL1 (FC: 0,085/ D: -1429) (FC: 0,053/ D: -899) (FC: 0,182/ D: -630), c-MYC (FC: 0,382/ D: -540) und CD184 (FC: 0,314/ D: -633) gegenüber Medium erniedrigt. Aus diesen differentiell unterexprimierten Genen war bereits zu erkennen, dass sowohl 4-HPR als auch ATRA eine sehr ähnliche biologische Wirkungsweise besaßen.

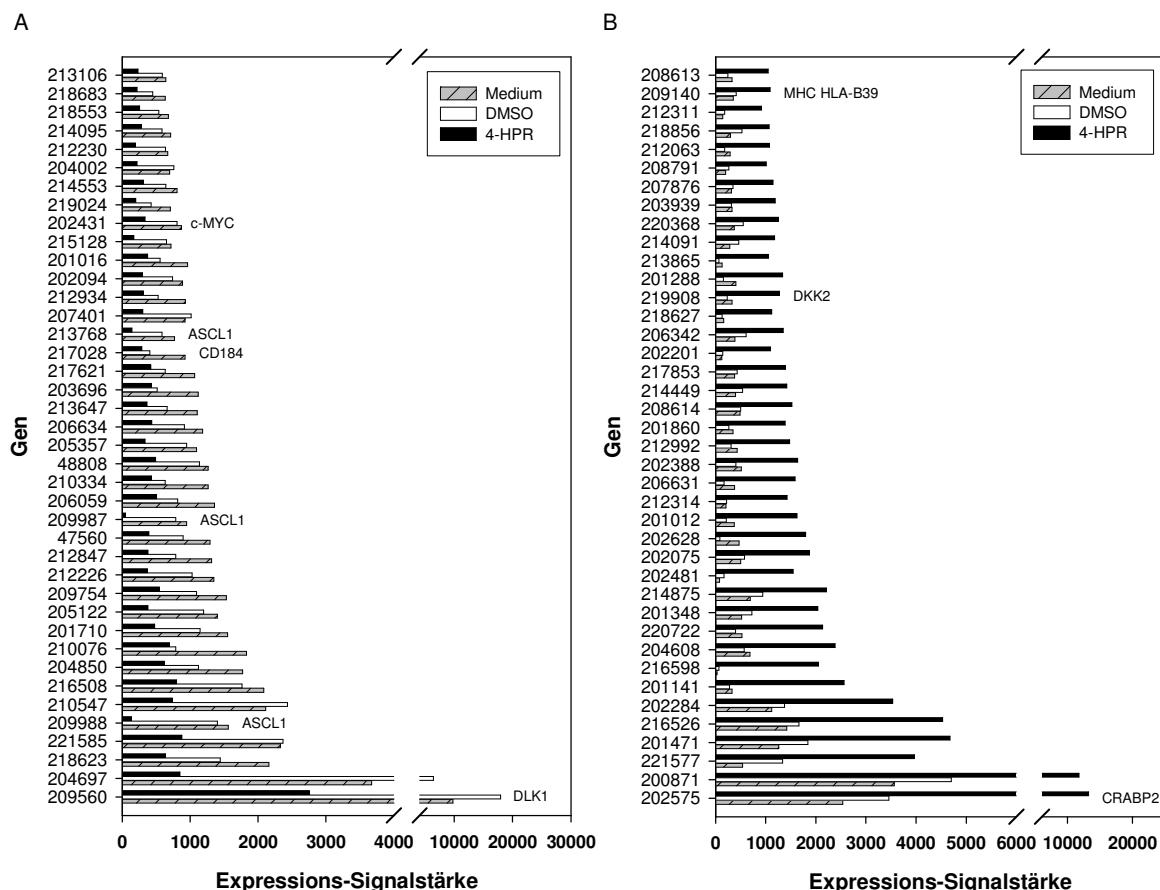


Abbildung 4-7: Analyse der differentiell über- und unterexprimierten Gene in der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y nach Stimulation mit 4-HPR. Die SH-SY5Y-Zellen wurden mit Medium, DMSO (1:2.560) und 4-HPR ($3,9 \times 10^{-6}$ M) für 96 h (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Die aus dem Trizol-Reagenz gewonnene Gesamt-RNA wurde im Anschluß in einer reversen Transkription in eine komplementäre cDNA umgeschrieben. In einer erneuten *in-vitro* Transkription (IVT) wurde eine mit Biotin markierte cRNA hergestellt. 15 µg Biotin-markierte cRNA wurden mit dem Affymetrix HG-U133A Genchip hybridisiert. Mit und ohne Antikörperverstärkung (Anti-Streptavidin) wurden die aus der Expression resultierenden Fluoreszenzsignale gescannt. Im Balkendiagramm wurden die 40 stärksten in 4-HPR gegenüber Medium und DMSO differentiell unter- (A) und überexprimierten (B) Gene dargestellt. Das Auswahlkriterium bestand aus einer minimalen Expressions-Differenz von 700 (-400) und einem Fold Change von 3 (0,4) von 4-HPR- gegenüber Medium-behandelten Neuroblastomzellen.

Durch Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y mit dem synthetischen Retinamid 4-HPR kam es auch zur Überexpression von Genen gegenüber den mit Medium und DMSO kultivierten Kontrollzellen. In Abbildung 4-7 (B) werden die 40 am stärksten heraufregulierten Gene präsentiert. Bei dieser Selektion wurden ausschließlich die Gene ausgewählt, bei denen mindestens ein Fold Change von 3 beziehungsweise eine Differenz von 700 bei 4-HPR im Vergleich zu Medium-behandelten Zellen vorlag. Durch das Retinamid wurde beispielsweise CRABP II (202575) und HLA-B39 (209140) in der Genexpression nennenswert heraufreguliert. Das durch 4-HPR um einen Fold Change von 3,08 und einer Differenz von 734 im Vergleich zu Medium-kultivierten SH-SY5Y-Zellen heraufregulierte zelluläre Retinsäure-bindende Protein CRABP II (*cellular retinoic acid-binding protein, II*) spielt eine entscheidende Rolle beim intrazellulären Transport wasserunlöslicher Retinoide. Das mRNA-Transkript des zur MHC-Klasse I zugehörigen Moleküls HLA-B39, das eine wichtige Funktion bei der Antigenpräsentation ausübt, wurde im Vergleich zu Medium-kultivierten Neuroblastomzellen durch 4-HPR um einen Fold Change von 5,22 und einer Differenz von 10.713 überexprimiert. Durch 4-HPR konnte im Vergleich zu ATRA keine Überexpression der Retinsäure-inaktivierenden Cytochrome P450RAI-1 und P450RAI-2 sowie von CD54, CD117 und des Retinsäure-Rezeptors B beobachtet werden.

4.4.4 Delta-Notch-vermittelte Differenzierung von Neuroblastomzellen

Dem Delta-Notch-Signalweg wurde bereits 1994 durch Muskavitch *et al.* eine zentrale Rolle bei der neuronalen Regulierung während der Embryogenese in *Drosophila melanogaster* zugesprochen²⁰¹. Auch bei der humanen embryonalen Neurogenese durch Ausdifferenzierung von unreifen Neuroblasten der Neuralleiste zu Neuronen oder Gliazellen ist der Delta-Notch-Signalweg in einem sehr komplexen Geflecht aus intrinsischen und extrinsischen Signalen involviert^{202; 203; 204; 205; 206; 207; 208}. Durch die Wirkung von *all-trans* Retinsäure wird die Differenzierung eines Neuroblasten zu neuronalen Zellstrukturen über einen Delta-Notch-Signalweg induziert^{207; 208; 209; 210; 211; 212}. Anhand von verschiedenen Tumorzelllinien mit neuroektodermalem Ursprung wurde die Differenzierung-induzierende Wirkung unterschiedlicher Retinoide anhand des Delta-Notch-Signalweges näher untersucht.

4.4.4.1 Retinoid-induzierte und Delta-Notch-regulierte Differenzierung von Neuroblastomzellen

Mit Hilfe des Genchips wurde die Differenzierung-induzierende Wirkung von *all-trans* Retinsäure und 4-HPR auf Neuroblastomzellen näher untersucht und verglichen. Nach Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit dem natürlichen Retinoid *all-trans* Retinsäure (Abbildung 4-6, A) und dem synthetischen 4-HPR (Abbildung 4-7, A) wurde unter den 40 am stärksten herunterregulierten Genen eine drastische Reduzierung des humanen ASCL1 (209988, 209987, 213768) sowie DLK1 (209560) identifiziert, die beide fundamentale Bestandteile des Delta-Notch-Signalweges zur Induktion einer neuronalen Differenzierung sind. Anhand von sieben Neuroblastom- und zwei Ewing-Tumor-Zelllinien mit gemeinsamen neuroektodermalen Ursprung und weiteren Zelllinien, die als Kontrolle fungierten, wurde das Expressionsprofil der verschiedenen Tumore bezüglich der Aktivierung des Delta-Notch-Signalweges in An- und Abwesenheit des Differenzierung-aktivierenden Retinoids ATRA analysiert (Abbildung 4-8, A). In allen sieben Neuroblastom-Zelllinien konnte eine konstitutive ASCL1 mRNA-Expression beobachtet werden. In den Ewing-Tumorzellen SK-N-MC und A673 wurde keine basale Expression des Transkriptionsfaktors ASCL1 nachgewiesen. Unter den restlichen Zelllinien wurde nur in der lymphoblastoiden Zelllinie CSIII wie bei den Neuroblastomzellen eine basale Expression von ASCL1 detektiert. Nach Behandlung mit ATRA wurde die Expression von ASCL1 in allen Neuroblastomzellen drastisch herunterreguliert. Allein in KELLY, IMR-5 und IMR-32 ließ sich aufgrund der hohen konstitutiven Expression nach Kultivierung mit ATRA noch eine ASCL1-spezifische Bande detektieren. Die

ASCL1 mRNA-Expression in der lymphoblastoiden Zelllinie CSIII war nach Stimulation mit dem Retinoid ebenfalls erniedrigt. Ein Ligand des Notch-Rezeptors, DLK1, wurde ausschließlich in den drei Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y, SIMA und KELLY konstitutiv exprimiert. Auch hier führte eine Behandlung mit ATRA während der Differenzierung zu einer deutlichen aber nicht vollständigen Herunterregulierung der DLK1 mRNA-Expression. Eine basale Expression des Transkriptionsfaktors HES-1 wurde nur in der Neuroblastom-Zelllinie SIMA detektiert. Eine besonders starke konstitutive Expression dieses Transkriptionsfaktors wurde in den beiden Ewing-Tumoren SK-N-MC und A673 sowie dem schwächer exprimierenden Fibrosarkom HT-1080 und der humanen Nierenzelllinie HEK293 beobachtet. Durch Behandlung mit der Retinsäure wurde in den vier Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y, SIMA, CHP-126 und IMR-5 eine erhöhte HES-1 mRNA-Expression induziert. Auch in den anderen vier konstitutiv exprimierenden Zelllinien SK-N-MC, A673, HT-1080 und HEK293 kam es zu einem deutlichen Anstieg der HES-1 mRNA-Expression.

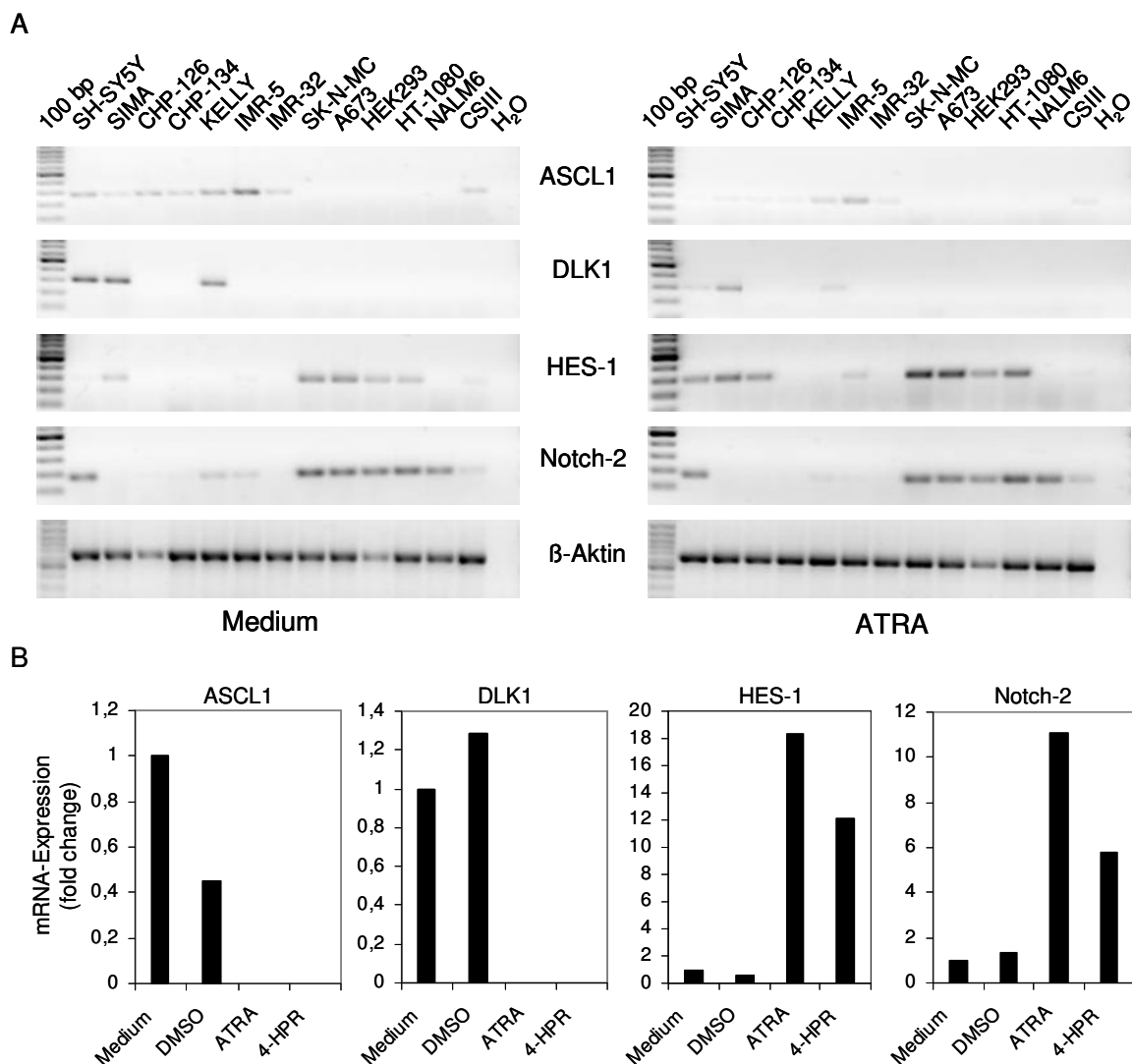


Abbildung 4-8: Expression von Genen des Delta-Notch-Signalwegs in Tumoren neuroektodermalen Ursprungs nach Behandlung mit natürlichen und synthetischen Retinoiden. Die Neuroblastomzellen (SH-SY5Y, SIMA, CHP-126, CHP-134, KELLY, IMR-5 und IMR-32), Ewing-Tumorzellen (SK-N-MC und A673) und Kontrollzelllinien wurden mit ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) oder 4-HPR ($3,9 \times 10^{-6}$ M) für 96 h (37°C, 5% CO₂) behandelt. RT-PCR (A) und quantitative *real time* RT-PCR (B) durch Bestimmung der Δ CT-Werte und des Fold Change der humanen ASCL1, DLK1, HES-1 und Notch-2 mRNA-Expression am Beispiel der SH-SY5Y-Zellen.

Die basale Expression des DLK1-spezifischen Rezeptors Notch-2 konnte ausschließlich in den mit Medium behandelten SH-SY5Y, KELLY und IMR-5 detektiert werden. Nur in KELLY und IMR-5 reduzierte sich die Expression nach Kultivierung mit ATRA. In SH-SY5Y blieb die Notch-2 mRNA-Expression konstant. Mit Ausnahme der lymphoblastoiden Zelllinie CSIII war die Notch-2 mRNA-Expression in den beiden Ewing-Tumorzellen und den anderen Kontrollzellen stark vertreten. Eine Regulation dieser Expression durch ATRA konnte hingegen nicht beobachtet werden. Der Einfluss der Retinoide ATRA und 4-HPR auf die Delta-Notch-regulierte Differenzierung wurde anhand der Modellzelllinie SH-SY5Y in der *real time* RT-PCR näher quantifiziert (Abbildung 4-8, B). In den SH-SY5Y-Zellen wurde in Anwesenheit beider Retinoide die ASCL1 mRNA-Expression um einen Fold Change (FC) von 0,002 (ATRA) und 0,003 (4-HPR) im Vergleich zu Medium drastisch herunterreguliert. Eine Behandlung mit DMSO führte mit einem FC von 0,45 ebenfalls zu einer leichten Reduktion der Expression. Um einen FC von $4,9 \times 10^{-5}$ in ATRA- und $5,8 \times 10^{-4}$ in 4-HPR-behandelten SH-SY5Y-Zellen reduzierte sich die Expression des Notch-Liganden DLK1. Die mit DMSO behandelten Kontrollzellen blieben mit einem FC von 1,3 in der Expression relativ konstant. Die Expression des Transkriptionsfaktors HES-1 wurde durch ATRA um einen Fold Change von 18,4 und durch 4-HPR um 12,2 während der Differenzierung im Vergleich zu Medium-behandelten Zellen induziert. Mit einem FC von 0,6 blieb die HES-1 mRNA-Expression in DMSO-kultivierten Neuroblastomzellen annähernd konstant. Der für DLK1 spezifische Rezeptor Notch-2 wurde laut der quantitativen *real-time* RT-PCR ebenfalls in der Expression um einen FC von 11,1 durch ATRA und 5,8 durch 4-HPR im Vergleich zur basalen Expression in Medium erhöht. Durch DMSO gab es mit einem FC von 1,4 fast keine Regulierung der Notch-2 mRNA-Expression. Durch die Behandlung unreifer Neuroblastomzellen kommt es mit Hilfe der unterschiedlichen Retinoide zu einer Induktion der Differenzierung von Vorläuferzellen. Der Prozess der Retinoid-vermittelten Ausdifferenzierung von unreifen Neuroblastomen wird dabei über die nachweisliche Aktivierung des Delta-Notch-Signalweges vorangetrieben.

4.4.4.2 Neuritenbildung in ASCL1-supprimierten und ausdifferenzierten Neuroblastomzellen

Der durchaus potente Einfluss von Retinoiden und die starke Plastizität der aus der Neuralleiste stammenden unreifen Neuroblastomzellen drückt sich während der Differenzierung beispielsweise morphologisch durch ein verstärkt ausgebildetes Neuritenwachstum aus. Das Gleichgewicht über den Differenzierungsstatus eines Neuroblastoms wird über Gene des Delta-Notch-Signalweges reguliert. Die quantitative mRNA-Expression von ASCL1, einem zentralen proneuronalen Transkriptionsfaktor der Differenzierung, wurde in diversen Neuroblastomzellen nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure untersucht (Abbildung 4-9, A). Mit einem Fold Change von 3,4 (KELLY), 4,4 (IMR-5) und 1,02 (SIMA) war die konstitutive ASCL1 mRNA-Expression gegenüber Medium-behandelten SH-SY5Y-Zellen (1) erhöht bzw. annähernd gleich exprimiert. In allen vier repräsentierten Neuroblastom-Zelllinien führte eine Behandlung mit ATRA zu einer erniedrigten ASCL1 mRNA-Expression. Im Vergleich zum Medium erniedrigte sich durch Kultivierung mit Retinsäure die ASCL1 mRNA-Expression um einen FC von 0,04 (SH-SY5Y), 0,32 (KELLY), 0,21 (SIMA) und 0,9 (IMR-5). Die Differenzierung-induzierende Wirkung von ATRA äußerte sich in allen untersuchten Neuroblastomzellen neben der Herunterregulierung von ASCL1 auch morphologisch in einer verstärkten Bildung von Neuriten oder Neuronen-ähnlichen Strukturen (Abbildung 4-9, B). Alle ausdifferenzierten Neuroblastomzellen, die zuvor mit Retinsäure stimuliert wurden, zeigten unter dem Lichtmikroskop ein feines, stark verzweigtes Netzwerk bestehend aus Neuriten, das alle Tumorzellen miteinander verband.

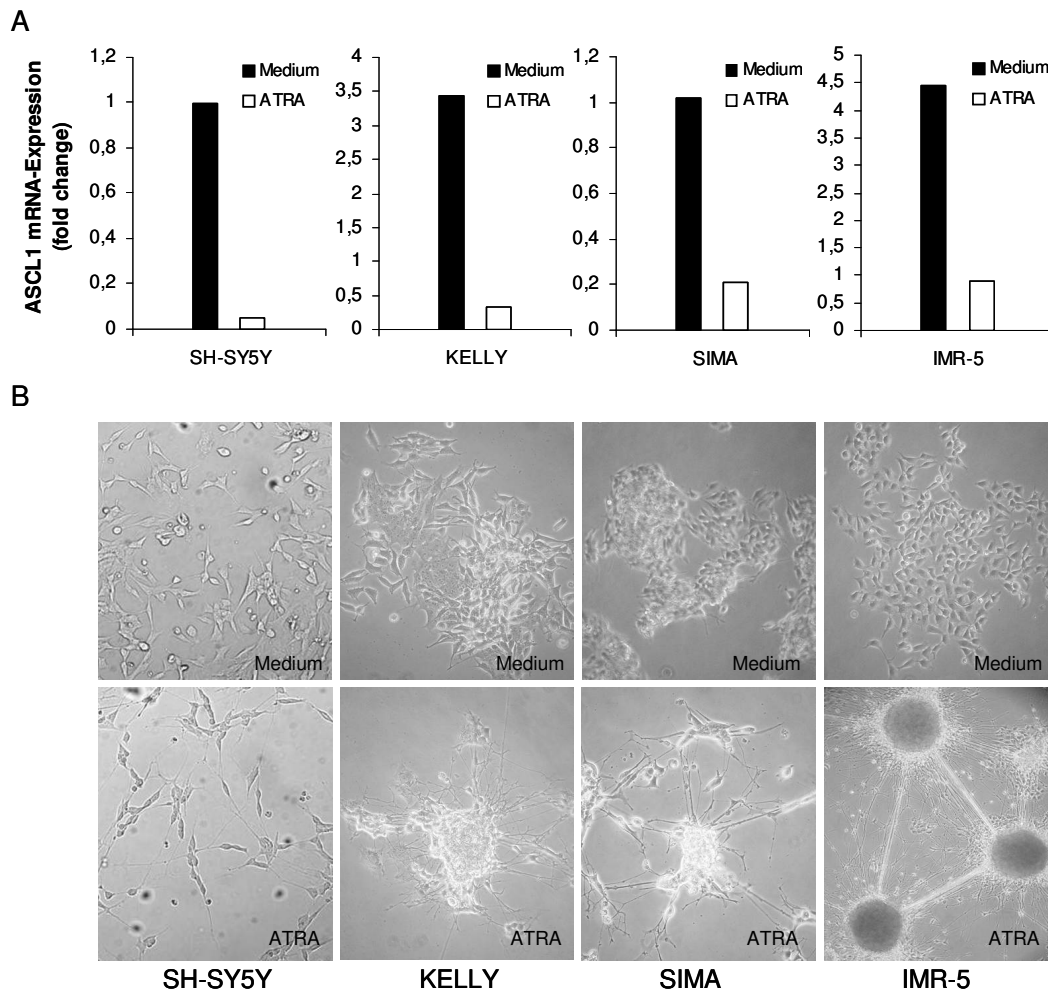


Abbildung 4-9: Retinsäure-induzierte Neuritenbildung von ASCL1-herunterregulierten und ausdifferenzierten Neuroblastomzellen. (A) Quantitative *real-time* RT-PCR der ASCL1 mRNA-Expression in ATRA- ($6,25 \times 10^{-5}$ M) und Medium-behandelten Neuroblastomzellen nach einer Inkubation von 96 h (37°C , 5% CO_2). (B) 100-fache Vergrößerung einer lichtmikroskopischen Aufnahme von unterschiedlich kultivierten Neuroblastomzellen.

4.4.4.3 Verteilung der ASCL1 und DLK1 mRNA-Expression in humanen Geweben

Neben den Neuroblastomzellen wurde auch die Verteilung der ASCL1 und DLK1 mRNA-Expression in verschiedenen humanen Geweben mittels RT-PCR näher untersucht (Abbildung 4-10). Hierbei konnte neben den SH-SY5Y-Zellen (27) als Positivkontrolle auch eine besonders starke ASCL1 mRNA-Expression in den neuronalen Geweben von fetalem Gehirn (11), Gesamtgehirn (12), Kleinhirn (18) und Nebenniere (22) detektiert werden. Im Vergleich zu den neuronalen Geweben ließ sich eine ASCL1 mRNA-Expression zusätzlich im Thymus (26) nachweisen. Der an Notch bindende Ligand DLK1 wurde in den hier untersuchten humanen Geweben in der Nebenniere (7), Ovar (6), Testis (10), Plazenta (13), Herz (17) und der fetalen Leber (20) basal exprimiert. Als Positivkontrolle fungierte erneut die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y (27), die den Liganden DLK1 ebenfalls konstitutiv exprimiert. Mit Ausnahme der unreifen SH-SY5Y-Zellen konnte in keinem der humanen und ausdifferenzierten Gewebe eine gleichzeitige Expression von ASCL1 und DLK1 beobachtet werden. Die jeweils gleichmäßige Expression des Haushaltgens GAPDH veranschaulichte die konstant eingesetzte cDNA Menge für die RT-PCR.

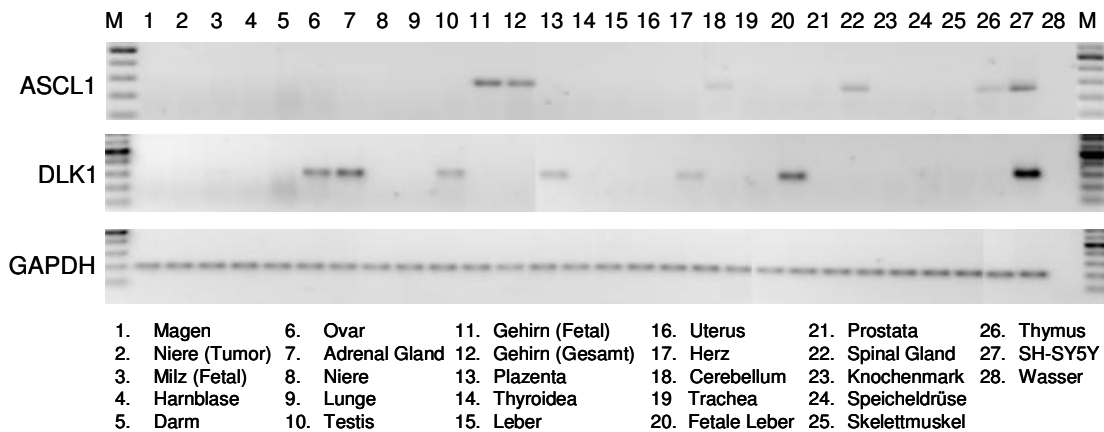


Abbildung 4-10: Verteilung der ASCL1 und DLK1 mRNA-Expression in normalen humanen Geweben. RT-PCR zur Vervielfältigung der ASCL1 und DLK1 mRNA-Transkripte aus diversen humanen Geweben (Gesamt-RNA der Fa. Becton Dickinson) durch Reverse Transkription von 1 µg Gesamt-RNA und Einsatz von 2 µl cDNA in die Polymerase-Kettenreaktion.

4.4.4.4 RNA-Interferenz des proneuronalen Transkriptionsfaktors ASCL1 in SH-SY5Y-Zellen

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist eine erfolgreiche Methode, die Expression von Genen posttranskriptionell zu hemmen¹⁷⁶. Mittels der Transfektion von 21 Nukleotid langen doppelsträngigen und linearen siRNAs (*small interfering RNAs*) wird durch Bindung an den komplementären *antisense*-Strang der RISC (*RNA induced silencing complex*)-vermittelte Abbau des mRNA-Transkriptes eingeleitet. Anhand von ASCL1-spezifischen siRNAs wurde die mögliche Induktion einer direkten und Retinoid-unabhängigen neuronalen Differenzierung durch Inaktivierung von ASCL1 in Neuroblastomzellen untersucht. Möglicherweise würde eine Erniedrigung von ASCL1 ein Ungleichgewicht in der Expression der anderen im Delta-Notch-Signalweg-involvierten Gene induzieren und gleichzeitig den Differenzierungsfortschritt der unreifen und malignen Neuroblastomzellen positiv beeinflussen. Hintergrund war die durch die Retinoide ATRA und 4-HPR initiierte Reduktion der ASCL1 mRNA-Expression und Ausdifferenzierung von Neuroblastomzellen. Zunächst wurde mittels kationischen Lipiden die Transfektion von ASCL1-siRNAs in SH-SY5Y-Zellen getestet. Mittels ALEXA-Fluor488-markierten unspezifischen (*non-silencing*) siRNAs wurden im FACS jedoch nur Transfektionsraten von maximal 20% erreicht (ohne Abbildung). Aufgrund des hohen basalen Expressionsniveaus von ASCL1 und der geringen siRNA-Transfektionsrate konnte im Western Blot und der RT-PCR keine Reduktion der konstitutiven ASCL1 mRNA- und Proteinexpression beobachtet werden. Mit Hilfe einer Elektroporation ähnelnden Methode (Fa. AMAXA) gelang jedoch die erfolgreichere Transfektion mit siRNAs. Jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen wurden in 100 µl des Elektroporationspuffers V resuspendiert, mit 2 µg siRNAs (ASCL1_2, ASCL1_3, ASCL1_2+3 oder ALEXA-Fluor488-markierten *non-silencing* siRNAs) vermischt und anschließend mit dem Programm G16 elektroporiert. Nach der Elektroporation wurde ein Teil der Zellen für maximal 72 h (37°C, 5% CO₂) rekultiviert oder sofort im FACS auf deren Transfektionsrate analysiert. Durch die AMAXA-Technologie konnte mittels der ALEXA-Fluor488-markierten siRNAs eine Transfektionsrate von über 95% in SH-SY5Y-Zellen durchflusszytometrisch gemessen werden (Abbildung 4-11, A). Durch Isolation der Gesamt-RNA und der Reversen Transkription in eine komplementäre cDNA konnte mittels der RT-PCR eine deutliche Reduktion der ASCL1 mRNA-Expression durch RNA-Interferenz mit den siRNAs ASCL1_2, ASCL1_3 sowie der gemeinsamen Inkubation von ASCL1_2+3 gemessen werden (Abbildung 4-11, B). Im Vergleich zu den Medium-kultivierten bzw. elektroporierten Kontrollzellen zeichnete sich die ASCL1-RNAi durch eine fast vollständige Aufhebung der konstitutiven Expression aus. Die Transfektion mit unspezifischen

(*non-silencing*) siRNAs hatte keinen Einfluss auf den Transkriptionsfaktor. Die ähnlich starke mRNA-Expression des Haushaltgens GAPDH verdeutlichte zudem die gleichmäßig eingesetzte cDNA Menge.

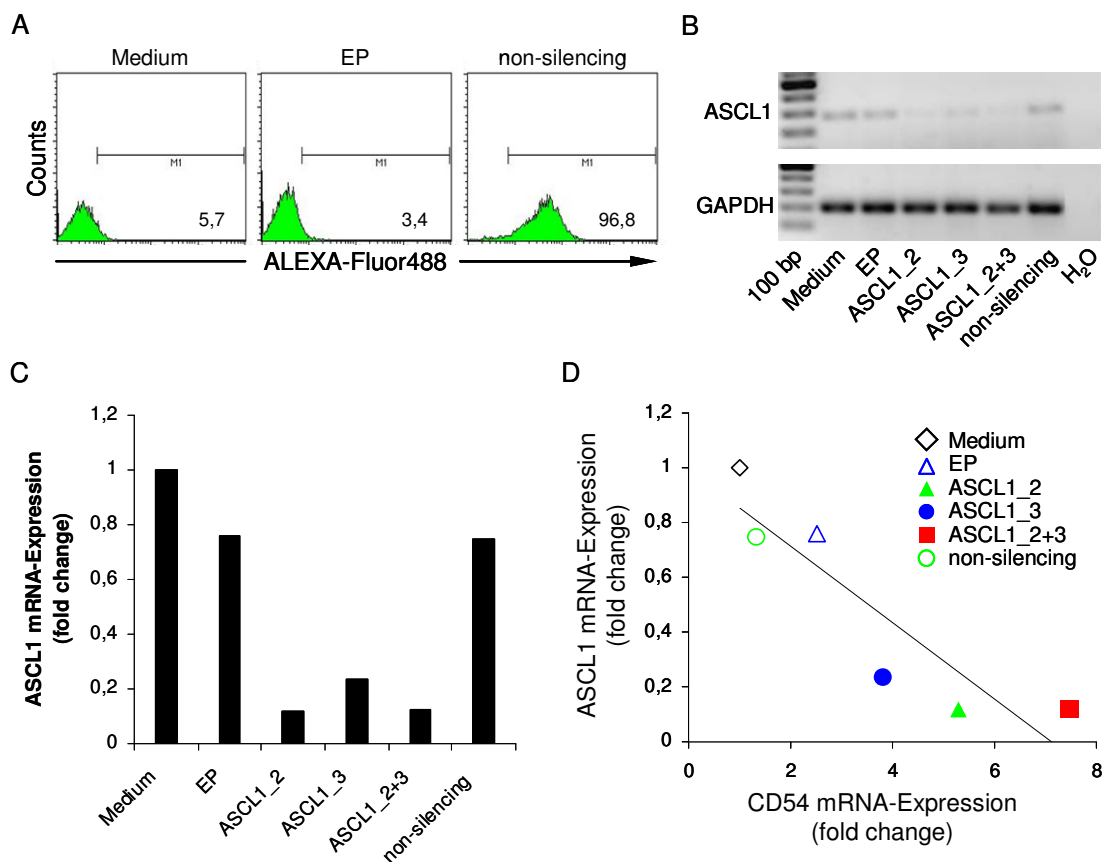


Abbildung 4-11: RNA-Interferenz der ASCL1 mRNA-Expression in SH-SY5Y-Zellen. (A) FACS-Analyse zur Bestimmung der AMAXA-Transfektionseffizienz von linearen siRNAs in SH-SY5Y-Zellen mittels ALEXA-Fluor488-markierten *non-silencing* siRNAs. RT-PCR (B) und quantitative *real-time* RT-PCR (C) der ASCL1 mRNA-Expression in Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) nach RNA-Interferenz mit den siRNA-Kombinationen ASCL1_2 und ASCL1_3 sowie dem äquimolarem Gemisch ASCL1_2+3. (D) Quantitative Gegenüberstellung der CD54 und ASCL1 mRNA-Transkripte in ASCL1-inaktivierten SH-SY5Y-Zellen.

Mittels der *real-time* RT-PCR wurde zusätzlich die ASCL1-RNAi quantifiziert (Abbildung 4-11, C). Durch den Einsatz diverser siRNAs mit unterschiedlichen ASCL1-Zielsequenzen konnte die Expression des Transkriptionsfaktors stark herunterreguliert werden. Die konstitutive ASCL1 mRNA-Expression reduzierte sich in SH-SY5Y-Zellen durch die Transfektion mit den siRNAs um einen Fold Change von 0,11 (ASCL1_2), 0,24 (ASCL1_3) und 0,12 (ASCL1_2+3) gegenüber der Medium-Kontrolle (1). In den elektroporierten (EP) oder mit unspezifischen (*non-silencing*) siRNAs transfizierten Kontrollansätzen wurde die ASCL1 mRNA-Expression nur geringfügig um einem FC von 0,76 und 0,75 im Vergleich zu Medium herunterreguliert. Durch Behandlung von Neuroblastomzellen mit Retinoiden konnte durch die induzierte Differenzierung neben einem verstärkten Neuritenwachstum auch eine erhöhte Expression des Oberflächenantigens CD54 beobachtet werden. Anhand der Coexpression des phänotypischen Differenzierungsmarkers CD54 wurde untersucht, ob auf direktem Weg durch RNA-Interferenz des proneuralen Transkriptionsfaktors ASCL1 eine Retinoid-unabhängige Differenzierung von Neuroblastomzellen initiiert werden kann. Es stellte sich heraus, dass durch ASCL1-RNAi eine direkte und Retinoid-unabhängige Differenzierung induziert werden konnte, die auch mit einer erhöhten CD54 mRNA-Expression einherging (Abbildung 4-11, D). Eine Reduktion der ASCL1 mRNA-Expression um einen FC von 0,11 (ASCL1_2), 0,24 (ASCL1_3) und 0,12 (ASCL1_2+3) war gleichzeitig mit einer

Heraufregulierung der CD54 mRNA-Expression um einen FC von 5,3 (ASCL1_2), 3,8 (ASCL1_3) und 7,5 (ASCL1_2+3) verbunden. Demnach waren genspezifische siRNAs durch Inhibition von ASCL1 befähigt, eine Differenzierungsinduktion und Überexpression von CD54 in ursprünglich unreifen Neuroblastomzellen zu generieren.

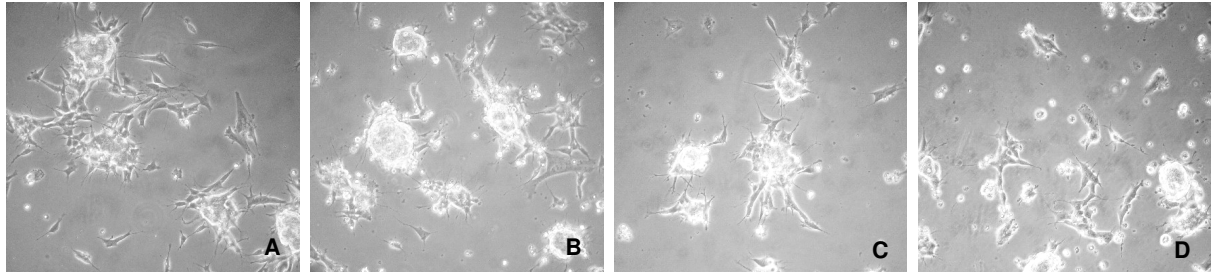


Abbildung 4-12: Lichtmikroskopische Aufnahme ASCL1-inaktivierter SH-SY5Y-Zellen. Die mit Medium (A), Elektroporation (B), ASCL1_2+3 siRNA (C) und *non-silencing* siRNA (D) behandelten SH-SY5Y-Zellen wurden sowohl zur Isolation von Gesamt-RNA und -Protein als auch zur Reaktivierung und lichtmikroskopischen Dokumentation (100-fache Vergrößerung) verwendet.

Eine erfolgreiche direkte Herunterregulierung der ASCL1 mRNA-Expression durch Transfektion mit den siRNAs ASCL1_2+3 reduzierte sich im Bezug auf Medium-behandelte Zellen um einen Fold Change von 0,12. Dies induzierte jedoch wie bei einer Behandlung mit *all-trans* Retinsäure kein verstärktes Neuritenwachstum (Abbildung 4-12). Ein verstärktes Neuritenwachstum, das als phänotypisches Zeichen einer Differenzierung zu interpretieren wäre, trat auch nach 72 stündiger Inkubation bei den besonders stark ASCL1-inaktivierten SH-SY5Y-Zellen (ASCL1_2+3) (C) wie bei den mit Medium (A), Elektroporation (B) oder *non-silencing* siRNA (D) behandelten Tumorzellen nicht auf.

4.4.4.5 Differentielle Genexpression von transient ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen

Mittels RNA-Interferenz, die die Expression eines Gens posttranskriptionell inhibiert, wurde anhand des inaktivierten Transkriptionsfaktors ASCL1 im Affymetrix Genchip HG-U133A 2.0 plus das Genexpressionsprofil unreifer Neuroblastomzellen verglichen. Dafür wurden SH-SY5Y-Zellen mit äquimolaren Mengen der zuvor in der quantitativen *real-time* RT-PCR getesteteten und besonders wirksamen ASCL1-siRNAs_2 und _3 mittels der AMAXA-Technologie gleichzeitig transfiziert. Beide siRNAs besaßen jeweils unterschiedliche Zielsequenzen im mRNA-Transkript. Als Kontrolle dienten wiederum Neuroblastomzellen, die mit Medium oder unspezifischen (*non-silencing*) siRNAs behandelt wurden. In Abbildung 4-13 (A und B) sind jeweils die 30 am stärksten differentiell über- und unterexprimierten Gene aus ASCL1-inaktivierten SH-SY5Y-Zellen dargestellt, die sich mindestens in einer Differenz von 400 (-400) und einem Fold Change von 1,5 (0,666) unterschieden. Für die Gegenüberstellung wurde der Mittelwert aus den Kontrollen gebildet und mit den Expressions-Signalstärken der ASCL1-inhibierten Neuroblastomzellen verglichen. Als experimentelle Versuchskontrolle konnte zunächst anhand drei verschiedener ASCL1-spezifischer SONDENSÄTZE eine erfolgreiche Herunterregulierung des gleichnamigen Transkriptionsfaktors unter den 30 am stärksten herunterregulierten Genen identifiziert werden. Die mit den äquimolaren ASCL1-siRNAs_2 und _3 transfizierten Neuroblastomzellen unterschieden sich mit einer Differenz (D) und einem Fold Change (FC) bei den SONDENSÄTZEN 209988 (D: -3280/ FC: 0,291), 209987 (D: -1461/ FC: 0,336) und 209985 (D: -281/ FC: 0,375) gegenüber den gemittelten Kontrollansätzen. Demnach kam es durch die *non-silencing* siRNAs zu keinem unspezifischen Effekt, der ebenfalls mit einer Herunterregulierung des ASCL1 mRNA-Transkriptes assoziiert war. Nach Inaktivierung von ASCL1 befanden sich unter den 30 am stärksten heraufregulierten Genen gleichzeitig drei SONDENSÄTZE für das IGF-2

(*insulin-like growth factor 2*) und zwei Sondensätze für den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor CDKN1C (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*) (Abbildung 4-13, B).

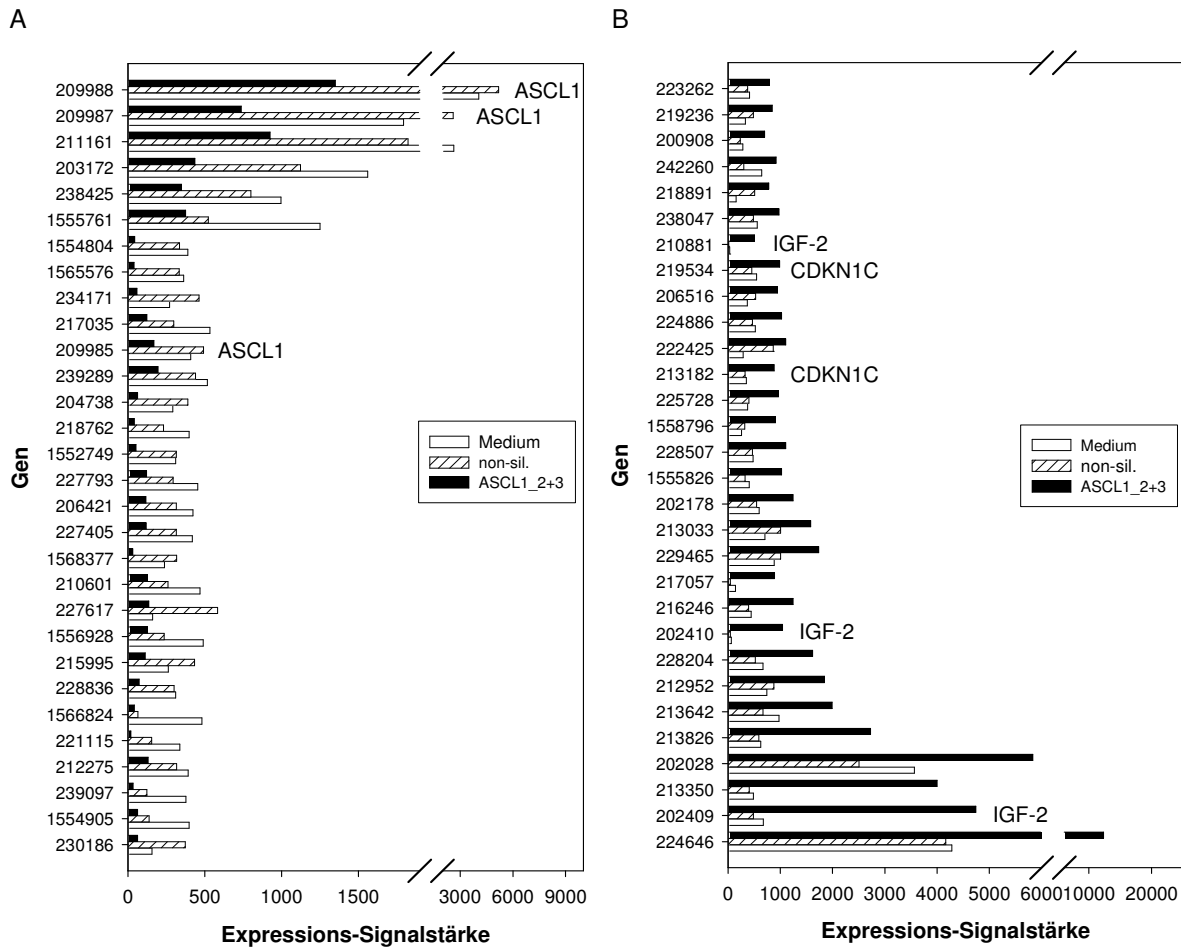


Abbildung 4-13: Differenzielles Genexpressionsprofil von ASCL1-herunterregulierten Neuroblastomzellen. Nach 72 stündiger Kultivierung (37°C, 5% CO₂) der SH-SY5Y-Zellen mit Medium, *non-silencing* siRNAs oder den doppelsträngigen äquimolaren ASCL1-siRNAs_2 und _3 wurde die Gesamt-RNA aus dem Trizol-Reagenz gewonnen. Nach der Reversen Transkription und Synthese einer komplementären cDNA wurde mittels des T7-Promoters in einer *in-vitro* Transkription (IVT) eine mit Biotin markierte cRNA hergestellt. Als letztes erfolgte die Hybridisierung der cRNA mit dem Affymetrix-Genchip HG-U133A 2.0 plus. Dargestellt wurden die 30 am stärksten differenziell exprimierten Gene, die aus dem Vergleich von ASCL1-siRNA und dem Mittelwert von Medium- und *non-silencing* siRNA resultierten. Als Selektionskriterium mußte eine differentielle Expression vorliegen, die mindestens eine Differenz von 400 (-400) und einen Fold Change von 1,5 (0,666) erfüllte.

Der Wachstumsfaktor IGF-2 wurde nach Behandlung mit den ASCL1-spezifischen siRNAs gegenüber den Kontrollen bei den Sondensätzen 202409, 202410 und 210881 um eine Differenz von 4162, 991 und 482 sowie um einen Fold Change von 8,17; 19,54 und 22,25 drastisch überexprimiert. Neben der mutagenen Wirkung bei verschiedenen Tumoren ist der Wachstumsfaktor IGF-2 in normalen Geweben besonders während der humanen und murinen Embryonal- und Plazentaentwicklung äußerst essentiell. Der ebenfalls drastisch heraufregulierte Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor CDKN1C spielt hingegen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung verschiedener Cyclin-Kinasen/Cyclin-Komplexe, die die G₁-Phase innerhalb des Zellzyklus regulieren und somit Einfluss auf das Zellwachstum haben. Eine Inaktivierung der ASCL1 mRNA-Expression mit dem Ziel einer benignen Ausreifung der Neuroblastomzellen war mit einer Induktion der CDKN1C mRNA-Expression um einen FC von 2,59 und einer Differenz von 543 bei dem Sondensatz 213182 und um einen FC von 1,97 und einer Differenz von 485 bei dem Sondensatz 219534 gegenüber den Kontrollzellen assoziiert.

4.4.4.6 Expressionsprofil von stabil ASCL1-inaktivierten und reifenden Neuroblastomzellen

Die Untersuchungen zu einer Retinoid-unabhängigen und direkten Induktion einer Differenzierung durch Interferenz von ASCL1 mit linearen siRNAs ergab unter anderem eine Heraufregulierung der CD54, CDKN1C und IGF-2 mRNA-Expression. Die Ausbildung eines für die Differenzierung charakteristischen Neuritennetzwerkes blieb innerhalb der Inkubationsdauer von 72 Stunden aus. Der Nachteil der linearen siRNAs liegt darin, dass sich die posttranskriptionelle inhibitorische Wirkung nach 72 Stunden weitestgehend erschöpft. Aus diesem Grund wurde ein vektorielles Expressionssystem erstellt, das eine stetige Expression von ASCL1-spezifischen siRNAs gewährt und die Differenzierung-induzierende Wirkung über einen unbegrenzt langen Zeitraum ermöglicht. Anhand der über einen Vektor kontinuierlich endogen exprimierten Mikro-RNAs (miRNAs) wurde mittels der direkt induzierten RNA-Interferenz von ASCL1 das Expressionsprofil der Kandidatengene untersucht, die ursprünglich in Anwesenheit der Differenzierung-aktivierenden Retinoide ATRA und 4-HPR differentiell exprimiert wurden. Die erfolgreiche Transfektion der SH-SY5Y-Zellen mit den beiden verschiedenen miRNA-haltigen Vektoren wurde durch Coexpression des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) im Fluoreszenzmikroskop bestätigt (Abbildung 4-14, A2 und A4). Bereits im Fluoreszenzmikroskop konnte die Reaktion der Neuroblastomzellen auf die kontinuierlich produzierten ASCL1-miRNAs beobachten werden. Die Wirkung der stabil ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen äußerte sich vor allem in einer verlangsamten Proliferation, leichten Neuritenbildung und drastischen Zunahme der Zellgröße im Vergleich zu den Zellen, die mit den negativen miRNAs transfiziert wurden (Abbildung 4-14, A-1 und A-2). Die differentielle Expression der Kandidatengene, die durch Inhibition von ASCL1 in den ursprünglich nicht ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen resultierte, ist in Abbildung 4-14 (B) dargestellt. Um eventuelle unspezifische Effekte der endogen synthetisierten miRNAs auszuschließen, wurde die relative Expressionsstärke der Gene, die durch die ASCL1-spezifischen miRNAs reguliert wurden, stets auf die negativen miRNAs bezogen (100%). Aus diesem Grund wurde die differentielle Genexpression als relative mRNA-Expression im Balkendiagramm logarithmisch dargestellt. Gegenüber der Kontrolle (negativer miRNA-haltiger Vektor) kam es durch die ASCL1-spezifischen miRNAs zu einer Reduktion des ASCL1-Transkriptes um einen Fold Change von 0,065. Diese drastisch erniedrigte Expression stellte zugleich eine interne Versuchskontrolle zur RNA-Interferenz von ASCL1 dar. Die direkte und Retinoid-unabhängige Inaktivierung des für die Differenzierung erforderlichen ASCL1 war zugleich mit einer Reduktion von DLK1 um einen Fold Change von 0,061 assoziiert. Der für den Liganden DLK1 spezifische Rezeptor Notch-2 sowie der Transkriptionsfaktor HES-1 wurden nach der Ausschaltung von ASCL1 um einen Fold Change von 4,69 (Notch-2) und 15,56 (HES-1) deutlich überexprimiert. Die ursprünglich durch die Differenzierung-aktivierenden Reagenzien ATRA und 4-HPR als reguliert identifizierten Oberflächenantigene CD54, CD117 und CD184 wurden durch die direkte Inaktivierung von ASCL1 ebenfalls differentiell exprimiert. Im Vergleich zu den negativen miRNAs erhöhte sich durch die ASCL1-miRNAs beispielsweise die CD54 mRNA-Expression ähnlich wie durch ATRA um einen Fold Change von 65,34. Entgegen der Überexpression des Rezeptors CD117 und dem Liganden SCF in SH-SY5Y-Zellen, die dauerhaft mit ATRA oder 4-HPR kultiviert wurden, kam es durch die stabile Inaktivierung von ASCL1 zu einer drastisch erniedrigten Expression von CD117 und SCF um einen Fold Change von 0,019 und 0,021. Die mRNA-Expression des Oberflächenantigens CD184 wurde durch die ASCL1-miRNAs um einen Fold Change von 0,011 inhibiert und war damit ebenfalls wie durch die beiden Retinoide *all-trans* Retinsäure und 4-HPR stark reduziert. Auch die in den Zellzyklus involvierten Proto-Onkogene MYCN und c-MYC sowie Cyclin D1 und CDKN1C wurden nach Inaktivierung von ASCL1 in der Expression um einen Fold Change von 0,063 (MYCN), 0,132 (c-MYC) und 0,283 (Cyclin D1) und 0,096 (CDKN1C) stark supprimiert. Im Vergleich zu den Retinsäure-induzierbaren Rezeptoren RARA und RARB wurde

die konstitutive Expression der Rezeptoren RARA und RARB durch die ASCL1-RNAi in SH-SY5Y-Zellen stattdessen um einen Fold Change von 0,603 (RARA) und 0,162 (RARB) erheblich reduziert. Die Expression des Retinsäure-inaktivierenden Cytochrom P450RAI-2 erhöhte sich stattdessen leicht um einen Fold Change von 3,73 durch den miRNA-vermittelten Abbau des ASCL1 mRNA-Transkriptes.

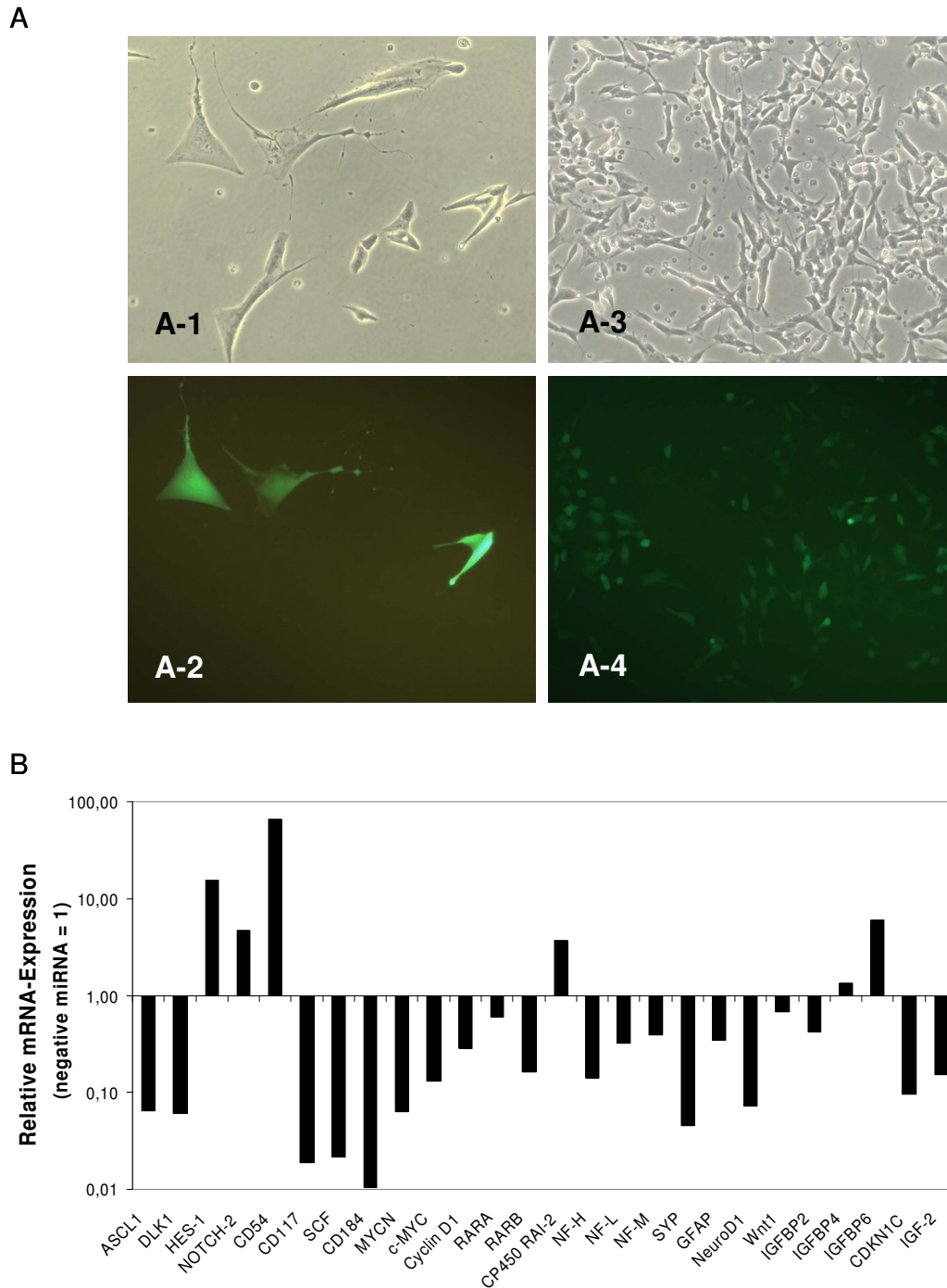


Abbildung 4-14: Genexpressionsprofil von stabil ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen. Jeweils 3 µg eines ASCL1-miRNA- oder genunspezifischen miRNA-ligierten Vektors pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR wurden mittels der AMAXA-Technologie in SH-SY5Y-Zellen transfiziert und über Blasticidin (15 ng/ml) selektiert. (A) Jeweils 100-fache lichtmikroskopische (1, 3) und GFP-vermittelte fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (2, 4) der mit ASCL1-miRNAs (1, 2) und negativen miRNAs (3, 4) transfizierten Zellen. (B) Quantitative *real-time* RT-PCR zur Bestimmung des differentiellen Genexpressionsprofils von ASCL1-inhibierten (ASCL1-miRNA) im Vergleich zu konstitutiv ASCL1-exprimierenden (negative miRNA) Neuroblastomzellen. Dargestellt wurde die relative Expression (Fold Change) der mit ASCL1-miRNAs kultivierten SH-SY5Y-Zellen im Bezug auf die negativen miRNA-haltigen Zellen (100%).

Die für Neuronen charakteristischen Marker Neurofilament-H (NF-H), -L (NF-L) und -M (NF-M) sowie das vesikuläre Synaptophysin (SYP) wurden nach der kontinuierlichen Expression der ASCL1-spezifischen miRNAs um einen Fold Change von 0,141 (NF-H), 0,323 (NF-L), 0,395 (NF-M) und 0,045 (SYP) in den Neuroblastomzellen herunterreguliert. Die Transkripte der für Gliazellen charakteristischen Gene GFAP (0,342), NeuroD1 (0,073) und Wnt1 (0,688) reduzierten sich ebenfalls. Innerhalb des regulatorischen Systems der Insulin-Wachstumsfaktoren kam es durch die Inaktivierung von ASCL1 ebenfalls zu einer differentiellen Genexpression. Sowohl IGF-2 (0,152) als auch der IGF-2-bindende Rezeptor IGF-1R (0,137) wurde laut *real-time* RT-PCR verringert exprimiert. Die unter anderem für die Bindung und Aktivität der IGFs verantwortlichen Bindeproteine IGFBP2 und IGFBP4 wurden durch die kontinuierliche ASCL1-RNAi in SH-SY5Y-Zellen um 0,418 (IGFBP2) schwach herunter- und um 1,36 (IGFBP4) nur leicht heraufreguliert. Im Vergleich zu der nur geringen differentiellen Expression von IGFBP2 und 4 kam es bei IGFBP6, einem Bindeprotein mit vornehmlich IGF-inaktivierenden Eigenschaften, zu einer sehr intensiven Induktion um einen Fold Change von 6,02.

4.4.5 Expression von Genen des Retinsäure-Stoffwechsels

Neben SH-SY5Y-Zellen wurden sechs weitere Neuroblastom-Zelllinien sowie fünf Tumorzelllinien inklusive der normalen humanen Nierenzelllinie HEK293 auf die Expression von Genen untersucht, die in den intrazellulären Retinsäure-Stoffwechsel involviert waren. Aus der Abbildung 4-15 (A) geht hervor, dass neben den sieben Neuroblastom-Zelllinien auch alle anderen Zelllinien den Retinsäure-Rezeptor A (RARA) etwa gleich stark konstitutiv exprimierten.

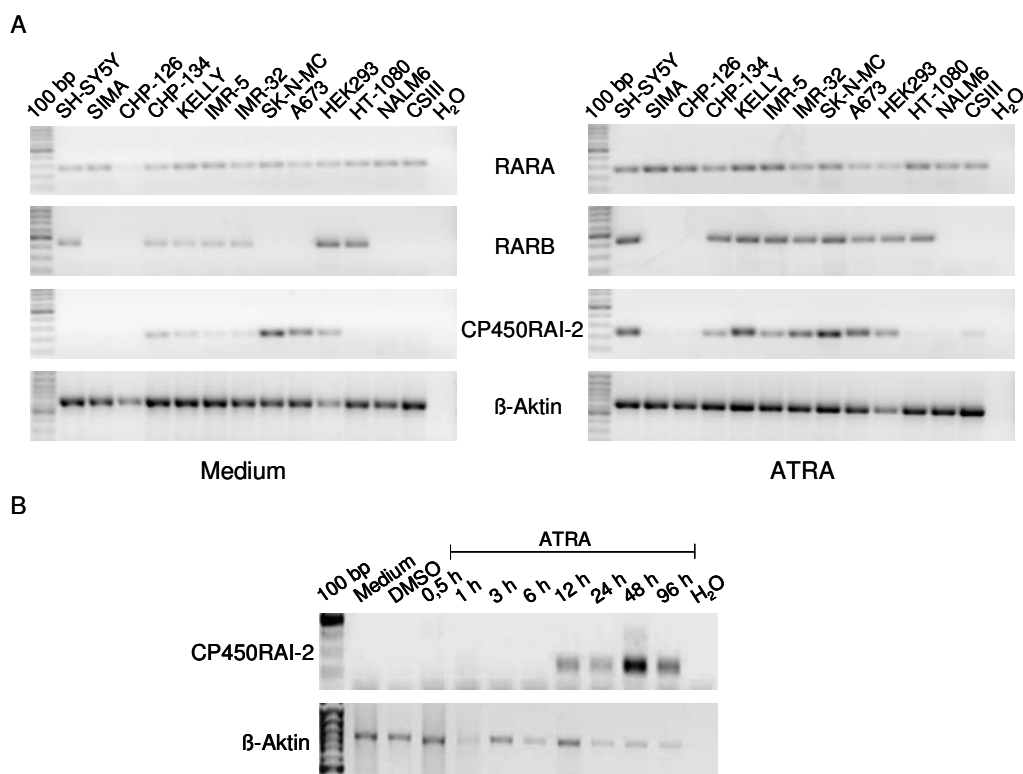


Abbildung 4-15: Expression von Genen des Retinsäure-Stoffwechsels in Neuroblastomzellen und diversen Tumorzelllinien nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure. (A) RT-PCR der RARA, RARB, CP450RAI-2 und β-Aktin mRNA-Expression in SH-SY5Y-Zellen in An- und Abwesenheit von ATRA. Die Tumorzellen wurden für 96 h (37 °C, 5% CO₂) mit dem entsprechenden Medium und ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) kultiviert. Die Angleichung des cDNA-Gehaltes erfolgte über das Haushaltgen β-Aktin. (B) RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung der CP450RAI-2 mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit dem Retinoid. Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen innerhalb eines Zeitraums von 0,5 bis 96 h (37 °C, 5% CO₂) mit ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) inkubiert.

Die RARA mRNA-Expression wurde zudem in allen Tumorzellen durch ATRA zusätzlich verstärkt. Mit Ausnahme von SIMA und CHP-126 exprimierten alle Neuroblastom-Zelllinien sowie die Fibrosarkom-Zelllinie HT-1080 und die Nierenzelllinie HEK293 den Retinsäure-Rezeptor B (RAR β) bereits konstitutiv. Nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure wurde bei allen basal RAR β exprimierenden Neuroblastomzellen und den beiden Ewing-Tumor-Zelllinien SK-N-MC und A673 eine deutliche Steigerung der mRNA-Expression beobachtet. In SIMA und CHP-126 ließ sich nach der Retinoid-Behandlung keine RAR β mRNA-Expression induzieren. Eine schwache konstitutive mRNA-Expression des Cytochrom P450RAI-2 konnte unter den Tumorzelllinien nur bei CHP-134, KELLY, IMR-5 und IMR-32 detektiert werden. Mit Ausnahme von SIMA und CHP-126 konnte in allen Neuroblastomzellen und der lymphoblastoiden Zelllinie CSIII eine Induktion des Cytochroms P450RAI-2 beobachtet werden. Konstitutiv stark wurde das Cytochrom P450RAI-2 in den beiden Ewing-Tumoren und dem Fibrosarkom HT-1080 exprimiert vorgefunden. Eine weitere Behandlung dieser Zellen mit dem Retinoid konnte jedoch keine weitere Expressionssteigerung herbeiführen. Darüber hinaus wurde in einer Kinetik der Zeitpunkt einer ATRA-induzierten Expression des Cytochrom P450RAI-2 mittels einer RT-PCR untersucht. Hierfür wurden SH-SY5Y-Zellen in einem Zeitraum von 0,5 bis 96 h mit *all-trans* Retinsäure inkubiert. Aus Abbildung 4-15 (B) geht hervor, dass erst nach einer Inkubationsdauer von mindestens 12 h das Retinsäure-inaktivierende Enzym Cytochrom P450RAI-2 im Vergleich zu Medium- und DMSO-behandelten Zellen induziert wurde. Nach einer Inkubationsdauer von 48 h wurde die maximale Cytochrom P450RAI-2 mRNA-Expression erreicht.

4.4.6 CD54 (ICAM-1) Expression in Neuroblastomzellen

Durch Bestimmung des differentiellen Genexpressionsprofils auf dem Affymetrix Genchip HG-U133A konnte am Beispiel der Modellzelllinie SH-SY5Y die Differenzierung-induzierende Wirkung des Retinoids *all-trans* Retinsäure näher charakterisiert werden. Hierbei kam es unter anderem zu einer Induktion der CD54 mRNA-Expression. Anhand weiterer Neuroblastom-Zelllinien wurde die CD54 Expression unter Einfluss eines Retinoides näher bestimmt. In Abhängigkeit von CD54 wurde zudem der therapeutische Nutzen sowie das Entwicklungsprofil von Retinoid-differenzierten Neuroblastomzellen genauer untersucht.

4.4.6.1 Überexpression von CD54 in Neuroblastomzellen nach Behandlung mit ATRA

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül CD54 wurde laut Genchip mit einem Fold Change von 8,8 und einer Differenz von 779 in ATRA- gegenüber Medium-behandelten SH-SY5Y-Zellen überexprimiert. Die in Abbildung 4-16 dargestellte CD54 mRNA-Expression der anderen etablierten Neuroblastom-Zelllinien ließ wie bei SH-SY5Y-Zellen ebenfalls keine konstitutive Expression dieses Gens erkennen. Nur die Ewing-Tumorzellen A673, die Fibrosarkomzellen HT-1080, die B-ALL-Zelllinie NALM6 und die lymphoblastoide Zelllinie CSIII zeigten eine basale CD54 mRNA-Expression. Wurde dem Kulturmedium das Retinoid *all-trans* Retinsäure hinzugefügt, so reagierten von den Neuroblastom-Zelllinien ausschließlich SH-SY5Y-Zellen mit einer erhöhten CD54 mRNA-Expression. In den anderen Zelllinien kam es bei den Ewing-Tumorzellen SK-N-MC und der lymphoblastoiden Zelllinie CSIII ebenfalls zu einer Induktion der CD54 mRNA-Expression. Im unteren Teil beider unterschiedlich behandelten Kulturansätze befand sich die mRNA-Expression des Haushaltgens β -Aktin, die die konstant eingesetzten cDNA-Mengen in die RT-PCR verdeutlichte.

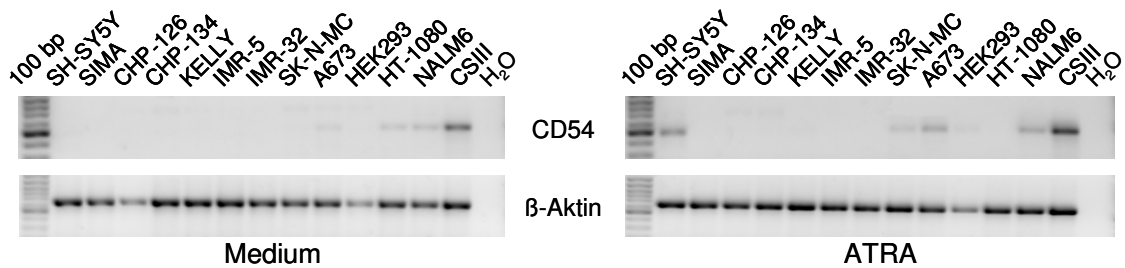


Abbildung 4-16: RT-PCR der CD54 mRNA-Expression in Neuroblastomzellen und diversen Tumor-Zelllinien nach Kultivierung mit ATRA. Die Neuroblastom- und Tumorzelllinien (inkl. HEK293) wurden in An- und Abwesenheit von ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) für 96 h (37°C , 5% CO_2) kultiviert. Mittels RT-PCR wurde die CD54 mRNA-Expression in einem 1,2%igen Agarosegel analysiert.

Neben der mRNA-Expression wurde ebenfalls die CD54 Proteinexpression auf der Oberfläche von Medium- und Retinoid-behandelten Zellen untersucht. Hierfür wurden Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien mit einem monoklonalen PE-gekoppelten Anti-CD54 Antikörper markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Die daraus resultierenden Fluoreszenzen werden in Abbildung 4-17 präsentiert.

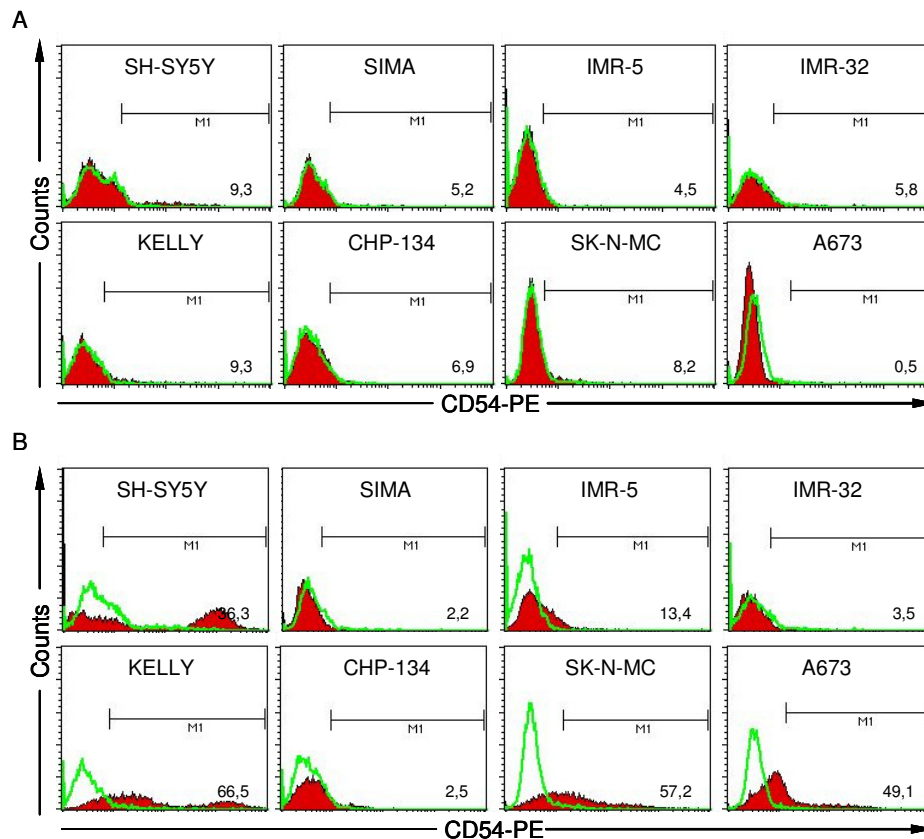


Abbildung 4-17: Differentielle CD54 Proteinexpression von Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien nach Behandlung mit ATRA. (A) FACS-Analyse zur konstitutiven CD54 Proteinexpression. Repräsentiert werden sechs Neuroblastom- (SH-SY5Y, SIMA, IMR-5, IMR-32, KELLY und CHP-134) und zwei Ewing-Tumor-Zelllinien (SK-N-MC und A673). 1×10^6 Zellen wurden in $100 \mu\text{l}$ PBS mit $10 \mu\text{l}$ eines monoklonalen direkt PE-markierten Anti-CD54 Antikörpers (rot) oder der Isotypen-Kontrolle (Maus-IgG₁-PE; grün) für 30 min (4°C , dunkel) gefärbt und im FACScan untersucht. (B) Durchflusszytometrische Analyse und Überlagerung der CD54 Proteinexpressionen von Medium- (grün) und ATRA- (rot) kultivierten Tumorzelllinien.

Hierbei wurde die Zellzahl (*Counts*) gegen das Fluoreszenzsignal der CD54-PE Expression aufgetragen. Aus den Histogrammen der Abbildung 4-17 (A) geht hervor, dass keine der sieben Neuroblastom- und beiden Ewing-Tumorzelllinien eine basale CD54 Proteinexpression auf der Zelloberfläche besaß. Nach Integration eines Markers (M) in die Histogramme ergab die

Auswertung eine nur schwache und zu vernachlässigende konstitutive CD54 Proteinexpression mit einem zellulären Anteil zwischen 0,5% bei den Ewing-Tumorzellen A673 und 9,3% bei SH-SY5Y-Zellen. Die Proteinexpression spiegelte somit erneut die fehlende bzw. schwache mRNA-Expression aus der semiquantitativen RT-PCR wider. Durch Kultivierung mit *all-trans* Retinsäure konnte sowohl auf der Zelloberfläche der Neuroblastomzellen SH-SY5Y und KELLY als auch auf den Ewing-Tumorzellen A673 und SK-N-MC eine Induktion der CD54 Proteinexpression beobachtet werden. Die Auswertung der Fluoreszenzen aus den hier dargestellten Histogrammen ergab einen Anteil CD54-positiver Zellen von 36% bei SH-SY5Y, 66% bei KELLY, 57% bei SK-N-MC und 49% bei A673 (Abbildung 4-17, B). Mit Ausnahme der KELLY-Zellen konnte somit für alle anderen Zelllinien die ATRA-vermittelte Induktion bzw. das Ausbleiben der CD54 Expression aus der RT-PCR bestätigt werden. Die Ursache für die Abweichungen zwischen der CD54 mRNA-Expression und der Proteinexpression in der Neuroblastom-Zelllinie KELLY könnte auf Schwankungen bei den Zellkulturbedingungen und dem instabilen Differenzierungszustand der unreifen Neuroblastomzellen zurückzuführen sein.

4.4.6.2 Zellzyklusanalyse CD54^{-/+}-differenzierter Neuroblastomzellen

Das natürlich vorkommende Retinoid *all-trans* Retinsäure zeigte bei der Modellzelllinie SH-SY5Y sowohl eine antiproliferative als auch eine Differenzierung-induzierende Wirkung, die sich unter anderem mit einer Heraufregulierung von CD54 äußerte. In einer Zellzyklusanalyse wurde die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen eines Zellzyklus in Abhängigkeit von unterschiedlich CD54-differenzierten SH-SY5Y-Zellen verglichen. Hierzu wurden die Neuroblastomzellen mit ATRA, 4-HPR und DMSO für 96 Stunden behandelt und anschließend mittels einer magnetaktivierten Zellseparation (MACS) in eine CD54-negative und -positive Zellpopulation separiert.

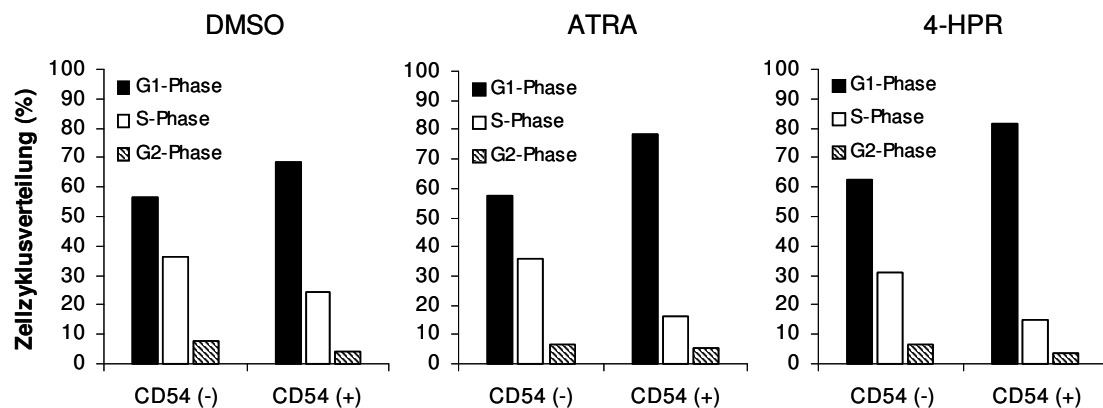


Abbildung 4-18: Zellzyklusverteilung von CD54⁻ und CD54⁺-differenzierten Neuroblastomzellen nach Stimulation mit synthetischen und natürlichen Retinoiden. SH-SY5Y-Zellen wurden mit ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M), 4-HPR ($3,9 \times 10^{-6}$ M) und DMSO (1:640) für 96 h (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Im Anschluß erfolgte eine Markierung der Zellen mit einem PE-gekoppelten Anti-CD54 Antikörper (30 min, 4°C). Nach mehrmaligen Waschen erfolgte eine Sekundärfärbung mit einem Magnetpartikel-gekoppelten Anti-PE Antikörper (15 min, 4°C). In einem Magnetfeld wurden die mit Magnetpartikeln markierten CD54-positiven Zellen von den CD54-negativen Neuroblastomzellen getrennt. Die genomische DNA wurde mit Propidium-Iodid gefärbt und die Fluoreszenz (FI-2) im FACS gemessen. Die Auswertung wurde durch das Computerprogramm *Cell Cycle Analysis* unterstützt.

Nach der Zellseparation wurde im Durchflusszytometer unter den SH-SY5Y-Zellen eine CD54⁺ Population mit einer Reinheit von 96% bestimmt (ohne Darstellung). In einer weiteren Färbung mit Propidium-Iodid wurde der unterschiedliche Chromatid-Gehalt in der G₁-, S- und G₂-Phase einer Zelle durchflusszytometrisch analysiert. In Abbildung 4-18 ist die prozentuale Verteilung der CD54-negativen und -positiven differenzierten Neuroblastomzellen aus der Behandlung mit DMSO, ATRA und 4-HPR innerhalb der verschiedenen Zyklusphasen dargestellt. Bei einer

entsprechend großen Zellausgangsmenge ließen sich auch bei basal besonders niedrig CD54 exprimierenden Neuroblastomzellen (9% der DMSO-kultivierten Gesamtpopulation) einige CD54-positive SH-SY5Y-Zellen mit anreichern. Durch Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen mit DMSO konnte eine Arretierung von 68% der CD54-positiven Neuroblastomzellen in der G₁-Phase gegenüber 57% der CD54-negativen Neuroblastomzellen beobachtet werden. Die Arretierung in der G₁-Phase war mit einer 11%igen Abnahme der replizierenden SH-SY5Y-Zellen aus der S-Phase verbunden. Durch *all-trans* Retinsäure arretierten 78% der CD54-positiven Neuroblastomzellen gegenüber 57% der CD54-negativen SH-SY5Y-Zellen in der G₁-Phase. Gleichzeitig war auch hier die Arretierung der CD54-positiven Neuroblastomzellen mit einer Abnahme von 21% aus der S-Phase assoziiert. Ähnlich wie bei der Behandlung mit ATRA kam es durch 4-HPR zu einem Anstieg CD54-positiver Neuroblastomzellen in der G₁-Phase. Mit einem Anteil von 82% befanden sich die CD54-positiven gegenüber 62% der CD54-negativen SH-SY5Y-Zellen in der G₁-Phase. Auch hier resultierte der G₁-Arrest aus einer 20%igen Abnahme CD54-positiver Neuroblastomzellen aus der Replikations-Phase. Der prozentuale Anteil der SH-SY5Y-Zellen aus der G₂-Phase war von der CD54 Expression und den Kulturbedingungen unabhängig und lag konstant bei etwa 5%. Die Daten veranschaulichten, dass der Anteil CD54-positiver Tumorzellen in der G₁-Phase größer war als bei CD54-negativen Neuroblastomzellen. Durch die beiden Retinoide ATRA und 4-HPR ließ sich dieser Effekt jedoch noch verstärken. Die durch die Retinoide differenzierten CD54-positiven Neuroblastomzellen arretierten verstärkt in der G₁-Phase und wurden somit an dem Eintritt in die Replikationsphase und Wachstum gehindert.

4.4.6.3 CTLs-vermittelte Bystanderlyse von CD54-differenzierten Neuroblastomzellen

Die Bystanderlyse ist bisher eine noch nicht detailliert verstandene Zelllyse (5.3.2). Die durch ATRA vermittelte Induktion der CD54 mRNA- und Proteinexpression wurde ebenfalls auf eine biologische Funktionalität für mögliche immuntherapeutische Zwecke analysiert. CD54 (ICAM-1) stellt hinsichtlich seiner Funktion als interzelluläres Adhäsionsmolekül für die Wechselwirkung mit dem Liganden LFA1 auf der Oberfläche der zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) ein wichtiges Zelllyse-vermittelndes Protein dar. Nach Behandlung mit ATRA wurde anhand von CD54 überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen die CTLs-gesteuerte Bystanderlyse von Neuroblastomzellen analysiert. Für diese Untersuchungen wurde die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y und als Kontrolle die Ewing-Tumorzellen SK-N-MC und A673 in An- und Abwesenheit von ATRA stimuliert und mit den zytotoxischen T-Lymphozyten 10BK.1 (CTLs) im Verhältnis 5:1 (Effektorzelle : Zielzelle) kokultiviert. Bei den 10BK.1 handelte es sich um einen murinen zytotoxischen T-Zellklon CD8⁺ T-Lymphozyten. In Abwesenheit antigenpräsentierender Zellen (APC) wächst dieser T-Zellklon ausschließlich über die eigene reziproke Präsentation und Aktivierung des prozessierten OVA-spezifischen Octapeptides SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄). Die daraus resultierende Lyse von Tumorzellen wurde durch Gewinnung der Kulturüberstände in einem LDH-Test näher untersucht und quantifiziert. In Abbildung 4-19 ist die 10BK.1-vermittelte Zelllyse von Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen dargestellt. Die Lyse jeder Zelllinie wurde bei allen Ansätzen stets auf die Medium-behandelten Tumorzellen + 10BK.1 ohne Anwesenheit von Interleukin-2 und Peptid (1 = 100%) bezogen. Die konstitutive 10BK.1-induzierte Zelllyse (ohne IL-2 oder Peptid) lag bei den SH-SY5Y-Zellen und den Ewing-Tumorzellen SK-N-MC und A673 in Anwesenheit von Medium, DMSO oder ATRA bei einem konstant kleinen Wert von 1. Auch in Anwesenheit des OVA-spezifischen Peptides SIINFEKL konnte keine Induktion der Bystanderlyse in SH-SY5Y-Zellen oder den Ewing-Tumorzellen A673 unabhängig von der Anwesenheit eines Retinoides gemessen werden. Nur in ATRA-behandelten SK-N-MC-Zellen kam es in Anwesenheit des Peptides zu einem kleinen 1,5-fachen Anstieg der Bystanderlyse. Die stärkste Induktion einer 10BK.1-vermittelten Bystanderlyse war in

Anwesenheit von Interleukin-2 (IL-2) und ATRA-kultivierten SH-SY5Y-Zellen zu beobachten. Hierbei kam es zu einer 4-fachen Induktion der Zellyse gegenüber Medium-behandelten SH-SY5Y-Zellen und 10BK.1. Auch in den mit ATRA stimulierten Ewing-Tumorzellen SK-N-MC wurde in Anwesenheit von IL-2 eine 2,2-fach höhere Bystanderlyse durch 10BK.1 gemessen. Diese Bystanderlyse ging jedoch auch mit einer erhöhten Lyse der Ewing-Tumor-Kontrollzellen Medium (1,9) und DMSO (1,6) einher. Die mit ATRA kultivierten Ewing-Tumorzellen A673 konnten durch die CTLs nicht verstärkt lysiert werden. Eine Behandlung von A673-Zellen mit ATRA und einer Kokultivierung mit 10BK.1 in Anwesenheit von IL-2 führte zu einer 1,2-fachen Bystanderlyse der Ewing-Tumorzellen gegenüber einer 1,2- und 1,4-fachen Lyse mit DMSO oder Medium.

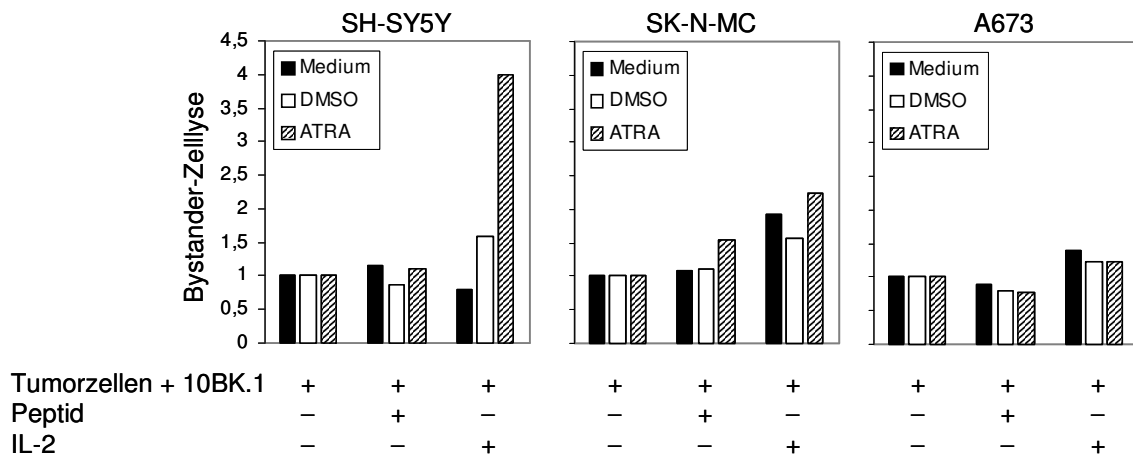


Abbildung 4-19: CTLs-vermittelte Bystanderlyse von CD54 überexprimierenden Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure. Die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y und die Ewing-Tumorzellen SK-N-MC und A673 wurden für 96 h (37°C, 5% CO₂) mit ATRA (6,25 x 10⁻⁵ M), DMSO (1:640) und Medium kultiviert. Im Anschluß wurden 20.000 Tumorzellen mit 100.000 10BK.1 Zellen in einem Verhältnis von 1:5 (Zielzelle : Effektorzelle) für 4 h in FKS-freiem X-VIVO Medium in An- und Abwesenheit von IL-2 (100 U/ml) und OVA-Peptid (30 ng/ml) in einer 96-Lochplatte kokultiviert. Zuletzt wurde das freigesetzte LDH (Maß der Zellyse) aus dem Kulturüberstand gewonnen und in einem LDH-Zytotoxizitätstest gemessen. Die Maximallyse (100% Zellyse) der Tumorzellen wurde durch Zugabe von Triton X-100 (0,1%) bestimmt.

Eine ATRA-induzierte Heraufregulierung von CD54 führte durch die reziproke Autoaktivierung von IL-2 stimulierten 10BK.1 Zellen zu einer stark ausgeprägten Bystanderlyse von SH-SY5Y-Zellen. Diese Wirkung der zytotoxischen T-Lymphozyten war in CD54 überexprimierenden Neuroblastomzellen nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht.

4.4.6.4 Vergleich des Genexpressionsprofils von CD54^{+/-}-differenzierten SH-SY5Y-Zellen

Durch den Genchip HG-U133A der Firma Affymetrix wurde in Anwesenheit von ATRA eine Vielzahl an herauf- und herunterregulierten Genen in differenzierten Neuroblastomzellen identifiziert. Für diese Untersuchung des Expressionsprofils wurde jedoch die Gesamt-RNA eines Populationsgemisches von CD54⁻ und CD54⁺ SH-SY5Y-Zellen gewonnen. Diese beiden Populationen entsprachen somit zwei verschiedenen sensitiven Zelltypen, die nach Behandlung mit einem Retinoid eine unterschiedliche Reaktion hinsichtlich der CD54 Expression zeigten. Aus diesem Grund wurde in weiteren Untersuchungen in Abhängigkeit von CD54 das Expressionsprofil von zwei verschiedenen *all-trans* Retinsäure differenzierten und separierten Zellpopulationen miteinander verglichen. Durch diese Analyse des Expressionsprofils sollte der Differenzierungsstatus CD54-negativer und -positiver Neuroblastomzellen nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure näher charakterisiert werden. Hierzu wurden erneut SH-SY5Y-Zellen (Passage 6, 9 und 10) mit ATRA behandelt und die CD54-positive und -negative Zellpopulation

mittels eines primären PE-markierten Anti-CD54 und sekundären Magnetpartikel-gekoppelten Anti-PE Antikörper über eine magnetaktivierte Zellseparation voneinander getrennt. Aus Abbildung 4-20 (A) geht hervor, dass in der FACS-Analyse vor Zellseparation eine ATRA-induzierte CD54⁺ Population mit einem Anteil von 19,4% (grün) vorlag. Nach Selektionierung der Zellen wurde eine Reinheit der separierten CD54⁺ Population von 99% (rot) und der depletierten CD54⁻ Population von 95% (blau) bestimmt. Ein Teil der CD54-positiven und -negativen SH-SY5Y-Zellen wurde rekultiviert und im Lichtmikroskop fotografisch dokumentiert (Abbildung 4-20, B).

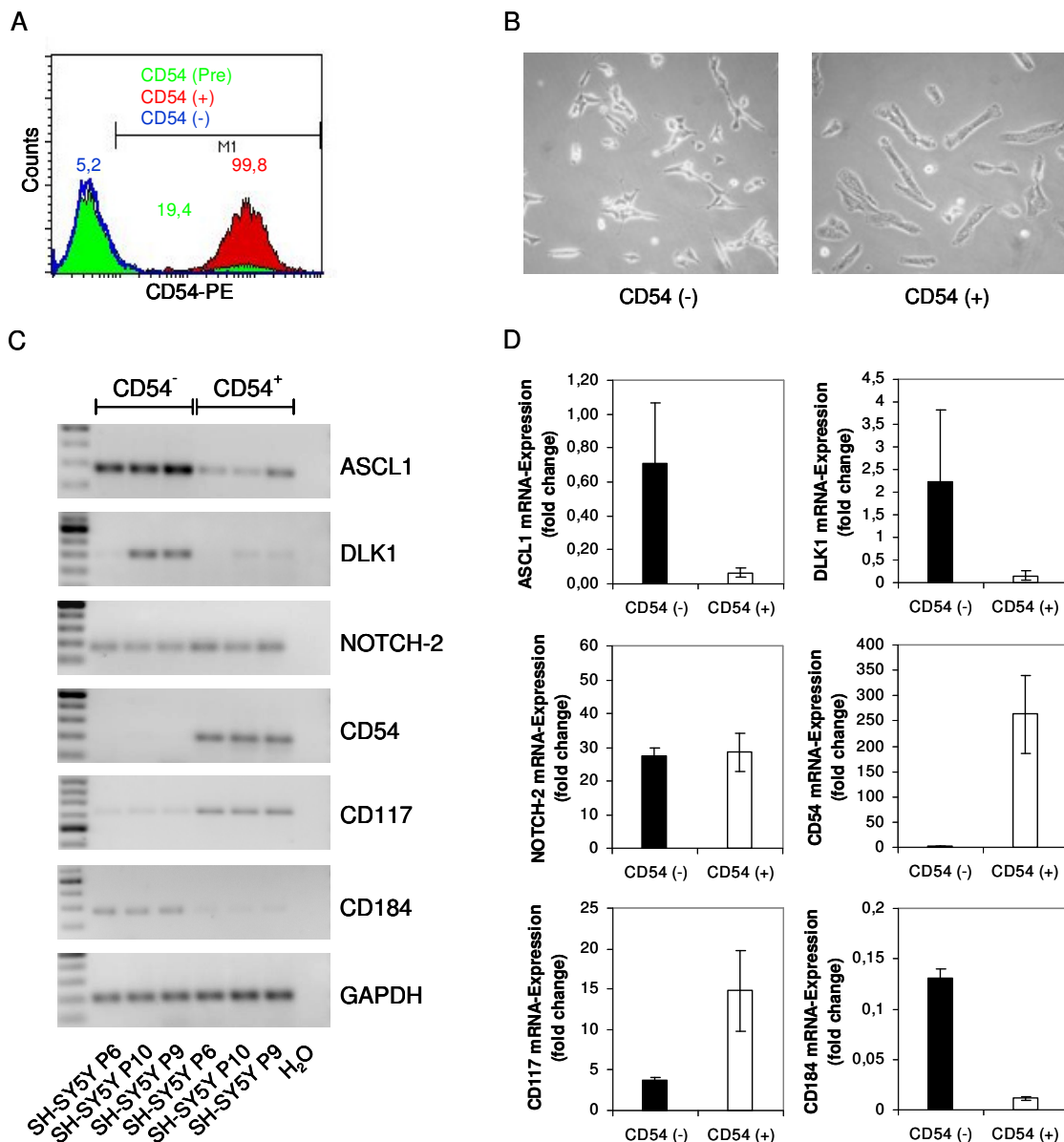


Abbildung 4-20: Analyse des Genexpressionsprofils von CD54⁻- und CD54⁺-selektionierten Neuroblastomzellen nach Stimulation mit dem Differenzierung-induzierenden Reagenz *all-trans* Retinsäure. SH-SY5Y-Zellen (Passage 6, 10 und 9) wurden mit ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) bei 37°C und 5% CO₂ für 96 h im Zellinkubator kultiviert. Im Anschluß erfolgte die MACS-Zellseparation über einen primären Anti-CD54-PE und einen sekundären mit Magnetpartikeln gekoppelten Anti-PE Antikörper. (A) FACS-Analyse zur Bestimmung der CD54-PE Fluoreszenz (Fl-2) der ATRA-behandelten SH-SY5Y-Zellen vor Separation (Pre; grün; 19,4%) sowie der CD54⁻ (5,2%; blau) und CD54⁺ (99,8%; rot) Population nach MACS-Selektionierung. (B) Lichtmikroskopische Aufnahme (10-fache Vergrößerung) CD54⁻- und CD54⁺-differenzierter Neuroblastomzellen nach magnetaktivierter Zellselektionierung. (C) RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression in CD54⁻-differenzierten SH-SY5Y-Zellen unter Verwendung der in 2.1.4 angegebenen Primer. (D) Quantitative *real time* RT-PCR zur fluorimetrischen Expressionsanalyse durch Ermittlung des Δ CT-Wertes und des Fold Change in ATRA-behandelten CD54⁻ und CD54⁺ SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zur Medium-Kontrolle (1 = 100%).

Deutlich konnten morphologische Unterschiede in der Zellform und Größe beobachtet werden. Die durch ATRA ausdifferenzierten CD54-positiven Neuroblastomzellen verloren ihr ursprüngliches typisch neuronales, spindeliges Aussehen und nahmen stattdessen in der Gesamtgröße zu. Laut Genchip wurden vor allem Gene des Delta-Notch-Signalweges und diverse Oberflächenproteine wie CD54, CD117 und CD184 durch ATRA differentiell exprimiert vorgefunden. In Abbildung 4-20 (C) ließ sich mittels einer RT-PCR eine deutliche Reduktion der ASCL1 und DLK1 mRNA-Expression in der CD54⁺ gegenüber der CD54⁻ Population beobachten. Die Expression des DLK1-spezifischen Rezeptors Notch-2 zeigte in der Expressionsintensität zwischen den beiden Populationen keinen Unterschied. Die Expression des ATRA-induzierten Oberflächenproteins CD54 war aufgrund der CD54-abhängigen Zellseparation in der CD54⁺ Population gegenüber der CD54⁻ Population erwartungsgemäß deutlich heraufreguliert. Dieser Expressionsvergleich stellte somit nochmals eine interne Versuchskontrolle dar. Eine Behandlung der SH-SY5Y-Zellen mit ATRA führte vorrangig in der CD54-positiven Population zu einer Induktion der CD117 mRNA-Expression. Gegenüber der CD54⁻ Zellpopulation wurde in den CD54⁺-differenzierten SH-SY5Y-Zellen eine deutliche Herunterregulierung des Chemokinrezeptors CD184 identifiziert. Durch die in Abbildung 4-20 (D) dargestellte quantitative *real-time* RT-PCR wurde das CD54-abhängige Expressionsprofil miteinander verglichen. Die Expressionsdaten veranschaulichten stets den Fold Change eines über- (>1) oder unterexprimierten Gens (<1) in den beiden CD54-selektionierten Populationen im Vergleich zur Kontrolle (Medium). Um einen Faktor von 263 in der CD54⁺ und von 1,4 in der CD54⁻ Population war das Antigen CD54 gegenüber Medium erwartungsgemäß stärker exprimiert. Bei den in den Notch-Signalweg involvierten Genen kam es mit einem FC von 0,066 (ASCL1) und 0,16 (DLK1) zu einer deutlichen Unterexpression in den Neuroblastomzellen, die gleichzeitig CD54 heraufregulierten. In der CD54⁻ Zellpopulation war im Vergleich zur Kontrolle der Transkriptionsfaktor ASCL1 mit einem FC von 0,71 leicht unter- und DLK1 mit 2,25 sogar leicht überexprimiert. Der DLK1 bindende Rezeptor Notch-2 wurde durch ATRA mit einem FC von 27 (CD54⁻) und 28 (CD54⁺) gegenüber der Kontrolle stark heraufreguliert, war jedoch von der Expression des Oberflächenantigens CD54 unabhängig. Die Expression des Tyrosinkinasegekoppelten Rezeptors CD117 war in der CD54-positiv separierten Zellpopulation um das 14,8-fache und in der negativen Population um das 3,7-fache gegenüber Medium erhöht. Im Vergleich zu Medium reduzierte sich die mRNA-Expression des Chemokin-Rezeptors CD184 bei beiden mit ATRA stimulierten und CD54-selektionierten Populationen um einen FC von 0,01 (CD54⁺) und 0,13 (CD54⁻). Letztlich war die ATRA-vermittelte Reduktion von CD184 in den CD54-positiv differenzierten Neuroblastomzellen stärker ausgeprägt als in den für ATRA unsensitiven und CD54-negativen SH-SY5Y-Zellen.

4.4.6.5 Vergleich des Expressionsprofils von Genen des Retinoidstoffwechsels und Regulatoren des Zellzyklus in CD54⁺ und CD54⁻-differenzierten Neuroblastomzellen

Laut RT-PCR (Abbildung 4-21, A) waren die Gene des Retinoid-Sooffwechsels sowohl in der CD54⁺ als auch in der CD54⁻ Population exprimiert. Die Expression der Retinsäure-Rezeptoren A (RARA) und B (RARB) war in der negativen gegenüber der positiven Population erhöht. Auch eine verstärkte Expression des Retinsäure-inaktivierenden Enzyms Cytochrom P450RAI-2 konnte in den CD54-depletierten gegenüber den CD54-separierten Zellen beobachtet werden. Die c-MYC-positiven SH-SY5Y-Zellen wiesen in der CD54⁻ differenzierten Population ein schwächeres Expressionssignal auf als in der CD54⁺. SH-SY5Y-Zellen, die als nicht MYCN amplifizierend beschrieben werden, zeigten eine erhöhte MYCN mRNA-Expression in der CD54⁻ gegenüber der CD54⁺ Zellpopulation. Die quantitative Auswertung dieser differentiell exprimierten Gene erfolgte erneut durch Analyse in der *real-time* RT-PCR. Der Fold Change (FC)

herauf- und herunterregulierter Gene (Abbildung 4-21, B) beider Populationen bezog sich auch hier auf die mit Medium kultivierten Kontrollzellen.

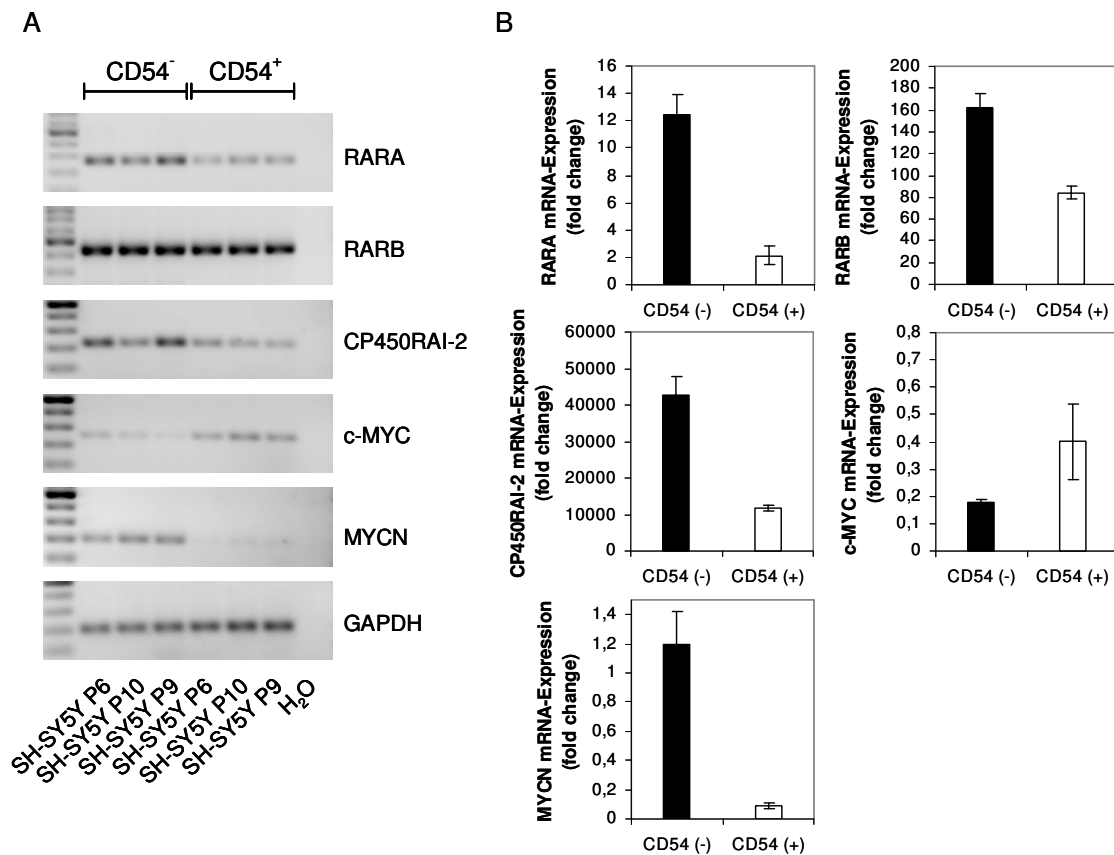


Abbildung 4-21: Expressionsprofile von Genen des Retinoid-Stoffwechsels und Promotoren des Zellzyklus in ATRA-stimulierten und CD54⁻ und CD54⁺ selektionierten Neuroblastomzellen. Die Passagen 6, 10 und 9 der Zelllinie SH-SY5Y wurden mit ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) für 96 h (37°C , 5% CO_2) kultiviert und mittels einer magnetaktivierten Zellseparation (MACS) in CD54⁻ und CD54⁺ Populationen aufgetrennt. Die RT-PCR (A) und quantitative *real-time* RT-PCR (B) wurde mit den unter 2.1.4 angegebenen Primern für RARA, RARB, CP450RAI-2 (CYP26B1), c-MYC, MYCN und GAPDH durchgeführt.

Die mRNA-Expression des Retinsäure-Rezeptors A (RARA) war in CD54-depletierten Zellen um einen FC von 12,4 und in CD54-separierten Zellen um 2,1 nach Behandlung mit ATRA gegenüber der Kontrolle erhöht. Beim Retinsäure-Rezeptor B (RARB) wurde eine gemeinsame Induktion der Expression um den Faktor 161 (CD54⁻) und 84 (CD54⁺) analysiert. Auch bei der Cytochrom P450RAI-2 mRNA-Expression wurde in der CD54-depletierten Zellfraktion mit einem FC von 42.737 ein deutlich höher induziertes Expressionssignal gemessen als in der separierten Fraktion mit einem FC von 11.850. Unabhängig vom Profil einer CD54 Expression zeigten nach Behandlung mit ATRA alle im Retinsäure-Stoffwechsel involvierten Gene eine Induktion der Expression. Wie schon in der RT-PCR beobachtet werden konnte, war das Expressionssignal von c-MYC in der CD54⁻ Population geringer als in der CD54⁺ Population. Beide Retinsäure-stimulierten Populationen waren jedoch hinsichtlich ihrer c-MYC mRNA-Expression um einen Faktor von 0,18 (CD54⁻) und 0,40 (CD54⁺) deutlich gegenüber Medium reduziert. Die MYCN mRNA-Expression der SH-SY5Y-Zellen, für die keine mehrfache genomische Kopie von MYCN beschrieben wird (MYCN-Amplifizierung), war in der CD54-negativen Zellfraktion mit einem FC von 1,2 etwa gleich stark wie in der Kontrolle. In den CD54-differenzierten Neuroblastomzellen wurde hingegen eine deutliche Reduktion des fluorimetrischen Expressionssignals von MYCN um den Faktor 0,089 gemessen.

4.4.6.6 Neuronen- und Gliazell-spezifische Typisierung von CD54[±]-differenzierten Neuroblastomzellen

Das Ziel einer Behandlung mit *all-trans* Retinsäure bestand stets darin, die aus der Neuralleiste stammenden unreifen Neuroblastomzellen in neuronale Zellstrukturen ausdifferenzieren zu lassen. Durch *in-vitro* Behandlung von Neuroblastomzellen mit *all-trans* Retinsäure und den Nachweis von Markern, wie sie gewebespezifisch in Neuronen und Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) exprimiert werden, wurde die Differenzierung-induzierende Wirkung von ATRA in CD54⁺ und CD54⁻ entwickelten SH-SY5Y-Zellen verglichen. Dafür wurde beispielsweise die Expression und die Verteilung der Neuronen-spezifischen Gene Neurofilament-H (NF-H), -L (NF-L) und -M (NF-M) in der RT-PCR untersucht (Abbildung 4-22, A).

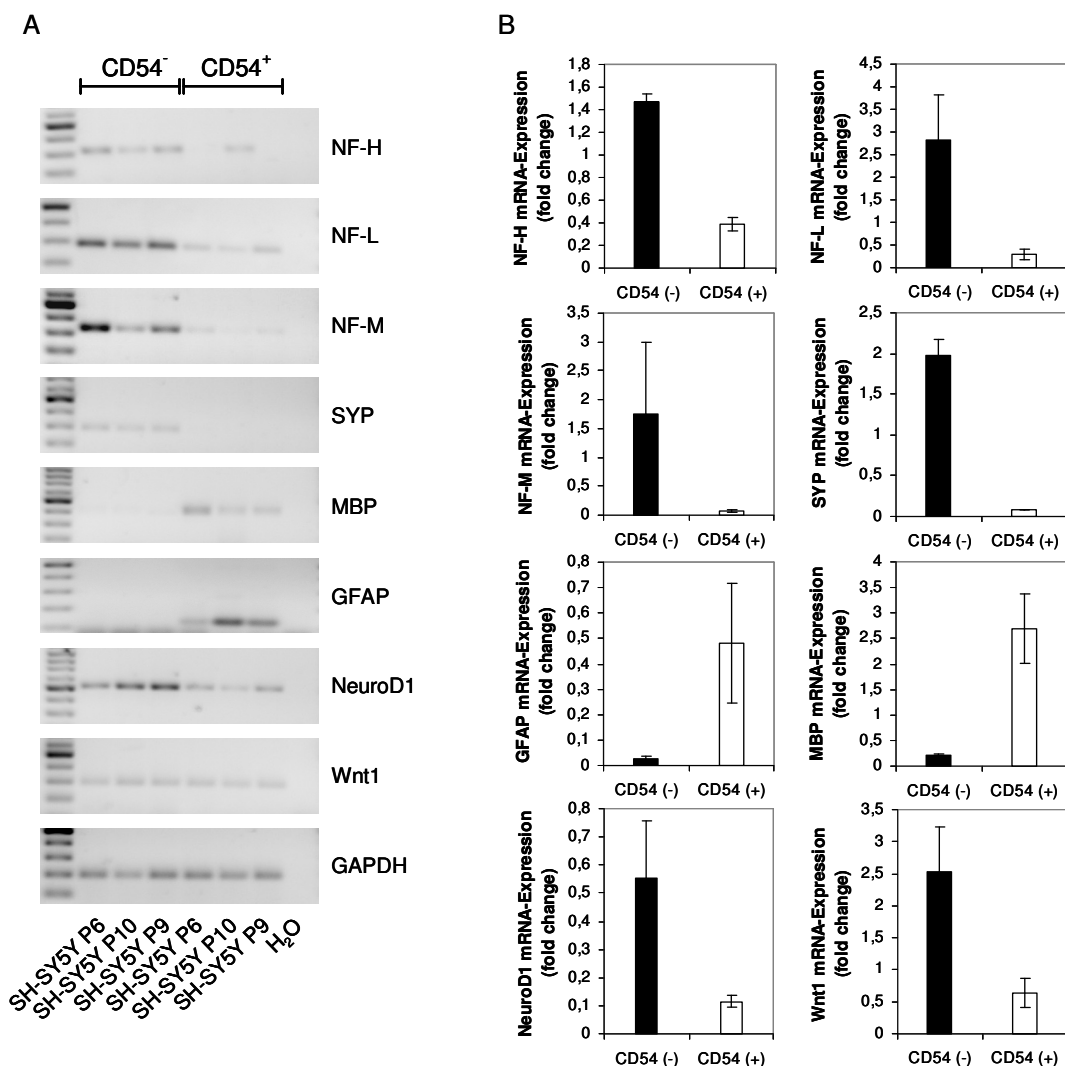


Abbildung 4-22: RT-PCR Analyse zur Bestimmung eines Neuron- und Gliazell-spezifischen Expressionsprofils von CD54⁻ und CD54⁺-differenzierten Neuroblastomzellen nach Stimulation mit ATRA. SH-SY5Y-Zellen der Passagen 6, 10 und 9 wurden mit ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) für 96 h (37°C, 5% CO₂) kultiviert und mittels MACS-Technologie in CD54⁻ und CD54⁺ Populationen separiert. RT-PCR (A) und quantitative *real time* RT-PCR (B) mit den unter 2.1.4 angegebenen Primern für Neurofilament-H, -L und -M sowie Synaptophysin, MBP, GFAP, NeuroD1 und Wnt1.

Hierbei konnte eine deutliche Überexpression der drei unterschiedlich großen Neurofilamentarten in der CD54⁻ gegenüber der CD54⁺-differenzierten Zellpopulation beobachtet werden. Auch das für Neuronen spezifische vesikuläre Protein Synaptophysin (SYP) wurde ausschließlich in der CD54-negativen Population exprimiert vorgefunden. Auch die beiden

basischen Transkriptionsfaktoren mit *helix-loop-helix*-Motiv Wnt1 (*wingless-type mammary tumor virus integration site family, member 1*) und NeuroD1 (*neurogenic differentiation factor 1*), die eine wichtige Funktion im Verlauf der frühen Neurogenese ausüben, wurden in den CD54⁻ gegenüber den CD54⁺ Neuroblastomzellen deutlich überexprimiert. Neben Markern, die ein Neuronen-spezifisches Profil beschreiben, wurde auch die Expression von Gliazellcharakteristischen Genen in den unterschiedlich differenzierten Zellpopulationen untersucht. Zwei entscheidende Subtypen von Gliazellen stellen die Astrozyten (Astroglia) und die Oligodendrozyten (Oligodendroglia) dar. Das basische Myelinprotein MBP (*myelin basic protein*), ein Marker für Oligodendrozyten, wurde als mRNA-Transkript erhöht in der CD54⁻ gegenüber der CD54⁺ Zellpopulation vorgefunden. Das saure Gliafaserprotein GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) ist hingegen ein Marker für Astrozyten. Die Expression dieses Gens wurde in der RT-PCR ausschließlich in den CD54-positiven Neuroblastomzellen detektiert. Darüber hinaus wurde mittels der *real-time* RT-PCR die differentielle mRNA-Expression der Gliazellcharakterisierenden Gene in den unterschiedlich CD54 exprimierenden Populationen verglichen (Abbildung 4-22, B). Die Expression der drei Neurofilament-Arten war in den CD54-positiven im Vergleich zu den -negativen Neuroblastomzellen stets erniedrigt. Mit einem Fold Change von 1,5 (NF-H), 2,8 (NF-L) und 1,8 (NF-M) war die mRNA-Expression der Neurofilamente in der CD54-negativen Population gegenüber Medium leicht erhöht. Im Bezug auf Medium-kultivierte SH-SY5Y-Zellen war die Expression der Neurofilamente-H (0,39), -L (0,30) und -M (0,07) in CD54-positiven Neuroblastomzellen deutlich kleiner als in der CD54-negativen Population. Die Expression des neurovesikulären Synaptophysins wurde im Bezug auf Medium in der CD54⁻ Population 1,98-fach herauf- und in der CD54⁺ Population 0,085-fach herunterreguliert. Wie schon in der RT-PCR waren auch in der *real-time* RT-PCR die neuronalen Transkriptionsfaktoren Wnt1 und NeuroD1 in der CD54⁻ gegenüber der CD54⁺ Population erhöht exprimiert. Mit einem Faktor von 2,54 wurde Wnt1 in der CD54-negativen Population deutlich stärker exprimiert als mit 0,64 in den CD54-positiven Neuroblastomzellen. Mit einem Fold Change von 0,55 war die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors NeuroD1 in der CD54⁻ Zellpopulation gegenüber der Kontrolle erniedrigt, jedoch stärker ausgeprägt als in der CD54⁺ Population (0,11). In der quantitativen *real-time* RT-PCR konnte wie in der RT-PCR eine erhöhte Expression der nicht neuronalen Astrozyten- und Gliazellmarker MBP und GFAP verstärkt in den CD54-positiv gegenüber den -negativ differenzierten Neuroblastomzellen gemessen werden. Trotzdem war mit einem Fold Change von 0,48 (CD54⁺) und 0,03 (CD54⁻) bei beiden mit ATRA kultivierten und CD54-selektionierten Populationen die GFAP mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle erniedrigt. Das MBP-Transkript wurde mit einem erhöhten Fold Change von 2,68 bei CD54⁺ SH-SY5Y-Zellen und einer erniedrigten Expression von 0,21 bei CD54⁻ Neuroblastomzellen im Vergleich zur Kontrolle quantifiziert.

4.4.7 CD184 Expression von Retinoid-kultivierten Neuroblastomzellen

Das Genexpressionsprofil der SH-SY5Y-Zellen wies sowohl nach der Behandlung mit dem synthetischen 4-HPR als auch der natürlich vorkommenden *all-trans* Retinsäure auf eine Herunterregulierung des Chemokinrezeptors CD184 hin. Das vorrangig auf lymphatischen Zellen vorkommende CD184 wird durch Bindung des spezifischen Liganden SDF-1 (*stromal derived factor-1*) aktiviert. Darüber hinaus ist auch bekannt, dass CD184-positive Tumorzellen durch Sezernierung von SDF-1 in ihren Invasivitäts- und Migrationseigenschaften positiv beeinflusst werden können. Anhand sechs verschiedener Neuroblastom-Zelllinien wurde die CD184 Expression unter Einfluss von ATRA näher charakterisiert und die Invasivität und das Migrationsverhalten unterschiedlich differenzierter Neuroblastomzellen über die funktionelle Wechselwirkung von CD184 mit SDF-1 genauer analysiert.

4.4.7.1 Herunterregulierung der CD184 Expression in Neuroblastomzellen nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure

Im Genchip HG-U133A wurde durch *all-trans* Retinsäure in SH-SY5Y-Zellen eine herunterregulierte CD184 mRNA-Expression um einen Fold Change von 0,29 und einer Differenz von 341 gegenüber den Medium-kultivierten Zellen identifiziert. Neben SH-SY5Y-Zellen wurden sechs weitere Neuroblastom-Zelllinien sowie die Ewing-Tumore SK-N-MC und A673, das Fibrosarkom HT-1080, die akute B-lymphatische Leukämie NALM6, die lymphoblastoide Zelllinie CSIII und die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 auf deren CD184 mRNA- und Protein-Expression in An- und Abwesenheit des natürlichen Retinoids im Kulturmedium untersucht. In Abbildung 4-23 (A) ist die CD184 mRNA-Expression der sieben untersuchten Zelllinien dargestellt. Mit Ausnahme von SIMA exprimierten alle anderen Neuroblastomzellen konstitutiv den Chemokinrezeptor. Unter den Neuroblastomzellen war die Expression besonders in SH-SY5Y-Zellen ausgeprägt. Die stärkste basale Expression von CD184 lag in den beiden Ewing-Tumorzellen A673 und SK-N-MC, der B-ALL-Zelllinie NALM6 und der Nicht-Tumorzelllinie HEK293 vor. Nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure wurde die mRNA-Expression von CD184 in allen Neuroblastom-Zelllinien sowie auch den HEK293-Zellen deutlich vermindert oder zum Teil vollständig aufgehoben. Bei den SK-N-MC-Zellen kam es nach der Behandlung mit ATRA stattdessen zu einer Induktion des Chemokinrezeptors. Die mRNA-Expression von CD184 blieb bei den Zelllinien A673 und NALM6 hingegen konstant.

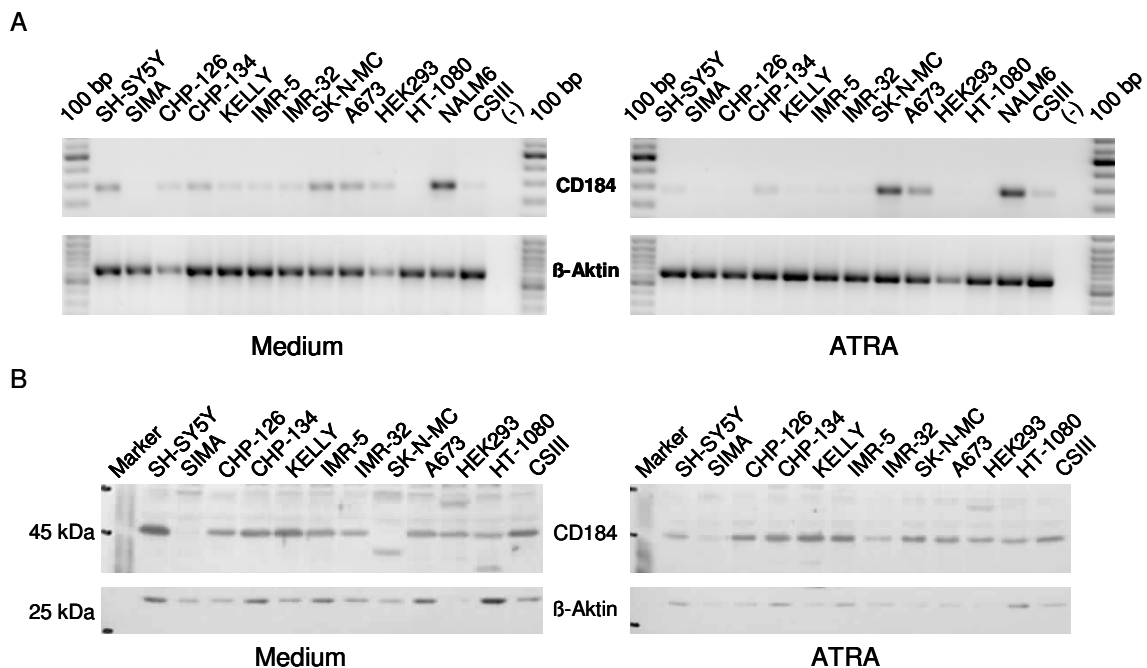


Abbildung 4-23: RT-PCR und Western Blot zur Bestimmung der CD184 mRNA- und Proteinexpression in Neuroblastomzellen. Die Zelllinien wurden in An- und Abwesenheit von ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) für 96 h (37°C , 5% CO_2) kultiviert und für die Isolation der Gesamt-RNA in TRIzol oder des Gesamt-Proteins in RIPA-Puffer lysiert. (A) RT-PCR zur Ermittlung der CD184 und GAPDH mRNA-Expression. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen und im UV-Transilluminator visualisiert. (B) Für die Western Blot-Analyse wurden aus dem RIPA-Puffer 50 μg Gesamtprotein in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Über einen primären humanen Anti-CD184 Antikörper (polyklonal, Kaninchen, 1:500) und einen HRP-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen Antikörper (Ziege, 1:5000) erfolgte die Detektion des 45 kDa großen CD184. Die Analyse des β -Aktin Signals erfolgte durch Zugabe eines primären humanen Anti- β -Aktin Antikörpers (1:250, Maus, monoklonal) und eines sekundären HRP-gekoppelten Anti-Maus Antikörpers (Ziege, 1:2500).

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse wurde darüber hinaus die Proteinexpression von CD184 untersucht (Abbildung 4-23, B). Auch hier konnte mit Ausnahme der SIMA-Zellen in allen anderen analysierten Neuroblastomzellen eine konstitutive Proteinexpression des Rezeptors

nachgewiesen werden. Wie in der RT-PCR war das Expressionssignal von CD184 in SH-SY5Y-Zellen am stärksten ausgeprägt. Bis auf SK-N-MC-Zellen konnte in allen anderen Tumorzelllinien ein 45 kDa großes Proteinsignal detektiert werden. Durch Behandlung mit Retinsäure kam es besonders in SH-SY5Y-Zellen zu einer drastischen Herunterregulierung der Proteinexpression von CD184. Mittels des humanen Anti-CD184 Antikörpers konnte in allen anderen Neuroblastom- und Tumorzelllinien keine nennenswerte Veränderung beobachtet werden. Nur in SK-N-MC-Zellen wurde wie schon in der RT-PCR eine Induktion des 45 kDa großen CD184 identifiziert. Das im unteren Teil der Abbildung dargestellte 25 kDa große Haushaltsgen β -Aktin variierte aufgrund möglicher Abweichungen beim Auftragen des Gesamtproteins auf das SDS-Polyacrylamidgel oder beim Transfer (*blotten*) der Proteine auf die Nitrozellulosemembran. Aufgrund der unspezifischen Bindung des Antikörpers kam es in der Western Blot-Analyse neben dem 45 kDa großen CD184 auch zur Detektion weiterer unterschiedlich großer Proteinbanden unbekannter Herkunft. Daraufhin wurde die Proteinexpression von CD184 auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen in An- und Abwesenheit von ATRA zusätzlich im Durchflusszytometer untersucht.

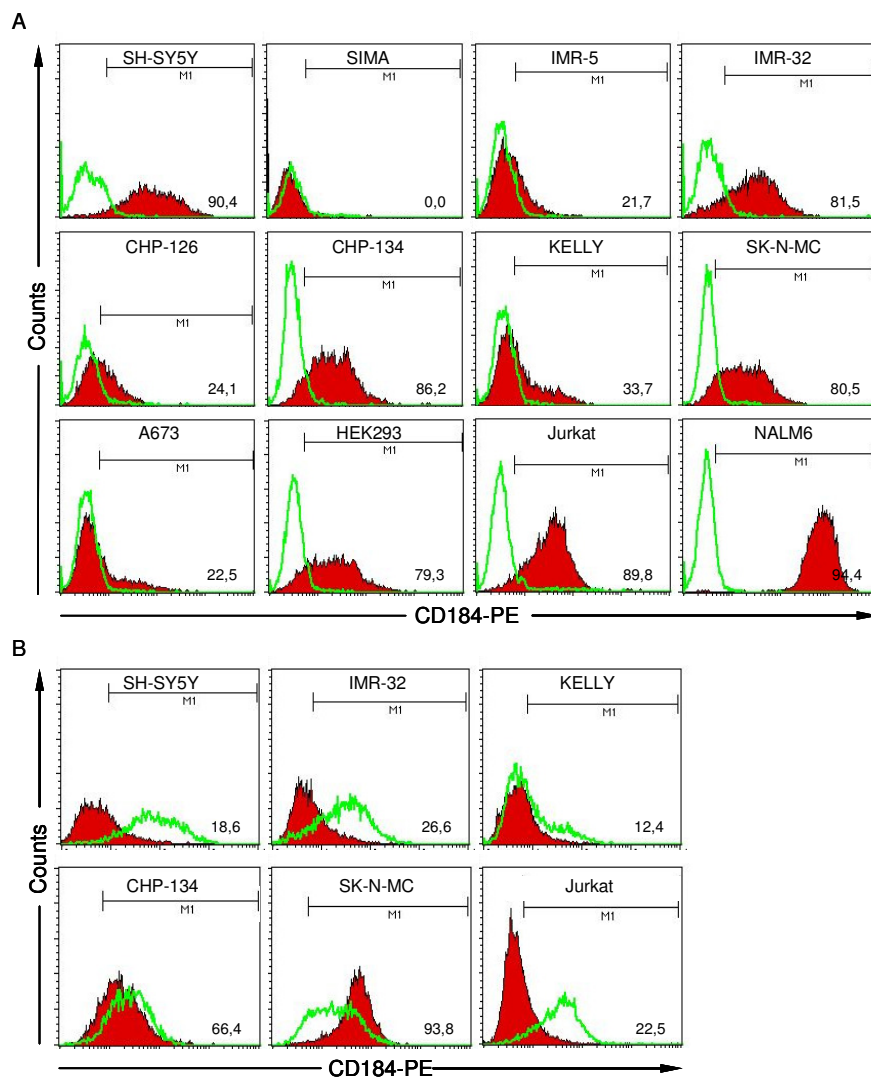


Abbildung 4-24: Differentielle Proteinexpression von CD184 auf der Oberfläche von Tumoren neuroektodermalen Ursprungs. Die für 96 h mit Medium bzw. ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) kultivierten Tumorzellen wurden mit einem PE-markierten Anti-CD184 Antikörper (Maus, monoklonal) oder einer Isotypen-Kontrolle (Maus IgG₁-PE) gefärbt. Im Anschluß wurde von 10.000 Zellen die Fluoreszenz (FI-2) durchflusszytometrisch analysiert. (A) Konstitutive Expression von CD184 auf Medium-behandelten Zellen nach Auswertung und Überlagerung der Fluoreszenzen aus Isotyp-Kontrolle (grün) und CD184-PE (rot). (B) FACS-Analyse und Überlagerung der Fluoreszenzen (CD184-PE) von Medium- (grün) und ATRA- (rot) behandelten Zellen.

Mittels eines PE-gekoppelten Antikörpers wurden die Neuroblastomzellen für das Antigen CD184 markiert und in der Fluoreszenz-2 eines Durchflusszytometers gemessen. In Abbildung 4-24 (A) ist die basale Expression von CD184 auf den untersuchten Zelllinien präsentiert. Bereits wie in der RT-PCR (Abbildung 4-23, A) konnte auch im FACS insbesondere bei den Neuroblastomzellen SH-SY5Y (90,4%), IMR-32 (81,5%) und CHP-134 (86,2%) die stärkste CD184 Expression nachgewiesen werden. Die schwächere CD184 Proteinexpression mit einem Anteil der Zellen von 21,7% (IMR-5), 24,1% (CHP-126) und 33,7% (KELLY) ähnelte der CD184 mRNA-Expression aus der RT-PCR. Die FACS-Analyse bestätigte ebenfalls die ausbleibende CD184 Expression in SIMA-Zellen. Die beiden Ewing-Tumor-Zelllinien SK-N-MC (80,5%) und A673 (22,5%) exprimierten den Chemokinrezeptor unterschiedlich stark. Auch die Nicht-Tumorzelllinie HEK293 (79,3%) und Leukämiezellen Jurkat (89,8%) exprimierten basal CD184. Mit einem Anteil von 94,4% und der höchsten mittleren Fluoreszenzintensität repräsentierten NALM6-Zellen wie in der RT-PCR die stärkste Expression des Chemokinrezeptors unter allen untersuchten Zelllinien. Darüber hinaus konnte im FACS in allen konstitutiv CD184-positiven Neuroblastomzellen durch die Behandlung mit ATRA eine starke Herunterregulierung des Expressionssignals detektiert werden. So reduzierte sich beispielsweise der Anteil der Medium-kultivierten SH-SY5Y-Zellen von 90,4% auf 18,6% nach Stimulation mit Retinsäure drastisch (Abbildung 4-24, B). Auch die Neuroblastom-Zelllinien IMR-32 und KELLY reagierten nach einer Behandlung mit ATRA mit einer deutlich erniedrigten Expression von 81,5% auf 26,6% bzw. 33,7% auf 12,4%. Bei CHP-134-Zellen wurde durch ATRA nur eine geringfügige Reduktion der Expression von 86,2% (Medium) auf 66,4% (ATRA) gemessen. Mit einem Anstieg von 80,5% auf 93,8% erhöhte sich ausschließlich bei den Ewing-Tumorzellen SK-N-MC die Expression von CD184 auf der Zelloberfläche nach Stimulation mit ATRA. Ähnlich wie bei den Neuroblastomzellen reduzierte sich auch bei Jurkat-Zellen drastisch der Anteil CD184-positiver Zellen von 89,8% auf 22,5% nach Behandlung mit Retinsäure. Bezüglich der CD184 Expression ließ sich sowohl in der RT-PCR als auch FACS-Analyse eine vergleichbare Regulation in Neuroblastomzellen durch ATRA nachweisen.

4.4.7.2 Migrationseigenschaften von Retinoid-differenzierten Neuroblastomzellen

Sowohl dem Neuroblastom als auch anderen Tumorarten wird über eine Expression des Chemokinrezeptors CD184 ein erhöhtes Potenzial für die Migration und Invasivität durch chemotaktische Wechselwirkung mit dem Liganden SDF-1 zugeschrieben. Bei konstitutiv CD184 exprimierenden Neuroblastomzellen konnte durch eine Behandlung mit *all-trans* Retinsäure eine Reduktion der Chemokinrezeptor-Expression induziert werden. Darauf aufbauend wurde in einem Migrations-Test untersucht, ob durch die Herunterregulierung des Chemokinrezeptors die Invasivität von Neuroblastomzellen in Anwesenheit von SDF-1 aufgehoben wird. Hierfür wurden die unterschiedlich kultivierten Neuroblastom-Zelllinien in spezielle 6-Loch-Einsätze hinzugegeben, bei der das innere und äußere Kompartiment über ein semipermeables Matrigel mit extrazellulären Matrix-Bestandteilen getrennt wurde. Im Fall einer CD184-vermittelten Invasivität werden die hoch malignen Zellen aus dem inneren in das äußere Kompartiment durch die 8 µm großen Poren des Matrigels in Richtung des chemotaktischen und rekombinanten SDF-1-Gradienten migrieren. Anhand der chemotaktischen Wechselwirkung von CD184 mit SDF-1 wurden durch Auszählung der unterschiedlich invasiven Neuroblastomzellen die Retinoid-abhängigen Migrationseigenschaften untersucht (Abbildung 4-25). Durch chemotaktische Wechselwirkung von CD184 auf der Oberfläche von Medium-kultivierten SH-SY5Y-Zellen mit dem rekombinanten SDF-1 migrierten mit 241 Tumorzellen deutlich mehr Zellen durch das Matrigel hindurch als ohne (62 Tumorzellen). Mit einer Zellzahl von 62 migrierten SH-SY5Y-Zellen bereits ohne SDF-1 konstitutiv durch das Matrigel. In Anwesenheit des Chemokins SDF-1 ließ sich die basale Migration der CD184 exprimierenden SH-SY5Y-Zellen um etwa 75% weiter

steigern. Nach Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit ATRA und des damit verbundenen Verlustes von CD184 wurde durch SDF-1 keine zusätzliche Invasivität vermittelt. Während durch SDF-1 bis zu 12 invasive und ATRA-kultivierte Neuroblastomzellen gezählt wurden, waren es in Abwesenheit des Chemokins nur noch 9 Tumorzellen. Auffällig war zudem die um 81% drastisch reduzierte basale Migration von ATRA-kultivierten SH-SY5Y-Zellen in Abwesenheit von SDF-1 gegenüber den Kontrollzellen mit Medium. Im Vergleich zu SH-SY5Y-Zellen war die SDF-1-vermittelte Invasivität der Neuroblastom-Zelllinie KELLY kleiner. Durch Anwesenheit von SDF-1 wurde bei KELLY eine Migration von 57 gegenüber 43 Zellen ohne SDF-1 gemessen. Dies entsprach einer SDF-1-induzierten Migrationssteigerung von etwa 33%. Auch KELLY-Zellen waren ähnlich wie die Neuroblastomzellen SH-SY5Y fähig in Abwesenheit des Chemokins durch das Matrigel hindurch zu wandern. Auch in ATRA-behandelten KELLY-Zellen kam es durch die Herunterregulierung von CD184 zu einem vollständigen Verlust der SDF-1-induzierten Migration gegenüber der Kontrolle (ohne SDF-1). Im Vergleich zu den mit Medium kultivierten Neuroblastomzellen sank stattdessen die Migration von ATRA-stimulierten KELLY-Zellen in Anwesenheit von SDF-1 auf 18 gegenüber 25 ohne SDF-1 ab.

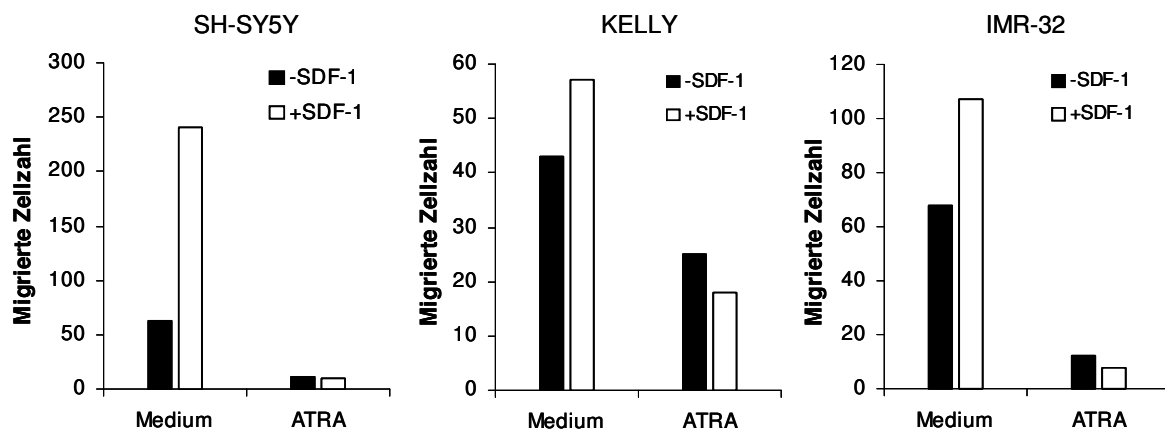


Abbildung 4-25: Invasivitäts- und Migrationseigenschaften von ATRA-behandelten Neuroblastomzellen durch chemotaktische Wechselwirkung von CD184 mit SDF-1. Die mit ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) oder Medium kultivierten Neuroblastomzellen ($2,5 \times 10^5$) wurden in das innere Kompartiment einer Invasionskammer (BD BioCoat Matrigel) hinzugegeben. Getrennt durch die extrazelluläre Matrix (Matrigel) wurde in das äußere Kompartiment das rekombinante humane SDF-1 (200 ng/ml) hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 48 h (37°C , 5% CO_2) wurden die an der Unterseite des Matrigels (äußeres Kompartiment) migrierten Zellen aus mehreren Gesichtsfeldern gezählt.

Folglich nahm unter dem Einfluss von SDF-1 die Invasivität von ATRA-stimulierten KELLY-Zellen um 28% ab. Darüber hinaus war auch die um 42% erniedrigte konsitutive Migration (ohne SDF-1) von ATRA-behandelten KELLY-Zellen gegenüber einer Inkubation mit Medium auffällig. Zuletzt konnte auch in der mit Medium kultivierten Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 durch den Chemokingradienten eine um 57% gesteigerte Migration von 68 Zellen in Ab- und 107 Zellen in Anwesenheit von SDF-1 gemessen werden. Ähnlich wie die Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y und KELLY zeichneten sich mit einer Zellzahl von 68 auch IMR-32-Zellen in Abwesenheit von SDF-1 durch eine basale Migration aus. Bei *all-trans* Retinsäure-kultivierten und CD184 herunterregulierten IMR-32-Zellen wurde in Anwesenheit von SDF-1 hingegen keine Migration induziert. Während in Anwesenheit des chemotaktischen Liganden bis zu 8 Neuroblastomzellen gezählt wurden, waren es in Abwesenheit von SDF-1 bis zu 12 IMR-32-Zellen. Die SDF-1-unterstützte Migration reduzierte sich somit in ATRA-behandelten Neuroblastomzellen um 33%. Wie schon bei den Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y und KELLY beobachtet werden konnte, reduzierten sich auch bei den mit ATRA stimulierten IMR-32-Zellen die konstitutiven Invasivitätseigenschaften (ohne SDF-1) um bis zu 82% gegenüber der Medium-Kontrolle. In allen

drei Zelllinien kam es bei einem Vergleich mit humanem Serumalbumin (HSA) als Kontrollprotein zu keiner induzierten Migration von Neuroblastomzellen (ohne Darstellung).

4.4.7.3 Verteilung des Rezeptors CD184 und Liganden SDF-1 in humanen Geweben

Die mit *all-trans* Retinsäure kultivierten Neuroblastomzellen konnten durch die differentielle Expression des Chemokinrezeptors CD184 in den Migrationseigenschaften beeinflusst werden. Existiert durch Sezernierung von SDF-1, dem funktionellen Liganden des Rezeptors CD184, ein chemotaktischer Gradient im Organismus, so können Tumore in die verschiedensten Gewebe in Richtung der SDF-1 sezernierenden Zielzelle infiltrieren. Durch eine Vielzahl an verschiedenen Gewebeproben wurde die Verteilung der Expression von CD184 und möglichen SDF-1 sezernierenden Zielgeweben untersucht. In Abbildung 4-26 ist die mRNA-Expression von CD184 und SDF-1 in verschiedenen humanen Geweben abgebildet. Besonders stark wurde der Rezeptor in der Niere (Bahn 2), fetalen Milz (3), Nebenniere (7), Lunge (9), fetalem Gehirn (11), Trachea (19), Rückenmark (22), Knochenmark (23) und dem Thymus (26) exprimiert. Mit Ausnahme von Niere (Bahn 8), Testis (10), Gesamtgehirn (12), Leber (15), Herz (17), Kleinhirn (18), Speicheldrüse (24) und Skelettmuskel (25) wurde in allen restlichen Geweben eine schwache Expression des Chemokinrezeptors nachgewiesen. In allen humanen Geweben konnte von einer schwachen bis starken Expression stets SDF-1 detektiert werden. Die schwächste SDF-1 mRNA-Expression wurde in den Geweben der Nebenniere (7), Niere (8), Gesamtgehirn (12), Plazenta (13) und dem Kleinhirn (18) analysiert. Die in der RT-PCR am stärksten SDF-1 exprimierenden Gewebe stellten die fetale Milz (3), Harnblase (4), Darm (5), Ovar (6), Lunge (9), Thyreoidea (14), Leber (15), Uterus (16), Herz (17), Trachea (19), fetale Leber (20), Prostata (21), Knochenmark (23), Skelettmuskel (25) und Thymus (26) dar. Im unteren Teil der Abbildung befindet sich die mRNA-Expression des Haushaltgens GAPDH. Die etwa gleich starken 194 bp großen Banden des Haushaltgens GAPDH dokumentierten die konstant in die RT-PCR eingesetzte cDNA Menge aus den verschiedenen Geweben.

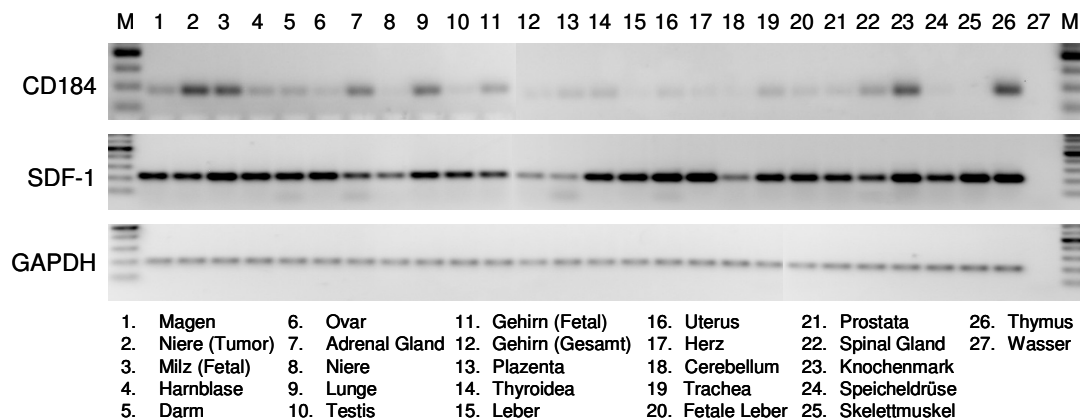


Abbildung 4-26: Expressionsprofil des Chemokinrezeptors CD184 und Liganden SDF-1 in verschiedenen humanen Geweben. Mittels einer Reversen Transkriptase wurden 1 µg Gesamt-RNA in eine komplementäre cDNA umgeschrieben und 2 µl in die RT-PCR eingesetzt. 10 µl PCR-Probe wurde auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und im UV-Transilluminator visualisiert.

4.4.8 Expression und therapeutische Relevanz von CD117 bei Neuroblastomzellen

Nach Behandlung der SH-SY5Y-Zellen wurde sowohl mit dem synthetischen Retinamid 4-HPR als auch mit der natürlichen *all-trans* Retinsäure mittels des Affymetrix Genchips HG-U133A eine Induktion der CD117 mRNA-Expression identifiziert. *In-vitro* wurde mit Hilfe weiterer MYCN-positiver und -negativer Neuroblastom-Zelllinien die differentielle CD117 Expression nach

Behandlung mit einem Retinoid näher analysiert und auf einen möglichen nutzbaren therapeutischen Einsatz durch einen Kinase-Inhibitor wie STI-571 untersucht.

4.4.8.1 Untersuchung zur regulierten Expression von CD117 und SCF in Neuroblastomzellen nach Retinoid-Behandlung

All-trans Retinsäure regulierte laut Genchip mit einem Fold Change von 3,46 und einer Differenz von 524 die CD117 mRNA-Expression gegenüber den Medium-stimulierten Kontrollzellen herauf. Anhand sechs weiterer Neuroblastom- und zwei Ewing-Tumor-Zelllinien wurde die mRNA-Expression des Tyrosinkinase-Rezeptors CD117 und Liganden SCF in An- und Abwesenheit von *all-trans* Retinsäure näher untersucht (Abbildung 4-27, A-C).

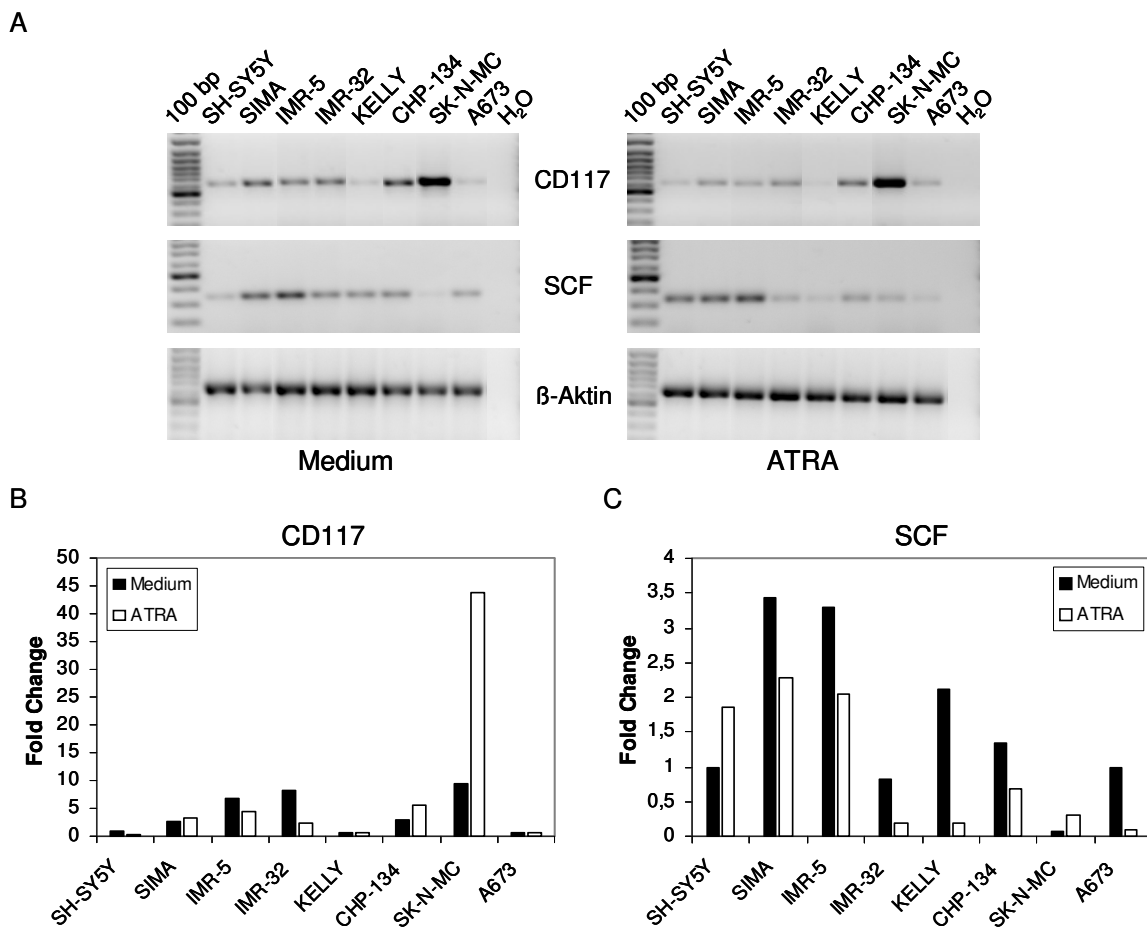


Abbildung 4-27: RT-PCR zur Bestimmung der CD117 und SCF mRNA-Expression in Zelllinien von Neuroblastomen und Ewing-Tumoren. Die Tumor-Zelllinien von Neuroblastomen und Ewing-Tumoren wurden mit ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) nach dem Standardprotokoll für 96 h (37°C , 5% CO_2) inkubiert. (A) RT-PCR der CD117, SCF und β -Aktin mRNA-Expression mit Einsatz von 2 μl cDNA aus dem RT-Reaktionsansatz (2 μg RNA). Quantitative *real-time* RT-PCR der CD117 (B) und SCF (C) mRNA-Expression durch fluorimetrische Bestimmung der ΔCT -Werte und der Berechnung des Fold Change. Der berechnete Fold Change wurde stets auf Medium-behandelte SH-SY5Y-Zellen bezogen.

Laut der RT-PCR wurde CD117 in allen Neuroblastom-Zelllinien bereits konstitutiv exprimiert (Abbildung 4-27, A). Am stärksten wurde der Rezeptor in SIMA und CHP-134, zwei MYCN-positiven Neuroblastomzellen, transkribiert. In den Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y und KELLY war die Expression vergleichsweise niedrig. Bei den beiden Ewing-Tumorzellen war die CD117 mRNA-Expression in SK-N-MC deutlich gegenüber A673 gesteigert. Durch Behandlung der Neuroblastomzellen für 96 h (37°C , 5% CO_2) mit ATRA konnte laut der RT-PCR Analyse im Vergleich zum Genchip keine Induktion der CD117 mRNA-Expression weder in der

Modellzelllinie SH-SY5Y noch in den anderen Neuroblastom-Zelllinien beobachtet werden. Mit Ausnahme der Ewing-Tumorzellen SK-N-MC reduzierte sich bei allen Neuroblastomzellen stattdessen das Expressionssignal nach Behandlung mit dem natürlichen Retinoid. SK-N-MC-Zellen ausgeschlossen, wurde in allen Neuroblastom- und Ewing-Tumorzelllinien der für CD117 spezifische Ligand SCF basal exprimiert vorgefunden. Die SCF mRNA-Expression war am schwächsten in SH-SY5Y-Zellen und am stärksten in den Neuroblastom-Zelllinien SIMA und IMR-5 ausgeprägt. Nach Kultivierung der Tumorzelllinien mit ATRA konnte ausschließlich in SH-SY5Y-Zellen und den Ewing-Tumorzellen SK-N-MC eine Induktion der SCF mRNA-Expression beobachtet werden. Die Expressionsstärke des Haushaltgens β -Aktin war aufgrund der konstant eingesetzten cDNA-Konzentration aller Proben vergleichbar. In der *real-time* RT-PCR wurde zusätzlich die differentielle CD117 und SCF mRNA-Expression in Medium- und Retinoid-behandelten Tumorzellen verglichen (Abbildung 4-27, B und C). Im Vergleich zu den mit Medium kultivierten SH-SY5Y-Zellen (1) war die CD117 mRNA-Expression bei den Neuroblastom-Zelllinien SIMA (2,8), IMR-5 (6,7), IMR-32 (8,3), KELLY (0,6) und CHP-134 (2,9) sowie den Ewing-Tumorzellen SK-N-MC (9,4) und A673 (0,6) konstitutiv sowohl stärker als auch geringer ausgeprägt. Wie in der RT-PCR war auch in der *real-time* RT-PCR die konstitutive CD117 mRNA-Expression in SK-N-MC-Zellen am stärksten. Nach Behandlung mit ATRA konnte ausschließlich in den Neuroblastom-Zelllinien SIMA (3,4) und CHP-134 (5,5) und den Ewing-Tumorzellen SK-N-MC (43) eine mehrfache Induktion der CD117 mRNA-Expression im Vergleich zu Medium-kultivierten SH-SY5Y-Zellen identifiziert werden. Entgegen der im DNA-Microarray beobachteten Überexpression von CD117 in SH-SY5Y-Zellen konnte mittels der *real-time* RT-PCR und der Berechnung des Fold Change auch in der Modellzelllinie SH-SY5Y (0,18) und den anderen Neuroblastom-Zelllinien IMR-5 (4,4) und IMR-32 (2,5) eine deutliche Herunterregulierung von CD117 nach Kultivierung mit Retinsäure analysiert werden. Die Tumorzelllinien KELLY und A673 blieben auch nach der Behandlung mit ATRA in der Expression des Tyrosinkinase-Rezeptors relativ konstant. Gegenüber SH-SY5Y-Zellen war die konstitutive SCF mRNA-Expression in den Tumorzelllinien wie SIMA (3,4), IMR-5 (3,3), IMR-32 (0,8), KELLY (2,1), CHP-134 (1,3), SK-N-MC (0,08) und A673 (0,99) unterschiedlich stark ausgebildet. Wie in der RT-PCR konnte auch in der *real-time* RT-PCR ausschließlich bei SH-SY5Y-Zellen (1,8) und den Ewing-Tumorzellen SK-N-MC (0,3) eine Induktion der SCF mRNA-Expression nach Stimulation mit ATRA beobachtet werden. In allen anderen Zelllinien reduzierte sich die SCF mRNA-Expression um einen Fold Change von 2,3 (SIMA), 2,1 (IMR-5), 0,18 (IMR-32), 0,18 (KELLY), 0,69 (CHP-134) und 0,1 (A673) nach Anwesenheit von ATRA im Kulturmedium. Neben der mRNA-Expression wurde ebenfalls die Proteinexpression von CD117 auf der Oberfläche von Retinoid-kultivierten Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 4-28, A und B). Aus der Abbildung 4-28 (A) geht hervor, dass SH-SY5Y-Zellen mit einem geringen Anteil von 8,8% wie in der RT-PCR und quantitativen *real-time* RT-PCR kein CD117 konstitutiv exprimierten. Die restlichen Neuroblastomzellen wie SIMA (21,5%), IMR-5 (94,2%), IMR-32 (83,4%), KELLY (50,2%) und CHP-134 (82,9%) exprimierten zumindest basal unterschiedlich stark den Rezeptor. Mit einem Anteil von 94,1% der Zellen und der größten mittleren Fluoreszenz-Intensität exprimierte die Ewing-Tumor-Zelllinie SK-N-MC CD117 am stärksten. Durch die Durchflusszytometrie konnte CD117 neben dem Transkript auch als Oberflächenprotein von diversen Tumorzellen verifiziert werden. Anhand einer durchflusszytometrischen Analyse konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass nach 96 stündiger Kultivierung mit *all-trans* Retinsäure keine Induktion der CD117 Proteinexpression auf Neuroblastomzellen erfolgte (Abbildung 4-28, B). Der Anteil CD117-positiver SH-SY5Y-Zellen blieb mit 8,8% bei einer Behandlung mit ATRA ähnlich wie mit 5,4% bei Medium vergleichbar klein. Bei den restlichen konstitutiv positiven Neuroblastomzellen wurde im FACS wie in der RT-PCR und *real-time* RT-PCR erneut eine Reduktion des Anteils CD117-positiver Zellen von SIMA

(0,5%), IMR-5 (83,6%), IMR-32 (71,5%), KELLY (13,6%) und CHP-134 (19,6%) beobachtet. Unter diesen standardisierten Bedingungen konnte weder in der Modellzelllinie SH-SY5Y noch in den anderen Neuroblastomzellen eine CD117 mRNA- oder Proteinexpression induziert werden, wie sie ursprünglich im Genchip HG-U133A identifiziert wurde.

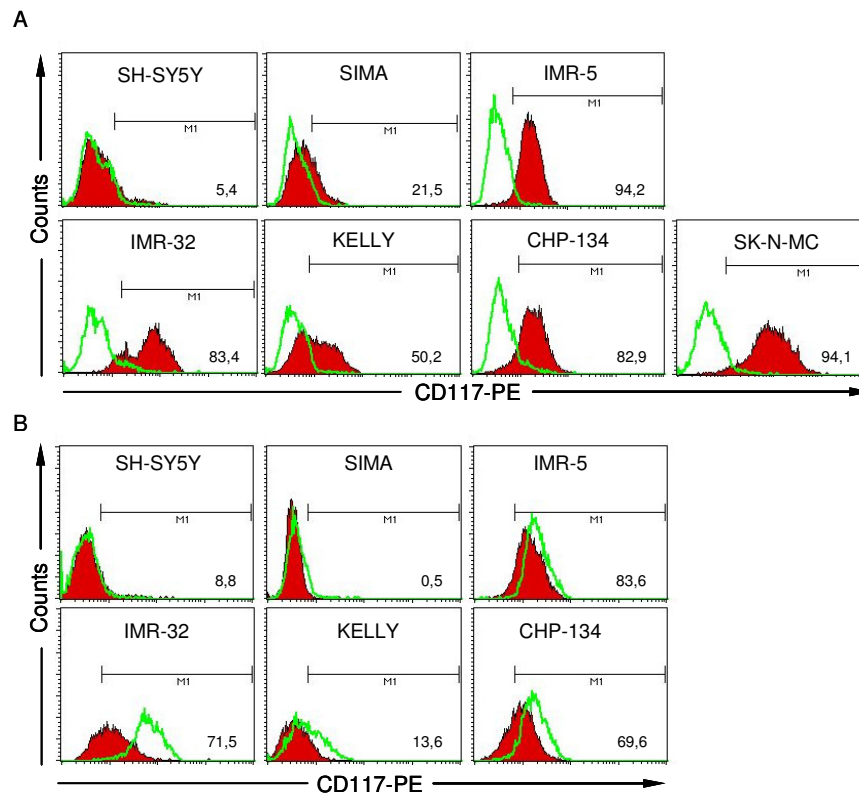


Abbildung 4-28: Durchflusszytometrische Analyse der Proteinexpression von CD117 auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen. Die für 96 h (37°C, 5% CO₂) mit Medium oder ATRA (6,25 x 10⁻⁵ M) kultivierten Zelllinien wurden anschließend mit einer Isotypen-Kontrolle (Maus IgG₁-PE) oder einem PE-gekoppelten Anti-CD184 Antikörper (Maus, monoklonal) markiert. Im Durchflusszytometer wurde anschließend von 10.000 Zellen die Fluoreszenz-2 gemessen. (A) Konstitutive CD117 Proteinexpression Medium-behandelter Zellen nach Auswertung und Überlagerung der Fluoreszenzen aus CD117-PE (rot) und IgG₁ Isotyp-Kontrolle (grün). (B) FACS-Analyse und Überlagerung der CD117-PE-vermittelten Fluoreszenz (FI-2) von Medium- (grün) und ATRA- (rot) behandelten Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie.

4.4.8.2 CD117 Expression in Neuroblastomzellen nach Dauerbehandlung mit Retinoiden

Nachdem eine 96 stündige Kultivierung von Neuroblastomzellen keine stetige Induktion von CD117 bewirkte, wurde anhand der Modellzelllinie SH-SY5Y eine zeitliche Änderung der Kultivierungsbedingungen vorgenommen. Wesentlicher Bestandteil der Änderung war die jeweilige dauerhafte Anwesenheit von ATRA oder 4-HPR im Kulturmedium. Durch die stetige Applikation von Retinoiden zu den Neuroblastomzellen, wie sie vergleichsweise auch in der Phase der Erhaltungstherapie von Neuroblastom-Patienten stattfindet, kam es nach einer Inkubationsdauer von mindestens 14 Tagen zu einer Induktion der CD117 mRNA- und Proteinexpression (Abbildung 4-29). In Abbildung 4-29 (A) ist die mRNA-Expression von CD117 und SCF zusammenfassend dargestellt. Durch die RT-PCR konnte eine deutliche Überexpression von CD117 und SCF in SH-SY5Y-Zellen nach der Dauerbehandlung mit den Retinoiden ATRA und 4-HPR gegenüber den Kontrollen beobachtet werden. Darüber hinaus konnte durch die fluorimetrische Analyse innerhalb der *real-time* RT-PCR (Abbildung 4-29, B) eine 45-fache Überexpression von CD117 durch ATRA im Vergleich zu Medium-behandelten SH-SY5Y-Zellen detektiert werden. Mit einem Fold Change von 4,1 war die Heraufregulierung von CD117 durch 4-HPR verhältnismäßig klein. Simultan zur Induktion von CD117 wurde auch die

mRNA-Expression von SCF in dauerhaft Retinoid-kultivierten SH-SY5Y-Zellen durch ATRA 16-fach und 4-HPR 21-fach heraufreguliert.

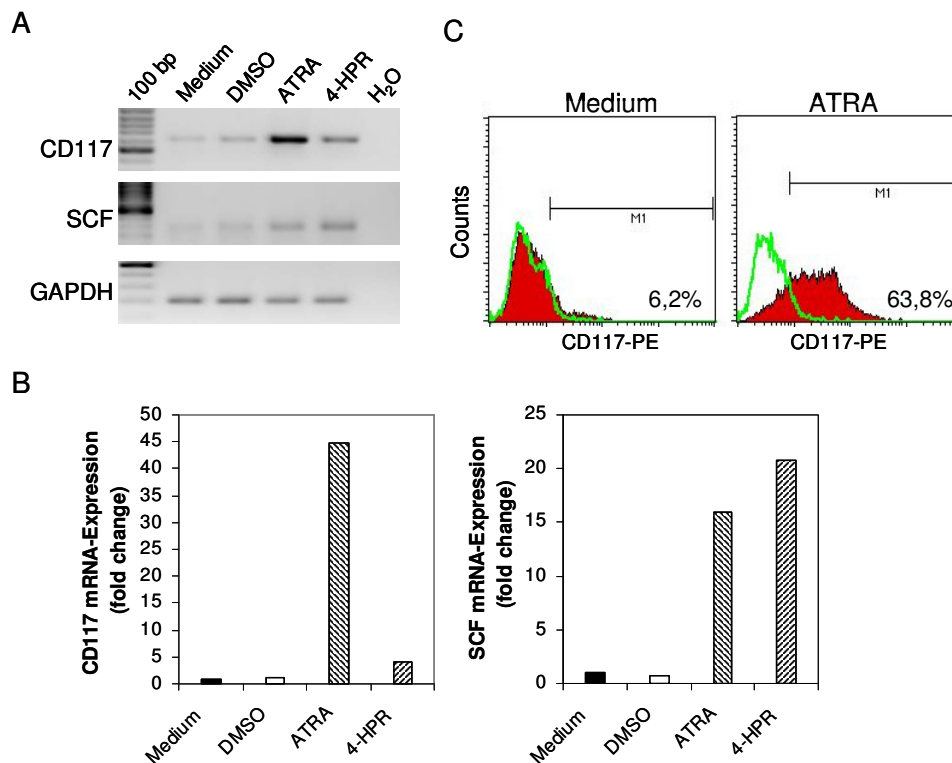


Abbildung 4-29: CD117 und SCF mRNA-Expression in SH-SY5Y-Zellen nach dauerhafter Applikation von ATRA oder 4-HPR. SH-SY5Y-Zellen wurden mindestens für 14 Tage mit ATRA ($6,25 \times 10^{-5}$ M) oder 4-HPR ($3,9 \times 10^{-6}$ M) kultiviert. (A) RT-PCR und (B) quantitative *real-time* RT-PCR der CD117, SCF und GAPDH mRNA-Expression in kontinuierlich mit Medium, DMSO, ATRA und 4-HPR kultivierten SH-SY5Y-Zellen. (C) FACS-Analyse von kontinuierlich mit Medium oder ATRA behandelten SH-SY5Y-Zellen nach Färbung mit einem PE-markierten Anti-CD117 Antikörper.

Durch Zugabe von DMSO wurde weder die mRNA-Expression von CD117 noch von SCF beeinflusst. Neben dem Transkript konnte im Durchflusszytometer auch eine Induktion des Proteins CD117 auf der Oberfläche von dauerhaft ATRA- und 4-HPR- (4-HPR nicht dargestellt) kultivierten SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4-29, C). Durch kontinuierliche Behandlung mit ATRA waren etwa 64% der Zellen im Vergleich zu 6% der mit Medium kultivierten Zellen für CD117 positiv. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer mit der Differenzierung-induzierenden *all-trans* Retinsäure war anhand der Modellzelllinie SH-SY5Y sowohl mit einer erhöhten Expression des CD117 Transkriptes als auch Proteins assoziiert.

4.4.8.3 Antiproliferative Wirkung und Induktion von Apoptose in ATRA-kultivierten und CD117 überexprimierenden Neuroblastomzellen durch STI-571

In der Anti-Tumortherapie stellt insbesondere CD117 eine bedeutende Zielstruktur dar. Ein potenter und spezifischer Inhibitor von Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptoren stellt der ATP-analoge Antagonist STI-571 dar. Der Tyrosinkinase-Inhibitor STI-571, der auch unter dem Namen Glivec oder Imatinibmesylat bekannt ist, findet vor allem in der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) und dem Gastrointestinalen Stromatumor Anwendung. In Abbildung 4-30 ist die vereinfachte Struktur des Rezeptor Tyrosinkinase-Inhibitors STI-571 abgebildet. Wie zuvor beschrieben, kam es durch Dauerbehandlung von Neuroblastomzellen mit den Retinoiden ATRA und 4-HPR zur Überexpression von CD117 und SCF. Aus diesen Erkenntnissen wurde in Kombination von STI-571 und *all-trans* Retinsäure die gemeinsame antiproliferative Wirkung auf diverse Neuroblastom-Zelllinien analysiert.

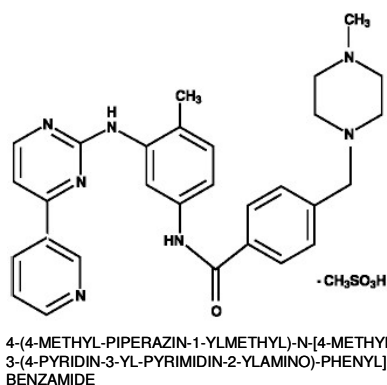


Abbildung 4-30: Struktur des Tyrosinkinase-Inhibitors STI-571.

Zunächst wurden die konstitutiv CD117-negativen SH-SY5Y-Zellen auf eine gesteigerte Sensibilisierung gegenüber STI-571 durch zuvorige Dauerbehandlung mit ATRA und anschließender Überexpression von CD117 untersucht. In Abbildung 4-31 (A) ist die Wirkung des Inhibitors STI-571 gegenüber SH-SY5Y-Zellen dargestellt. Bei den mit Medium behandelten CD117-negativen Tumorzellen konnten mit Ausnahme vereinzelt auftretender toter Zellen im Kulturüberstand mehrheitlich vitale, adhären wachsende Zellen in An- und Abwesenheit von STI-571 beobachtet werden. Dem gegenüber kam es durch die Überexpression von CD117 in den kontinuierlich mit ATRA kultivierten SH-SY5Y-Zellen und der Cokultivierung mit STI-571 zur Hemmung des Wachstums und Induktion von Apoptose, die sich durch ausschließliche Anwesenheit nicht adhärenter, granulierter Zellen im Überstand des Kulturmediums äußerte. Als Folge der Apoptose kommt es zur Umstrukturierung der Zellmembran inklusive einer Umlagerung des ursprünglich zytoplasmatisch lokalisierten Phosphatidylserins (PS) auf die extrazelluläre Membranseite. Mit Hilfe des FITC-gekoppelten Annexin-V, einem stark PS-bindenden Protein, lassen sich zusammen mit dem frei zugänglichen DNA-Interkalator 7-AAD (7-Amino-Actinomycin) apoptotische Zellen im Durchflusszytometer darstellen. In einem sogenannten Dot Plot wurde auf der Abzisse das Fluoreszenzsignal von Annexin-V-FITC (FI-1) gegen das von 7-AAD (FI-3) auf der Ordinate dargestellt. Doppelt positiv gefärbte apoptotische Zellen befanden sich im oberen rechten Quadranten. Bedingt durch die Methode konnte im FACS bei Stimulation mit Medium ein Anteil von 63% vitaler Zellen gegenüber 24% nach einer Cokultivierung mit STI-571 gemessen werden (Abbildung 4-31, B). Diese vorrangig vitale Zellpopulation befand sich aufgrund des doppelt negativen Fluoreszenzsignals im unteren linken Quadranten. Im Vergleich dazu, wurde bei einer Cokultivierung von kontinuierlich ATRA-behandelten und CD117 überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen mit STI-571 ein fast vollständiger Verlust vitaler Zellen (5,8%) gemessen. Der vitale Anteil permanent ATRA-behandelter Tumorzellen betrug ohne Anwesenheit von STI-571 84,8%. Eine kontinuierliche Behandlung von Neuroblastomzellen mit ATRA war durch die Heraufregulierung von CD117 auch mit einer erhöhten Sensibilisierung gegenüber STI-571 assoziiert. In einer Dosis-Wirkung-Analyse wurde darüber hinaus die Sensitivität und Viabilität unterschiedlicher CD117-positiver und -negativer Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen gegenüber STI-571 in einem MTT-Proliferationstest untersucht. (Abbildung 4-31, C) Durch Titration von STI-571 und der Ermittlung der relativen Viabilität konnte die Inhibitor-Konzentration bestimmt werden, bei der die Zellviabilität um mindestens 50% inhibiert wurde (ED50-Wert). Bei einer Konzentration von 2,5 bis 6,25 x 10⁻¹ mM STI-571 wurde bei keiner Tumorzelllinie eine Viabilität nachgewiesen. Anhand der ED50-Werte zeigte sich die geringste Sensitivität gegenüber STI-571 vorrangig bei den CD117-negativen Zelllinien SH-SY5Y (64,2 µM), SIMA (79,8 µM) und KELLY (63,2 µM). Bei den stärker CD117 exprimierenden Neuroblastom-Zelllinien IMR-5, IMR-32 und CHP-134 stieg die Proliferation aufgrund der höheren Sensitivität gegenüber dem Tyrosinkinase-Inhibitor erst nach

weiterer Verdünnung von STI-571 an. Mit einem ED50-Wert von 19,8 μM (IMR-5), 16,1 μM (IMR-32) und 18,01 μM (CHP-134) erwiesen sich diese Neuroblastomzellen als besonders empfindlich gegenüber STI-571. Den höchsten inhibitorischen Wachstumseffekt konnte man bei dem Ewing-Tumorzellen SK-N-MC beobachten.

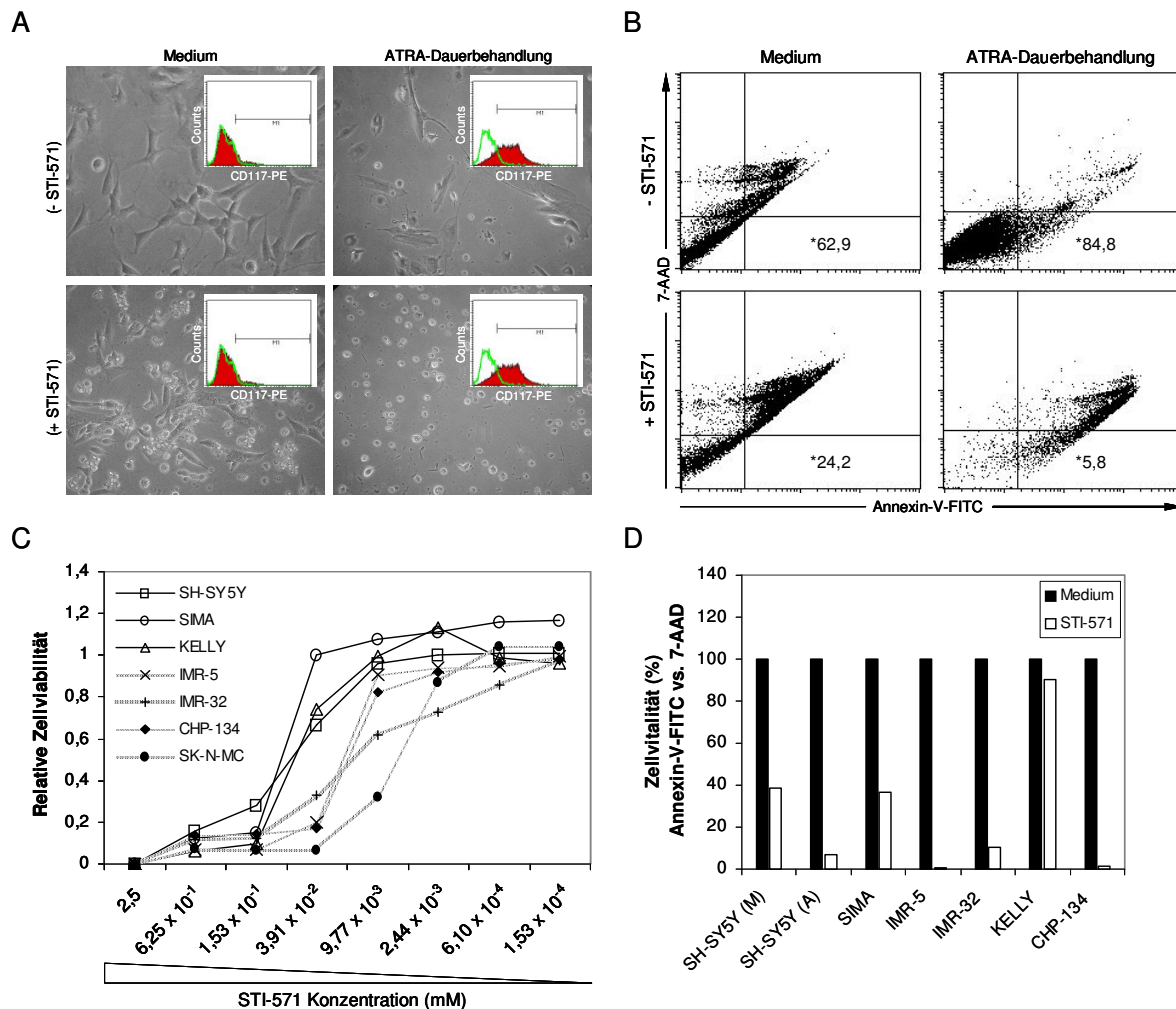


Abbildung 4-31: Antiproliferative und Apoptose-induzierende Wirkung von STI-571 gegenüber verschiedenen CD117 exprimierenden Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (100-fache Vergrößerung) von ATRA-dauerbehandelten SH-SY5Y-Zellen ($6,25 \times 10^{-5}$ M, 37°C, 5% CO₂) und Cokultivierung mit und ohne STI-571 ($9,7 \times 10^{-3}$ mM; 96 h, 37°C, 5% CO₂). (B) FACS-Analyse zur Bestimmung der STI-571-induzierten Apoptose in kontinuierlich ATRA-behandelten SH-SY5Y-Zellen durch Färbung mit Annexin-V-FITC (FI-1) und 7-AAD (FI-3). (C) MTT-Proliferationstest zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Viabilität von STI-571-kultivierten Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen. (D) Durchflusszytometrische Bestimmung der unterschiedlichen Sensitivitäten von CD117-positiven und -negativen Tumorzellen gegenüber STI-571 ($9,7 \times 10^{-3}$ mM) durch Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC und 7-AAD.

Aufgrund der besonders starken Proteinexpression von CD117, die sich im FACS mit dem höchsten prozentualen Anteil und MFI äußerte, zeigten insbesondere SK-N-MC-Zellen eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber STI-571. Folglich wurde bei diesen Ewing-Tumorzellen eine um 50% reduzierte Viabilitätsrate erst bei einer Verdünnung von 5,85 μM STI-571 erreicht. Anhand veröffentlichter Plasmakonzentrationen von STI-571-behandelten Neuroblastom-Patienten und der Diskriminierung in zwei unterschiedlich STI-571-sensitive Gruppen wurde für weitere *in-vitro* Untersuchungen eine Standardkonzentration von $9,7 \times 10^{-3}$ mM STI-571 definiert. Neben dem Proliferationstest wurde mittels der durchflusszytometrischen Analyse ebenfalls der Anteil einer STI-571-induzierten Apoptose in unterschiedlich CD117 exprimierenden Neuroblastomzellen ermittelt (Abbildung 4-31, D). Der Anteil von Medium-kultivierten, vitalen

Tumorzellen wurde stets auf 100% festgelegt. Durch Stimulation von Medium-behandelten und CD117-negativen SH-SY5Y-Zellen mit STI-571 kam es bereits zu einer Reduktion vitaler Zellen auf 38,4%. Die CD117-vermittelte Sensibilisierung gegenüber STI-571 führte durch die Dauerbehandlung mit ATRA zu einer drastischen Reduktion vitaler Zellen auf 6,8%. Bei den beiden schwach konstitutiv CD117 exprimierenden Zelllinien SIMA und KELLY reduzierte sich der Anteil vitaler Zellen auf 36,3% (SIMA) und 90,1% (KELLY) durch STI-571 gegenüber der Kontrolle mit Medium (100%).

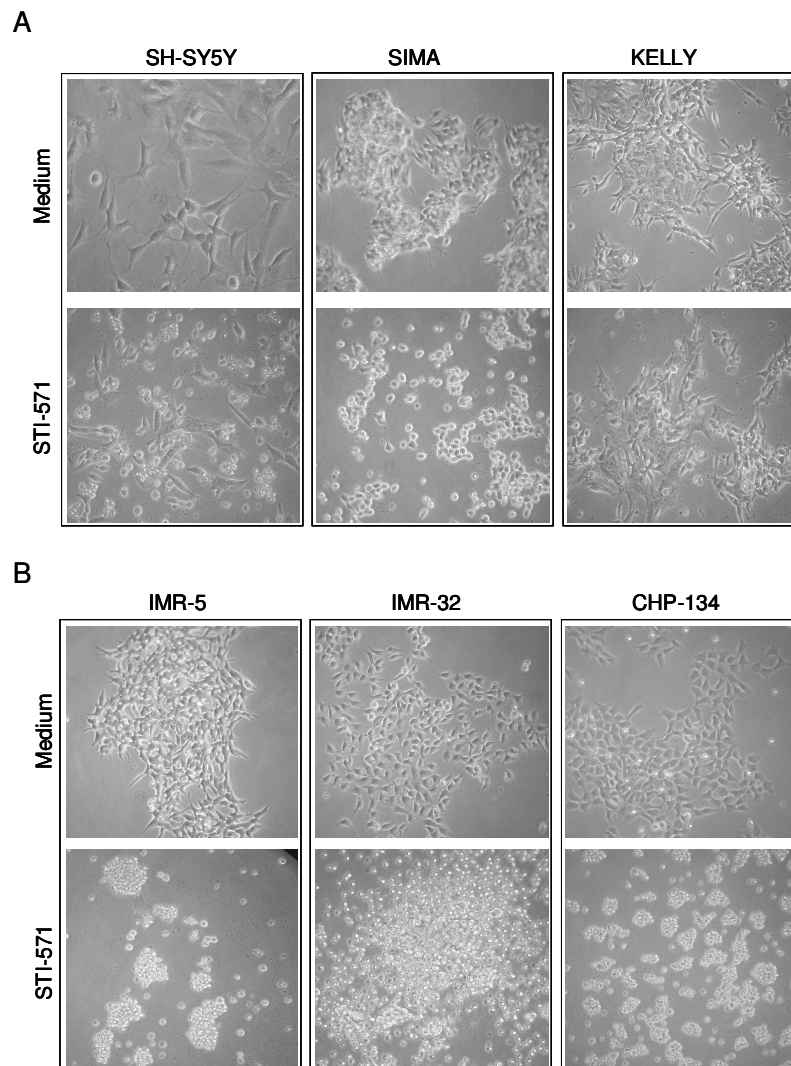


Abbildung 4-32: Lichtmikroskopische Aufnahme STI-571-behandelter Neuroblastomzellen. Die nur geringfügig CD117 exprimierenden Zelllinien SH-SY5Y, SIMA und KELLY (A) sowie die stark CD117 präsentierenden Neuroblastomzellen IMR-5, IMR-32 und CHP-134 (B) wurden in An- und Abwesenheit von 9,7 μ M STI-571 für 96 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert und unter dem Lichtmikroskop mit einer 100-fachen Vergrößerung fotografiert.

Aufgrund der ausgeprägten basalen Expression von CD117 auf den Neuroblastomzellen von CHP-134, IMR-5 und IMR-32 kam es zu einer erhöhten apoptotischen Reaktivität gegenüber dem Inhibitor. Hierdurch reduzierte sich die Zahl vitaler Zellen auf 1,1% (CHP-134), 0,96% (IMR-5) und 10,2% (IMR-32). In Abbildung 4-32 (A und B) ist die Kultivierung CD117-positiver und -negativer Neuroblastomzellen in An- und Abwesenheit des 9,7 μ M Tyrosinkinase-Inhibitors STI-571 lichtmikroskopisch dargestellt. Im Vergleich zur Kultivierung mit Medium konnten nach Behandlung der schwach CD117-positiven Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y, SIMA und KELLY mit STI-571 sowohl vitale, adhärent wachsende als auch vereinzelt tote Zellen im Überstand der Kulturflasche beobachtet werden (Abbildung 4-32, A). Bei den stark CD117 exprimierenden

Neuroblastomzellen IMR-5, IMR-32 und CHP-134 führte eine Behandlung mit dem ATP-analogen Inhibitor STI-571 im Gegensatz zur Medium-Kontrolle zum vollständigen Verlust aller vitalen Zellen. Dieser äußerte sich durch ausschließliches Vorfinden nicht adhärenter, kugeliger und granulierter Tumorzellen im Kulturüberstand (Abbildung 4-32, B).

4.4.8.4 Zusammenhang zwischen quantitativer CD117 Expression und der STI-571-vermittelten Zytotoxizität an Neuroblastomzellen

Zur Bestimmung der Apoptose-Indizes wurden die unterschiedlichen Sensitivitäten von CD117-positiven und -negativen Neuroblastomzellen gegenüber STI-571 mittels MTT-Proliferationstest und FACS-Analyse analysiert (Abbildung 4-31; C und D). Desweiteren wurde der direkte Zusammenhang zwischen der quantitativen CD117 Expression und den unterschiedlichen STI-571 Sensitivitäten untersucht. In einer Dosis-Wirkungs-Analyse wurde durch Titration von STI-571 die Zellviabilität im MTT-Proliferationstest (Abbildung 4-31, C) gemessen und die effektive Dosis (ED50) des Inhibitors bestimmt. In Abbildung 4-33 (A) sind die ED50-Werte der unterschiedlich CD117 exprimierenden Tumorzellen präsentiert. Die geringste Sensitivität gegenüber STI-571 besaßen die niedrig CD117 exprimierenden Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y (64,2 μM), SIMA (79,8 μM) und KELLY (63,2 μM). Für eine minimale Viabilitätsrate von 50% musste bei den Zelllinien IMR-5, IMR-32 und CHP-134 der Kinaseinhibitor STI-571 bis zu einer effektiven Dosis von 19,8 μM (IMR-5), 16,1 μM (IMR-32) und 18,01 μM (CHP-134) verdünnt werden. Mit einem ED50-Wert von 5,85 μM waren die besonders stark CD117 überexprimierenden Ewing-Tumorzellen SK-N-MC für eine antiproliferative Wirkung durch STI-571 am empfänglichsten.

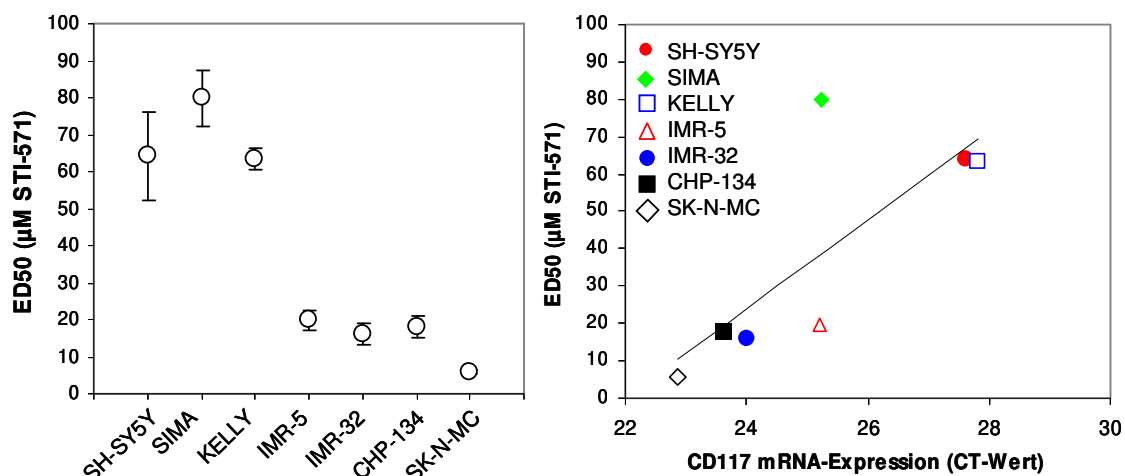


Abbildung 4-33: Korrelation zwischen der CD117 mRNA-Expression und STI-571-induzierten Apoptose am Beispiel verschiedener neuroektodermaler Tumorzellen. (A) Bestimmung der effektiven Dosis (ED50-Wert) unterschiedlicher Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien durch Titration von STI-571 in einem Konzentrationsbereich von 2,5 bis $1,53 \times 10^{-4}$ mM und Analyse der Zellviabilität im MTT-Proliferationstest. (B) Vergleich der in der *real-time* RT-PCR quantifizierten CD117 mRNA-Expression mit den ED50-Werten von diversen STI-571-stimulierten Tumorzellen.

Durch Gegenüberstellung der STI-571-abhängigen ED50-Werte (Ordinate) mit den in der *real-time* RT-PCR quantifizierten CT-Werten der CD117 mRNA-Expression (Abzisse) wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Expression des Rezeptors und der Sensitivität gegenüber STI-571 ersichtlich (Abbildung 4-33, B). Die mit einem geringen CT-Wert stark CD117-positiven Neuroblastomzellen IMR-5, IMR-32, und CHP-134 sowie die Ewing-Tumorzellen SK-N-MC besaßen zugleich den kleinsten ED50-Wert und damit auch die größte Sensitivität gegenüber STI-571. Dem gegenüber hatten die mit einem hohen CT-Wert basal nur schwach CD117 exprimierenden Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y, SIMA und KELLY eine deutlich geringere

Empfindlichkeit und damit verbundenen höheren ED50-Wert bei einer Behandlung mit dem ATP-analogen Inhibitor. *In-vitro* ließen sich somit vorrangig CD117 überexprimierende Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen in ihrem Wachstum durch Behandlung mit STI-571 erfolgreich inhibieren.

4.4.9 Expression hämatopoetischer Stammzellmarker auf Neuroblastomzellen

Für die Behandlung von Hoch-Risiko Neuroblastom-Patienten ist die myeloablative Megatherapie, bestehend aus Chemo- und Strahlentherapie, und Transplantation autologer Stammzellen in Kombination mit Retinoiden (*all-trans* Retinsäure, 13-*cis*-Retinsäure, 4-HPR) während der Phase der Erhaltungstherapie eine der vielversprechendsten Therapiemethoden^{53; 54; 55}. Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) werden vorrangig aus Knochenmark, peripheren Blutstammzellen und Nabelschnurblut gewonnen. Die Separierung und Gewinnung tumorfreier HSZ erfolgt bis heute vorrangig über das Oberflächenantigen CD34. Seit der Entdeckung dieses gleichnamigen Antigens auf Neuroblastomzellen wird die Gewinnung von CD34-angereicherten hämatopoetischen Stammzellen zunehmend in Frage gestellt und ist somit umstritten^{213; 214}. Eine Beteiligung von CD34 bei rezidivierenden Prozessen durch Transplantation autologer Stammzellen kann somit nicht ausgeschlossen werden. Mit diesem Hintergrund wurde die Expression und therapeutische Relevanz der hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 und CD133 von unreifen und Retinoid-differenzierten Neuroblastomzellen näher untersucht und verglichen.

4.4.9.1 CD34 Expression auf Neuroblastomzellen

Neben hämatopoetischen Stammzellen wurde anhand diverser Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien die Expressionsverteilung des Oberflächenantigens CD34 untersucht. Als zusätzliche Kontrolle wurden über eine magnetaktivierte Zellseparation CD34-markierte Zellen aus einem zentrifugierten Leukozyten- und Thrombozyten-Konzentrat (*Buffy Coat*) angereichert. Laut Durchflusszytometer wurden CD34-positive HSZ mit einer Reinheit von 99% gewonnen (ohne Abbildung). HSZ exprimierten erwartungsgemäß am stärksten das 436 bp große mRNA-Transkript für CD34 (Abbildung 4-34, A). Neben den HSZ wurde eine mRNA-Expression von CD34 am stärksten in den Neuroblastomzellen IMR-32 und CHP-134 nachgewiesen. Alle anderen Neuroblastomzellen exprimierten nur geringfügig den hämatopoetischen Stammzellmarker. In den beiden Ewing-Tumor-Zelllinien SK-N-MC und A673 konnte im Vergleich zu den Neuroblastomzellen hingegen kein CD34-spezifisches Transkript identifiziert werden. Mittels der quantitativen *real-time* RT-PCR wurde die basale CD34 mRNA-Expression aller Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen in Bezug auf SH-SY5Y-Zellen untersucht (Abbildung 4-34, B). Wie in der RT-PCR zeigte sich auch in der *real-time* RT-PCR eine deutliche Überexpression von CD34 in den Neuroblastom-Zelllinien IMR-32 und CHP-134 um einen Faktor von 7,1 (IMR-32) und 1,3 (CHP-134). Die anderen Neuroblastomzellen exprimierten mit einem Fold Change von 0,7 (KELLY), 0,8 (IMR-5) und 0,5 (SIMA) das Antigen annähernd gleich schwach wie SH-SY5Y-Zellen. Mit einem Fold Change von 0,01 und 0,006 wurde in den beiden Ewing-Tumorzellen SK-N-MC und A673 keine CD34 mRNA-Expression nachgewiesen. Darüber hinaus wurde anhand eines PE-gekoppelten Anti-CD34 Antikörpers die Proteinexpression von CD34 auf der Oberfläche von Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien im Durchflusszytometer untersucht. Mit einem Anteil von 98,1% und 32,2% exprimierten die beiden Zelllinien IMR-32 und CHP-134 am stärksten CD34 auf der Zelloberfläche. Bei den restlichen Neuroblastomzellen konnte mit einem Anteil von 5,1% (SH-SY5Y), 11,35% (SIMA), 15,9% (IMR-5) und 6,7% (KELLY) (6,7%) keine Expression des Oberflächenantigens im FACS gemessen werden. Wie in der RT-

PCR zeigten die beiden Ewing-Tumor-Zelllinien SK-N-MC und A673 mit einem Anteil von 3,2% und 3,6% eine ausbleibende CD34 Proteinexpression.

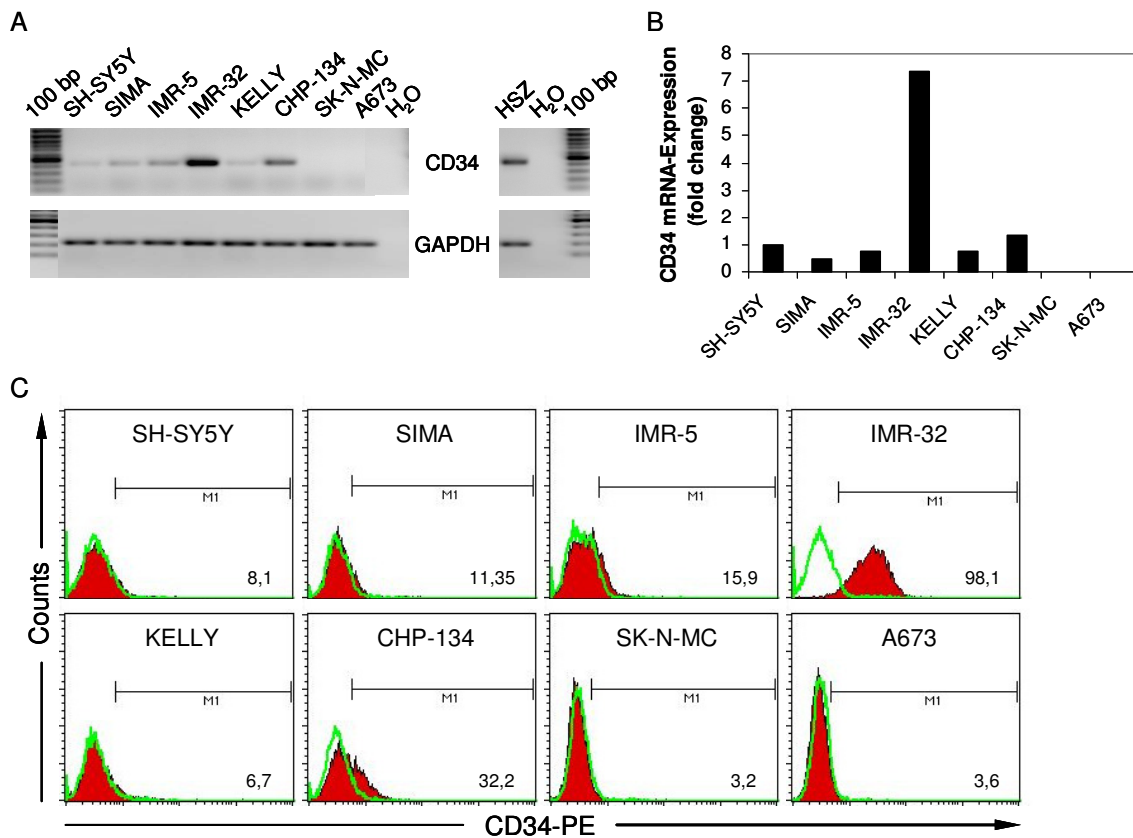


Abbildung 4-34: Expression des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 auf Tumoren peripheren neuroektodermalen Ursprungs. RT-PCR (A) und quantitative *real-time* RT-PCR (B) zur Bestimmung der CD34 mRNA-Expression. (C) FACS-Analyse zur Detektion des Oberflächenantigens CD34 auf verschiedenen Tumoren mittels eines monoklonalen PE-markierten Anti-CD34 Antikörpers.

4.4.9.2 Expression des HSZ-spezifischen Antigens CD133 auf Neuroblastomzellen

Durch die verbreitete Expression von CD34 auf Tumorzellen, wie beispielsweise dem Neuroblastom, wird verstärkt über die therapeutische Anwendung von CD133 zur Gewinnung tumorfreier Stammzellapheresate diskutiert. Daraufhin wurde neben CD34 auch die Expression des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD133 auf Neuroblastomzellen untersucht. Dafür wurde zunächst das Expressionsprofil der Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y, SIMA und CHP-126 mit den Ewing-Tumorzellen SK-N-MC im Affymetrix-Genchip HG-U133A verglichen (Abbildung 4-35, A). Das auf dem SONDENSATZ 204304_s_at lokalisierte CD133 wurde bereits in allen Tumorzellen konstitutiv exprimiert. Mit einer Signalintensität von 2180 wurde CD133 insbesondere in SIMA-Zellen im Vergleich zu den restlichen Neuroblastomzellen SH-SY5Y (130) und CHP-126 (130) sowie der Ewing-Tumor-Zelllinie SK-N-MC (481) überexprimiert vorgefunden. In Abbildung 4-35 (B) wurde in der RT-PCR die Verteilung einer CD133 mRNA-Expression anhand sechs verschiedener Neuroblastom- und zwei Ewing-Tumor-Zelllinien näher untersucht. Mit Ausnahme der Neuroblastomzellen SIMA und IMR-5 konnte keine weitere konstitutive Expression von CD133 beobachtet werden. Wurde dem Kulturmedium ATRA hinzugefügt, so reduzierte sich die Expressionsintensität beider Zelllinien drastisch. In Ewing-Tumorzellen konnte hingegen keine basale Expression des Stammzellmarkers nachgewiesen werden. In einer *real-time* RT-PCR wurde zusätzlich die konstitutive und durch ATRA regulierte Expression von CD133 in den Tumorzellen quantifiziert (Abbildung 4-35, C). Wie im Affymetrix-Genchip und der

RT-PCR wurde mit einem Fold Change von 744 und 148 eine konstitutive Überexpression von CD133 insbesondere in den Zelllinien SIMA und IMR-5 im Vergleich zu SH-SY5Y (1) detektiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass wie in der RT-PCR eine Kultivierung mit *all-trans* Retinsäure eine Reduktion der CD133 Expression induzierte. In den Neuroblastomzellen SIMA und IMR-5 wurde die CD133 mRNA-Expression durch die Behandlung mit ATRA auf einen FC von 458 und 119 herunterreguliert. Die restlichen Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen, die keine basale Expression von CD133 aufwiesen, zeigten auch nach der Behandlung mit Retinsäure keine Veränderung.

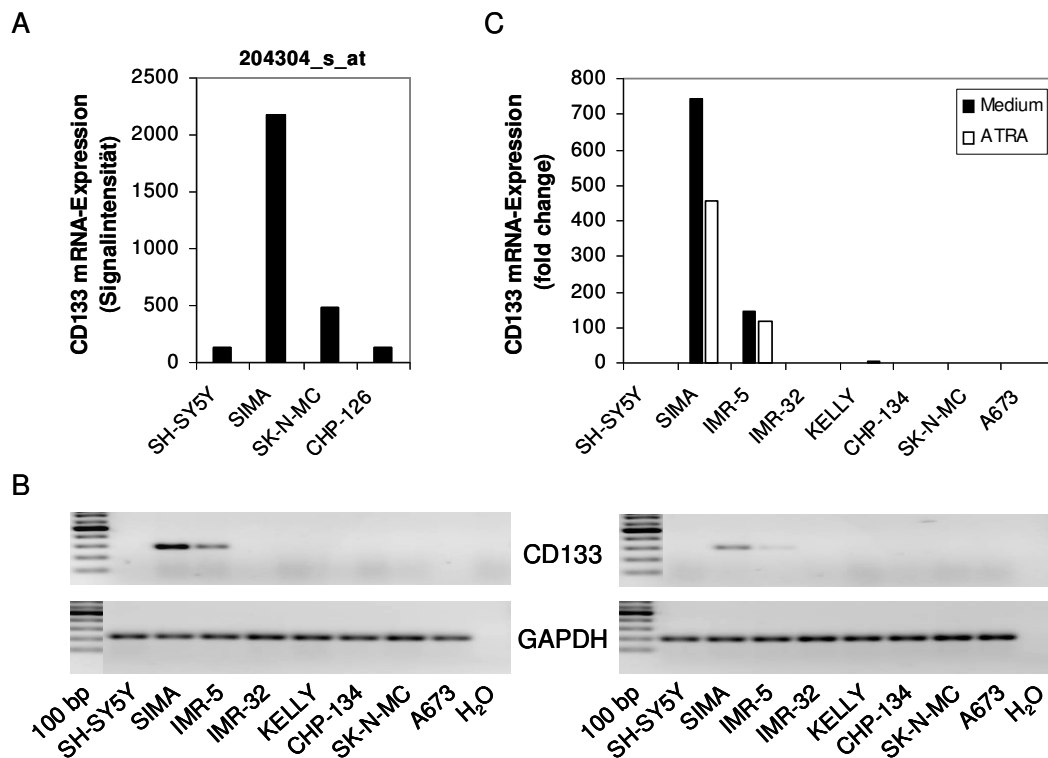


Abbildung 4-35: Expression von CD133 in pädiatrischen soliden Tumoren mit peripheren neuroektodermalen Ursprung. (A) Konstitutive Expressionsstärken von CD133 aus dem Affymetrix-Genchip HG-U133A. RT-PCR (B) und quantitative *real-time* RT-PCR (C) zur Bestimmung der CD133 mRNA-Expression in An- und Abwesenheit des Retinoids *all-trans* Retinsäure ($6,25 \times 10^{-5}$ M, 37 °C, 5% CO₂).

4.4.9.3 CD133 Proteinexpression von Retinsäure-differenzierten Neuroblastomzellen

In einer FACS-Analyse wurde mittels eines monoklonalen PE-gekoppelten Anti-CD133 Antikörpers die konstitutive Proteinexpression auf der Oberfläche von diversen Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien untersucht (Abbildung 4-36, A). Neben der Vervielfältigung des CD133 mRNA-Transkriptes in der RT-PCR wurde zudem die Präsenz des Antigens auf der Zelloberfläche von SIMA und IMR-5 identifiziert. Mit einem Anteil von 99,4% und 97,1% wurde ausschließlich in den Neuroblastomzellen SIMA und IMR-5 das ebenfalls für hämatopoetische Stammzellen charakteristische Antigen CD133 exprimiert vorgefunden. Die anderen Neuroblastomzellen besaßen mit einem Anteil von 6,4% (SH-SY5Y), 11,7% (IMR-32), 4,8% (KELLY) und 7,4% (CHP-134) kein CD133 auf der Zelloberfläche. Auf Ewing-Tumorzellen wie SK-N-MC und A673 ließ sich das HSZ-spezifische Antigen ebenfalls nicht durchflusszytometrisch nachweisen. Darüber hinaus konnte durch Anwesenheit von ATRA in der RT-PCR eine Herunterregulierung von CD133 bei positiven Neuroblastomzellen beobachtet werden. Die Retinoid-induzierte Reduktion der CD133 Proteinexpression von SIMA und IMR-5 wurde daher auch im Durchflusszytometer untersucht. Nach 96 stündiger Inkubation beider Zelllinien mit

ATRA erfolgte eine Doppelfärbung mit einem PE-markierten Anti-CD133 und FITC-gekoppelten Anti-CD34 Antikörper und Analyse im FACS.

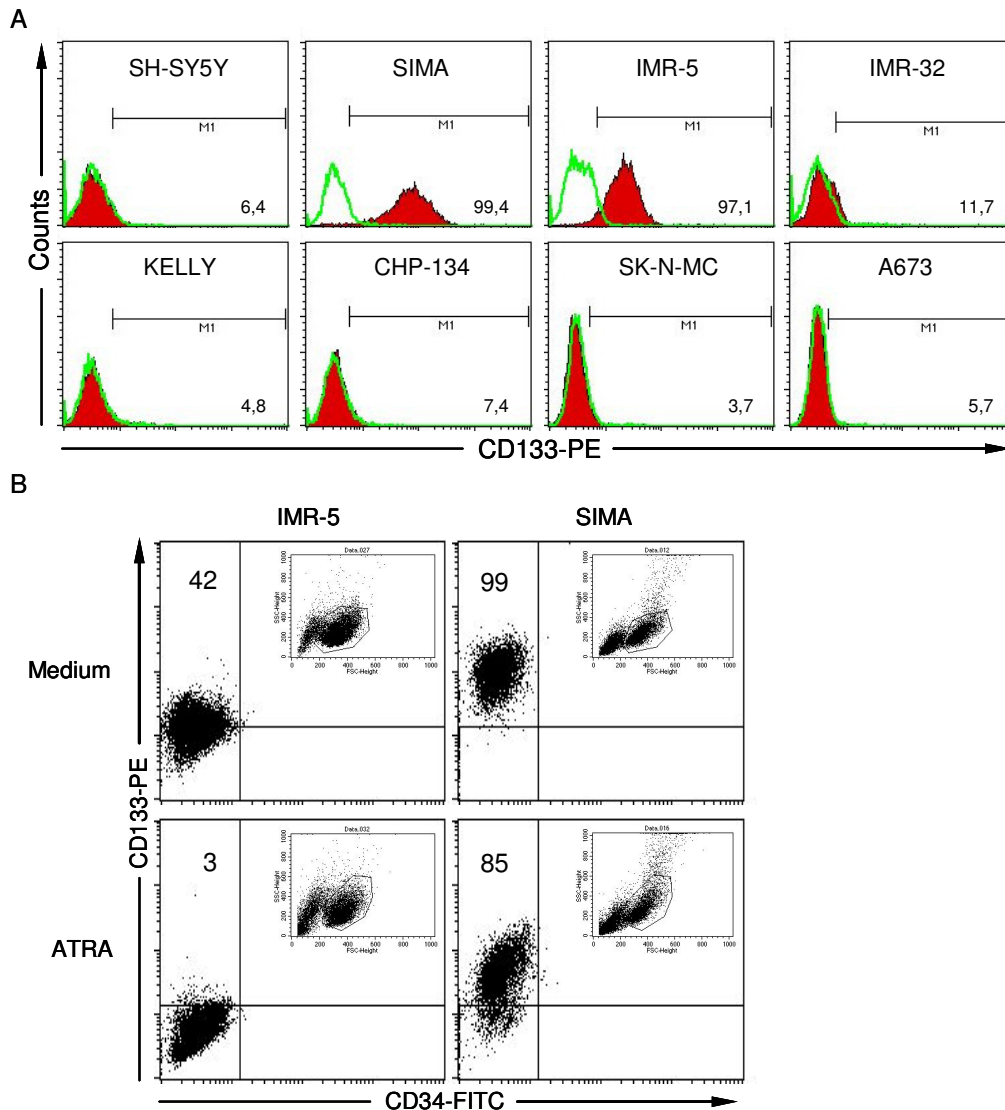


Abbildung 4-36: Differentielle CD133 Proteinexpression von pädiatrischen Tumorzellen durch den Einfluss von ATRA. (A) FACS-Analyse zur Bestimmung der konstitutiven CD133 Proteinexpression auf Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen mittels eines PE-markierten Anti-CD133 Antikörpers. (B) Doppelfärbung der mit Medium bzw. ATRA kultivierten Neuroblastomzellen IMR-5 und SIMA mittels des PE-markierten Anti-CD133 und FITC-gekoppelten Anti-CD34 Antikörpers und Messung von 10.000 Zellen im Durchflusszytometer.

Die im Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenzen der Antigene CD133-PE und CD34-FITC wurden in einem Dot Plot gegenübergestellt (Abbildung 4-36, B). Mit einem Anteil von 42% und 99% war die CD133 Proteinexpression in den Neuroblastomzellen IMR-5 und SIMA unterschiedlich stark ausgebildet. Da beide Zelllinien ausschließlich das Antigen CD133 statt CD34 exprimierten, befand sich die einfach positive Zellpopulation im oberen linken Quadranten des Dot Plots. Wurde dem Kulturmedium ATRA hinzugefügt, so konnte in SIMA-Zellen und IMR-5-Zellen eine Reduktion der CD133-positiven Population beobachtet werden. Bei IMR-5-Zellen reduzierte sich der Anteil von 42% auf 3% CD133-positiver Neuroblastomzellen drastisch. Eine Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie SIMA mit Retinsäure senkte den Anteil CD133-positiver Zellen von 99% auf 85% hingegen deutlich schwächer. Letztlich konnte die durch Stimulation mit *all-trans* Retinsäure induzierte Expressionserniedrigung von CD133 auf Neuroblastomzellen sowohl als Transkript als auch Protein verifiziert werden.

4.4.9.4 Gewinnung tumorreduzierter CD133-positiver hämatopoetischer Stammzellen

Durch Anwesenheit von CD34 auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen und anderen Tumorarten können während der CD34-abhängigen Anreicherung von hämatopoetischen Stammzellen auch Kontaminationen mit Tumorzellen stattfinden. Aus diesem Grund gibt es zunehmende Überlegungen zur alternativen Nutzung von CD133 zur Aufbereitung von autologen HSZ. In den zuvorigen Experimenten konnte jedoch ebenfalls die Expression von CD133 auf Neuroblastomzellen nachgewiesen werden. Dieser Stammzellmarker stellt somit prinzipiell keine direkte Alternative dar. Durch Behandlung von Neuroblastomzellen mit *all-trans* Retinsäure konnte aber eine Reduktion der konstitutiven CD133 mRNA- und Proteinexpression induziert werden. In einem *in-vitro* Modell wurde eine Anreicherung von tumorbelasteten peripheren hämatopoetischen Stammzellen über eine Selektionierung mit CD133 simuliert, um anschließend die Kontaminationsrate von Medium- und ATRA-behandelten Tumorzellen vergleichen zu können.

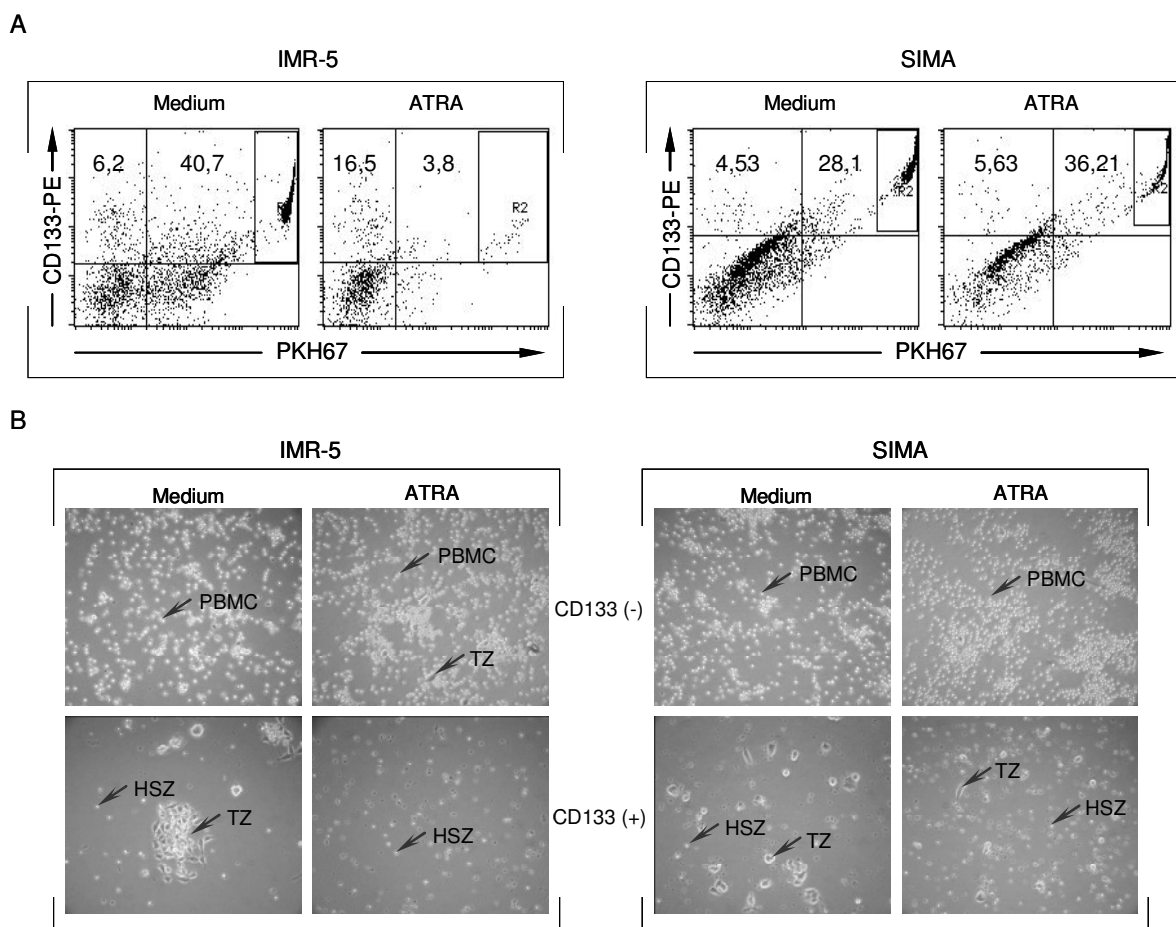


Abbildung 4-37: Vergleich der tumorbelasteten Anreicherung von CD133⁺ hämatopoetischen Stammzellen durch zuvorige Stimulation der Neuroblastomzellen mit und ohne Retinsäure. (A) FACS-Analyse der mit Medium oder ATRA kultivierten und doppelt gefärbten Neuroblastomzellen (IMR-5 und SIMA) mit PKH67 (FI-1) und Anti-CD133-PE (FI-2) sowie der einfach markierten HSZ (Anti-CD133-PE) innerhalb der CD133 (+) separierten Zellfraktion. (B) Lichtmikroskopische Aufnahme (100-fache Vergrößerung) rekultivierter HSZ und Tumorzellen (TZ) aus den CD133 (-) depletierten und CD133 (+) separierten Zellfraktionen in Abhängigkeit der inkubierten Tumorzellen mit ATRA oder Medium.

Zunächst wurden die konstitutiv CD133 exprimierenden Neuroblastom-Zelllinien SIMA und IMR-5 sowie die aus einem Lymphozyten- und Thrombozyten-Konzentrat angereicherten peripheren HSZ getrennt mit Medium und ATRA für 96 h (37°C und 5% CO₂) kultiviert. Im Anschluß wurden die Tumorzellen gewonnen und mit dem transmembranen Fluoreszenzfarbstoff PKH67 (FI-1) gefärbt. Die PKH67-gefärbten Tumorzellen wurden letztlich in einem Verhältnis von 1:100 (TZ :

PBMC) mit den hämatopoetischen Stammzellen vermischt. Durch Markierung der Zellen mit einem primären PE-gekoppelten Anti-CD133 und sekundären Magnetpartikel-gekoppelten Anti-PE Antikörper erfolgte eine magnetaktivierte Separation der CD133⁺ Zellen und die Depletion CD133⁻ Zellen im Magnetfeld (MACS-Technologie). Die CD133-separierte Zellfraktion wurde anschließend im FACS analysiert (Abbildung 4-37, A) und rekultiviert (Abbildung 4-37, B). In Abbildung 4-37 (A) ist in einem Dot Plot die CD133-PE Expression (FI-2) gegen die PKH67 Färbung (FI-1) dargestellt. Die mit CD133 und PKH67 markierten und somit doppelt positiv gefärbten Tumorzellen befanden sich in der Region R2 (PKH67⁺/CD133⁺) des oberen rechten Quadranten des Dot Plots. Die nicht mit PKH67 markierten und daher einfach gefärbten CD133-positiven HSZ waren aufgrund ihrer ausschließlich PE-emittierten Fluoreszenz im oberen linken Quadranten (PKH67⁻/CD133⁺) lokalisiert. Durch den Anti-CD133-PE und mit Magnetpartikeln gekoppelten Anti-PE Antikörper wurden aufgrund der konstitutiven CD133 Proteinexpression bis zu 41% der mit Medium kultivierten und mit PKH67 gefärbten IMR-5-Zellen (Region R2) neben 6% HSZ (oberer linker Quadrant) in der CD133-separierten Fraktion angereichert. Bei zuvoriger Behandlung der Neuroblastomzellen mit ATRA zeigten sich hingegen deutliche Unterschiede in der tumorbelasteten Anreicherung von CD133-positiven HSZ. Durch die Retinsäure-induzierte Herunterregulierung von CD133 auf IMR-5-Zellen konnte in der CD133-separierten Zellfraktion nur noch ein Tumoranteil von 3,8% neben 16,5% hämatopoetischen Stammzellen mit angereichert werden. Die mit ATRA kultivierten und mit PKH67 gefärbten IMR-5-Zellen wurden aufgrund der erniedrigten CD133 Proteinexpression in der CD133-depletierten Zellfraktion isoliert (ohne Darstellung). SIMA-Zellen exprimierten ebenfalls basal sehr stark das Antigen CD133. Aus diesem Grund wurden neben 4,5% CD133⁺ hämatopoetischer Stammzellen auch 28,1% CD133⁺ und PKH67 doppelt positive Tumorzellen in der CD133-separierten Fraktion aufkonzentriert. Im Vergleich zu der Neuroblastom-Zelllinie IMR-5 führte eine Behandlung von SIMA-Zellen mit ATRA nur zu einer schwachen Reduktion der CD133 Proteinexpression. Daher ließ sich laut FACS-Analyse die Tumorkontamination der CD133-spezifischen Anreicherung von HSZ mit Retinsäure-stimulierten SIMA-Zellen nicht senken. Neben 5,6% HSZ betrug der Anteil ATRA-kultivierter und CD133⁺/PKH67⁺-selektionierter Neuroblastomzellen 36,2% in der CD133-separierten Fraktion. Damit waren diese Neuroblastomzellen in der CD133-selektionierten Fraktion sogar stärker vertreten als Medium-kultivierte Tumorzellen mit einem Anteil von 28,1%. Die relativ beständige Überexpression von CD133 auf SIMA-Zellen nach Kultivierung mit *all-trans* Retinsäure ließ somit auch keine Anreicherung von Tumorzellen in dem CD133-depletierten Isolat zu (ohne Darstellung). In Abbildung 4-37 (B) sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der rekultivierten CD133-depletierten und -separierten Zellfraktionen dargestellt. Eine Rekultivierung der CD133⁺-separierten Population verdeutlichte sowohl bei den mit Medium behandelten SIMA-Zellen als auch IMR-5-Zellen eine Kontamination mit Tumorzellen unter den CD133⁺-angereicherten HSZ. In der CD133-depletierten Zellfraktion konnten bei Behandlung der Tumorzellen mit Medium ausschließlich PBMC nachgewiesen werden. Eine Vorbehandlung der Neuroblastom-Zelllinie IMR-5 mit Retinsäure führte im Vergleich zu SIMA zu einer Aufhebung der Kontamination mit Tumorzellen unter den CD133-angereicherten HSZ. Die ATRA-vermittelte Herunterregulierung von CD133, die in der Neuroblastom-Zelllinie IMR-5 stärker als in SIMA ausgeprägt war, äußerte sich stattdessen in einer Verschiebung und Aufkonzentrierung der Tumorzellen aus der CD133-separierten in die -depletierte Zellfraktion. Diese niedrig CD133 exprimierenden IMR-5-Zellen wurden folglich zwischen den PBMC in der CD133-depletierten Fraktion vorgefunden. Die relativ stabile Expression von CD133 auf Retinsäure-kultivierten SIMA-Zellen resultierte mit einer weiterhin bestehenden Anwesenheit unter den CD133-angereicherten HSZ.

5 DISKUSSION

5.1 Genchipanalysen zur Diskriminierung eines Neuroblastoms von anderen neuroektodermalen Tumoren

Sowohl Neuroblastome als auch Ewing-Tumore sind neuroektodermale Tumore, die histogenetisch gemeinsam von Zellen des Neuroektoderms abstammen. Die weitere histogenetische Trennung der neuroektodermalen Tumore entsteht während der Neurulation. Hierbei entspringen aus dem Neuralrohr alle Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) und aus der Neuralleiste, die eine dorsale Lippe des Neuralrohrs darstellt, alle Zellen des peripheren Nervensystems. Primitive neuroektodermale Tumore (PNET) wie das Medulloblastom stellen somit einen Tumor des ZNS dar. Dem gegenüber werden die peripheren primitiven neuroektodermalen Tumore (pPNET) der Ewing-Tumor-Familie (inklusive Askin-Tumor und klassisches Ewing-Sarkom) sowie das Neuroblastom den Tumoren des peripheren Nervensystems zugeordnet. Daher ist es verständlich, dass es in der Vergangenheit beispielsweise nur schwer möglich war, einen Ewing-Tumor von anderen klein, rund und blauzelligen Tumoren (SRBCT; *small round blue cell tumours*) wie dem Neuroblastom, histologisch abzugrenzen. Histologisch gehören neben den drei Subtypen der Ewing-Tumor-Familie und dem Neuroblastom auch das Rhabdomyosarkom und Lymphom der SRBCT-Familie an. Das Problem der genauen tumorspezifischen Differenzierung, die Voraussetzung für eine wirkungsvolle Therapie ist, wird durch den Einsatz des DNA-Microarrays erheblich reduziert. Durch den Vergleich der Expressionsprofile ist die Microarray-basierende Genexpressionsanalyse gegenwärtig die modernste molekularbiologische Methode, um verschiedenartige klein, rund und blauzellige Tumore zu vergleichen und zu charakterisieren^{147; 215; 216}. Durch den Vergleich der etablierten Neuroblastom-Zelllinien mit SK-N-MC-Zellen, die initial ebenfalls als Neuroblastom beschrieben wurden¹⁶⁰, konnte mittels der DNA-Microarray Analyse und der Bestimmung der Genexpressionsprofile mit dem Genchip HG-U133A die Zelllinie SK-N-MC erstmals als Ewing-Tumor statt Neuroblastom identifiziert werden¹⁹⁷. Als Grundlage wurde ein Ewing-Tumor-spezifisches Expressionsprofil generiert, das auf dem Vergleich von Ewing-Tumoren mit 133 normalen Gewebeproben aus einer NBA (*normal body atlas*)-Datenbank basierte. Aus diesem Vergleich wurden mittels des EOS-Hu01 Genchips 38 Gene identifiziert, die im Vergleich zu den Normalgeweben ausschließlich in den Ewing-Tumoren überexprimiert wurden. Aufgrund eines abgewandelten Genchip-Designs befanden sich nur 19 dieser EFT-spezifischen Gene auf dem Affymetrix Microarray HG-U133A. In einer Cluster-Analyse und der Falschfarbendarstellung wurde im Gegensatz zu den restlichen Neuroblastomzellen der expressionsabhängige nahe Verwandtschaftsgrad von SK-N-MC-Zellen zu den Ewing-Tumoren in Form eines Stammbaumes ersichtlich (Abbildung 4-1, A). Bis in die Gegenwart wurden SK-N-MC-Zellen sowohl als Neuroblastom²¹⁷ als auch Askin-Tumor²¹⁸, einem Mitglied der Ewing-Tumorfamilie²¹⁹, beschrieben. Gegenwärtig wird in der Routinediagnostik der Ewing-Tumor über den Nachweis chromosomaler Translokationen zwischen der TLS-EWSR1-TAF15 (TET)-Proteinfamilie und den Transkriptionsfaktoren der E26 (ETS)-Familie manifestiert²²⁰. Lässt sich in der RT-PCR oder dem Western Blot eine chromosomale Translokation des Typs t(11;22)(q24;q12) wie in den Ewing-Tumorzellen SK-N-MC und A673 (Abbildung 4-1, B, Abbildung 4-1, C) bzw. t(21;22)(q22;q12) oder t(7;22)(p22;q12) im Tumorgewebe nachweisen, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Ewing-Tumor²²¹. Des Weiteren konnte im Gegensatz zu den Ewing-Tumorzellen eine Expression des Neuroblastom-spezifischen MYCN mRNA-Transkriptes und Proteins ausschließlich in Neuroblastomzellen beobachtet werden (Abbildung 4-1, B; Abbildung 4-1, C)^{30; 31}. Ein dabei

identifizierter MYC-Dualismus äußerte sich darin, dass zur Aufrechterhaltung des malignen Wachstums von MYCN-negativen Neuroblastomzellen eine kompensatorische Expression von c-MYC festgestellt wurde (Abbildung 4-1, B; Abbildung 4-1, C). Ein für die Diagnostik bedeutendes Gen, das hochspezifisch exprimiert nur in einem Ewing-Tumor vorgefunden wurde, war die Membran-assoziierte Phospholipase A1 β (*lipase member 1*; LIPI). Ursprünglich wurde Lipase I als *Cancer/Testis*-Antigen identifiziert, das vornehmlich in Testis und malignen Zellen exprimiert wird¹⁹⁹. Es konnte bereits gezeigt werden, dass murine LIPI-Mutationen mit einer Hypertriglyceridämie und Dyslipidämie assoziiert waren²²². Neben Lipase I (LIPI) wurde auch Lipase H (LIPH) als Isoenzym der Phospholipase A1 β identifiziert²⁰⁰. Lipase I wird mit Ausnahme vom Hoden ausschließlich in Ewing-Tumoren exprimiert. Das aus den beiden 634 und 544 bp großen Splicevarianten bestehende Lipase I mRNA-Transkript wurde wie EWS-FLI1 ausnahmslos in Ewing-Tumorzellen coexprimiert vorgefunden (Abbildung 4-1, B). Über den Nachweis einer LIPI mRNA-Expression existiert im Vergleich zur Amplifizierung von EWS-ETS Fusionsproteinen, wie zum Beispiel EWS-FLI1, vor allem ein diagnostisch wesentlich sensitiverer Marker zum Nachweis von Ewing-Tumoren²²³. Im Vergleich zu EWS-FLI1 lassen sich mittels der Vervielfältigung von LIPI mRNA-Transkripten in der RT-PCR bereits kleinste Spuren, wie sie beispielsweise als Rezidiv auftreten können, an Ewing-Tumorzellen nachweisen. Dieser Nachweis kann somit für den weiteren therapeutischen Verlauf von großem Vorteil sein. Die Bestimmung und der Vergleich der Genexpressionsprofile von verschiedenen Tumoren durch die Microarray-Technologie gewinnt immer mehr an Bedeutung. Durch Erstellung von tumorspezifischen Expressionsprofilen existiert neben dem Translokations- und Fusionsgen EWS-FLI1 nun mit Lipase I ein noch bedeutend sensitiverer Marker zur Identifizierung und Diskriminierung von Tumoren peripheren neuroektodermalen Ursprungs.

5.2 Biologische Wirkung von Retinoiden

Innerhalb der ersten Lebensjahre ist das Risiko für eine Krebserkrankung doppelt so hoch wie im fortschreitenden Kinder- und Jugendalter. Kindliche Tumore wie das Neuroblastom, der Ewing-Tumor, das Non-Hodgkin Lymphom oder das Rhabdomyosarkom, die sich auch zu der Gruppe der kleinen rund und blauzelligen Tumore zusammenfassen lassen, werden bereits in der Schwangerschaft angelegt. Mit einem Anteil von 8% aller malignen Erkrankungen und einer Inzidenz von 0,8 bis 0,9 pro 100.000 Kinder unter 15 Jahren ist das Neuroblastom eine der häufigsten Tumorerkrankungen im Kindesalter. Auf Basis der aktuellen multizentrischen Therapiestudie „NB 2004“ der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) erfolgt die Behandlung von Neuroblastom-Patienten. Hierbei orientiert sich die Behandlung in Abhängigkeit vom Stadium, Alter, MYCN-Amplifikation, Tumolvolumen, Symptomatik und des *in-situ* belassenen Tumorrestes. In der Therapie kommt es neben dem chirurgischen Eingriff auch zum Einsatz von Strahlen- und Chemotherapie. Besonders vielversprechend ist die myeloablative Chemotherapie, eine Kombination aus Hochdosischemo- und Strahlentherapie, mit anschließender Transplantation autologer hämatopoetischer Stammzellen^{47; 48}. Auch die Behandlung von Neuroblastom-Patienten mittels einer Therapie mit Anti-GD2-Antikörpern findet durch die Neuroblastom-spezifische Überexpression des Glykolipidantigens GD2 eine wirkungsvolle Anwendung⁶⁰. Da insbesondere Neuroblastome im fortgeschrittenem Tumorstadium eine Rezidiv erleiden, wird die Behandlung von Hoch-Risiko Neuroblastom-Patienten mit einer myeloablativen Chemo- und hämatologischen Stammzelltherapie und einer Applikation mit Retinoiden kombiniert^{53; 54; 55; 56; 57; 58}. Das aus dem peripheren sympathischen Nervensystems stammende Neuroblastom hat seinen Ursprung aus der Neuralleiste. Die damit verbundene hohe Plastizität macht die blastoide Zelle besonders empfänglich für eine

Behandlung mit Retinoiden. Die Retinoide stellen bereits heute eine sinnvolle Therapieoption für eine bestimmte Subgruppe von potenziell Rezidiv-gefährdeten Neuroblastom-Patienten dar. Natürliche Retinsäuren wie 9-*cis* zeichneten sich *in-vitro* im Vergleich zu 13-*cis* besonders als Differenzierung-aktivierendes Agens aus⁹⁹, zeigte aber in klinischen Studien bei Erwachsenen eine inakzeptable Toxizität²²⁴. Im Vergleich zu *all-trans* ließ sich durch 13-*cis* Retinsäure eine deutlich höhere Plasmakonzentration und Differenzierungsaktivität beobachten²²⁵. Klinische Studien belegen eindeutig, dass eine maximal tolerierte Dosis von 13-*cis* Retinsäure bei Resttumor-freien Hoch-Risiko Neuroblastom-Patienten nach myeloablativer Chemotherapie und der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen die Lebenserwartungen deutlich steigert. Durch Applikation von 13-*cis* Retinsäure steigt die Zahl der 3 Jahre rezidivfreien Patienten auf 46% im Vergleich zu 29% der nicht Retinoid-behandelten Neuroblastom-Patienten an^{53; 118}.

5.2.1 Antiproliferative Wirkung und therapeutischer Einsatz von Retinoiden

Synthetische und natürliche Retinoide wirken zum Teil sowohl unterstützend in der Differenzierung als auch in der Apoptose und Wachstumshemmung von Neuroblastomen. Bereits 1982 beschrieb Sidell die antiproliferative Wirkung und morphologische Änderung von Neuroblastomen durch Retinoide, die sich beispielsweise in Neuriten-ähnlichen Zellausläufern äußert⁵². Auch synthetische Retinoide, wie das 1976 durch Sporn näher charakterisierte 4-HPR, besitzen ein hohes Potenzial bei der Behandlung eines Neuroblastoms^{71; 109}. Bei einer Kultivierung von Neuroblastomzellen mit ATRA oder 4-HPR konnte zunächst durch beide Retinoide eine Inhibition des Wachstums beobachtet werden. Eine unterschiedliche Wirkung zeigte sich jedoch sowohl zwischen den Zelllinien als auch unter den beiden Retinoiden. Eine Titration des natürlichen und synthetischen Retinoids zeigte in einem MTT-Proliferationstest die insgesamt stärkere antiproliferative Wirkung von 4-HPR im Vergleich zu ATRA gegenüber diversen Zelllinien von Neuroblastomen und Ewing-Tumoren (Abbildung 4-2, A und C). Im Vergleich zu einer Behandlung mit 4-HPR proliferierten die Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien in Anwesenheit von *all-trans* Retinsäure bereits innerhalb eines Konzentrationsbereiches von $2,5 \times 10^{-4}$ bis $6,25 \times 10^{-5}$ M anstatt erst eines Titers von $6,25 \times 10^{-5}$ bis $1,56 \times 10^{-5}$ M 4-HPR. Darüber hinaus wird durch eine andere Arbeitsgruppe auch ein erhöhtes zytotoxisches und antiproliferatives Potenzial von 4-HPR gegenüber den Neuroblastomen beschrieben, die bei einer Behandlung mit *all-trans* und 9-*cis* Retinsäure eine resistente bzw. unsensitive Reaktion zeigen¹²⁸. Ähnliche Beobachtungen wurden bei den Neuroblastomzellen SH-SY5Y gemacht, da sie als unempfindlichste Zelllinie gegenüber ATRA identifiziert wurde und nach einer Kultivierung mit 4-HPR eine ähnlich gute Empfindlichkeit wie ein Großteil der restlichen Tumorzellen besaß. Anhand der gemessenen konzentrationsabhängigen Viabilität der Tumorzellen und der Ermittlung der effektiven Dosis ED50 wurde für weitere *in-vitro* Versuche eine definierte Konzentration von $6,25 \times 10^{-5}$ M ATRA und $3,9 \times 10^{-6}$ M 4-HPR ermittelt. Die zuversichtliche Behandlung von häufig Rezidiv erleidenden Neuroblastom-Patienten mit einem synthetischen Retinamid wie 4-HPR begründet die intensive Forschung, die sich momentan in einer Studie der Phase I befindet²²⁶. Bei einer oralen Applikation von 2,47 mg 4-HPR/m²/Tag wird in den Neuroblastom-Patienten eine durchschnittliche Plasmakonzentration von 9,9 µmol/l 4-HPR gemessen. Diese Plasmakonzentration zeigt damit eine große Ähnlichkeit zu der *in-vitro* ermittelten 4-HPR-Konzentration von $3,9 \times 10^{-6}$ M (3,9 µM). Die Anti-Tumorstoffwirkung von 4-HPR auf diverse Zelllinien wurde in der Vergangenheit mehrmals publiziert und beruht im Vergleich zu einer Differenzierung von unreifen Neuroblastomen durch *all-trans* Retinsäure viel mehr auf einer Induktion von Apoptose und Nekrose^{109; 129; 130; 227}. Alle hier verwendeten kindlichen soliden Tumorzellen konnten in ihren Proliferationseigenschaften bei vergleichsweise geringeren Konzentrationen

stärker durch 4-HPR als durch ATRA inhibiert werden. Eine besonders hohe Retinoid-Konzentrationen von über $3,9 \times 10^{-6}$ M 4-HPR bewirkte in den Neuroblastomzellen bereits eine Apoptose. Der genaue Mechanismus einer 4-HPR-vermittelten Wachstumshemmung ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt und ist teilweise widersprüchlich. So wird einerseits bei einer Kultivierung von Neuroblastomzellen mit 4-HPR eine Rezeptor-unabhängige Induktion der Ceramid-Produktion und damit verbunden eine Ceramid-induzierte Apoptose und Nekrose diskutiert²²⁸. Im Gegensatz dazu kann durch 4-HPR auch eine Rezeptor-vermittelte Wachstumshemmung analysiert werden¹³¹. Letztlich kann eine hemmende Wirkung von 4-HPR wahrscheinlich sowohl über Retinoid-Rezeptor-abhängige und -unabhängige Signalwege in Tumorzellen vermittelt werden²²⁹. Neben der Induktion einer Apoptose beruht der Anti-Tumoreffekt von 4-HPR auch auf einer Inhibition der Angiogenese²³⁰ und einer immunogenen Wirkung durch die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen)²³¹. Wie schon zuvor beschrieben wurde, unterliegt die therapeutische Anwendung von 4-HPR beim Neuroblastom momentan noch einer laufenden Phase I-Studie²²⁶. Neben dem Neuroblastom findet auch beim Brust-¹²⁴, Blasen-¹²⁵ und Mundhöhlenkarzinom¹²⁶ eine klinische Anwendung mit 4-HPR statt. Eine besondere Eigenschaft des synthetischen Retinamids ist die im Vergleich zu den Retinsäuren gute Verträglichkeit. Durch Kopplung von 4-HPR an den Anti-GD2 Antikörper ist es unter anderem gelungen, die Anti-Tumoraktivität gegenüber Neuroblastomzellen zusätzlich zu verstärken²³². Die hohe Erwartungshaltung und die vielversprechende Therapie von Neuroblastom-Patienten mit 4-HPR erklären die Entwicklung einer neuen flüssigen und wirkungsvolleren Applikationsform in Form eines lipidhaltigen Komplexes, die gegenwärtig für eine Phase I-Studie vorbereitet wird²³³.

Bereits in Phase II befindet sich auch eine klinische Studie zur Behandlung von Neuroblastom-Patienten mit $90 \text{ mg/m}^2/\text{Tag}$ *all-trans* Retinsäure²³⁴. Aus dieser klinischen Studie konnten jedoch keine Informationen zur Plasmakonzentration von ATRA entnommen werden. Neben dem Neuroblastom wird ATRA insbesondere bei der Therapie der Akuten Promyeloischen Leukämie (APML) verwendet^{110; 235}. Die APML, eine besondere Form der Akuten Myeloischen Leukämie, ist am häufigsten durch die Translokation des Hauptfusionsgens PML-RARA t(15,17) gekennzeichnet. Durch Beteiligung des Retinsäure-Rezeptors-A lässt sich die APML besonders effizient mit *all-trans* Retinsäure behandeln²³⁶. Durch pharmakokinetische Untersuchungen kann in APML-Patienten bei einer oralen Dosierung von $45 \text{ mg ATRA/m}^2/\text{Tag}$ eine Plasmakonzentration von maximal $14,4 \mu\text{M}$ gemessen werden²³⁷. Im Verhältnis zu der APML-Therapie wäre bei einer oralen Applikation von $90 \text{ mg/m}^2/\text{Tag}$ *all-trans* Retinsäure theoretisch mit einer Plasmakonzentration von etwa $29 \mu\text{M}$ in den Neuroblastom-Patienten zu rechnen. Diese Plasmakonzentration würde annähernd der *in-vitro* bestimmten ATRA-Konzentration von $6,25 \times 10^{-5}$ M ($62,5 \mu\text{M}$) entsprechen, die zu einer 50%igen Inhibition der Proliferationsrate von Neuroblastomzellen führte. Bereits in den 70er Jahren erkannte Sporn die chemopreventive Eigenschaft von Retinoiden⁷¹. Neben der Behandlung der Akuten Myeloischen Leukämie¹¹⁰, dem Brustkrebs¹¹¹ oder dem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom¹¹² findet auch beim Neuroblastom ein therapierender Einsatz mit Retinsäuren statt. Gegenwärtig erfolgt die Applikation von Retinsäuren zur Prophylaxe von Rezidiven vornehmlich in der Phase der Erhaltungstherapie von Hoch-Risiko Neuroblastom-Patienten nach erfolgreicher myeloablativer Megatherapie und kombinierter Stammzelltransplantation^{53; 118}. In der Praxis findet aufgrund der geringeren Toxizität und den besseren pharmakologischen Eigenschaften die 9-*cis* und *all-trans* Retinsäure hingegen weniger Anwendung als 13-*cis* Retinsäure¹³⁰. Anämie, Exantheme, Hyperkalzämie, Übelkeit, Thrombozytopenie sind die wesentlichsten Hauptnebenwirkungen bei einer Behandlung mit Retinsäure. Eine Retinsäure-bedingte Hauttoxizität äußert sich bei den Patienten in Form von trockener und schuppender Haut, Cheilitis, Konjunktivitis und erythematöser makulopapulöser Effloreszenz¹¹⁸. Generell besitzen Retinsäuren im Vergleich zu

synthetischen Retinoiden ein höheres Differenzierungspotenzial^{102; 103}. Bezüglich der Wachstumshemmung wird unter den Retinsäure-Molekülen der 9-*cis* Retinsäure ein größeres Potenzial zugeschrieben als der *all-trans* und 13-*cis* Retinsäure^{106; 107}.

5.2.2 Retinoid-induzierte Arretierung von Neuroblastomzellen

Der Nachteil eines MTT-Proliferationstests liegt in der Bestimmung der Zellviabilität, die auf der Proportionalität aus Farbstoffbildung und Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen in vitalen Zellen beruht¹⁸⁵. Eine mögliche Retinoid-bedingte Reduktion der Stoffwechselrate während der Differenzierung könnte eine scheinbare antiproliferative Wirkung der Reagenzien vortäuschen. Aus diesem Grund wurde die wachstumshemmende Wirkung beider Retinoide zusätzlich in einer Generationsanalyse untersucht. Anhand dieser durchflusszytometrischen Methode, die von der intrazellulären Stoffwechselsituation unabhängig war, ließen sich in den mit ATRA und 4-HPR kultivierten Neuroblastomzellen weniger Tochtergenerationen nachweisen (Abbildung 4-3, A und B). Eine mögliche Reduktion der Stoffwechselrate, die während einer Differenzierung von unreifen Zellen einhergehen kann, hatte somit den antiproliferativen Effekt durch die beiden Retinoide im MTT-Proliferationstest nicht vorgetäuscht. Natürliche und synthetische Retinoide besaßen ein wirksames antiproliferatives Potenzial. Anhand einer Zellzyklusanalyse äußerte sich die antiproliferative Wirkung der Retinoide in einer gleich starken Zunahme des zellulären Anteils in der G1-Phase und unter gleichzeitiger Abnahme in der wachstumsfördernden S-Phase (Abbildung 4-4). Die im Vergleich zu ATRA stärkere Wachstumshemmung durch 4-HPR war somit nicht durch eine stärkere Arretierung in der G1-Phase gekennzeichnet. Bei beiden Retinoiden resultierte die inhibitorische Wirkung aus einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase und einem gleichzeitigen Replikations-Stopp. Der Mechanismus dieser Wachstumshemmung innerhalb von differenzierten Neuroblastomen wurde bereits Anfang der 90er Jahre durch Gaetano²³⁸ als auch Giannini⁹³ beschrieben. Die Hemmung der Proliferation von Neuroblastomen durch Retinsäure wird vorrangig durch eine herunterregulierte Expression von Cyclin D1 und Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinasen (*cdks*; *cyclin D-dependent kinases*) gesteuert²³⁹. Zellzyklus-regulierende Proteine wie die Cyclin-abhängigen Kinasen Cdc2²⁴⁰ und Cdc25A²⁴¹, die Cycline A²⁴², D1 und E²⁴³ sowie der an der Apoptose beteiligte Tumorsuppressor p53 stehen in der Expression unter dem Einfluss des onkogenen Transkriptionsfaktors c-MYC²⁴⁴. Im Vergleich zur Arretierung der Zellen in der G2-M-Phase des Zellzyklus durch den aus 4-HPR gebildeten Metaboliten 4-Oxo-4-HPR erfolgt durch 4-HPR und ATRA ein Proliferations-Stopp durch einen Arrest in der G1-Phase²⁴⁵. Bei den ursprünglich malignen Neuroblastomzellen SH-SY5Y handelt es sich um einen c-MYC-positiven Zellklon der Zelllinie SK-N-SH, der ehemals aus einem MYCN-negativen Neuroblastom-Patienten etabliert wurde¹⁶⁰. Die Aufhebung dieses hoch malignen Charakters nach Stimulation mit den Retinoiden ließ sich mittels des Affymetrix Genchips HG-U133A und der Herunterregulierung von c-MYC interpretieren. Die Ausdifferenzierung und Arretierung war demnach unter anderem eine Folge der gemeinsamen herabregulierten Expression von c-MYC durch ATRA (Abbildung 4-6, A) und 4-HPR (Abbildung 4-7, A) sowie der Gene, die der Regulation dieses Transkriptionsfaktors unterlagen. Als Folge des herunterregulierten c-MYC wurde auch eine Suppression des Zellzyklus-steuernden Cyclin D1 detektiert, da es unter dem direkten Einfluss des onkogenen Transkriptionsfaktors c-MYC stand. Das Zellzyklus-regulierende und etwa 67 kDa große Proto-Onkogen c-MYC ist erstmals als das zelluläre homologe Protein zum retroviralen Onkogen v-MYC des Geflügelvirus MC29 (*avian myelocytomatosis virus strain 29*) beschrieben worden²⁴⁶. c-MYC ist Bestandteil der MYC-Familie, die zusätzlich aus den Proto-Onkogenen B-MYC, L-MYC, MYCN und s-MYC besteht und durchweg neoplastisches Potenzial besitzt²⁴⁷. Das auf Chromosom 8q24 lokalisierte c-MYC unterstützt durch

Translokation mit den Immunglobulin-Genen auf Chromosom 2, 14 und 22 innerhalb von B-Lymphozyten die Generierung von lymphoproliferativen Erkrankungen aus der Non-Hodgkin-Familie wie beispielsweise dem Burkitt-Lymphom²⁴⁸. Neben lymphoproliferativen Pathologien ist eine erhöhte c-MYC Expression ebenfalls im Lungen-²⁴⁹, Brust-²⁵⁰ und Colon-Karzinom²⁵¹ vorzufinden. Die Aktivierung der c-MYC Expression erfolgt durch die Signaltransduktion mittels des Tumorsuppressor-Proteins APC (*adenomatous polyposis coli*), welches negativ den Abbau des intrazellulären β -Catenin reguliert²⁵². Ein entscheidender Bindungspartner von c-MYC zur Ausbildung des genaktivierenden Heterodimers stellt das Protein Max²⁵³ mit seinem Antagonisten Mad²⁵⁴ dar. Unter dem Einfluss von c-MYC stehen auch die an der DNA-Metabolisierung involvierten Gene Dihydrofolat-Reduktase²⁵⁵ und Thymidin-Kinase²⁵⁶. Durch Induktion der Telomerase-Expression ist c-MYC auch an einer Stabilisierung der vollständigen DNA-Replikation beteiligt²⁵⁷. Die als Warburg-Effekt bezeichnete Form einer Laktat-Überproduktion ist ebenfalls das Ergebnis einer c-MYC-induzierten LDH-Überexpression²⁵⁸. Weiterhin ist bekannt, dass c-MYC die Expression der Gene für die Translations-regulierenden Faktoren eIF-2 und eIF-4E heraufreguliert²⁵⁹. c-MYC stellt somit auch für die stark proliferierenden Neuroblastome ein äußerst essentielles Proto-Onkogen dar, da es entscheidend in die Regulation von Zellzyklus, Apoptose, Translation sowie DNA- und Energie-Metabolismus involviert ist. Zur Aufrechterhaltung des malignen Wachstums wurde in allen Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien stets eine Expression von c-MYC oder MYCN, einem weiteren Mitglied der onkogenen MYC-Familie, vorgefunden (Abbildung 4-1, B und C). Innerhalb dieses „MYC-Dualismus“ wurde jedoch nie eine synchrone Expression von MYCN und c-MYC detektiert. Das MYC-Expressionsprofil verdeutlichte jedoch, dass die Expression eines MYC-Proteins zur Aufrechterhaltung der Malignität äußerst essentiell war. So konnte beispielsweise in Retinsäure-kultivierten und -differenzierten Neuroblastomzellen, die sich im Phänotyp durch eine Expression von CD54 auszeichneten, eine geringere Expression von c-MYC und MYCN (Abbildung 4-21) sowie eine stärkere Arretierung der Zellen in der G1-Phase beobachtet werden (Abbildung 4-18). Das 60 kDa große MYCN wird vorrangig im fortgeschrittenen Tumorstadium detektiert und korreliert zudem mit einer schlechteren Heilungsprognose^{23; 24; 25}. MYCN ist wie das Proto-Onkogen c-MYC der zellulären MYC-Familie zugehörig, die homolog zum viralen Geflügelvirus MC29 ist. Im Vergleich zu c-MYC und L-MYC besitzt MYCN onkogene und nicht onkogene Einflüsse auf neuronale Zellen, die sich auf Proliferation, Zellzyklus, Apoptose, Differenzierung, Angiogenese und genomischer Instabilität konzentrieren^{12; 260}. Unabhängig vom Alter und Tumorstadium ist eine Expression von MYCN oft mit einer raschen Tumorprogression und schlechten Prognose assoziiert¹⁰². Ähnlich wie c-MYC ist auch MYCN befähigt, das Wachstum von Neuroblastomen zu unterstützen. Innerhalb des Zellzyklus wird durch MYCN die G1-Phase verkürzt und die DNA-Synthese und Proliferationsrate von Neuroblastomen gesteigert^{261; 262}. Vergleichbar mit den Retinoiden kann mittels der Inaktivierung von MYCN der zelluläre Anteil in der Replikations-Phase (S-Phase) reduziert werden²⁶³. Mehrere Arbeitsgruppen beobachten zudem eine Assoziation von inaktiviertem MYCN mit einer Wachstumshemmung, Apoptose und Differenzierung von Neuroblastomen^{264; 265}. Neben dem Zellzyklus wird durch MYCN auch die Vaskularisierung durch Synthese der Angiogenese-induzierenden Wachstumsfaktoren bFGF (*basic fibroblastic growth factor*) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sowie eine Herunterregulierung von Inhibitoren der endothelialen Wachstumsfaktoren stimuliert²⁶⁶. Die Regulierung von Genen durch MYCN erfolgt ähnlich wie bei c-MYC durch Ausbildung eines aktiven heterodimeren MYCN-Max-Transkriptionsfaktors²⁶⁷ bzw. eines MYCN-Mad-Heterodimers, der hingegen mit der Repression einer Transkription verbunden ist²⁶⁸. Neben dem zellulären Retinsäure-Bindeprotein CRABP II wird auch MDM2 (*mouse double minute 2*) durch MYCN reguliert^{269; 270}. Trotz einer Reduktion von MYCN durch ATRA (Abbildung 4-21, B) ließ sich eine Induktion der CRABP II mRNA-Expression in Anwesenheit von Retinsäure in einem

zweiten MYCN-unabhängigen Signalweg induzieren (Abbildung 4-6, B). Das MYCN-regulierte MDM2 trägt ebenfalls entscheidend zum malignen Charakter eines Neuroblastoms bei, indem es durch Ubiquitinierung das Protein p53 inaktiviert und eine gezielte Apoptose verhindert²⁷¹. Wie andere Onkogene besitzt auch MYCN das Paradoxon sowohl Apoptose als auch eine entartete Proliferation von Tumorzellen zu generieren²⁷². Durch Überexpression von MYCN und der Herunterregulierung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L und der Induktion des proapoptotischen Proteins Bax kann neben dem Wachstum auch die Apoptose unterstützt werden^{273; 274}.

5.2.3 Intrazelluläre Homöostase und Signalwege von Retinoiden

Die antiproliferative Wirkung von Retinoiden auf Neuroblastome wird unter anderem durch den intrazellulären Retinsäurehaushalt und der Bindung von Retinoiden an spezifische Bindeproteine und Rezeptoren gesteuert. In der Klinik stellt die Resistenz von Neuroblastomen gegenüber einer Behandlung mit Retinoiden insbesondere durch die induzierte Metabolisierung ein zentrales Problem dar²⁷⁵. Auch das in der Therapie am häufigsten angewendete Isomer, die 13-*cis*-Retinsäure, unterliegt in Folge der intrazellulären Metabolisierung einer Umwandlung in *all-trans* Retinsäure²⁷⁵ und einem Abbau durch Cytochrome aus der CYP26-Proteinfamilie^{83; 84}. Gegenwärtig sind vier Retinsäure-inaktivierende Cytochrome aus der CYP26-Familie bekannt^{85; 86; 87}. Durch Metabolisierung von *all-trans* Retinsäure entstehen verschiedene Intermediate, die biologisch inaktiv sind und keine wachstumshemmende und Differenzierung-induzierende Funktion gegenüber Neuroblastomen ausüben²⁷⁶. Wie bereits von Reijntjes *et al.* publiziert wurde²⁷⁷, konnte in Neuroblastomzellen nach Behandlung mit ATRA im Gegensatz zu 4-HPR eine Induktion der beiden Retinsäure-inaktivierenden Enzyme Cytochrome P450RAI-1 und P450RAI-2 beobachtet werden (Abbildung 4-6, B; Abbildung 4-7, B; Abbildung 4-15, B). Mit Ausnahme von CYP26C1 kann neben *all-trans* auch 9-*cis* Retinsäure eine Cytochrom P450RAI-1 und P450RAI-2 mRNA-Expression induzieren^{277; 278}. Eine Korrelation zwischen der Zellviabilität und dem Cytochrom-Expressionsprofil konnte hingegen nicht gefunden werden, da sowohl Neuroblastom- als auch Ewing-Tumor-Zelllinien mit einer konstitutiven und zusätzlich ATRA-induzierten Cytochrom P450 mRNA-Expression keine geringere Sensitivität besaßen als die Tumorzellen, die erst nach Kultivierung mit Retinsäure das Cytochrom P450RAI-1 bzw. P450RAI-2 exprimierten (Abbildung 4-15, A; Abbildung 4-2, A und B). Neuroblastomzellen wie SH-SY5Y sind jedoch in der Lage, über eine fehlende basale jedoch drastische Überexpression des Cytochrom P450RAI-2 einen Mechanismus für Resistenz und Tumorregression zu entwickeln. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber *all-trans* Retinsäure unter anderem auch in dem variablen und individuellen Differenzierungsfortschritt begründet, da in ASCL1-inaktivierten und neuronal ausdifferenzierten Neuroblastomzellen eine stärkere basale Expression des Retinsäure-inaktivierenden Cytochrom P450RAI-2 vorlag (Abbildung 4-14, B). Die Metabolisierung von Retinsäure-Molekülen unter dem Einfluss der CYP26-Proteinfamilie stellt unbestritten eine zentrale Zielstruktur gerade in der Therapie von Retinoid-unsensitiven bzw. resistenten Neuroblastomen dar. Dem Problem einer Cytochrom-vermittelten Inaktivierung von Retinsäuren wird beispielsweise durch Inhibitoren wie Ketoconazol und Liarozol begegnet^{279; 280}. Mittels des unspezifischen CYP26-Inhibitors R116010 läßt sich beispielsweise *in-vivo* und *in-vitro* die Metabolisierung und Inaktivierung von *all-trans* Retinsäure blockieren²⁸¹. Die antiproliferative und Differenzierung-induzierende Wirkung von ATRA führt durch Erhöhung der Halbwertszeit zu einer gesteigerten Sensibilisierung der Neuroblastome²⁸². Darüber hinaus läßt sich der Effekt einer Inhibition der Metabolisierung von *all-trans* Retinsäure durch R116010 zusätzlich durch RNA-Interferenz der CYP26 mRNA-Expression steigern. Der Einsatz von Imidazol-basierenden Inhibitoren, wie zum Beispiel Ketoconazol, inhibiert ebenfalls die

Cytochrom-vermittelte Inaktivierung von *all-trans* Retinsäure und steigert somit auch die intrazelluläre Halbwertszeit und Empfindlichkeit der Neuroblastomzellen⁸⁶. In der Klinik kommt es neben dem Neuroblastom auch zur Behandlung der akuten promyeloischen Leukämie (APML) durch Retinoide¹¹⁰. Interessanterweise wird bei der Behandlung der APML mit *all-trans* Retinsäure die Differenzierung-induzierende Wirkung durch das synthetische Retinamid 4-HPR zusätzlich verstärkt²⁸³. Die Ursache liegt in einer 4-HPR-vermittelten Inhibition der Metabolisierung von *all-trans* Retinsäure durch die Cytochrom P450-Enzyme, wodurch sich die Halbwertszeit und biologische Aktivität der Retinoide erhöht. Weitere Untersuchungen zeigen zudem, dass 4-HPR das zelluläre Retinol-Bindeprotein CRBPI heraufreguliert und durch Bindung von Retinolen ebenfalls eine Steigerung der intrazellulären Halbwertszeit und Aktivität von Retinoiden herbeiführt²⁸⁴. Die intrazelluläre Metabolisierung und der Signalweg des synthetischen 4-HPR ist zur Zeit noch nicht vollständig geklärt. Unter anderem geht man jedoch auch von einer Hydrolysierung des synthetischen 4-HPR zu *all-trans* Retinsäure aus²⁸⁵. Im Gegensatz zu ATRA- (Abbildung 4-6, B) konnte in 4-HPR-kultivierten Neuroblastomzellen hingegen keine Induktion von Retinsäure-inaktivierenden Cytochromen identifiziert werden (Abbildung 4-7, B), obwohl bereits eine Metabolisierung des 4-HPR zum biologisch aktiven 4-oxo-4-HPR (4-oxo-N-(4-hydroxyphenyl)retinamid) und inaktiven 4-MPR (N-(4-methoxyphenyl)retinamid) durch Aktivierung des Cytochrom P450RAI-1 (CYP26A1) in einem Ovarialkarzinom beschrieben wurde²⁸⁶. Die ausbleibende Expression der Retinsäure-metabolisierenden Cytochrome in Anwesenheit von 4-HPR wäre eine mögliche Erklärung für die bedeutend höhere Empfindlichkeit der Neuroblastomzellen gegenüber dem synthetischen Retinamid, die im Vergleich zu der Behandlung mit ATRA aufgrund der basalen bzw. zusätzlich induzierten Cytochrom-Expression nur eine moderate oder geringe Sensitivität besaßen (Abbildung 4-2, B und D).

Nach Aufnahme oder Synthese werden Retinsäure-Moleküle an eine der beiden intrazellulären Retinsäure-Bindeproteine CRABPI und II gebunden, die einer Familie von zytoplasmatischen Proteinen mit Bindungsaffinität zu hydrophoben Liganden wie dem zellulär Retinol-bindenden Protein CRBPI und II, das Fettsäure-bindende Protein und das P2-Protein angehören²⁸⁷. Den beiden Bindeproteinen CRABPI und II wird für 9-*cis*- und 13-*cis*-Retinsäure eine höhere Affinität als für *all-trans* Retinsäure zugeschrieben^{77; 78; 88}. Während CRABPI bereits konstitutiv in Neuroblastomzellen exprimiert wird, läßt sich die CRABPII-Expression ähnlich wie die Cytochrome P450RAI-1 und P450RAI-2 durch diverse Retinsäure-Isomere induzieren^{278; 288; 289; 290}. Eine Auswertung des Affymetrix Genchips HG-U133A identifizierte ebenfalls eine Heraufregulierung der CRABPII mRNA-Expression durch die natürliche *all-trans* Retinsäure und darüber hinaus auch vermindert durch das synthetische 4-HPR (Abbildung 4-6, B, Abbildung 4-7, B). Die induzierte Expression von CRABPII durch 4-HPR war überraschend, da mit Ausnahme von einigen Metabolisierungsprodukten für das synthetische Retinamid bisher keine erhöhte Bindungsaktivität zu den CRABPs beobachtet wird²⁹¹. Interessanterweise wird bei dem ebenfalls mit 4-HPR therapierten Ovarialkarzinom im Vergleich zu den Neuroblastomzellen keine Induktion der CRABPI und II mRNA-Expression *in-vitro* beobachtet²⁸⁶. Stattdessen wird ausschließlich die Induktion des Retinol-bindenden Proteins CRBPI, das ebenfalls keine Bindungsaffinität zu 4-HPR besitzt, beschrieben. Die drastische Überexpression von Retinsäure-bindenden Proteinen nach Behandlung mit Retinoiden ist möglicherweise als zelluläre Reaktion einer Stressphase in Neuroblastomzellen zu interpretieren. Fortgeschrittene Neuroblastome, die MYCN gehäuft als vielfache genomische Kopie besitzen oder exprimieren, können durch Bindung des Proto-Onkogens in die Promoterregion von CRABPII ohne Beteiligung von Retinsäure direkt eine Expression des Retinsäure-Bindeproteins induzieren²⁶⁹. Unabhängig von der eigentlichen Funktion eines Bindeproteins wird eine Coexpression von CRABPII sowohl bei prognostisch unvorteilhaften und MYCN-amplifizierenden Neuroblastomen als auch bei der Pathogenese des

Ovarialkarzinoms und des Brustkrebs diskutiert^{292; 293}. Grundsätzlich werden den beiden CRABPs deutliche funktionelle Unterschiede in der Signalübermittlung zwischen Retinsäuren und Retinsäure-Rezeptoren zugeschrieben. Während CRABPI die Funktion eines passiven Transporters ausübte, stellte CRABPII mehr einen aktiven Transporter mit direkt bindender und signalverstärkender Funktion zwischen Retinsäuren und Rezeptoren dar²⁹⁴. Die laut DNA-Microarray ausgebliebene Überexpression von CRABPI in Retinsäure-stimulierten Neuroblastomzellen könnte sich vorteilhaft auf die Entfaltung des wachstumsinhibierenden Potenzials auswirken, da sich beispielsweise die Retinsäure-induzierte Differenzierung von Teratokarzinomzellen entgegengesetzt proportional zur Expressionsstärke von CRABPI verhält²⁹⁵. Zusammen mit Retinsäuren bildet CRABPI einen Komplex, der zur Cytochrom-vermittelten Metabolisierung von ATRA in diverse biologisch inaktive Intermediate fungiert⁸⁸. Aus diesem Grund könnte neben dem Teratokarzinom auch die CRABPI-Expressionsstärke verstärkt die Cytochrom-induzierte Inaktivierung und somit die Halbwertszeit und biologische Wirkung von Retinsäuren in Neuroblastomen beeinflussen²⁹⁶. Anhand des aromatischen Retinoids Acitretin, das zusammen mit ATRA um eine Bindungsstelle an CRABPI konkurriert, kann beispielsweise die Halbwertszeit erhöht und die biologische Wirkung stabilisiert werden²⁹⁷. Obwohl Neuroblastomzellen nach Applikation von ATRA mit einer Heraufregulierung von Cytochromen reagierten, wurde das für die Inaktivierung essentielle CRABPI nicht induziert. Im Gegensatz zu CRABPI konnte bei CRABPII eine mehrfache Verstärkung des Expressionssignals in Anwesenheit von ATRA analysiert werden, die zur Entfaltung des wachstumsinhibitorischen Potenzial essentiell war. Aus diesem Grund wird auch eine Korrelation zwischen dem Verlust der CRABPII-Expression und der Resistenz eines Retinsäure-induzierten Wachstumsarrests von Brustkrebszellen beobachtet²⁹⁸. Dieser Befund wird jedoch kontrovers diskutiert, da eine andere Arbeitsgruppe keinen Zusammenhang zwischen einer ATRA-induzierten Arretierung von Brustkrebszellen und der konstitutiven bzw. induzierten Expression von CRABPII erkennt²⁸⁴. Letztlich führt jedoch auch beim Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches (HNSCC) eine Inaktivierung der CRABPII-Expression zur Abnahme eines Retinsäure-vermittelten Wachstumshemmung²⁹⁹. Obwohl CRABPII eine Verstärkung des RAR-abhängigen Signalweges durch Differenzierung und Wachstumshemmung unterstützt, wird einer konstitutiven Expression von CRABPI und II auch eine potenzielle Rolle in der Pathogenese von diversen Tumoren zugeschrieben³⁰⁰. Neben der metabolischen Funktion hat eine Überexpression von CRABPII auch Einfluss auf die Induktion des positiven Zellzyklus-unterstützenden Cyclin D1³⁰¹. Im Vergleich zum Normalgewebe werden beide CRABPs beispielsweise verstärkt exprimiert im Ovarialkarzinom und Brustkrebs vorgefunden^{292; 293}. Zudem korreliert eine Überexpression von CRABPII mit einer schlechteren Prognose des Wilms-Tumors³⁰². Eine Resistenz gegenüber einer Behandlung mit Retinsäure wurde auch bei der CRABPII-überexprimierenden APLM publiziert^{303; 304}. Möglicherweise unterschied sich die biologische Wirkung von ATRA und 4-HPR unter anderem auch in der unterschiedlich starken Aktivierung von CRABPII und damit verbunden in der niedrigeren Verstärkung des Retinsäure-Rezeptor-vermittelten Signals durch ein synthetisches Retinamid im Vergleich zu natürlichen Retinsäuren wie ATRA.

Neben dem Transport mit Bindeproteinen und der Metabolisierung durch Cytochrome spielt auch die Signalübertragung der Retinoide über spezifische Rezeptoren vom Typ RAR und RXR eine entscheidende Rolle für die Ausbildung der biologischen Wirkung. Für die Entfaltung der Wirkung von Retinsäuren ist die Expression und Bindung an Retinsäure-Rezeptoren der RAR- und RXR-Familie essentiell^{100; 289}. Während *all-trans* und *9-cis* Retinsäure gemeinsam an RARs binden, bleibt ausschließlich der *9-cis* Retinsäure eine Bindung an RXR-Rezeptoren vorbehalten^{98; 305}. Die Expression von Retinsäure-Rezeptoren kann sowohl in normalen Zelltypen³⁰⁶ als auch in neuroektodermalen Tumor-Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 4-15, A). In normalen Zelltypen wie Keratinozyten und Fibroblasten wird in Anwesenheit von Retinsäure ausschließlich

RARB induziert³⁰⁶. Aber auch in entarteten Melanomzellen³⁰⁷ lässt sich wie in Retinsäure-kultivierten Neuroblastomzellen im Vergleich zu den Rezeptoren RARA und RARG ausschließlich eine Induktion von RARB identifizieren (Abbildung 4-6, B; Abbildung 4-15, A). Die Retinsäure-vermittelte Heraufregulierung von RAR-Rezeptoren in Neuroblastomen wird bis heute kontrovers diskutiert. In der Mehrzahl der Publikationen wird ausschließlich eine Induktion des Rezeptors RARB beschrieben, jedoch nicht die der Retinsäure-Rezeptoren RARA und RARG^{288; 308; 309}. Dem gegenüber wird durch eine andere Arbeitsgruppe jedoch auch eine Heraufregulierung der RARA-Expression in den Neuroblastomzellen LA-N-5 identifiziert³¹⁰. Im Gegensatz zu ATRA blieb eine Induktion von RARB durch das synthetische 4-HPR weitestgehend aus (Abbildung 4-7, B), obwohl im Vergleich zur Retinsäure eine moderate Aktivierung des Rezeptors RARB als auch eine überdurchschnittlich starke Induktion des Rezeptors RARG beschrieben wird¹³¹. Eine 4-HPR-vermittelte Heraufregulierung des Retinsäure-Rezeptors RARA blieb wie bei der mehrheitlich beschriebenen Behandlung mit Retinsäuren aus. Eine erhöhte RARB-Expression korreliert zudem mit einer verstärkt apoptotischen und antiproliferativen Wirkung von 4-HPR auf Neuroblastomzellen. Da 4-HPR mit etwa 15% eine deutlich geringere Bindungskapazität zu den RARs aufweist als ATRA, läßt sich im Gegensatz zu 4-HPR in RARG-überexprimierenden Neuroblastomzellen durch ATRA auch eine stärkere Apoptose induzieren^{291; 311}. Da 4-HPR jedoch vorrangig Apoptose in *all-trans* und 9-*cis* Retinsäure-resistenten Tumoren induziert, müssen biologische Aktivitäten vorliegen, die unabhängig von Retinoid-Rezeptoren sind^{128; 229; 312}. Bei den untersuchten Neuroblastomzellen konnte wie schon bei den Cytochromen keine Korrelation zwischen RARA- und RARB-Expression und der wachstumsinhibitorischen Sensitivität gegenüber *all-trans* Retinsäure beobachtet werden. Für diesen Zusammenhang hätten sich besonders sensitive Neuroblastomzellen durch eine starke basale bzw. ATRA-induzierte Expression der Retinsäure-Rezeptoren im Vergleich zu den weniger empfindlichen Zelllinien auszeichnen müssen (Abbildung 4-2, Abbildung 4-15, A). Interessanterweise war die Expressionsstärke der RAR-Rezeptoren in CD54-differenzierten Neuroblastomzellen, die durch ATRA oder ASCL1-inaktivierende miRNAs induzierte wurde, kleiner als in den nicht ausdifferenzierten CD54-negativen Neuroblastomzellen (Abbildung 4-21; Abbildung 4-14, B). In der Differenzierung fortgeschrittenere Neuroblastome könnten durch die geringere Expression der Rezeptoren RARA und RARB beispielsweise einen Mechanismus entwickelt haben, der sie für eine Behandlung mit Retinsäure weniger sensitiv macht. Der aus der Differenzierung resultierende heterogene Charakter von Neuroblastomzellen und die damit verbundene differentielle Expression von RAR-Rezeptoren, könnte neben der diskutierten Metabolisierung mit verantwortlich für die häufig beschriebene Resistenz gegenüber Retinsäuren sein^{128; 229; 278}. Aufgrund Rezeptor-unabhängiger Mechanismen nimmt gegenwärtig 4-HPR einen festen Platz in der Therapie ein²²⁹. Der Umstand, dass RAR-Rezeptoren nicht effizient an die Retinsäure-Response-Elemente (RARE) binden, führte zur Suche und Identifikation der RXR-Rezeptoren, die als akzessorischer Aktivator die Bindung zwischen RAR und RARE verstärken^{313; 314}. Die nach Behandlung mit *all-trans* und 9-*cis* Retinsäure entstehende Generierung eines RAR-RXR Heterodimers bzw. RXR-RXR Homodimers ist beispielsweise mitverantwortlich für die in der Homöostase von Retinoiden verantwortlichen Proteine CYP26A1 und CRABP II^{315; 316}.

5.3 Retinoid-vermittelte Differenzierung von Neuroblastomzellen

Definitionsgemäß handelt es sich bei einem Neuroblastom um eine unreife blastoide Zelle des peripheren sympathischen Nervensystems, da es aus einer neuroepithelialen Vorläuferzelle der Neuralleiste hervorgeht^{103; 154; 155; 156; 157; 158; 159}. Die erstmals 1868 durch W. His beschriebene Neuralleiste entsteht während der Neurulation, hierbei gehen aus dem Ektoderm drei zelluläre

Regionen hervor, das neurale Ektoderm (Neuralplatte), das nicht neurale Ektoderm (Epidermis) und Zellen zwischen neuralem und nicht-neuralem Ektoderm (Neuralleiste). Die Neuralleiste entsteht durch Migration von neuronalen Zellen des in der dritten Woche der Embryonalentwicklung gebildeten Neuralrohrs³¹⁷. Neben den Wachstumsfaktoren BMP (*bone marrow protein*) und FGF (*fibroblastic growth factor*) haben auch Retinoide wie *all-trans* Retinsäure einen entscheidenden Anteil an der Bildung und Ausdifferenzierung der Neuralleiste^{318; 319; 320}. Die pluripotente Neuroepithelialzelle der Neuralleiste besitzt eine hohe Plastizität und läßt sich zu Zellen des peripheren Nervensystems (Neuronen und Gliazellen), Melanozyten und endokrinen Zellen ausdifferenzieren³²¹. In Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus des Neuroblasten unterscheidet man zwischen malignen (Neuroblastom) und benignen (Ganglioneurom, Ganglioneuroblastom) Neoplasien. Das Ungleichgewicht zwischen differenzierten und undifferenzierten Neuroblastomen wurde bereits 1927 durch Cushing und Wohlbach beschrieben³²². Neuroblastome sind in ihrem Status der Differenzierung sehr instabil und daher variabel¹⁵⁷. Überhaupt zeigt das Neuroblastom durch die Expression der Gene CD117, Notch und humanes ASCL1 weniger den Phänotyp einer muren sympathischen Zelle sondern mehr eine Charakteristik unreifer embryonaler und Neuralleisten-ähnlicher Zellen^{207; 323}. Auch das Tumorstadium und damit die Amplifikation des Proto-Onkogens MYCN spielt eine entscheidende Rolle im Differenzierungsstatus dieses unreifen soliden Tumors³²⁴. *All-trans* Retinsäure ist von zentraler Bedeutung bei der Embryonalentwicklung, in dem es die primäre Neurogenese und spätere neuronale Spezialisierung unterstützt^{325; 326; 327; 328; 329; 330}. Die Wirkungsstätte von Retinsäure ist sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem verschiedener Säugetiere lokalisiert^{331; 332; 333; 334}. Eine Unterversorgung mit Retinoiden führt bei den verschiedensten Modellorganismen während der embryonalen Neurogenese zu schwerwiegenden neuronalen Defekten und Fehlbildungen^{335; 336}.

5.3.1 Delta-Notch-vermittelte Inaktivierung von ASCL1 in differenzierten Neuroblastomzellen

Als einer der potentesten Induktoren zur Reifung und Differenzierung von Neuroblastomen in neuronale Zellstrukturen wird *in-vitro* die Retinsäure beschrieben⁵¹. ATRA induziert in Neuroblastomen eine Differenzierung, die unter anderem mit Wachstumsarrest, Neuritenwachstum und Herunterregulierung von MYCN verbunden ist^{212; 337}. Von zentraler Bedeutung für die Ausdifferenzierung eines unreifen Neuroblasten zu Neuronen oder Gliazellen stellt der Delta-Notch-Signalweg dar, der aus einem sehr komplexen Geflecht von intrinsischen und extrinsischen Signalen besteht^{202; 203; 204; 205; 206; 207; 208}. Ursprünglich beschreibt dieser Signalweg in *D. melanogaster* ein Modell für die Regulation von Oogenese, Melanogenese und Metamorphose²⁰¹. Die Delta-Notch-Signaltransduktion stellt im Laufe der Evolution eine hochkonservierte Struktur dar³³⁸. Der *notch*-Genloкус wurde bereits 1919 in *D. melanogaster* beschrieben³³⁹. Ein teilweiser Verlust der *notch*-Aktivität führt zu den namensgebenden Einschnitten in den Flügelrändern (*engl.: notches*) der Fruchtfliege. Gegenwärtig ist die Funktion der Notch-Gene als Signalrezeptor für die Differenzierung der Zellen während der Morphogenese von Insekten und Säugetieren bekannt²⁰². Durch die Notch-gesteuerte Entwicklung von diversen Organen ist bei Veränderung auch eine Beteiligung an verschiedenen Krankheiten zu beobachten. So verursachen beispielsweise Mutationen im Notch-3-Gen das CADASIL-Syndrom (Cerebrales Autosomales Dominantes Arteriopathiesyndrom mit Subcorticaler Infarkt und Leukoencephalopathie), das auf Fehlbildungen der glatten Gefäßmuskulatur basiert³⁴⁰. Eine Notch-beteiligte Translokation bei der akuten lymphoblastischen Leukämie (T-ALL) wird ebenfalls beschrieben³⁴¹. Die Differenzierungsinduktion zwischen zwei benachbarten Zellen beginnt in *D. melanogaster* jeweils mit der initialen Expression der Liganden *delta* oder *serrate*

und der Bindung an den einzigen *notch*-Rezeptor³⁴². Dem gegenüber werden in *H. sapiens* die homologen Rezeptoren Notch-1, -2, -3 und -4 exprimiert^{343; 344; 345}. In *H. sapiens* werden mit hoher Homologie zum *delta* aus *D. melanogaster* die Liganden Delta-like 1 (DLL1), DLL3, DLL4 und DLK1 vorgefunden. Ein Sequenzvergleich ergab eine starke Homologie des humanen DLK zu den Genen *delta*³⁴⁶, *serrate*³⁴⁷ und *notch*³⁴⁸ aus *D. melanogaster*. Der weitere *notch*-bindende Ligand *serrate* aus *D. melanogaster* ist homolog zum humanen Jagged-1 und -2³⁴⁹. Als Folge der Aktivierung von *notch* kommt es zu einer Abspaltung der intrazellulären Domäne (NICD), die innerhalb des Zellkerns zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *Suppressor of hairless*, der Histon Acetyl-Transferase und dem Zellkernprotein *Mastermind* einen Komplex bildet, der wiederum die Transkription der Gene *Enhancer of Split* und *hairy* induziert^{350; 351}. Diese Transkriptionsfaktoren mit Helix-Loop-Helix (HLH)-Struktur stellen einen negativen Regulator der proneuralen HLH-Proteine *achaete* und *scute* dar, die beispielsweise für die Entwicklung der sensorischen Härchen verantwortlich sind³⁵². Im Vergleich zum *hairy* aus *D. melanogaster* werden in *H. sapiens* die Transkriptionsfaktoren HES-1 bis -10 (*hairy and enhancer of split complex*) exprimiert^{353; 354; 355}, die im Fall von HES-1 die Expression des humanen *achaete-scute complex homolog 1* (HASH1) unterdrückt und eine neuronale Differenzierung initiiert^{356; 357}. Die Wirkung des transkriptionellen Repressors HES-1 erfolgt über die Bindung an das Motiv CACGCG des *achaete*-Promoters³⁵⁸ oder durch eine negative Selbstregulation und Bindung an die N-Box (CACNAG) des HES-1 Promoters³⁵⁹. Ursprünglich wurde das ASCL1 der Säuger (MASH1, *mammalian achaete-scute complex homolog 1*) aus einer immortalisierten sympathoadrenalen Vorläuferzelle aus *Rattus norvegicus* kloniert, das den proneuralen *achaete-scute* Genen aus *D. melanogaster* homolog ist³⁶⁰. Das aus neuroendokrinen Tumoren klonierte humane ASCL1³⁶¹ wird während der Embryogenese in spezifischen Phasen der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems nachgewiesen^{360; 362; 363; 364}. Darüber hinaus konnte für das murine ASCL1 bisher gezeigt werden, dass es vor allem in der frühen Embryonalentwicklung im Neuroepithel des Mittel- und Vorderhirns³⁶⁵, im sich entwickelnden olfaktorischen Epithel³⁶⁶ und in neuroendokrinen Zellen der Lunge exprimiert wird³⁶⁷. Als Initiatoren einer Differenzierung konnte neben Retinoiden auch der Phorbolster TPA identifiziert werden²¹². Übertragen aus dem Modell von *D. melanogaster* konnte auch in Neuroblastomzellen sowohl nach einer Behandlung mit einem natürlichen Retinoid wie *all-trans* Retinsäure als auch dem synthetischen 4-HPR eine Differenzierung erzeugt werden, die durch Reduktion des proneuralen humanen ASCL1 und DLK1 induziert wurde (Abbildung 4-6, A; Abbildung 4-7, A). Als Folge der Differenzierung von unreifen Neuroblastomzellen konnten unter anderem auch Zell-Zell-Kontakte in Form fein ausgebildeter und quervernetzter Neuriten-ähnlicher Ausläufer, vergleichbar mit Neuronen des zentralen Nervensystems, beobachtet werden (Abbildung 4-9, B)^{52; 368; 369}. Eine konstitutive Expression des Transkriptionsfaktors ASCL1 wird vorrangig in unreifen Vorläuferzellen der Neuralleiste des autonomen Nervensystems, inklusive sympathischer und parasympathischer Abschnitte, und damit in nativen Neuroblastomen und verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien als auch in normal differenzierten neuronalen Geweben (Abbildung 4-10) detektiert^{155; 209; 210}. DLK1 wurde hingegen verstärkt in nicht neuronalen Geweben detektiert (Abbildung 4-10). Im Verlauf von sich ausdifferenzierenden Neuroblastomzellen wird als zelluläre Antwort auf ein Differenzierungs-induzierendes Retinoid stets ASCL1 herunterreguliert^{207; 208; 209; 210; 211; 212}. Im Vergleich zu den Ewing-Tumorzellen ließ sich ausschließlich in Neuroblastomzellen eine konstitutive und nach Behandlung mit ATRA reduzierte ASCL1 mRNA-Expression nachweisen (Abbildung 4-8, A)^{360; 361; 364}. Während sich in 66% der nativen Primärtumoren eine konstitutive ASCL1-Expression nachweisen läßt, zeigen Neuroblastome mit einer fehlenden transienten ASCL1-Expression eine Resistenz gegenüber Retinsäure²⁰⁹. Das basale ASCL1-Expressionsprofil ließ hingegen keine Korrelation zu den unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Neuroblastomzellen gegenüber

ATRA erkennen. Im Gegensatz zum unveränderten Notch-2 wurde auch der für die Initiation der Delta-Notch-Signaltransduktion notwendige Ligand DLK1 wie ASCL1 basal in diversen Neuroblastomzellen exprimiert und nach Behandlung mit dem natürlichen Retinoid fast vollständig unterdrückt (Abbildung 4-8, A) ^{368; 370; 371}. Während eine basale HES-1 mRNA-Expression vor allem in den Ewing-Tumor-Zelllinien vorzufinden war, wurde in Anwesenheit von ATRA auch in Neuroblastomzellen der für die Inaktivierung des humanen ASCL1 negative Regulator HES-1 induziert. Während eine transient erhöhte HES-1 Aktivität in der erniedrigten ASCL1-Expression involviert ist, zeigt hingegen eine konstitutive Expression von Notch-1 und die daraus resultierende Aktivierung des HES-1 Promoters eine Inhibition der Differenzierung ²⁰⁷. Interessanterweise wurden die in den Delta-Notch-Signalweg involvierten Gene sowohl durch ATRA als auch 4-HPR während der Differenzierungsphase synchron reguliert (Abbildung 4-8, B), obwohl dem 4-HPR ^{109; 129; 130} im Vergleich zur Retinsäure ^{208; 209; 210; 212} bis heute eher eine antiproliferative Wirkung durch Apoptose statt Differenzierung zugeschrieben wird.

In *D. melanogaster* lässt sich die Differenzierung von unreifen neuronalen Zellen während der Neurogenese anhand der drei *notch*-abhängigen Modelle: 1. Laterale Inhibition, 2. Zelllinien-Entscheidung und 3. Grenzbildung näher beschreiben ³⁷². Das auf Säugetiere übertragbare Modell der lateralen Inhibition (Abbildung 5-1) aus *D. melanogaster* und *R. norvegicus* geht dabei von einer Differenzierungsinduktion zwischen zwei benachbarten Zellen A und B aus ^{201; 203}.

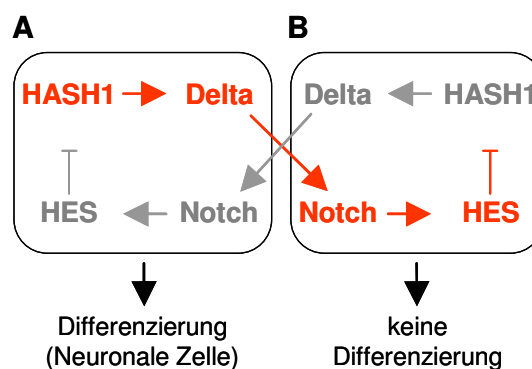


Abbildung 5-1: Vereinfachtes Modell der lateralen Inhibition (van Limpt *et al.*, 2005). In zwei benachbarten unreifen Neuroblastomzellen A und B, die beide aus der Neuralleiste hervorgehen, wird anhand eines aktiven Delta-Notch-Signalweges (rote Markierung) eine Differenzierung durch eine Initialzelle A ausgelöst. Nach Bindung von Delta aus der Initialzelle A an den benachbarten Notch-Rezeptor wird innerhalb der passiven Zelle B aufgrund der Aktivierung von HES und der Herunterregulierung des proneuralen Gens HASH1 keine Differenzierung stimuliert. Durch das fehlende Delta in Folge der HASH1-Herunterregulierung bleibt eine Aktivierung von Notch und eine Supprimierung von HASH1 in der Initialzelle A aus. Diese zelluläre Antwort der Notch-aktivierten Zelle B und die ausbleibende Rückaktivierung der Initialzelle A durch die fehlende Bindung von Delta an Notch symbolisiert der graue Signalpfad. Im Gegensatz zur Zelle B kommt es aufgrund des vorhandenen proneuralen Gens HASH1 zur neuronalen Differenzierung in der Initialzelle A.

Das Modell der lateralen Inhibition besteht darin, dass sich nur eine einzige Zelle aus einem proneuronalen Cluster in eine neuronale Vorläuferzelle entwickelt, die weiter in eine Haarzelle differenzieren kann. Durch Expression von *delta* in der neuronalen Vorläuferzelle A wird in der benachbarten Zelle B *notch* aktiviert, die wiederum zur Repression proneuronaler Gene führt. Mathematische Modelle postulieren zudem eine Festlegung der Größe eines Zellclusters in Abhängigkeit des *notch*-signals, da mit Zunahme der Zellzahl eines Clusters auch die durchschnittliche *notch*-Signalaktivität ansteigt ³⁷³. Dieses Modell der Notch-vermittelten neuronalen Differenzierung kann auch während der humanen Embryogenese beobachtet werden ^{207; 210; 211; 238; 374}. Bei der Zelllinien-Entscheidung wird während der Zellteilung der *notch*-Inhibitor *numb* asymmetrisch weitergegeben. Während die *numb*-haltige Tochterzelle weiterhin als Vorläuferzelle verharrt, differenziert die andere Tochterzelle durch das aktive *notch* beispielsweise in eine Muskelzelle aus ³⁷⁵. Die *notch*-regulierte Grenzbildung wird beispielsweise

zur Abgrenzung verschiedener Zellpopulationen auf der dorsoventralen Achse während der Flügelbildung in *D. melanogaster* durch laterale Induktion beobachtet. Im Gegensatz zu den ventralen Zellen wird in dorsalen Zellen die *serrate*-vermittelte Aktivierung von *notch* durch stärkere Expression des Inhibitors *fringe* verhindert³⁷⁶.

Der Effekt einer Retinoid-ähnlichen Differenzierungsinduktion in unreifen Neuroblastomen konnte *in-vitro* auch durch direkte Inaktivierung von ASCL1 und der Regulation der in den Delta-Notch-Signalweg involvierten Gene beobachtet werden (Abbildung 4-14, B). Darüber hinaus ließ sich erstmals *in-vitro* durch eine direkte, Retinoid-unabhängige und transiente Inaktivierung von ASCL1 (Abbildung 4-11, D) eine neuronale Ausdifferenzierung von Neuroblastomzellen erzeugen, die sich phänotypisch durch Induktion von CD54 äußerte^{105; 377}. Im Vergleich zu den Retinoid-differenzierten Neuroblastomzellen (Abbildung 4-9, B) konnte durch die direkte Retinoid-unabhängige Inaktivierung von ASCL1 keine morphologische Veränderung in Form Neuriten-ähnlicher Ausläufer identifiziert werden (Abbildung 4-14, A)⁵². Trotz der gemeinsamen Herunterregulierung von ASCL1 und DLK1 konnte ausschließlich in ATRA- im Vergleich zu 4-HPR-kultivierten Neuroblastomzellen das Antigen CD54 induziert werden (Abbildung 4-6, Abbildung 4-7, Abbildung 4-16, Abbildung 4-17). Das stetige Ungleichgewicht von differenzierten und undifferenzierten Neuroblastomzellen ist eine mögliche Ursache für den abweichenden Expressionsnachweis einiger Zelllinien in der RT-PCR und dem Durchflusszytometer³²². Ein damit verbundener Effekt ist unter anderem die spontane Remission von Neuroblastomen des Stadium IVs durch plötzliche Ausdifferenzierung sowie die unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber einem Retinoid¹⁵⁷. Bis heute wird CD54 beständig als phänotypischer Marker einer vollzogenen Differenzierung von Neuroblastomzellen beschrieben^{105; 377; 378; 379}. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass insbesondere CD54-differenzierte Neuroblastomzellen gegenüber der depletierten Population im Wachstum durch einen Arrest in der G1-Phase gehemmt wurden (Abbildung 4-18). Diese Arretierung verhinderte den Eintritt in die S-Phase und somit die fortschreitende Teilung der Zellen²⁴⁵. Hauptverantwortlich dafür war unter anderem das Gen c-MYC, das durch ATRA und 4-HPR supprimiert wurde (Abbildung 4-6, Abbildung 4-7) und als Zellzyklus-regulierender Transkriptionsfaktor die Expression von Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen und p53 steuert^{239; 240; 241; 242; 243; 244}. Diese Beobachtungen korrelierten jedoch nicht mit der gemeinsamen, jedoch insgesamt schwächeren Reduktion von c-MYC in CD54-differenzierten Neuroblastomzellen als in undifferenzierten und CD54-depletierten Zellen (Abbildung 4-20). Letztlich wurden jedoch auch stabil ASCL1-inaktivierte und CD54-überexprimierende Neuroblastomzellen von einer Reduktion der proliferationsunterstützenden Gene c-MYC, MYCN und Cyclin D1 begleitet (Abbildung 4-14, B). Die stärkere Proliferationshemmung in CD54-differenzierten Neuroblastomzellen könnte unter anderem auch eine Folge der geringeren Cytochrom P450RAI-2 mRNA-Expression sein (Abbildung 4-21, A und B), da durch Steigerung der Halbwertszeit die biologische Wirkung der Retinsäure länger aufrecht erhalten wurde. Ähnliche Effekte zeigen sich beim Einsatz von Cytochrom-unspezifischen Inhibitoren wie Ketoconazol und Liarozol^{279; 280}, die ebenfalls die biologische Wirkung von Retinsäuren durch Hemmung der Metabolisierung verstärken^{86; 281; 282}. Die intensivere Wachstumshemmung der CD54-positiven Neuroblastomzellen schien zudem nicht mit der Expression der Rezeptoren zu korrelieren, da RARA und RARB in CD54-depletierten Zellen stärker induziert wurde (Abbildung 4-21, A und B). Bislang konnte eine stärkere Wirkung von Retinoiden nur in RARG-überexprimierenden Neuroblastomzellen beobachtet werden³¹¹. Die wachstumshemmende und arretierende Wirkung sowie die Überexpression von CD54 waren die Folge einer Differenzierung der unreifen Zellen durch Kultivierung mit Retinoiden^{105; 239}. Darauf aufbauend wurde jedoch erstmals die unterschiedliche Verteilung und der Arrest in Abhängigkeit von der CD54 Expression ausdifferenzierter Neuroblastomzellen beschrieben.

5.3.2 CTLs-induzierte Bystanderlyse von CD54-differenzierten Neuroblastomzellen

Durch Retinsäure wurde neben Wachstumshemmung und Differenzierung auch die immunogene Wirkung gegenüber zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) anhand der Induktion von CD54 auf Neuroblastomzellen gesteigert. Ursprünglich wurde das Oberflächenantigen CD54 als Rezeptor für das Leukozyten-Integrin LFA-1 und Mac-1 beschrieben^{380; 381; 382}. Darüber hinaus fungiert CD54 (ICAM-1) als ein interzelluläres Adhäsionsmolekül, das über den spezifischen Liganden LFA1 (Lymphozyten-Funktionsantigen 1) in Form eines engen Zell-Zell-Kontaktes beispielsweise mit CTLs in Wechselwirkung tritt. Solchen zytotoxischen Effektormechanismen ist gemeinsam, dass sie durch einen sehr engen Zellkontakt zwischen T-Zelle und erkannter Zielzelle eine äußerst selektive Wirkung erzielen und als fremd identifizierte Zellen durch mehrere Zell-Zell-Kontakte eliminieren können. So werden beispielsweise über den HLA-Klasse I-Komplex CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert. Trotz dieser postulierten Selektivität läßt sich in verschiedenen Modellen auch eine noch nicht detailliert verstandene unspezifische Bystanderlyse von Zellen beobachten, die keiner HLA-Restriktion unterliegt. Diese unspezifische Lyse von Zellen, wie sie beispielsweise durch Infiltration von Lymphozyten in den Tumor *in-vivo* vorkommen kann, ist gehäuft bei sich reziprok selbst aktivierenden zytotoxischen T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 oder eines Peptides zu beobachten. Hierbei kommt es zu einer CTLs-vermittelten Lyse von Zellen, die sich in direkter Nachbarschaft aktivierter CTLs befinden und für die ursprüngliche Aktivierung der Lymphozyten nicht verantwortlich sind¹⁸⁹. Bei den als CTLs fungierenden 10BK.1-Zellen handelt es sich um einen murinen zytotoxischen T-Zellklon aus CD8⁺ T-Lymphozyten, der in Abwesenheit von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) über eine eigene reziproke Präsentation des OVA-spezifischen Octapeptides SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) proliferiert^{169; 187; 188}. Die durch *all-trans* Retinsäure heraufregulierte Expression von CD54 auf Neuroblastomzellen induzierte in Anwesenheit von Interleukin-2 eine massive 10BK.1-vermittelte Zelllyse (Abbildung 4-19). Mit Hilfe von CD54 können Tumorzellen in einen engeren Kontakt mit den LFA1-exprimierenden CTLs treten und die immunogene Wirkung durch eine nicht HLA-restringierte Zelllyse erhöhen. Ähnliche Effekte zeigen sich bei einer HLA-unabhängigen Bystanderlyse von Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen, die durch aktivierte zytotoxische Lymphozyten vom Typ BK282 (EBV-peptidspezifischer und HLA-Klasse I-restringierter CD8⁺ T-Zellklon) ohne Anwesenheit des spezifischen Peptides vermittelt werden. Auch hier erhöht Retinsäure die Empfindlichkeit der Neuroblastomzellen gegenüber einer Lyse mit CTLs, die nicht einer HLA-Restriktion unterliegt. Als mögliche Mediatoren einer nicht HLA-restringierten Bystanderlyse werden unter anderem die Rezeptoren für Fas, TRAIL und TNF diskutiert. Möglicherweise resultiert die geringere Bystanderlyse der Ewing-Tumor-Zelllinien im Vergleich zu den Neuroblastomzellen (Abbildung 4-19), trotz der gemeinsamen Expression von CD54 (Abbildung 4-16, Abbildung 4-17), aus unterschiedlichen Signalwegen der genannten Rezeptoren. Darüber hinaus kann neben der HLA-unabhängigen Bystanderlyse auch bei Retinsäure-behandelten und HLA-Klasse I überexprimierenden Neuroblastomzellen eine spezifische Lyse durch Peptid-restringierte CD8⁺ CTLs beobachtet werden. Die dafür notwendige Induktion von HLA-Klasse I wurde ebenfalls in Retinsäure-stimulierten Neuroblastomzellen beobachtet (Abbildung 4-5). Auf diese Weise steigern Retinoide ebenfalls die HLA-Klasse I-restringierte peptidspezifische Zelllyse von Neuroblastomzellen durch CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten³⁸³. Durch Überexpression der Oberflächenmoleküle CD54 und HLA-Klasse I bieten sich bessere therapeutische Zielstrukturen auf Neuroblastomzellen an und sensibilisiert diese für eine gezieltere zytotoxische Immunantwort³⁸⁴. Das Adhäsionssystem zwischen CD54 und LFA-1 spielt somit eine entscheidende Rolle, T-Lymphozyten an die Zielzellen (Tumorzellen) zu binden, um bei einer Abwesenheit von antigenpräsentierenden HLA-Klasse II-Molekülen eine T-Zell-vermittelte Zytotoxizität zu induzieren^{385; 386}. Eine Coexpression von CD54 und HLA-Klasse I ist für eine Bindung mit autologen T-Lymphozyten essentiell^{387; 388}. Weiterhin wurde

bereits gezeigt, dass Tumorzellen, die einer Zytokin-induzierten Überexpression von CD54 unterliegen, für eine Lyse durch infiltrierte Lymphozyten, Monozyten und Natürliche Killerzellen sensibilisiert werden^{389; 390}.

5.3.3 Phänotypisierung von CD54-differenzierten Neuroblastomzellen

Grundsätzlich kann durch Einwirkung von Retinsäure eine Differenzierung von Neuroblastomzellen zu einem Neuronen- und Fibroblasten- bzw. Epithelialzell-ähnlichen Phänotyp beobachtet werden^{391; 392}. Der Entwicklungsfortschritt von differenzierten Neuroblastomzellen wird unter anderem über die Expression von CD54 definiert^{105; 377; 379}. Bezüglich der Gesamtpopulation war die Induktion von CD54 jedoch unvollständig. Demzufolge entstanden zwei verschiedene Populationen, die sich mittels einer magnetaktivierten Zellseparation mit hoher Reinheit voneinander trennen ließen (Abbildung 4-20, A). Interessanterweise wurde jedoch in den CD54-differenzierten Neuroblastomzellen, die sich zugleich durch eine essentielle Reduktion der proneuronalen Gene ASCL1 und DLK1 auszeichneten, eine geringere Expression der Neuronen-spezifischen Gene für Neurofilament-H (NF-H), -F (NF-L) und -M (NF-M) sowie Synaptophysin (SYP) identifiziert als in den depletierten Zellen (Abbildung 4-22, A und B). Aufgrund der vorrangig in Neuronen exprimierten Neurofilamente, die neben Vimentin (Mesenchymalzellen), Keratin (Epithelzellen), GFAP (Gliazellen) und Desmin (Muskelzellen) Bestandteil der zytoplasmatischen Intermediärfilamente sind³⁹³, und des in synaptischen Vesikeln lokalisierten Synaptophysins³⁹⁴, besaßen die CD54-depletierten Neuroblastomzellen einen stärker ausgeprägten neuronalen Phänotyp als die CD54-differenzierten SH-SY5Y-Zellen. Auch die Neuroblastomzellen, die zu einer Differenzierung durch direkte Inaktivierung von ASCL1 angeregt wurden, exprimierten CD54 drastisch herauf und gleichzeitig die neuronalen Marker für Neurofilament sowie Synaptophysin herunter (Abbildung 4-14, B). Aufgrund der konstitutiven Expression dieser neuronalen Proteine in unreifen Neuroblastomzellen lässt der Retinoid-abhängige Entwicklungszustand eines differenzierten Neuroblastoms sich nicht über diese Gene eindeutig phänotypisieren^{395; 396}. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass periphere neuroblastische Tumore wie das Ganglioneuroblastom und Ganglioneurom neben dem Neuroblastom bereits auch eine molekulare Charakteristik von reifen neuronalen und neuroendokrinen Zellen besitzen, da sich sowohl Synaptophysin als auch verschiedene Neurofilamente nachweisen lassen³⁹⁷. Vielmehr besaßen CD54-selektionierte Neuroblastomzellen durch Anwesenheit des basischen Myelinproteins (MBP) und sauren Gliafaserproteins (GFAP) einen stärker ausgeprägten Gliazell-ähnlichen statt Neuronen-ähnlichen Phänotyp. Zwei Subtypen von Gliazellen stellen die Astrozyten (Astroglia) und die Oligodendrozyten (Oligodendroglia) dar. Die Oligodendrozyten sind nur im Zentralen Nervensystem (ZNS) vorzufinden und besitzen Zellfortsätze aus Myelinhaltigen Markscheiden. Myelin fungiert hierbei als elektrischer Isolator durch Umhüllen der Axone von Nervenzellen. Das basische Myelinprotein ist ein charakteristischer Marker für Oligodendrozyten, dessen Funktion bis heute nicht aufgeklärt ist³⁹⁸. Die Mehrheit der Gliazellen wird durch Astrozyten gestellt, deren sternenförmige Fortsätze eine membranähnliche Struktur zur Abgrenzung an Gehirnoberfläche und Blutgefäße bilden. Astrozyten regulieren vorrangig über die Steuerung von K⁺-Ionen den pH-Haushalt im Gehirn. Durch exozytotische Freisetzung von Glutamat und Aktivierung von Neuronen wird den Astrozyten ebenfalls eine Funktion bei der Informationsverarbeitung zugeschrieben. Das saure Gliafaserprotein stellt einen spezifischen Marker für Astrozyten dar³⁹⁹. Die gegenüber den Kontrollzellen reduzierte und den CD54-negativen Neuroblastomzellen erhöhte Expression des Gliazell-spezifischen GFAP nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure konnte auch in stabil ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen beobachtet werden (Abbildung 4-14, B). Ähnlich wie die Neurofilamente und

das Synaptophysin lässt sich auch GFAP und MBP bereits in unreifen Neuroblastomen, Ganglioneuroblastomen und Ganglioneuromen nachweisen³⁹⁷. Die Heterogenität eines Neuroblastoms zeichnet sich zudem durch gleichzeitige Anwesenheit von Neuronen- und Gliazell-spezifischen Genen in allen Entwicklungsphasen eines sich ausdifferenzierenden Neuroblastoms aus⁴⁰⁰. Somit stellen auch GFAP und MBP nur einen ungenügenden Marker dar, der den Differenzierungsfortschritt unreifer Zellen beschreibt. Interessanterweise war eine gleichzeitige Expression von Synaptophysin und Neurofilament für einen neuroendokrinen bzw. neuronalen Phänotyp mit einer Coexpression der Gliazellmarker GFAP und MBP ausschließlich bei Ganglioneuroblastomen und Ganglioneuromen zu beobachten. In Neuroblastomzellen wurden hingegen nicht gleichzeitig neuronale und Gliazell-spezifische Gene exprimiert vorgefunden. Auch die mit Retinsäure kultivierten und anschließend CD54-selektionierten Neuroblastomzellen zeigten stets ein gegenläufiges Expressionsprofil. Darüber hinaus konnte sowohl in ASCL1-inaktivierten und CD54-differenzierten als auch *all-trans* Retinsäure-kultivierten und CD54-selektionierten Neuroblastomzellen eine Reduktion von NeuroD1 und Wnt1 beobachtet werden (Abbildung 4-22, A und B; Abbildung 4-14, B), die im Fall der CD54-exprimierenden Neuroblastomzellen hingegen geringer war als in depletierten Zellen. Die Expression des Transkriptionsfaktors Wnt1, das sich vom murinen *Int-1* und vom *wingless* aus *D. melanogaster* ableitet, war für die Untersuchungen der Differenzierung mit von Interesse, da eine Beteiligung von Wnt1 bei der Neurogenese innerhalb der Initialphase der Neuralplattenformation beobachtet wird⁴⁰¹. Ähnliches gilt auch für den Transkriptionsfaktor NeuroD1, der eine entscheidende neurologische Funktion während der terminalen Differenzierung von Neuronen des ZNS hat^{402; 403}. Durch Bestimmung eines Neuronen- und Gliazell-spezifischen Expressionsprofils konnte der CD54-negativen Zellpopulation ein stärker ausgeprägter neuronaler Phänotyp zugewiesen werden als den in der Vergangenheit gehäuft publizierten CD54-positiven Neuroblastomzellen. Das bessere Verständnis zur Reifung und Ausdifferenzierung von Neuroblastomzellen wird jedoch durch eine zusätzliche Heterogenität und Plastizität der Zellen aufgrund einer bidirektionalen Interkonversion erschwert. Hierbei kommt es zu einer autonomen Differenzierung von Neuroblastom-ähnlichen zu Epithelial-ähnlichen Zellen und umgekehrt⁴⁰⁴.

5.3.4 Differentielle Genexpression in ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen

Neuroblastomzellen, in denen durch Aktivierung von Delta-Notch ASCL1 herunterreguliert wurde (Abbildung 4-9, A), zeichneten sich unter anderem durch eine Differenzierung mit Neuriten-ähnlichen Ausläufern (Abbildung 4-9, B) und einer Induktion von CD54 (Abbildung 4-11, D) aus. Die schon bei den Retinoiden beobachtete Inaktivierung von ASCL1 wurde anhand einer transienten und direkten Inhibition der ASCL1 Expression in Neuroblastomzellen durch Bestimmung des Genexpressionsprofils im Genchip HG-U133 Plus2.0 näher untersucht. Unspezifischen Effekte, die zu einer Veränderung der basalen ASCL1 mRNA-Expression führen können, wurden nicht beobachtet⁴⁰⁵. Im Gegensatz zu Neuroblastomzellen wurde bereits in neuroendokrinen Zellen der Prostata (PNEC) eine RNA-Interferenz von ASCL1 durchgeführt und eine Reduktion des Zellzyklus-regulierenden c-Myb beobachtet⁴⁰⁶. Während das zum viralen v-Myb (*avian myeoblastosis oncogen*; AMV) homologe c-Myb auch die Proliferation und Malignität von Neuroblastomzellen unterstützt^{407; 408}, ist eine Inhibition der c-Myb Expression wiederum mit einer geringeren Proliferation und verstärkter Apoptose assoziiert^{409; 410; 411}. Darüber hinaus gilt ein Nachweis von c-Myb als besonders schlechter Prognosefaktor bei Neuroblastom-Patienten, der unabhängig von einer MYCN-Amplifikation ist⁴¹². Interessanterweise konnte die von den Autoren beschriebene Retinoid-induzierte Supprimierung der c-Myb-Expression in Neuroblastomzellen weder durch ATRA und 4-HPR noch durch direkte RNA-Interferenz von

ASCL1 im Genchip identifiziert werden^{413; 414}. Stattdessen wurde in den mit linearen siRNAs transient ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen eine Heraufregulierung der Gene IGF-2 (*insulin-like growth factor 2*) und CDKN1C (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1c*) beobachtet⁴¹⁵. Der Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor CDKN1C (p57^{KIP2}) reguliert über diverse Cyclin/cdk-Komplexe beispielsweise die G1-Phase des Zellzyklus^{416; 417}. Somit könnte die erhöhte CDKN1C mRNA-Expression unter anderem mit für die Wachstumsarretierung von Retinoid-differenzierten und ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen verantwortlich sein (Abbildung 4-4, Abbildung 4-18). Die Ursache für die unterschiedliche Expression der Gene IGF-2 und CDKN1C in transient bzw. stabil ASCL1-inaktivierten SH-SY5Y-Zellen könnte möglicherweise in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen begründet sein (Abbildung 4-13, B und Abbildung 4-14, B). Die dauerhafte Expression des CDK-Inhibitors CDKN1C in Neuroblastomzellen könnte mit der Proliferation dieser Zellen nicht vereinbar sein, sodass bei Selektion stabil transfizierter Zellen eine mögliche Selektion CDKN1C-negativer Zellen stattfand. Da für die stabile und transiente Transfektion andere Nukleotide verwendet wurden, könnten die Unterschiede jedoch auch hierdurch bedingt sein. Ob ein Zusammenhang zwischen CDKN1C und IGF-2 Expression unter diesen Bedingungen besteht, bedarf weiterer Untersuchungen. Ähnlich wie in direkt ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen kann auch in Anwesenheit von Retinsäure eine Induktion der IGF-2 mRNA- und Proteinexpression gemessen werden^{418; 419}. Weder durch ATRA noch durch 4-HPR konnte im Affymetrix Genchip HG-U133A eine Expressionsinduktion von IGF-2 identifiziert werden. Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor IGF-2 (*insulin-like growth factor 2*) ist neben dem IGF-1 einer Proteinfamilie zugehörig, die dem Insulin sehr ähnlich ist, und Wachstum, Differenzierung, Metabolismus und Transformation unter anderem von neuronalen Zellen^{420; 421} über IGF- und Insulin-Rezeptoren reguliert⁴²². Das in der Leber synthetisierte IGF-2 wird im Serum an spezifische IGF-Bindeproteine (*insulin-like growth factor binding protein*) gekoppelt. Über die Bindung regulieren die IGF-BP1 bis 7 neben den Transport auch die biologische Aktivität (Hemmung vs. Verstärkung) der IGFs⁴²³. Im Gegensatz zu normalen Geweben werden IGF-Proteine ubiquitär auch in malignen embryonalen Tumorzellen nachgewiesen^{422; 424}. Beispielsweise stimuliert autokrines und parakrines IGF-2 das embryonale Tumorstadium des Rhabdomyosarkoms⁴²⁵ und Wilms-Tumors⁴²⁶. Beim humanen Neuroblastom kommt vor allem dem IGF-2 eine potenzielle Funktion als autokriner Wachstumsfaktor zuteil^{427; 428}. Die Wirkung des IGF-2 erfolgt durch Bindung an den IGF-1-Rezeptor, der auf Tumoren peripheren neuroektodermalen Ursprungs wie den Neuroblastomen und Ewing-Tumoren vorzufinden ist⁴²⁹. Tumore mit der Überexpression eines IGF-Rezeptors können sich zudem vor Apoptose schützen⁴³⁰. Dem gegenüber wird keine Korrelation zwischen IGF-2-Expression und der Tumorphnose bezüglich des Stadiums, der Histologie und der MYCN-Amplifikation von Neuroblastomen beobachtet⁴³¹. Da IGFs in Anwesenheit von Differenzierung-aktiven Reagenzien ihre wachstumsfördernde Wirkung verlieren und stattdessen die Reifung von Neuroblastomzellen unterstützen, wirken sie nicht ausschließlich mitogen^{432; 433}. Diese reifungsunterstützenden Eigenschaften der IGFs auf Neuroblastomzellen könnte auch die Herunterregulierung des Proto-Onkogens c-MYC erklären, das das Wachstum von unreifen Zellen durch den Eintritt in die S-Phase positiv beeinflusst⁴³⁴. Die induzierte IGF-2 mRNA-Expression in den transient ASCL1-inaktivierten Neuroblastomen wurde nicht von einem Anstieg der entsprechenden IGF-Bindeproteine begleitet, da die IGF-BPs als Regulator der biologischen Aktivität von IGFs fungieren⁴²³. Mit Ausnahme von IGF-BP1 wurden jedoch alle IGF-Bindeproteine basal in Neuroblastomzellen exprimiert (Daten nicht dargestellt). Im Gegensatz zur transienten RNA-Interferenz von ASCL1 (Abbildung 4-13) und einer Behandlung mit 4-HPR (Abbildung 4-7) wurde eine Herunterregulierung der IGF-Bindeproteine IGF-BP5, IGF-BP3 und IGF-BP7 sowie eine Induktion des IGF-BP6 ausschließlich durch *all-trans* Retinsäure identifiziert (Abbildung 4-6). Außerhalb der Selektionskriterien wurden jedoch auch IGF-BP2 und IGF-BP4 weniger stark

herunterreguliert detektiert (Daten nicht dargestellt). Innerhalb des IGF-Systems wird durch Heraufregulierung von IGFBP6 und Reduktion von IGFBP2 und 4 durch *all-trans* Retinsäure ebenfalls eine Wachstumshemmung beschrieben^{435; 436}. Im Vergleich zu den transient inaktivierten konnte in stabil ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen unter anderem auch eine erniedrigte Expression des IGF-aktivierenden Bindeproteins IGFBP2 und drastische Heraufregulierung des IGF-inaktivierenden IGFBP6 nachgewiesen werden (Abbildung 4-14, B). Das Expressionsprofil der IGF-Bindeproteine ließ in ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen einen Entwicklungsschritt zugunsten einer Differenzierung erkennen, da IGFs in ihrer Aktivität vorrangig über die Bindung an die IGF-Bindeproteine IGFBP2 und IGFBP4 positiv und durch IGFBP6 negativ reguliert werden^{437; 438}. Während IGFBP2 und IGFBP4 die Bindung des mitogen wirkenden IGF-2 zum IGF-1-Rezeptor stabilisierend unterstützen, wird durch die 100-fach höhere Bindungsaktivität vom IGFBP6 zum IGF-2 die Proliferation und anti-apoptotische Wirkung der differenzierten Neuroblastomzellen inhibiert⁴³⁹. Retinoide wie *all-trans* Retinsäure besitzen demnach das Potenzial, die Differenzierung und Wachstumshemmung von Neuroblastomzellen durch ein verändertes Expressionsprofil der IGF-Bindeproteine auch in Anwesenheit des sonst mitogen wirkenden IGF-2 zu unterstützen^{432; 433}. Eine Arretierung des Zellwachstums scheint somit vom Verhältnis des IGFBP2 und 4 zum IGFBP6 abhängig zu sein^{436; 440}. Dem gegenüber wird unter konstitutiven Bedingungen in autokrin IGF-2-sezernierenden Neuroblastomen eine hohe ubiquitäre Expression von IGFBP2 und 4 sowie eine schwache Expression von IGFBP6 beobachtet^{435; 440}. Darüber hinaus steht auch das IGF-System unter dem Einfluss von MYCN. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch die onkogene Wirkung von MYCN die Expression der Proliferation-unterstützenden Gene IGF-2, IGFBP2 und IGFBP4 induziert und im Gegenzug die Expression des IGF-2-inaktivierenden und wachstumshemmenden IGFBP6 herunterreguliert wird⁴⁴¹. Da sowohl ATRA als auch die RNA-Interferenz von ASCL1 die Expression von MYCN reduzierte (Abbildung 4-21; Abbildung 4-14, B), konnte unter dem ausbleibenden Einflusses des onkogenen Transkriptionsfaktors die Expression des wachstumsunterstützenden IGFBP2 und 4 gesenkt und die des Differenzierung-fördernden IGFBP6 induziert werden (Abbildung 4-6; Abbildung 4-14, B). Somit unterstrich MYCN erneut seine onkogene Wirkung innerhalb des IGF-Systems auch auf Neuroblastomzellen.

Interessanterweise sind die durch Inhibition des proneuronalen Transkriptionsfaktors ASCL1 regulierten Gene IGF-2 und CDKN1C auch zentraler Bestandteil in der Pathogenese des Beckwith-Wiedemann-Syndroms (BWS)⁴⁴². Hierbei handelt es sich um ein komplexes Krankheitsbild, das vor allem im Säuglings- und Kleinkindalter mit einer Inzidenz von 1:8000 bis 1:15.000 auftritt. Das BWS wurde erstmals durch den Kinderpathologen John Bruce Beckwith und den deutschen Genetiker Hans Rudolf Wiedemann beschrieben^{6; 443}. Dieses embryonale Überwachssyndrom zeichnet sich durch Bauchwanddefekte, Makroglossie, Körperüberwuchs und um ein 10% erhöhtes Tumorrisiko aus. BWS-Patienten neigen verstärkt zur Bildung eines Wilms-Tumors, Hepatoblastoms, Rhabdomyosarkoms oder Neuroblastoms^{444; 445}. Der Ursache des BWS, das in 85% der Fälle sporadisch ist, liegen genetische Veränderungen in der Chromosomenregion 11p15 zugrunde. Die Chromosomenregion 11p15 ist eine elterlich geprägte Region (*Imprinting*) mit den zwei unterschiedlich methylierten Imprintingzentren H19-DMR (ICR1) und KVDNR1 (ICR2). Gegenwärtig sind bis zu 50 verschiedene humane Gene bekannt, von denen in Abhängigkeit von der elterlichen Herkunft eine der beiden Kopien inaktiv ist (<http://.cancer.otago.ac.nz>)⁴⁴⁶. Das genomische *Imprinting* ist ein epigenetischer Prozess, bei der die Veränderung der Genfunktion nicht durch Änderungen der DNA-Sequenz hervorgerufen wird. Das Ergebnis eines *Imprints* ist eine Modifikation des DNA-Stranges oder DNA-bindender Proteine, wie z.B. Histone, die allelspezifisch acetyliert, methyliert oder phosphoryliert werden. Bei Säugern kommt es vorrangig zu einer Methylierung von Cytosin-Basen in CpG (*cytosine phosphorylated guanine*)-Dinukleotiden. CpG-Dinukleotide finden sich gehäuft in

Promoterregionen und Replikations-Startpunkten wieder. Das telomerisch gelegene H19-DMR dient der Regulation der Gene IGF-2 und H19. Während das paternal exprimierte IGF-2 als Wachstumshormon wirkt, ist die Funktion der maternal exprimierten und untranslatierten Antisense-RNA H19 unbekannt. Die Genregulation erfolgt über den Mechanismus des *enhancer competition*-Modells, gesteuert durch Methylierung des paternalen Allels und Bindung des Transkriptionsrepressor-Proteins CTCF an die nicht methylierte maternale Kopie. Durch maternale Methylierung des centromerisch gelegenen *Imprinting*-Zentrums KVDMR1 kommt es innerhalb des Introns zur Ausschaltung von CDKN1C und KCNQ1⁴⁴⁷. Die differentiell methylierte centromerische Region KVDMR1 ist ein maternales Allel mit CpG-Inseln im Gen KCNQ1 (*potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 1*). Normalerweise liegt das maternale KCNQ1 auf Chromosom 11p15 *imprinted* vor. Durch das paternale untranslatierte *imprinted antisense*-Transkript LIT1 (*long QT intronic transcript 1*) wird das maternale Allel KCNQ1 inaktiviert⁴⁴⁸. Daraus resultiert wiederum die reduzierte Expression der Gene CDKN1C und ASCL2 (*achaete-scute complex homolog 2, drosophila*)^{449; 450}. Interessanterweise wurden durch gezielte Inaktivierung von ASCL1 zwei Gene differentiell exprimiert, die auch für das klinische Bild eines BWS prädisponieren. Obwohl im Genchip nach Inaktivierung von ASCL1 keine Herunterregulierung von ASCL2 beobachtet wurde, ist für das BWS auch eine Reduktion des ASCL2 beschrieben⁴⁵¹. Während ASCL1 die Differenzierung der aus der Neuralleiste stammenden Vorläuferzellen reguliert^{362; 365}, steuert ASCL2 hingegen die Ausdifferenzierung des Trophoektoderms innerhalb der Embryonalentwicklung⁴⁵². Darüber hinaus führt die fehlregulierte Überexpression von IGF-2 beim BWS zu einer zusätzlich erniedrigten Expression von CDKN1C⁴⁵³. Für den eigentlichen phänotypischen Gigantismus der BWS-Patienten ist jedoch das paternal exprimierte IGF-2 verantwortlich, das eine wichtige Funktion während der Embryo- und Plazentaentwicklung ausübt^{454; 455}.

5.4 CD184 (CXCR4) Expression in Neuroblastomzellen

5.4.1 Regulierung von CD184 in Retinoid-differenzierten Neuroblastomzellen

Das durch das *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) und Brodeur definierte Tumorstadium eines Neuroblastoms unterscheidet in Abhängigkeit von histologischen und chirurgischen Kriterien zwischen fünf verschiedenen Stadien¹¹. Neben dem Tumorstadium zeichnet sich ein fortgeschrittenes Stadium insbesondere durch eine verstärkte Metastasierung aus. Der Primärtumor eines Neuroblastoms ist am häufigsten im Retroperitoneum entlang des Grenzstranges und der Nebennierenrinde vorzufinden⁴³. Aufgrund der erhöhten Migrationsneigung lassen sich im fortgeschrittenem Tumorstadium jedoch auch Metastasen im Knochenmark und Skelettsystem, in den Lymphknoten, der Leber, dem ZNS und der Haut detektieren⁴³. Als Grundlage für die Migration und Metastasierung von Tumorzellen in periphere Bereiche des Körpers fungieren unter anderem chemotaktische Botenmoleküle. Die für die Chemotaxis erforderlichen Signalmoleküle werden als Chemokin bezeichnet. Chemokine sind kleine Peptide aus der Familie der Zytokine, die unter anderem als potente Aktivatoren und chemotaktische Botenstoffe für unterschiedliche Leukozyten-Subpopulationen und einige nicht hämatopoetische Zellen während der normalen Entwicklung, Inflammation, Infektion, Atherosklerose, Angiogenese und Migration fungieren^{456; 457; 458}. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Mobilisierung von CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen in das periphere Blut durch eine wechselwirkende Beziehung zwischen dem Chemokin-Rezeptor CD184 und dem Liganden SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*) vermittelt wird⁴⁵⁹. In Abhängigkeit von der Positionierung der ersten beiden, gepaarten und hoch konservierten

Cysteine unterscheidet man die Chemokin-Superfamilie in vier Gruppen: die CXC-, CX₃C-, CC- und C-Chemokine. Chemokine interagieren hochspezifisch mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die sich durch 7 transmembran durchspannende Domänen auszeichnen. Die G_α-GTP-aktivierten RGS-Rezeptoren (*regulator of G protein signaling*) vom Typ RGS1, RGS3, RGS13, RGS16 und RGS18 induzieren nach der Bindung von SDF-1⁴⁶⁰ und der Phosphorylierung von MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinase*) eine intrazelluläre Signaltransduktion^{461; 462}. Mittlerweile sind bis zu 18 Mitglieder (CXCR1-5, CCR1-9, D6, CX₃CR1, XCR1 und DARC) dieser Chemokin-Rezeptorfamilie bekannt⁴⁶³. Ein für die Onkologie besonders interessantes Molekül stellt CXCR4 (CD184) dar⁴⁶⁴. CD184 wurde 1994 erstmalig durch Loetscher *et al.* aus Leukozyten kloniert und erhielt anschließend das Akronym LESTR (*leukocyte-derived seven-transmembrane-domain-receptor*) oder Fusin⁴⁶⁵. Die in den Neuroblastomzellen und Ewing-Tumorzellen detektierte konstitutive mRNA- und Protein-Expression von CD184 (Abbildung 4-23, A und B; Abbildung 4-24, A) konnte neben nativen Tumorproben bereits auch in einigen Neuroblastom-Zelllinien identifiziert werden^{466; 467; 468}. Eine Expression von Chemokinen und deren Rezeptor ist ein komplexes Netzwerk in der Pathogenese verschiedenster Tumore⁴⁶⁹. Daher findet man eine Expression von CD184 neben dem Neuroblastom auch im Ovarialkarzinom⁴⁷⁰, Malignen Melanom⁴⁷¹, Pankreaskarzinom⁴⁷², Brustkarzinom⁴⁷³, Glialtumor⁴⁷⁴, kleinzelligen Lungenkarzinom⁴⁷⁵, anaplastischen Schilddrüsenkarzinom⁴⁷⁶, follikulären B-Zell-Lymphom⁴⁷⁷, Colorektalkarzinom⁴⁷⁸ und Prostatakarzinom^{479; 480} vor. Eine Expression von CD184 darf jedoch nicht ausschließlich mit einer verstärkten Metastasierung von Tumoren assoziiert werden. Neben der bereits geschilderten Mobilisierung von CD34⁺ Stammzellen konnte auch in diversen normalen, nicht malignen Geweben eine physiologische Expression des Chemokinrezeptors nachgewiesen werden (Abbildung 4-26). Neben den chemotaktischen Eigenschaften spielt CD184 auch eine potenzielle Rolle als Cofaktor für den infektiösen Eintritt des T-tropischen HIV (*human immunodeficiency virus*)-Virus Typ 1 und Typ 2⁴⁸¹. Darüber hinaus wird die HIV-Infektion von CD4-positiven T-Lymphozyten durch Bindung von SDF-1 an CD184 inhibiert^{482; 483}. Die für eine Metastasierung notwendige Expression von CD184 reduzierte sich jedoch in den Neuroblastomzellen, die einer Differenzierung durch Retinoide (Abbildung 4-6, A; Abbildung 4-7, A; Abbildung 4-23; Abbildung 4-24; Abbildung 4-20, C und D) oder direkte Inaktivierung von ASCL1 unterlagen (Abbildung 4-14, B). Interessanterweise konnte in der Vergangenheit auch gezeigt werden, dass der zum *achaete-scute*-Komplex aus *D. melanogaster* homologe Transkriptionsfaktor ASCL2³⁶⁰, der die Ausdifferenzierung des Trophoektoderms während der Embryonalentwicklung steuert⁴⁵², auch die Expression von CD184 heraufreguliert⁴⁸⁴. Obwohl ASCL1 als proneuonaler Transkriptionsfaktor im Vergleich zu ASCL2 in einer anderen Entwicklungsphase der Embryogenese wirkt, in dem er die Reifung undifferenzierter Neuroblasten der Neuralleiste vorantreibt^{362; 365}, sind sowohl ASCL1 als auch ASCL2 befähigt, die Expression von CD184 während der Differenzierung zu beeinflussen.

5.4.2 CD184-abhängige Migrationseigenschaften differenzierter Neuroblastomzellen

Einem Neuroblastom wird durch Expression des Oberflächenantigens CD184 und der chemotaktische Wechselwirkung mit dem Liganden SDF-1 bisher ein gesteigertes Migrationsverhalten und eine erhöhte Invasivität zugeschrieben. Dabei korreliert die Expression von CD184 mit dem Stadium, Prognose und der Metastasierungsrate und somit mit der Aggressivität eines Neuroblastoms^{466; 468}. Das für die Chemotaxis notwendige Signalmolekül SDF-1 wird von Stromalzellen sezerniert und ist durch Bindung an CXCR4 ein hoch effizienter Ligand für Lymphozyten und Monozyten⁴⁸⁵. SDF-1 wurde erstmals durch Nagasawa *et al.* aus einer Stromal-Zelllinie kloniert⁴⁸⁶. SDF-1 (CXCL12) gehört zu der Familie der CXC-Chemokine

und befindet sich auf dem Chromosom 10, im Gegensatz zu allen anderen CXC-Chemokinen, die auf Chromosom 4 vorzufinden sind. Das humane und murine SDF-1 besitzen bis zu 99% Homologie und wurden demnach im Verlauf der Evolution stark konserviert⁴⁸⁷. Eine Kultivierung unreifer neuronaler Zellen führte im Entwicklungsprozess der Differenzierung sowohl durch ATRA als auch 4-HPR zu einer erniedrigten CD184 mRNA- und Proteinexpression (5.4.1). In einem *in-vitro* Migrations-Test konnte darüber hinaus eindrucksvoll gezeigt werden, dass Retinsäure-behandelte Tumorzellen in Anwesenheit von SDF-1 eine geringere Migrations- und Invasivitätsneigung besaßen als unbehandelte, unreife und CD184 überexprimierende Neuroblastomzellen (Abbildung 4-25). Neben SDF-1 müssen jedoch noch weitere chemotaktische Signalmoleküle im Medium existieren, da auch in Abwesenheit des Liganden eine basale Migration stattfand⁴⁶⁷. Im Gegensatz zu humanen neuronalen Zellen wird bis heute eine ähnliche Retinoid-vermittelte Herunterregulierung von CD184 ausschließlich bei Dendritischen Zellen (DC), die ebenfalls mit einer verringerten Migration reagieren, beschrieben⁴⁸⁸. Darüber hinaus wird während der Embryonalentwicklung des Zebrafisches (*Danio rerio*) die CD184-vermittelte Zellwanderung des Primordiums (Seitenlinien-Vorläuferzelle) für den Aufbau des Lateralliniensystems durch 4-HPR inhibiert. Das mechanosensorische Seitenlinienorgan, das sich aus dem Primordium in Neuromasten (Haarzell-Organ) entwickelt, gilt bis heute als das Modell zur koordinierten Zellbewegung während der Organbildung. Neben Stromalzellen, die als wichtigste SDF-1-sezernierende Zellen gelten⁴⁸⁶, wurde in diversen normalen humanen Geweben eine ausnahmslose mRNA-Expression dieses Chemokins identifiziert (Abbildung 4-26). Im besonders fortgeschrittenen Tumorstadium IV lassen sich Neuroblastom-Metastasen am häufigsten im Knochenmark, Skelettsystem, Lymphknoten, Leber, ZNS und der Haut lokalisieren⁴³. Aufgrund der Identifikation von CD184 in Neuroblastomzellen und der verbreiteten Expression von SDF-1 korreliert die Migrationsneigung mit den klinischen Befunden über eine gehäufte Lokalisation von Metastasen unter anderem in Leber und Knochenmark. Die Chemokin-unterstützte Metastasierung von Neuroblastomen wird bis heute jedoch noch immer kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wird durch die Wechselwirkung von CD184 und SDF-1 erneut eine gezielte Invasion dieses neuroektodermalen Tumors beschrieben^{466; 468}. Eine andere Arbeitsgruppe publiziert stattdessen eine CD184-vermittelte jedoch SDF-1-unabhängige Metastasierung von Neuroblastomzellen⁴⁶⁷. Letztlich konnte jedoch auch anhand anderer Tumorfamilien gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von CD184 durch RNA-Interferenz oder den Antagonisten AMD 3100 eine deutliche Reduktion der Metastasierung bewirkt^{470; 472; 473}. Für eine zukünftige Verbesserung der Therapie wäre neben weiteren Retinsäure-Präparaten auch eine zusätzliche Applikation von CD184-inhibierenden Antikörpern denkbar, um den Anteil metastasierender Neuroblastome während der Erhaltungstherapie gezielt zu senken.

5.5 Nachweis und Anwendung von CD117 in Neuroblastomzellen

5.5.1 Induktion von CD117 in Retinoid-differenzierten Neuroblastomzellen

Durch Kultivierung von Neuroblastomzellen mit Retinoiden konnte neben immunstimulatorischen und migrationsbeeinflussenden Antigenen als weitere therapeutische Zielstruktur der Rezeptor CD117 identifiziert werden. Initial wurde eine Heraufregulierung von CD117 im Gegensatz zum synthetischen 4-HPR ausschließlich durch *all-trans* Retinsäure detektiert (Abbildung 4-6, B; Abbildung 4-7, B). Da eine Expressionssteigerung des Rezeptors ausschließlich in Retinoid-behandelten und nicht direkt ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen beobachtet wurde, könnte die Induktion von CD117 als direkte Wirkung der Retinoide statt dem Ergebnis einer Differenzierung interpretiert werden (Abbildung 4-20; Abbildung 4-14, B).

Das zelluläre 145 bis 165 kDa große Oberflächenantigen CD117, das in der Nomenklatur auch unter dem Synonym c-KIT verbreitet ist, stellt das humane homologe Protein zum viralen *v-KIT*, dem Onkogen des *Hardy Zuckerman 4 (HZ4) feline sarcoma virus* dar. Hierbei handelt es sich um ein Virusprotein, das ursprünglich aus der Katze isoliert wurde⁴⁸⁹. CD117 codiert für ein transmembranes Rezeptorprotein mit Tyrosinkinase-Aktivität und wird durch den Liganden SCF (*stem cell factor*) aktiviert. Durch Bindung von SCF an CD117 wird eine Signaltransduktion aktiviert, die entscheidende Funktionen während der Hämatopoese, Gametogenese und Melanogenese kontrolliert^{490; 491; 492}. Eine Expression von CD117 liegt neben normalen auch in verschiedenen neoplastischen Geweben vor⁴⁹³. Durch somatische Mutationen von CD117 kommt es zu einer konstitutiven Daueraktivierung des Tyrosinkinase-vermittelten Signalweges. In CD117-positiven Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) wird beispielsweise durch diverse Mutationen im Exon 11 eine Korrelation zwischen erhöhter Malignität und erniedrigter Überlebensrate beschrieben^{494; 495; 496}. Diese Mutationen führen zur Ausbildung verschiedener Tumore, wie dem Gastrointestinalen Stromatumor⁴⁹⁷, der Mastozytose⁴⁹⁸, der Akuten Myeloischen Leukämie (AML)⁴⁹⁹ und dem Testikulärem Seminom (Keimzelltumor)⁵⁰⁰. Aufgrund einer fehlenden Genmutation ist der Tyrosinkinase-Rezeptor an der eigentlichen Pathogenese des Neuroblastoms jedoch unbeteiligt⁵⁰¹. Die untersuchten Neuroblastomzellen zeigten nach der Sequenzierung des vollständigen kodierenden Leserahmens (ORF; *open reading frame*) von CD117 ebenfalls keine aktiven Mutationen⁵⁰². Interessanterweise konnte in SH-SY5Y-Zellen ein heterozygot ausgeprägter Polymorphismus (*SNP; single nucleotide polymorphism*) identifiziert werden, der auch bei Patienten mit Mastozytose auftritt⁵⁰³. Insbesondere diese Variante ist für die Proliferation von SCF abhängig und im Vergleich zum Wildtyp stark sensitiv gegenüber einer Behandlung mit STI-571⁵⁰³. Darüber hinaus wurde in allen untersuchten Zellen eine um 12 Nukleotide verkürzte Transkriptionsvariante entdeckt⁵⁰⁴. Trotz der gleichen Liganden-Bindungsaffinität und Liganden-unabhängigen Autophosphorylierung besitzt die verkürzte Isoform GNNK- des CD117-Proteins gegenüber der längeren Isoform GNNK+ eine höhere Signaltransduktions- und Transformations-Kapazität⁵⁰⁵. Ein höherer Anteil dieser verkürzten Isoform bei Tumoren im Vergleich zu Normalzellen existiert hingegen nicht⁵⁰⁵. Neben der Mutation wird auch durch autokrine und parakrine Aktivierung von CD117 die Bildung des kleinzelligen Lungenkarzinoms⁵⁰⁶, Ewing-Tumors⁵⁰⁷ oder Neuroblastoms³²³ unterstützt. Die Expression von CD117 wird in diversen pädiatrischen, soliden Tumoren vorgefunden⁵⁰⁸. Neuroektodermale Tumore wie das Neuroblastom und Ewing-Tumor exprimierten den Rezeptor bereits konstitutiv (Abbildung 4-27, A; Abbildung 4-28, A)^{323; 509; 510; 511}. Eine vorrangige Anwesenheit des Rezeptors in MYCN-amplifizierenden Neuroblastomen⁵¹¹ korrelierte zudem mit der fehlenden basalen Expression von CD117 in dem c-MYC-positiven Zellklon SH-SY5Y (Abbildung 4-1)¹⁶⁰. Entgegen dem Ergebnis aus dem Genchip ließ sich nach 96 stündiger Kultivierung mit ATRA die Expression von CD117 in den Neuroblastomzellen im Gegensatz zu den Ewing-Tumorzellen nicht steigern (Abbildung 4-27, A und B; Abbildung 4-28, A und B). Die nicht fortwährende Reproduzierbarkeit einer Induktion von CD117 könnte sowohl in den schwankenden experimentellen Bedingungen als auch den unterschiedlichen Sensitivitäten der Neuroblastomzellen gegenüber einem Retinoid in Abhängigkeit vom variablen und instabilen Differenzierungsstatus begründet sein¹⁵⁷. Der für CD117 spezifische Ligand SCF wurde annähernd in allen CD117-positiven Neuroblastomzellen basal exprimiert vorgefunden (Abbildung 4-27, A)^{323; 509}. Entgegen der ausgebliebenen Heraufregulierung des Liganden SCF in Neuroblastom- und Ewing-Tumor-Zelllinien (Abbildung 4-27, A und C) wird von einer anderen Arbeitsgruppe eine Sezernierung des SCF-Proteins in den Kulturüberständen von Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen beschrieben⁵¹².

Wenn nicht anders im Text verwiesen wurde, erfolgte die Behandlung der Tumorzellen mit Retinoiden stets für 96 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Die begleitende Expression des

Retinsäure-inaktivierenden Cytochroms P450RAI-2 könnte mit verantwortlich für die eingeschränkte biologische Wirkung der *all-trans* Retinsäure auf die Expression von CD117 und SCF gewesen sein (Abbildung 4-15, B). Wäre die Induktion von CD117 und SCF unabhängig von der Art des Retinoides, hätte das nicht Cytochrom-induzierende 4-HPR eine stärkere Wirkung erzielen müssen. Besonders Hoch-Risiko Neuroblastom-Patienten bekommen in der Phase der Erhaltungstherapie hingegen über einen sehr langen Zeitraum kontinuierlich Retinsäure-Präparate zur Rezidivprophylaxe appliziert⁵³. Diese Form der kombinierten Therapie kann die Heilungs- und Überlebensrate von prognostisch schlechten und rezidivgefährdeten Patienten deutlich verbessern. In Anlehnung an diese Therapieform führte eine langanhaltende Stimulation im Vergleich zur kurzzeitigen Behandlung zu einem drastischen Anstieg der Expression von CD117 und SCF durch ATRA und vermindert auch durch 4-HPR (Abbildung 4-29, A, B und C). Möglichweise entwickeln Neuroblastomzellen durch Heraufregulierung von CD117 und der autokrinen Sezernierung von SCF einen Resistenzmechanismus, der sie vor einer Retinoid-induzierten Apoptose oder Differenzierung schützt⁵¹³. Für periphere neuroektodermale Tumore als auch nicht maligne Zellen kann bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung von CD117 über eine autokrine Sezernierung von SCF gezielt vor Apoptose schützt^{507; 514; 515}. Letztlich bleibt aber ungeklärt, ob es sich bei der Überexpression von CD117 um einen Differenzierungseffekt oder einen Mechanismus zur Entwicklung einer Resistenz von Neuroblastomzellen gegenüber Retinoiden handelt. Da CD117 in Retinoid-kultivierten und CD54-selektionierten Neuroblastomzellen (Abbildung 4-20, C und D) stärker exprimiert wurde als in direkt ASCL1-inaktivierten Zellen, könnte die Heraufregulierung des Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptors möglicherweise durch Retinoide und nicht als Folge einer Differenzierung initiiert worden sein. Unter der Voraussetzung, dass CD54 ausschließlich in ausdifferenzierten Neuroblastomzellen exprimiert wurde, wäre eine Retinoid-vermittelte Induktion der CD117 Expression jedoch die phänotypische Folge einer Differenzierung von Neuroblastomen^{105; 377; 378; 379}. Die eigentliche Relevanz von CD117 und SCF für die klinische Therapie und Prognose eines Neuroblastom-Patienten wird gegenwärtig noch immer kontrovers diskutiert^{323; 509}. Einige Autoren beschreiben einerseits die bevorzugte Expression von CD117 und SCF im fortgeschrittenem Tumorstadium eines Neuroblastom-Patienten, die mit einer gleichzeitigen prognostisch unvorteilhaften Coexpression des Proto-Onkogens MYCN assoziiert ist⁵¹¹. Andererseits wird CD117 auch als Marker für eine vorteilhafte klinische Prognosestellung definiert⁵¹⁶.

5.5.2 Verstärkung der Wachstumshemmung von Neuroblastomzellen durch Kombination von ATRA und STI-571

Tyrosinkinase-gekoppelte Rezeptoren wie CD117 sind interessante Zielstrukturen für die Anti-Tumorthherapie. Ein wesentlich potenter und spezifischer Inhibitor von Rezeptor-Tyrosinkinasen stellt das in der Onkologie häufig verwendete Präparat STI-571 dar, das von der Firma Novartis ebenfalls unter dem Namen Glivec oder Imatinibmesylat vertrieben wird. Die Abkürzung **STI-571** steht für die Bezeichnung **S**ignal-**T**ransduktions-**I**nhibitor. Hierbei handelt es sich um einen ATP-analogen selektiven Inhibitor einiger Rezeptor-Tyrosinkinasen wie dem *c-Abl* (*abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*), dem fusionierten Translokationsgen *Bcr-Abl* (*breakpoint cluster region* und *abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*), dem PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) und dem CD117. Initial wurde die antiproliferative Wirkung von STI-571 bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML), die zu 95% das Philadelphia-Chromosom besitzen, erfolgreich getestet⁵¹⁷. Die reziproke Translation t(9;22) führt zur Entstehung eines verkürzten Chromosoms 22, dem Philadelphia-Chromosom (Ph). Das Ph-Chromosom ist Träger des *Bcr-Abl* Hybridgens. Hierbei fusioniert das Gen *Bcr* (*breakpoint*

cluster region) auf Chromosom 22 mit Teilen des Abl (*abelson leukemia virus*) auf Chromosom 9. Das onkogene Bcr-Abl codiert für eine entartete Tyrosinkinase mit 100-fach höherer Aktivität als das zelluläre c-Abl⁵¹⁸. Darüber hinaus belegen klinische Studien ebenfalls eine erfolgreiche Behandlung des CD117-positiven GIST durch den Tyrosinkinase-Inhibitor⁵¹⁹. Durch die Therapie mit STI-571 kann jedoch auch das Wachstum PDGF/PDGFR- und SCF/CD117-positiver Glioblastome, Dermatofibrosarkome und kleinzelliger Lungentumore effizient inhibiert werden^{520; 521; 522}.

Das gegenwärtige Therapieschema von Hoch-Risiko Neuroblastom-Patienten beinhaltet zur Rezidivprophylaxe eine langanhaltende Applikation von Retinoiden während der Erhaltungstherapie. Übertragen aus den *in-vitro* Erkenntnissen könnten auch im Körper verbliebende restliche Neuroblastomzellen versuchen, sich über eine autokrine Sezernierung von SCF und einer Aktivierung des überexprimierten CD117 vor einer Retinoid-induzierten Apoptose oder Differenzierung zu schützen⁵¹³. Mit diesem Hintergrund konnte bei den dauerhaft mit ATRA kultivierten und CD117-überexprimierenden Neuroblastomzellen eine wachstumshemmende Sensibilisierung gegenüber STI-571 beobachtet werden, die durch eine deutliche apoptotische Reaktion charakterisiert war (Abbildung 4-31)⁵⁰². Bei einigen CD117-negativen Tumorzellen konnte eine STI-571-vermittelte Apoptose wahrscheinlich auch über die Blockierung anderer Rezeptoren vermittelt werden⁵²³. Die Neuroblastomzellen, die basal oder nach Stimulation CD117 heraufregulierten, konnten für eine antiproliferative Behandlung mit STI-571 besonders sensibilisiert werden. Darüber hinaus konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Expression von CD117 und der Empfindlichkeit gegenüber STI-571 beobachtet werden (Abbildung 4-33, B). Demnach besaßen vor allem Zellen mit besonders hoher Expressionsrate von CD117 eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber einer Behandlung mit STI-571 als niedrig exprimierende Tumore. Die Wirkung von STI-571 gegenüber dem Ewing-Tumor und Neuroblastom wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. Der Ewing-Tumor, der wie das Neuroblastom peripheren neuroektodermalen Ursprungs ist, kann einerseits ebenfalls selektiv durch den Inhibitor im Wachstum unterdrückt werden^{524; 525}. Andererseits wird jedoch auch bei CD117-überexprimierenden Ewing-Tumoren eine ausbleibende Empfindlichkeit für STI-571 publiziert⁵²⁶. In dem Plasma von STI-571-behandelten Neuroblastom-Patienten, die sich in der Phase II einer Studie befanden, wird eine durchschnittliche Konzentration von 10 µM STI-571 ermittelt⁵²⁷. Diese Plasmakonzentration korrelierte annähernd mit den im MTT-Proliferationstest gemessenen ED50-Werten und der standardisierten Konzentration von 9,7 µM STI-571 für weitere *in-vitro* Untersuchungen. Als Folge der Apoptose ließen sich die morphologischen Änderungen der Tumorzellen durch STI-571 im Lichtmikroskop darstellen (Abbildung 4-32). Mit Hilfe einer autokrinen Sezernierung von SCF sind sowohl Neuroblastome als auch andere Tumore in der Lage, sich vor Apoptose zu schützen⁵¹³. Die dafür notwendige Expression von SCF und CD117 läßt sich in verschiedenen nativen Neuroblastomen und Zelllinien nachweisen³²³. Durch selektive Inhibition des Rezeptors läßt sich *in-vitro* die Proliferation von CD117-positiven Neuroblastomzellen durch Behandlung mit STI-571 erfolgreich unterdrücken⁵¹¹. Anhand eines Mausmodells läßt sich zudem auch *in-vivo* das Tumorwachstum von CD117- und PDGFR-exprimierenden Neuroblastomzellen durch STI-571 erfolgreich inhibieren⁵²⁸. Somit stellt die Inhibition von CD117 auf Tumorzellen einen wichtigen therapeutischen Ansatz auch zur Behandlung von Neuroblastom-Patienten dar⁵²⁹. Bisher existiert nur eine Veröffentlichung, die eine gesteigerte Wirkung durch Kombination von Retinsäure und STI-571 beschreibt, ohne dabei eine Retinsäure-bedingte Induktion von CD117 zu Grunde zu legen⁵³⁰. In der Tat konnte innerhalb eines individuellen Heilversuches bei einer mehrfach rezidivierenden Neuroblastom-Patientin durch kombinierte Applikation von Retinsäure mit STI-571 eine partielle Reduktion des Tumolvolumens nach dem dritten Behandlungszyklus *in-vivo* beobachtet werden (Abbildung 8-2). Die Notwendigkeit der haploidentischen Stammzelltransplantation während dieser Therapie

bestand darin, dass Tumorzellen in der Phase der Langzeitbehandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor STI-571 gehäuft eine Resistenz entwickeln^{531; 532}. Auf der anderen Seite war durch die allogene Transplantation haploidentischer Stammzellen eine zusätzliche Konsolidierung der Tumorregression durch eine induzierte Immuntherapie vorstellbar⁵³³. Der Vorteil einer allogenen Stammzelltransplantation liegt darin, einen möglichen Transplantat-Anti-Tumoreffekt (GVT; *graft-versus-tumor*) zu generieren. Mittels allogener Stammzelltransplantation und einer daraus resultierenden GVT-Reaktion wird bereits eine Regression solider Tumore wie beispielsweise dem Brustkarzinom beschrieben⁵³⁴. Die bedeutendste Komplikation einer Therapie solider Tumore wie dem Neuroblastom mit allogenen hämatopoetischen Stammzellen ist die Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion (GVHD; *graft-versus-host-disease*). Die GVHD wird von im Stammzelltransplantat enthaltenen alloreaktiven Spender T-Lymphozyten ausgelöst und hängt von der Kompatibilität der humanen Leukozyten-Antigene (HLA-Restriktion) ab. Während es sich bei der GVHD um eine unerwünschte Reaktion der alloreaktiven Spenderlymphozyten auf dem Wirtsorganismus handelt, ist der GVT-Effekt durchaus eine wünschenswerte immunogene Begleiterscheinung. Alloreaktive Spender T-Lymphozyten sind vorrangig für die Verminderung der Rezidivhäufigkeit und den Gesamterfolg der Stammzelltransplantation verantwortlich. Für diese Anti-Tumorwirkung sind vor allem die CD3/CD56-positiven Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) verantwortlich, da sie in der Lage sind, die Tumorzellen ohne spezifische Antigenerkennung zu lysieren⁵³⁵. Das Gleichgewicht zwischen stimulierender und inhibierender Interaktion von Tumorzelle und NK-Zelle wird dabei durch sogenannte KIR-Rezeptoren (*killer cells immunoglobulinlike receptors*) reguliert⁵³⁶.

Retinoide sind hoch potente Morphogene sowie Induktoren der Differenzierung und besitzen dadurch die positive Eigenschaft, die Überlebens- und Heilungsrate von Hoch-Risiko Neuroblastom-Patienten zu steigern^{53; 128}. Daher könnte gerade in der Phase der Erhaltungstherapie von Neuroblastom-Patienten eine zusätzliche Kombination von Retinsäure und STI-571 oder anderer potenter Tyrosinkinase-Inhibitoren eine noch wirksamere Therapie in der Prophylaxe der Rezidivbehandlung darstellen. Mit Nilotinib und Dasatinib existiert neben STI-571 bereits eine neuere Generation von Tyrosinkinase-Inhibitoren⁵³⁷. Die Entwicklung neuer Inhibitoren ist auch notwendig, da eine publizierte Studie der Phase II unter anderem beschreibt, dass eine alleinige Behandlung von pädiatrischen soliden Tumoren mit STI-571 keine bedeutende Anti-Tumorwirkung hat⁵²⁷. Bei einer Kombination aus Chemotherapie und dem Inhibitor STI-571 wird hingegen eine deutlich gesteigerte Inhibition des Tumorwachstums durch die Sensibilisierung gegenüber den Zytostatika Doxorubicin und Vincristin erzielt^{510; 538}. Trotz der *in-vitro* beobachteten Wachstumshemmung von unreifen Zellen durch Retinoide erleiden viele Neuroblastom-Patienten gehäuft ein Rezidiv. Gerade in der Phase der Erhaltungstherapie entwickeln die überlebenden, rezidivierenden Zellen diverse Resistenzmechanismen. So wurde beispielsweise die Wirkung von Retinoiden durch die induzierte Expression von inaktivierenden Cytochromen minimiert (Abbildung 4-6, A; Abbildung 4-15, A),^{277; 282}. Eine Inhibition der CYP26-Aktivität durch den Inhibitor R116010 und Ketoconazol sowie der CYP26-Expression durch RNA-Interferenz kann jedoch die intrazelluläre Halbwertszeit von Retinoiden und damit verbunden die Sensitivität der Tumorzellen steigern^{86; 282}. In Zukunft wären daher wirkungsvollere Therapieschemen vorstellbar, die aus einer Kombination von Retinoiden sowie Cytochrom- und Tyrosinkinase-Inhibitoren bestehen.

5.6 Neuroblastomzellen und deren Expression HSZ-spezifischer Antigene

5.6.1 Differentielle Expression von CD34 und CD133 in Neuroblastomzellen

Schon im 18. Jahrhundert wurde die Frage der Hämatopoese aufgeworfen und bis heute ist die eindeutige Identifizierung und Klassifizierung von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen nicht gelungen⁵³⁹. Gegenwärtig lassen sich hämatopoetische Stammzellen nur morphologisch und phänotypisch definieren. Alle Zellen des Blutes entstehen durch Differenzierung aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), die sich durch Zellteilung selbst regenerieren und durch viele Reifungsstufen zu verschiedenen Effektorzellen ausdifferenzieren^{540; 541}. Durch Andrews wurde 1986 ein monoklonaler Antikörper beschrieben, mit dessen Hilfe aus dem Knochenmark primitive koloniebildende Vorläuferzellen angereichert werden⁵⁴². Das später als CD34 geclusterte Antigen wird auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, Leukämiezellen, Endothelzellen und fetalen mesenchymalen Stammzellen exprimiert. CD34 übt unter anderem eine wichtige Funktion bei der Hämatopoese⁵⁴³ aus und ist zudem an der Repopulation aller reifen Blutzellen beteiligt^{544; 545}. Die autologe Transplantation von HSZ ist gegenwärtig auch in der Pädiatrie ein etabliertes Standardverfahren zur Behandlung maligner solider Tumore⁴⁷. Besonders nach der myeloablativen Megatherapie findet gehäuft bei soliden pädiatrischen Tumoren wie dem Hoch-Risiko Neuroblastom⁴⁸ und Ewing-Tumor^{49; 50} eine Transplantation mit HSZ statt. Eine Behandlung von Hoch-Risiko Neuroblastomen ohne myeloablative Chemotherapie wird als insuffizient und mit einer geringeren Tumorregression eingestuft^{546; 547}. Besonders eine Kombination aus der myeloablativen Megatherapie und der autologen Stammzelltransplantation bewirkt zusammen mit der Erhaltungstherapie anhand der Retinoide *all-trans* und 13-*cis* Retinsäure sowie 4-HPR eine erhöhte Heilungs- und Überlebensrate^{53; 54; 55; 56; 57; 58}. Als Quelle von HSZ dienen Knochenmark, periphere Blutstammzellen und Nabelschnurblut. Für die Gewinnung von peripheren Blutstammzellen werden die Spender mit GM-CSF (Granulozyten und Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) und G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) behandelt⁵⁴⁸. Dadurch kommt es zur verstärkten Bildung und Mobilisierung von peripheren Blutstammzellen aus dem Knochenmark in das Blut, die anschließend in einem Apheresator zum gleichnamigen Apheresat aufkonzentriert werden. Bis heute ist die autologe Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen ein sensibler Bereich, da eine realistische Gefahr besteht, dass sich unter dem HSZ-Transplantat ($4\text{-}5 \times 10^6$ CD34⁺ HSZ pro kg Körpergewicht) auch Tumorzellen befinden^{549; 550}. Erste Versuche bestanden darin, die im Knochenmark gewonnenen HSZ über die Depletion von Antikörpermarkierten Neuroblastomzellen aufzureinigen⁵⁵¹. Gegenwärtig ist man bemüht, der Problematik einer Tumorzellkontamination über eine CD34-abhängige Selektionierung entgegenzuwirken^{552; 553; 554; 555; 556}. Dieser Optimierungsschritt zur Gewinnung tumorfreier HSZ ist jedoch nur ungenügend, da CD34 in einigen Neuroblastomzellen im Gegensatz zu Ewing-Tumorzellen exprimiert wurde und sogar der Intensität von HSZ ähnelte (Abbildung 4-34, A, B und C). Somit exprimierte immerhin ein Drittel der untersuchten Neuroblastomzellen das gegenwärtig für die Gewinnung tumorbefreier Apheresate verwendete Antigen CD34. Da durch Expression des Chemokinrezeptors CD184 eine verstärkte Migration von Neuroblastomen in das Knochenmark stattfindet^{466; 468}, beinhalten die aus dem Knochenmark verwendeten Stammzellen eine potenzielle Gefahr für Kontaminationen mit metastasierten Tumorzellen^{549; 550}. Demnach stellen auch die über CD34 gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen eine Gefahr für Tumorkontaminationen während der autologen Transplantation von Neuroblastom-Patienten dar^{213; 214; 557}. Die bis heute postulierte Gewinnung von tumorfreien CD34-positiven HSZ muß somit zunehmend in Frage gestellt werden^{552; 553; 554; 555; 556}. Mittlerweile versucht man der Tumorbelastung in Apheresaten durch Selektionierung mit CD133⁵⁵⁸ oder kombiniert mit CD34

und CD133 entgegenzuwirken^{559; 560}. Eine *ex-vivo* Expansion der HSZ und die daraus resultierende Tumorreduktion wird ebenfalls diskutiert⁵⁶¹. Durch Yin wurde erstmals der Antikörper AC133 (Pentaspän-Oberflächenmolekül) entdeckt, der als CD133 Cluster ebenfalls HSZ beschreibt^{562; 563}. CD133 (Prominin) wird in der sehr frühen Entwicklungsphase CD34-positiver Stammzellen exprimiert vorgefunden. Sowohl CD133 als auch CD34 sind während der Hämatopoese und der Repopulation aller reifen Blutzellen beteiligt. Neben HSZ ist auch auf blastoiden Zellen der akuten myeloischen Leukämie (AML), der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und dem Myelodisplastischen Syndrom (MDS) eine Expression von CD133 identifizierbar. Das alternativ zum CD34 verwendete CD133 kann jedoch nicht als vorteilhafteres Oberflächenantigen zur Gewinnung kontaminationsfreier Apheresate definiert werden, da sich CD133 ähnlich wie CD34 neben HSZ auch in Neuroblastomzellen nachweisen ließ (Abbildung 4-35, A, B und C). Die eng mit dem Neuroblastom verwandten Ewing-Tumore exprimierten synchron zum CD34 ebenfalls kein CD133. Interessanterweise wurde in Anwesenheit von *all-trans* Retinsäure im Kulturmedium die konstitutive Expression von CD133 in Neuroblastomzellen herunterreguliert (Abbildung 4-36, A und B). Mit CD133 würde im Gegensatz zu CD34 ein HSZ-charakteristisches Antigen für die Gewinnung tumorbefreiter autologer Stammzellen zur Verfügung stehen, in dem man die in der *ex-vivo* Expansion und mit Retinsäure kultivierten CD133-positiven HSZ durch Depletion der Neuroblastomzellen voneinander trennt (Abbildung 4-37, A und B). Aufgrund dieser erstmals beschriebenen Existenz von CD133 auf Neuroblastomzellen stellt dieses Antigen ohne Beteiligung von Retinsäuren keine klinische Alternative für die HSZ-Gewinnung zu CD34 dar. Die in der Literatur favorisierte CD133-abhängige Zellseparation zur Gewinnung von tumorfreien Stammzellapheresaten ist daher sehr fragwürdig^{558; 559; 560}. Obwohl das primäre Ziel ein aufgereinigtes Stammzellapheresat darstellt, wird die Belastung von autolog zu transplantierenden hämatopoetischen Stammzellen mit Tumorzellen wie dem Neuroblastom kontrovers diskutiert. In der Kontamination von hämatopoetischen Stammzellen mit Tumorzellen wird bei der posttransplantativen Therapie im Zustand einer Lymphopenie auch eine mögliche Vakzinierung gesehen. Diese Vakzinierung beruht letztlich auf einer möglichen Immunantwort, die durch Generierung tumorspezifischer T-Lymphozyten induziert werden könnte und die Regression der Neuroblastomzellen weiter vorantreibt^{564; 565; 566}.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zunächst ermöglichte der Einsatz der DNA-Microarray-Technologie die Generierung eines Tumor-spezifischen Genexpressionsprofils, wodurch bereits in der Vergangenheit diverse Tumore identifiziert und voneinander abgrenzt wurden. Durch den Vergleich der Ewing-Tumore mit Normalgeweben konnte ein Ewing-Tumor-spezifisches Expressionsprofil generiert werden, das es ermöglichte, die initial als Neuroblastom beschriebene Zelllinie SK-N-MC eindeutig als Ewing-Tumor zu charakterisieren.

Insbesondere der primitive Entwicklungsstand macht das unreife Neuroblastom sehr empfänglich für eine Behandlung mit Retinoiden. Anhand verschiedener Studien werden neben der bereits therapeutisch etablierten 13-*cis* Retinsäure weitere Retinoide wie *all-trans* Retinsäure oder das synthetische Retinamid 4-HPR untersucht, damit für den klinischen Einsatz möglichst neue und wirkungsvollere Alternativen in der Rezidivprophylaxe während der Erhaltungstherapie von Neuroblastom-Patienten zur Verfügung stehen. Mit diesem Hintergrund wurde *in-vitro* die wachstumshemmende Wirkung und die Differenzierung-induzierende Aktivität von ATRA und 4-HPR verglichen. Im Vergleich zu ATRA zeigte das synthetische 4-HPR eine wirksamere Hemmung der Proliferation von Neuroblastomzellen. Darüber hinaus wurde für beide Retinoide zur wirkungsvollen Wachstumshemmung *in-vitro* eine Molarität bestimmt, wie sie vergleichsweise auch bei der Anwendung im Serum von Neuroblastom-Patienten *in-vivo* vorzufinden ist.

Die potente Wachstumshemmung beider Retinoide äußerte sich in einer Arretierung der Neuroblastomzellen in der G₁-Phase des Zellzyklus. Einen entscheidenden Anteil an der drastisch reduzierten Proliferation und Arretierung von Retinoid-kultivierten Neuroblastomzellen hatte unter anderem die im DNA-Microarray beobachtete Herunterregulierung des Protoonkogens c-MYC.

Im Ursprung beruht das maligne Wachstum von Neuroblastomzellen auf der fehlenden Reifung in neuronale Zellstrukturen, die gezielt durch den Delta-Notch-Signalweg vermittelt wird. Nach dem Modell der lateralen Inhibition induzierte sowohl ATRA als auch das weniger differenzierungsaktiv beschriebene 4-HPR eine Aktivierung dieses Signalweges, die sich in der Herunterregulierung des Notch-bindenden Liganden DLK1 und des proneuronalen Transkriptionsfaktors ASCL1 in unreifen Neuroblastomzellen während der Differenzierung äußerte. Trotz der gemeinsamen Reduktion von ASCL1 bildeten im Gegensatz zu 4-HPR ausschließlich die mit ATRA kultivierten Neuroblastomzellen die für eine Differenzierung charakteristischen feinen Neuriten-ähnlichen Ausläufer aus.

Neben morphologischen Änderungen wurde während der Reifung von Neuroblastomzellen auch eine Induktion von therapeutisch relevanten Zelladhäsionsmolekülen wie CD54 beobachtet. Zusammen mit dem ebenfalls Retinoid-induzierten HLA-Klasse I-Molekül wird durch die zunehmende Bindungskapazität zwischen Tumorzelle und Lymphozyt die immunogene Wirkung gesteigert. Durch Erhöhung der Zell-Zell-Interaktion konnte mittels zytotoxischer T-Lymphozyten (CTLs) eine erhöhte Bystander-Zelllyse der CD54 überexprimierenden Neuroblastomzellen vermittelt werden. Neben der immunologischen Wirkung zeigte insbesondere die CD54 exprimierende Zellpopulation aufgrund der Differenzierung eine gesteigerte Arretierung in der G₁-Phase des Zellzyklus. In CD54 exprimierenden Neuroblastomzellen, die phänotypisch als differenziert beschrieben werden, konnte nach Kultivierung mit ATRA und der Separierung eine stärkere Erniedrigung der DLK1 und ASCL1 mRNA-Expression beobachtet werden als in der depletierten Zellpopulation. Aufgrund der schwächeren Expression von diversen neuronalen Genen und erhöhten Expression von Gliazell-spezifischen Genen besaßen die CD54-differenzierten und mit Neuriten-ähnlichen Ausläufern geprägten Neuroblastomzellen im Vergleich zum neuronalen Phänotyp der CD54-depletierten Zellen hingegen ein

Expressionsprofil, das verstärkt Gliazellen glich. Eine direkte und Retinoid-unabhängige Inhibition der ASCL1 mRNA-Expression induzierte durch RNA-Interferenz ebenfalls eine Differenzierung in Neuroblastomzellen, die mit einer Erhöhung von CD54 assoziiert war.

Darüber hinaus wurde in ASCL1-inaktivierten und differenzierten Neuroblastomzellen eine Heraufregulierung der wachstumsbeeinflussenden Gene IGF-2 und CDKN1C beobachtet. Interessanterweise sind beide Gene entscheidend an der Pathogenese des Beckwith-Wiedemann-Syndroms (BWS) beteiligt, das wiederum ein 10% höheres Risiko für eine Tumorerkrankung wie beispielsweise dem Neuroblastom aufweist. Das den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren zugehörige IGF-2 kann aufgrund der pluripotenten Funktionen in den verschiedensten Tumoren sowohl Wachstum als auch Differenzierung unterstützen. Die biologische Aktivität des IGF-2 wird durch IGF-Bindeproteine (IGFBPs) gesteuert, die während der Differenzierung von ASCL1-inaktivierten Neuroblastomzellen sowohl durch ATRA als auch RNA-Interferenz zu einer Senkung der wachstumsunterstützenden Bindeproteine IGFBP2 und 4 sowie zu einer Heraufregulierung des proliferationshemmenden und Differenzierungsunterstützenden IGFBP6 führte.

Insbesondere Hoch-Risiko Neuroblastom-Patienten erleiden innerhalb der Erhaltungstherapie durch Resistenzbildung gegenüber Retinoiden häufig ein Rezidiv. Ein wesentlicher Resistenzmechanismus der Neuroblastome zum Schutz vor Differenzierung und Apoptose besteht in der Heraufregulierung von Retinsäure-inaktivierenden Cytochromen aus der CYP26-Familie, die im Gegensatz zu 4-HPR vorrangig in ATRA stimulierten Neuroblastomzellen identifiziert wurden. Möglicherweise war die stärkere Wachstumshemmung von 4-HPR gegenüber ATRA in der fehlenden Heraufregulierung von Retinsäure-inaktivierenden Cytochromen und der Verlängerung der intrazellulären Halbwertszeit begründet. Letztlich konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Expression eines Retinsäure-Rezeptors oder metabolisierenden Cytochroms und der Resistenz gegenüber einem Retinoid wie ATRA beobachtet werden. Vielversprechend scheint daher in Zukunft die weitere therapeutische Wirkung durch Kombination von Cytochrom-Inhibitoren wie Ketoconazol, Liarozol und R116010 bei Retinoid-unsensitiven Neuroblastomen zu untersuchen.

Neben der Heraufregulierung von Genen, die in der Metabolisierung von Retinoiden involviert waren, konnte laut Genchip sowohl durch ATRA als auch 4-HPR eine Erniedrigung der CD184 Expression detektiert werden. Die verminderte Expression dieses Chemokinrezeptors, dem eine wichtige Funktion bei der aggressiven Invasivität und Migration von Tumorzellen über das chemotaktische Botenmolekül SDF-1 zugeschrieben wird, hatte *in-vitro* geringere Migrationseigenschaften von Tumorzellen zur Folge.

Neben Rezeptoren, die sowohl die immunogene Wirkung als auch die Migrationsneigung von Neuroblastomzellen positiv veränderten, wurde auch die Expression des Tyrosinkinasegekoppelten Rezeptors CD117 durch Retinoide beeinflusst. Im Vergleich zu 4-HPR wurde CD117 ähnlich wie CD54 ausschließlich in ATRA-differenzierten Neuroblastomzellen drastisch überexprimiert. Eine stabile Induktion von CD117 konnte hingegen nur bei einer dauerhaften Kultivierung mit ATRA und darüber hinaus auch mit 4-HPR erzielt werden. Diese Behandlungsform ähnelte dem Therapieschema einer Rezidivprophylaxe von Hoch-Risiko Neuroblastom-Patienten auch stärker. Neuroblastome, die mit Retinoiden behandelt werden, sind befähigt, sich vor Apoptose durch autokrine Sezernierung des Liganden SCF und der Überexpression und Aktivierung von CD117 zu schützen. Mit diesem Hintergrund ließ sich mittels des Tyrosinkinase-Inhibitors STI-571 vorrangig eine Apoptose in konstitutiv und Retinoid-stimulierten CD117-überexprimierenden Neuroblastomzellen erfolgreich induzieren. Neben dem Metabolismus von Retinoiden können Neuroblastome auch über CD117 Resistenzen entwickeln. Am Fallbeispiel einer mehrfach rezidivierenden Neuroblastom-Patientin wurde *in-vivo* die kombinierte Wirkung von ATRA und STI-571 nach vollendeter Chemo- und Strahlentherapie und

der Transplantation allogener hämatopoetischer Stammzellen untersucht. Nach dem dritten Applikationszyklus konnte in der Computertomographie keine vollständige jedoch partielle Reduktion des Tumervolumens im Vergleich zu den vorherigen beiden Zyklen beobachtet werden.

Die Transplantation autologer Stammzellen, die auch Bestandteil der Therapie war, birgt bei Anreicherung von CD34-positiven HSZ die potenzielle Gefahr einer Kontamination mit Tumorzellen, da sich auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen dieses Antigen ebenfalls nachweisen ließ. Die Anwesenheit von Neuroblastomzellen im Knochenmark könnte wiederum aus der Metastasierung von CD184-positiven Neuroblastomzellen durch chemotaktische Wechselwirkung mit dem aus Stromazellen sezernierten SDF-1 resultieren. In der frühen Entwicklungsphase zeichnen sich CD34-positive Stammzellen jedoch auch durch eine Expression von CD133 aus. Durch CD133, das sich auf Neuroblastomzellen identifizieren und durch Retinsäure regulieren ließ, konnten im Gegensatz zu CD34 hämatopoetische Stammzellen ohne Beteiligung von Tumorzellen durch zuvorige Behandlung mit ATRA in der *ex-vivo* Expansion hergestellt werden. Die Beteiligung von Tumorzellen am Transplantat bleibt bis heute jedoch umstritten, da in den Tumorzellen, insbesondere nach der myeloablativen Therapie und der Phase der Lymphopenie, eine Vakzinierung durch Generierung Neuroblastom-spezifischer T-Lymphozyten diskutiert wird. Durch das bessere Verständnis einer Retinoid-induzierten Differenzierung von unreifen Neuroblastomzellen konnten mit Hilfe des DNA-Microarrays klinisch relevante Zielstrukturen identifiziert werden, die neue wirksame Ansätze in der Therapie von Neuroblastom-Patienten bieten. Neben der bereits in der Therapie fest etablierten 13-*cis* Retinsäure stehen mit der ebenfalls natürlichen *all-trans* Retinsäure und dem synthetischen 4-HPR weitere potenzielle Retinoide zur Verfügung, die auch über eine Wachstumshemmung und unterschiedlich starke Differenzierungsaktivität eine Alternative in der Rezidivprophylaxe von Hoch-Risiko Neuroblastom-Patienten darstellen könnten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Evans, A. (2000). Neuroblastoma. A Historical Perspective 1864-1998. In: Brodeur GM., Sawada T., Tsuchida Y., Voute PA. (eds.). *Neuroblastoma. Elsevier Science B. V., Amsterdam (2000) S. 1-8.*
2. Shimada, H., Ambros, I. M., Dehner, L. P., Hata, J., Joshi, V. V. & Roald, B. (1999). Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 86, 349-63.
3. Matthay, K. K. (1995). Neuroblastoma: a clinical challenge and biologic puzzle. *CA Cancer J Clin* 45, 179-92.
4. Mora, J., Gerald, W. L., Qin, J. & Cheung, N. K. (2001). Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management: a review of the MSKCC experience. *Oncologist* 6, 263-8.
5. Matthay, K. K. (1997). Neuroblastoma: biology and therapy. *Oncology (Williston Park)* 11, 1857-66; discussion 1869-72, 1875.
6. Beckwith, J. B. & Perrin, E. V. (1963). In Situ Neuroblastomas: A Contribution to the Natural History of Neural Crest Tumors. *Am J Pathol* 43, 1089-104.
7. Haas, D., Ablin, A. R., Miller, C., Zoger, S. & Matthay, K. K. (1988). Complete pathologic maturation and regression of stage IVS neuroblastoma without treatment. *Cancer* 62, 818-25.
8. Pritchard, J. & Hickman, J. A. (1994). Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously? *Lancet* 344, 869-70.
9. Caron, H. & Pearson, A. (1998). Neuroblastoma. *Cancer in Children, Clinical Management, Voute, Kalifa, Barrett (274-91).*
10. Shimada, H., Ambros, I. M., Dehner, L. P., Hata, J., Joshi, V. V., Roald, B., Stram, D. O., Gerbing, R. B., Lukens, J. N., Matthay, K. K. & Castleberry, R. P. (1999). The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86, 364-72.
11. Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castleberry, R. P., De Bernardi, B., Evans, A. E., Favrot, M., Hedborg, F. & et al. (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11, 1466-77.
12. Maris, J. M. & Matthay, K. K. (1999). Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 17, 2264-79.
13. Brodeur, G. M., Sekhon, G. & Goldstein, M. N. (1977). Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* 40, 2256-63.
14. Gilbert, F., Feder, M., Balaban, G., Brangman, D., Lurie, D. K., Podolsky, R., Rinaldt, V., Vinikoor, N. & Weisband, J. (1984). Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res* 44, 5444-9.
15. Brodeur, G. M., Maris, J. M., Yamashiro, D. J., Hogarty, M. D. & White, P. S. (1997). Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 19, 93-101.
16. Maris, J. M., Weiss, M. J., Guo, C., Gerbing, R. B., Stram, D. O., White, P. S., Hogarty, M. D., Sulman, E. P., Thompson, P. M., Lukens, J. N., Matthay, K. K., Seeger, R. C. & Brodeur, G. M. (2000). Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 18, 1888-99.
17. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3753-7.
18. Cheng, N. C., Van Roy, N., Chan, A., Beitsma, M., Westerveld, A., Speleman, F. & Versteeg, R. (1995). Deletion mapping in neuroblastoma cell lines suggests two distinct tumor suppressor genes in the 1p35-36 region, only one of which is associated with N-myc amplification. *Oncogene* 10, 291-7.
19. Lastowska, M., Roberts, P., Pearson, A. D., Lewis, I., Wolstenholme, J. & Bown, N. (1997). Promiscuous translocations of chromosome arm 17q in human neuroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* 19, 143-9.
20. Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M., O'Neill, S., Pearson, A. D., Plantaz, D., Meddeb, M., Danglot, G., Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Laureys, G., Speleman, F., Nicholson, J., Bernheim, A., Betts, D. R., Vandesompele, J. & Van Roy, N. (1999). Gain of

- chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 340, 1954-61.
21. Barker, P. E. (1982). Double minutes in human tumor cells. *Cancer Genet Cytogenet* 5, 81-94.
 22. Cowell, J. K. (1982). Double minutes and homogeneously staining regions: gene amplification in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 16, 21-59.
 23. Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K. H., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M. & Trent, J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305, 245-8.
 24. Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Schwab, M., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224, 1121-4.
 25. Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S. E., Wong, K. Y. & Hammond, D. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313, 1111-6.
 26. Brodeur, G. M. (1994). Molecular pathology of human neuroblastomas. *Semin Diagn Pathol* 11, 118-25.
 27. Schwab, M. (1994). Where pathology meets molecular biology: N-myc amplification in human neuroblastoma as a paradigm for the clinical use of an oncogene alteration. *Verh Dtsch Ges Pathol* 78, 26-33.
 28. Matthay, K. K., Perez, C., Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Shimada, H., Atkinson, J. B., Black, C. T., Gerbing, R., Haase, G. M., Stram, D. O., Swift, P. & Lukens, J. N. (1998). Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 16, 1256-64.
 29. Brodeur, G. M., Hayes, F. A., Green, A. A., Casper, J. T., Wasson, J., Wallach, S. & Seeger, R. C. (1987). Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res* 47, 4248-53.
 30. 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. *Cancer* 72, 3346-54.
 31. Cohn, S. L., Salwen, H., Quasney, M. W., Ikegaki, N., Cowan, J. M., Herst, C. V., Kennett, R. H., Rosen, S. T., DiGiuseppe, J. A. & Brodeur, G. M. (1990). Prolonged N-myc protein half-life in a neuroblastoma cell line lacking N-myc amplification. *Oncogene* 5, 1821-7.
 32. Canossa, M., Twiss, J. L., Verity, A. N. & Shooter, E. M. (1996). p75(NGFR) and TrkA receptors collaborate to rapidly activate a p75(NGFR)-associated protein kinase. *Embo J* 15, 3369-76.
 33. Tanaka, T., Hiyama, E., Sugimoto, T., Sawada, T., Tanabe, M. & Ida, N. (1995). trk A gene expression in neuroblastoma. The clinical significance of an immunohistochemical study. *Cancer* 76, 1086-95.
 34. Nakagawara, A., Arima, M., Azar, C. G., Scavarda, N. J. & Brodeur, G. M. (1992). Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res* 52, 1364-8.
 35. Nakagawara, A., Arima-Nakagawara, M., Scavarda, N. J., Azar, C. G., Cantor, A. B. & Brodeur, G. M. (1993). Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328, 847-54.
 36. Kogner, P., Barbany, G., Dominici, C., Castello, M. A., Raschella, G. & Persson, H. (1993). Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* 53, 2044-50.
 37. Acheson, A., Conover, J. C., Fandl, J. P., DeChiara, T. M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S. P., Yancopoulos, G. D. & Lindsay, R. M. (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374, 450-3.
 38. Blackburn, E. H. (1991). Telomeres. *Trends Biochem Sci* 16, 378-81.
 39. Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. & Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-5.
 40. Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Matsuura, Y., Piatyszek, M. A. & Shay, J. W. (1995). Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1, 249-55.

41. Hiyama, E., Hiyama, K., Ohtsu, K., Yamaoka, H., Ichikawa, T., Shay, J. W. & Yokoyama, T. (1997). Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* 33, 1932-6.
42. Poremba, C., Willenbring, H., Hero, B., Christiansen, H., Schafer, K. L., Brinkschmidt, C., Jurgens, H., Bocker, W. & Dockhorn-Dworniczak, B. (1999). Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis. *Ann Oncol* 10, 715-21.
43. Gutjahr, P. (1999). Krebs bei Kindern und Jugendlichen. *Deutscher Ärzteverlag* 1999.
44. Berthold, F., Kassenbohmer, R. & Zieschang, J. (1994). Multivariate evaluation of prognostic factors in localized neuroblastoma. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 16, 107-15.
45. 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. *Eur J Cancer* 31A, 541-4.
46. Berthold, F. & Hero, B. (2000). Neuroblastoma: current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs* 59, 1261-77.
47. Chen, A. R. (1999). High-dose therapy with stem cell rescue for pediatric solid tumors: rationale and results. *Pediatr Transplant* 3 Suppl 1, 78-86.
48. Ladenstein, R., Philip, T. & Gardner, H. (1997). Autologous stem cell transplantation for solid tumors in children. *Curr Opin Pediatr* 9, 55-69.
49. Burdach, S., Jurgens, H., Peters, C., Nurnberger, W., Mauz-Korholz, C., Korholz, D., Paulussen, M., Pape, H., Dilloo, D., Koscielniak, E. & et al. (1993). Myeloablative radiochemotherapy and hematopoietic stem-cell rescue in poor-prognosis Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 11, 1482-8.
50. Burdach, S., Nurnberger, W., Laws, H. J., Engel, B. C., Dirksen, U., Krauth, K., Pape, H., Kahn, T., Korholz, D., Gardner, H., Gobel, U. & Jurgens, H. (1996). Myeloablative therapy, stem cell rescue and gene transfer in advanced Ewing tumors. *Bone Marrow Transplant* 18 Suppl 1, S67-8.
51. Reynolds, C. P., Kane, D. J., Einhorn, P. A., Matthay, K. K., Crouse, V. L., Wilbur, J. R., Shurin, S. B. & Seeger, R. C. (1991). Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro and in vivo. *Prog Clin Biol Res* 366, 203-11.
52. Sidell, N. (1982). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 68, 589-96.
53. Matthay, K. K., Villablanca, J. G., Seeger, R. C., Stram, D. O., Harris, R. E., Ramsay, N. K., Swift, P., Shimada, H., Black, C. T., Brodeur, G. M., Gerbing, R. B. & Reynolds, C. P. (1999). Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 341, 1165-73.
54. Berthold, F., Boos, J., Burdach, S., Erttmann, R., Henze, G., Hermann, J., Klingebiel, T., Kremens, B., Schilling, F. H., Schrappe, M., Simon, T. & Hero, B. (2005). Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 6, 649-58.
55. Handgretinger, R., Lang, P., Ihm, K., Schumm, M., Geiselhart, A., Koscielniak, E., Hero, B., Klingebiel, T. & Niethammer, D. (2002). Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34(+) progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution and long-term outcome in children with high-risk neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant* 29, 731-6.
56. Miano, M., Garaventa, A., Pizzitola, M. R., Piccolo, M. S., Dallorso, S., Villavecchia, G. P., Bertolazzi, C., Cabria, M. & De Bernardi, B. (2001). Megatherapy combining I(131) metaiodobenzylguanidine and high-dose chemotherapy with haematopoietic progenitor cell rescue for neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant* 27, 571-4.
57. Reynolds, C. P. & Lemons, R. S. (2001). Retinoid therapy of childhood cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 15, 867-910.
58. Klingebiel, T., Bader, P., Bares, R., Beck, J., Hero, B., Jurgens, H., Lang, P., Niethammer, D., Rath, B. & Handgretinger, R. (1998). Treatment of neuroblastoma stage 4 with 131I-meta-iodo-benzylguanidine, high-dose chemotherapy and immunotherapy. A pilot study. *Eur J Cancer* 34, 1398-402.
59. Mueller, B. M., Romerdahl, C. A., Gillies, S. D. & Reisfeld, R. A. (1990). Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody. *J Immunol* 144, 1382-6.
60. Handgretinger, R., Anderson, K., Lang, P., Dopfer, R., Klingebiel, T., Schrappe, M., Reuland, P., Gillies, S. D., Reisfeld, R. A. & Niethammer, D. (1995). A phase I study of

- human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer* 31A, 261-7.
61. Barker, E., Mueller, B. M., Handgretinger, R., Herter, M., Yu, A. L. & Reisfeld, R. A. (1991). Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 51, 144-9.
 62. Jerne, N. K. (1984). Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol Rev* 79, 5-24.
 63. Cheung, N. K., Guo, H. F., Heller, G. & Cheung, I. Y. (2000). Induction of Ab3 and Ab3' antibody was associated with long-term survival after anti-G(D2) antibody therapy of stage 4 neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 6, 2653-60.
 64. Wolf, G. (1978). A historical note on the mode of administration of vitamin A for the cure of night blindness. *Am J Clin Nutr* 31, 290-2.
 65. Karrer, P., Morf, R. & Schoepp, K. (1931). Zur Kenntnis des Vitamin A aus Fischtranen II. *Helv.Chim.Acta* 14, 1431-1436.
 66. Wald, G. (1934). Carotenoids and the vitamin A cycle in vision. *Nature* 134, 65.
 67. Hale, F. (1933). Pigs born without eye balls. *J. Hered.* 24, 105-106.
 68. Lassen, H. C. A. (1930). Vitamin A deficiency and resistance against a specific infection. A preliminary report. *J. Hygiene* 30, 300-310.
 69. Thompson, J. N., Howell, J. M. & Pitt, G. A. (1964). Vitamin a and Reproduction in Rats. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159, 510-35.
 70. Wolbach, S. B. & Howe, P. R. (1978). Nutrition Classics. The Journal of Experimental Medicine 42: 753-77, 1925. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. S. Burt Wolbach and Percy R. Howe. *Nutr Rev* 36, 16-9.
 71. Sporn, M. B., Dunlop, N. M., Newton, D. L. & Smith, J. M. (1976). Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 35, 1332-8.
 72. Naik, H. R., Kalemkerian, G. & Pienta, K. J. (1995). 4-Hydroxyphenylretinamide in the chemoprevention of cancer. *Adv Pharmacol* 33, 315-47.
 73. Sporn, M. B. & Roberts, A. B. (1985). What is a retinoid? *Ciba Found Symp* 113, 1-5.
 74. Napoli, J. L. (1996). Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 80, S52-62.
 75. Lotan, R. (1995). Cellular Biology of the Retinoids. In: *Degos L., Parkinson DR, eds: Retinoids in oncology. Springer Verlag: 27-42, 1995.*
 76. Napoli, J. L. (1993). Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis. *J Nutr* 123, 362-6.
 77. Ong, D. E. & Chytil, F. (1975). Specificity of cellular retinol-binding protein for compounds with vitamin A activity. *Nature* 255, 74-5.
 78. Fiorella, P. D., Giguere, V. & Napoli, J. L. (1993). Expression of cellular retinoic acid-binding protein (type II) in Escherichia coli. Characterization and comparison to cellular retinoic acid-binding protein (type I). *J Biol Chem* 268, 21545-52.
 79. Duester, G. (1998). Alcohol dehydrogenase as a critical mediator of retinoic acid synthesis from vitamin A in the mouse embryo. *J Nutr* 128, 459S-462S.
 80. Labrecque, J., Dumas, F., Lacroix, A. & Bhat, P. V. (1995). A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem J* 305 (Pt 2), 681-4.
 81. Vermot, J., Fraulob, V., Dolle, P. & Niederreither, K. (2000). Expression of enzymes synthesizing (aldehyde dehydrogenase 1 and reinaldehyde dehydrogenase 2) and metabolizing (Cyp26) retinoic acid in the mouse female reproductive system. *Endocrinology* 141, 3638-45.
 82. Li, H., Wagner, E., McCaffery, P., Smith, D., Andreadis, A. & Drager, U. C. (2000). A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech Dev* 95, 283-9.
 83. Fujii, H., Sato, T., Kaneko, S., Gotoh, O., Fujii-Kuriyama, Y., Osawa, K., Kato, S. & Hamada, H. (1997). Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *Embo J* 16, 4163-73.
 84. Abu-Abed, S., MacLean, G., Fraulob, V., Chambon, P., Petkovich, M. & Dolle, P. (2002). Differential expression of the retinoic acid-metabolizing enzymes CYP26A1 and CYP26B1 during murine organogenesis. *Mech Dev* 110, 173-7.
 85. White, J. A., Beckett-Jones, B., Guo, Y. D., Dilworth, F. J., Bonasoro, J., Jones, G. & Petkovich, M. (1997). cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem* 272, 18538-41.

86. White, J. A., Ramshaw, H., Taimi, M., Stangle, W., Zhang, A., Everingham, S., Creighton, S., Tam, S. P., Jones, G. & Petkovich, M. (2000). Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6403-8.
87. Taimi, M., Helvig, C., Wisniewski, J., Ramshaw, H., White, J., Amad, M., Korczak, B. & Petkovich, M. (2004). A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J Biol Chem* 279, 77-85.
88. Fiorella, P. D. & Napoli, J. L. (1991). Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism. *J Biol Chem* 266, 16572-9.
89. Samokyszyn, V. M., Gall, W. E., Zawada, G., Freyaldenhoven, M. A., Chen, G., Mackenzie, P. I., Tephly, T. R. & Radomska-Pandya, A. (2000). 4-hydroxyretinoic acid, a novel substrate for human liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase(s) and recombinant UGT2B7. *J Biol Chem* 275, 6908-14.
90. Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. & Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-50.
91. Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. & Evans, R. M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-9.
92. Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-95.
93. Giannini, G., Dawson, M. I., Zhang, X. & Thiele, C. J. (1997). Activation of three distinct RXR/RAR heterodimers induces growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 272, 26693-701.
94. Brand, N., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de The, H., Marchio, A., Tiollais, P. & Dejean, A. (1988). Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* 332, 850-3.
95. Benbrook, D., Lernhardt, E. & Pfahl, M. (1988). A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature* 333, 669-72.
96. Zelent, A., Krust, A., Petkovich, M., Kastner, P. & Chambon, P. (1989). Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature* 339, 714-7.
97. Krust, A., Kastner, P., Petkovich, M., Zelent, A. & Chambon, P. (1989). A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5310-4.
98. Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M., Lovey, A. & et al. (1992). 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 355, 359-61.
99. Lovat, P. E., Irving, H., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Bernassola, F., Malcolm, A. J., Pearson, A. D., Melino, G. & Redfern, C. P. (1997). Retinoids in neuroblastoma therapy: distinct biological properties of 9-cis- and all-trans-retinoic acid. *Eur J Cancer* 33, 2075-80.
100. Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 10, 940-54.
101. Mangelsdorf, D. J., Umesono, K. & Evans, R. M. (1994). The retinoid receptors. In: *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine.* (Sporn, M.B., Roberts, A.B., & Goodman, D.S., eds.), pp. 319-349, Raven Press, New York.
102. Seeger, R. C., Siegel, S. E. & Sidell, N. (1982). Neuroblastoma: clinical perspectives, monoclonal antibodies, and retinoic acid. *Ann Intern Med* 97, 873-84.
103. Abemayor, E. & Sidell, N. (1989). Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environ Health Perspect* 80, 3-15.
104. Mey, J. (2001). Retinoic acid as a regulator of cytokine signaling after nerve injury. *Z Naturforsch [C]* 56, 163-76.
105. Voigt, A., Hartmann, P. & Zintl, F. (2000). Differentiation, proliferation and adhesion of human neuroblastoma cells after treatment with retinoic acid. *Cell Adhes Commun* 7, 423-40.
106. Redfern, C. P., Lovat, P. E., Malcolm, A. J. & Pearson, A. D. (1995). Gene expression and neuroblastoma cell differentiation in response to retinoic acid: differential effects of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Eur J Cancer* 31A, 486-94.
107. Han, G., Chang, B., Connor, M. J. & Sidell, N. (1995). Enhanced potency of 9-cis versus all-trans-retinoic acid to induce the differentiation of human neuroblastoma cells. *Differentiation* 59, 61-9.

108. Murayama, A., Suzuki, T. & Matsui, M. (1997). Photoisomerization of retinoic acids in ethanol under room light: a warning for cell biological study of geometrical isomers of retinoids. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 43, 167-76.
109. Ponzoni, M., Bocca, P., Chiesa, V., Decensi, A., Pistoia, V., Raffaghello, L., Rozzo, C. & Montaldo, P. G. (1995). Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. *Cancer Res* 55, 853-61.
110. Huang, M. E., Ye, Y. C., Chen, S. R., Chai, J. R., Lu, J. X., Zhao, L., Gu, L. J. & Wang, Z. Y. (1988). Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72, 567-72.
111. Lawrence, J. A., Adamson, P. C., Caruso, R., Chow, C., Kleiner, D., Murphy, R. F., Venzon, D. J., Shovlin, M., Noone, M., Merino, M., Cowan, K. H., Kaiser, M., O'Shaughnessy, J. & Zujewski, J. (2001). Phase I clinical trial of all-trans-retinoin and tamoxifen in breast cancer patients: toxicity, pharmacokinetic, and biomarker evaluations. *J Clin Oncol* 19, 2754-63.
112. Recchia, F., Sica, G., De Filippis, S., Rosselli, M., Saggio, G., Guerriero, G., Pompili, P. & Rea, S. (2000). Cisplatin, vindesine, mitomycin-C and 13-cis retinoic acid in the treatment of advanced non small cell lung cancer. A phase II pilot study. *Anticancer Res* 20, 1985-90.
113. Zou, C. P., Clifford, J. L., Xu, X. C., Sacks, P. G., Chambon, P., Hong, W. K. & Lotan, R. (1994). Modulation by retinoic acid (RA) of squamous cell differentiation, cellular RA-binding proteins, and nuclear RA receptors in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* 54, 5479-87.
114. Schmutzler, C. & Kohrle, J. (2000). Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer. *Thyroid* 10, 393-406.
115. Boylan, J. F., Lufkin, T., Achkar, C. C., Taneja, R., Chambon, P. & Gudas, L. J. (1995). Targeted disruption of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and RAR gamma results in receptor-specific alterations in retinoic acid-mediated differentiation and retinoic acid metabolism. *Mol Cell Biol* 15, 843-51.
116. Oridate, N., Lotan, D., Mitchell, M. F., Hong, W. K. & Lotan, R. (1995). Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by retinoids: implications for chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl* 23, 80-6.
117. Finklestein, J. Z., Krailo, M. D., Lenarsky, C., Ladisch, S., Blair, G. K., Reynolds, C. P., Sitarz, A. L. & Hammond, G. D. (1992). 13-cis-retinoic acid (NSC 122758) in the treatment of children with metastatic neuroblastoma unresponsive to conventional chemotherapy: report from the Childrens Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* 20, 307-11.
118. Villablanca, J. G., Khan, A. A., Avramis, V. I., Seeger, R. C., Matthay, K. K., Ramsay, N. K. & Reynolds, C. P. (1995). Phase I trial of 13-cis-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 13, 894-901.
119. Abou-Issa, H., Moeschberger, M., el-Masry, W., Tejwani, S., Curley, R. W., Jr. & Webb, T. E. (1995). Relative efficacy of glucarate on the initiation and promotion phases of rat mammary carcinogenesis. *Anticancer Res* 15, 805-10.
120. Decensi, A., Bruno, S., Torrissi, R., Parodi, S. & Polizzi, A. (1994). Pilot study of high dose fenretinide and vitamin A supplementation in bladder cancer. *Eur J Cancer* 30A, 1909-10.
121. McCormick, D. L., Johnson, W. D., Rao, K. V., Bowman-Gram, T., Steele, V. E., Lubet, R. A. & Kelloff, G. J. (1996). Comparative activity of N-(4-hydroxyphenyl)-all-trans-retinamide and alpha-difluoromethylornithine as inhibitors of lymphoma induction in PIM transgenic mice. *Carcinogenesis* 17, 2513-7.
122. Slawin, K., Kadmon, D., Park, S. H., Scardino, P. T., Anzano, M., Sporn, M. B. & Thompson, T. C. (1993). Dietary fenretinide, a synthetic retinoid, decreases the tumor incidence and the tumor mass of ras+myc-induced carcinomas in the mouse prostate reconstitution model system. *Cancer Res* 53, 4461-5.
123. Kelloff, G. J., Crowell, J. A., Boone, C. W., Steele, V. E., Lubet, R. A., Greenwald, P., Alberts, D. S., Covey, J. M., Doody, L. A., Knapp, G. G. & et al. (1994). Clinical development plan: N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *J Cell Biochem Suppl* 20, 176-96.
124. Abou-Issa, H., Curley, R. W., Jr., Panigot, M. J., Wilcox, K. A. & Webb, T. E. (1993). In vivo use of N-(4-hydroxyphenyl retinamide)-O-glucuronide as a breast cancer chemopreventive agent. *Anticancer Res* 13, 1431-6.
125. Decensi, A., Bruno, S., Giaretti, W., Torrissi, R., Curotto, A., Gatteschi, B., Geido, E., Polizzi, A., Costantini, M., Bruzzi, P. & et al. (1992). Activity of 4-HPR in superficial bladder cancer using DNA flow cytometry as an intermediate endpoint. *J Cell Biochem Suppl* 16I, 139-47.

126. Costa, A., Formelli, F., Chiesa, F., Decensi, A., De Palo, G. & Veronesi, U. (1994). Prospects of chemoprevention of human cancers with the synthetic retinoid fenretinide. *Cancer Res* 54, 2032s-2037s.
127. Reynolds, C. P. (2000). Differentiating agents in pediatric malignancies: retinoids in neuroblastoma. *Curr Oncol Rep* 2, 511-8.
128. Reynolds, C. P., Matthay, K. K., Villablanca, J. G. & Maurer, B. J. (2003). Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 197, 185-92.
129. Di Vinci, A., Geido, E., Infusini, E. & Giaretti, W. (1994). Neuroblastoma cell apoptosis induced by the synthetic retinoid N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Int J Cancer* 59, 422-6.
130. Lovat, P. E., Ranalli, M., Annichiarico-Petruzzelli, M., Bernassola, F., Piacentini, M., Malcolm, A. J., Pearson, A. D., Melino, G. & Redfern, C. P. (2000). Effector mechanisms of fenretinide-induced apoptosis in neuroblastoma. *Exp Cell Res* 260, 50-60.
131. Fanjul, A. N., Delia, D., Pierotti, M. A., Rideout, D., Yu, J. Q. & Pfahl, M. (1996). 4-Hydroxyphenyl retinamide is a highly selective activator of retinoid receptors. *J Biol Chem* 271, 22441-6.
132. Delia, D., Aiello, A., Meroni, L., Nicolini, M., Reed, J. C. & Pierotti, M. A. (1997). Role of antioxidants and intracellular free radicals in retinamide-induced cell death. *Carcinogenesis* 18, 943-8.
133. Rotmensz, N., De Palo, G., Formelli, F., Costa, A., Marubini, E., Campa, T., Crippa, A., Danesini, G. M., Delle Grottaglie, M., Di Mauro, M. G. & et al. (1991). Long-term tolerability of fenretinide (4-HPR) in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 27, 1127-31.
134. Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M. A., Bassett, D. E., Jr., Hieter, P., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1997). Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 88, 243-51.
135. Freeman, W. M., Robertson, D. J. & Vrana, K. E. (2000). Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* 29, 1042-6, 1048-55.
136. Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-17.
137. Alwine, J. C., Kemp, D. J. & Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5350-4.
138. Gress, T. M., Hoheisel, J. D., Lennon, G. G., Zehetner, G. & Lehrach, H. (1992). Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome* 3, 609-19.
139. Southern, E. M., Maskos, U. & Elder, J. K. (1992). Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics* 13, 1008-17.
140. Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T. & Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251, 767-73.
141. DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A. & Trent, J. M. (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14, 457-60.
142. Shalon, D., Smith, S. J. & Brown, P. O. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 6, 639-45.
143. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-70.
144. Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276, 1268-72.
145. Frohme, M., Scharm, B., Delius, H., Knecht, R. & Hoheisel, J. D. (2000). Use of representational difference analysis and cDNA arrays for transcriptional profiling of tumor tissue. *Ann N Y Acad Sci* 910, 85-104; discussion 104-5.
146. Lockhart, D. J. & Winzeler, E. A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405, 827-36.
147. Wai, D. H., Schaefer, K. L., Schramm, A., Korsching, E., Van Valen, F., Ozaki, T., Boecker, W., Schweigerer, L., Dockhorn-Dworniczak, B. & Poremba, C. (2002). Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. *Int J Oncol* 20, 441-51.
148. Spix, C., Pastore, G., Sankila, R., Stiller, C. A. & Steliarova-Foucher, E. (2006). Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer* 42, 2081-91.

149. Triche, T. J. & Askin, F. B. (1983). Neuroblastoma and the differential diagnosis of small-, round-, blue-cell tumors. *Hum Pathol* 14, 569-95.
150. Matthay, K. K., Yanik, G., Messina, J., Quach, A., Huberty, J., Cheng, S. C., Veatch, J., Goldsby, R., Brophy, P., Kersun, L. S., Hawkins, R. A. & Maris, J. M. (2007). Phase II study on the effect of disease sites, age, and prior therapy on response to iodine-131-metaiodobenzylguanidine therapy in refractory neuroblastoma. *J Clin Oncol* 25, 1054-60.
151. Furchert, S. E., Lanvers-Kaminsky, C., Juurgens, H., Jung, M., Loidl, A. & Fruhwald, M. C. (2007). Inhibitors of histone deacetylases as potential therapeutic tools for high-risk embryonal tumors of the nervous system of childhood. *Int J Cancer* 120, 1787-94.
152. Ponthan, F., Wickstrom, M., Gleissman, H., Fuskevag, O. M., Segerstrom, L., Sveinbjornsson, B., Redfern, C. P., Eksborg, S., Kogner, P. & Johnsen, J. I. (2007). Celecoxib prevents neuroblastoma tumor development and potentiates the effect of chemotherapeutic drugs in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 13, 1036-44.
153. Tanno, B., Mancini, C., Vitali, R., Mancuso, M., McDowell, H. P., Dominici, C. & Raschella, G. (2006). Down-regulation of insulin-like growth factor I receptor activity by NVP-AEW541 has an antitumor effect on neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 12, 6772-80.
154. Cooper, M. J., Steinberg, S. M., Chatten, J., Evans, A. E. & Israel, M. A. (1992). Plasticity of neuroblastoma tumor cells to differentiate along a fetal adrenal ganglionic lineage predicts for improved patient survival. *J Clin Invest* 90, 2402-8.
155. Gestblom, C., Grynfeld, A., Ora, I., Ortoft, E., Larsson, C., Axelson, H., Sandstedt, B., Cserjesi, P., Olson, E. N. & Pahlman, S. (1999). The basic helix-loop-helix transcription factor dHAND, a marker gene for the developing human sympathetic nervous system, is expressed in both high- and low-stage neuroblastomas. *Lab Invest* 79, 67-79.
156. Hoehner, J. C., Gestblom, C., Hedborg, F., Sandstedt, B., Olsen, L. & Pahlman, S. (1996). A developmental model of neuroblastoma: differentiating stroma-poor tumors' progress along an extra-adrenal chromaffin lineage. *Lab Invest* 75, 659-75.
157. 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. *Cancer Res* 49, 219-25.
158. Ross, R. A., Spengler, B. A., Domenech, C., Porubcin, M., Rettig, W. J. & Biedler, J. L. (1995). Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ* 6, 449-56.
159. Thiele, C. J. (1991). Biology of pediatric peripheral neuroectodermal tumors. *Cancer Metastasis Rev* 10, 311-9.
160. Biedler, J. L., Helson, L. & Spengler, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33, 2643-52.
161. Marini, P., MacLeod, R. A., Treuner, C., Bruchelt, G., Bohm, W., Wolburg, H., Schweizer, P. & Girgert, R. (1999). SiMa, a new neuroblastoma cell line combining poor prognostic cytogenetic markers with high adrenergic differentiation. *Cancer Genet Cytogenet* 112, 161-4.
162. Schlesinger, H. R., Gerson, J. M., Moorhead, P. S., Maguire, H. & Hummeler, K. (1976). Establishment and characterization of human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 36, 3094-100.
163. Pastuszko, A., Yee, D. K., Nelson, D. & Wilson, D. F. (1988). Calcium dependent regulation of catecholamine and serotonin metabolism in human neuroblastoma cells. *Cancer Biochem Biophys* 10, 67-76.
164. Tumilowicz, J. J., Nichols, W. W., Cholon, J. J. & Greene, A. E. (1970). Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res* 30, 2110-8.
165. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
166. Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P. & Gardner, M. B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33, 1027-33.
167. Hurwitz, R., Hozier, J., LeBien, T., Minowada, J., Gajl-Peczalska, K., Kubonishi, I. & Kersey, J. (1979). Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* 23, 174-80.
168. Schneider, U., Schwenk, H. U. & Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19, 621-6.

169. Dick, T., Staeger, M. S., Reichmann, G. & Reske-Kunz, A. B. (1993). Manifestation of the MHC-unrestricted killing potential of a cytotoxic T cell clone requires activation in response to MHC-restricted self-presentation of antigen. *J Immunol* 150, 2575-83.
170. Schuler, G. D. (1997). Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med* 75, 694-8.
171. Schuler, G. D., Boguski, M. S., Stewart, E. A., Stein, L. D., Gyapay, G., Rice, K., White, R. E., Rodriguez-Tome, P., Aggarwal, A., Bajorek, E., Bentolila, S., Birren, B. B., Butler, A., Castle, A. B., Chiannikulchai, N., Chu, A., Clee, C., Cowles, S., Day, P. J., Dibling, T., Drouot, N., Dunham, I., Duprat, S., East, C., Edwards, C., Fan, J. B., Fang, N., Fizames, C., Garrett, C., Green, L., Hadley, D., Harris, M., Harrison, P., Brady, S., Hicks, A., Holloway, E., Hui, L., Hussain, S., Louis-Dit-Sully, C., Ma, J., MacGilvery, A., Mader, C., Maratukulam, A., Matise, T. C., McKusick, K. B., Morissette, J., Mungall, A., Muselet, D., Nusbaum, H. C., Page, D. C., Peck, A., Perkins, S., Piercy, M., Qin, F., Quackenbush, J., Ranby, S., Reif, T., Rozen, S., Sanders, C., She, X., Silva, J., Slonim, D. K., Soderlund, C., Sun, W. L., Tabar, P., Thangarajah, T., Vega-Czarny, N., Vollrath, D., Voyticky, S., Wilmer, T., Wu, X., Adams, M. D., Auffray, C., Walter, N. A., Brandon, R., Dehejia, A., Goodfellow, P. N., Houlgatte, R., Hudson, J. R., Jr., Ide, S. E., Iorio, K. R., Lee, W. Y., Seki, N., Nagase, T., Ishikawa, K., Nomura, N., Phillips, C., Polymeropoulos, M. H., Sandusky, M., Schmitt, K., Berry, R., Swanson, K., Torres, R., Venter, J. C., Sikela, J. M., Beckmann, J. S., Weissenbach, J., Myers, R. M., Cox, D. R., James, M. R., et al. (1996). A gene map of the human genome. *Science* 274, 540-6.
172. Fodor, S. P., Rava, R. P., Huang, X. C., Pease, A. C., Holmes, C. P. & Adams, C. L. (1993). Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364, 555-6.
173. Schadt, E. E., Li, C., Su, C. & Wong, W. H. (2000). Analyzing high-density oligonucleotide gene expression array data. *J Cell Biochem* 80, 192-202.
174. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-73.
175. Livak, K. & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 4, 402-8.
176. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
177. Ambros, V. (2001). microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107, 823-6.
178. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-97.
179. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23, 4051-60.
180. Zeng, Y. & Cullen, B. R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem* 280, 27595-603.
181. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* 10, 185-91.
182. Cullen, B. R. (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 16, 861-5.
183. Crosland-Taylor, P. J. (1953). A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature* 171, 37-8.
184. Hulett, H. R., Bonner, W. A., Barrett, J. & Herzenberg, L. A. (1969). Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166, 747-9.
185. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. & Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47, 936-42.
186. Gerlier, D. & Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 94, 57-63.
187. Staeger, M. S., Dick, T., Ertl, R., Jahnel, U., Nawrath, H., Rammensee, H. G. & Reske-Kunz, A. B. (1994). The antigen self-presentation function of the cytotoxic T-cell clone 10BK.1 depends on reciprocal peptide presentation. *Immunology* 81, 333-7.
188. Staeger, M. S., Dick, T. & Reske-Kunz, A. B. (1996). Functionally active T cell receptor/CD3 complexes are present at the surface of cloned cytotoxic T cells without fluorescence-immunological detectability. *Cell Immunol* 171, 62-7.

189. Staeger, M. S., Gisch, K. & Reske-Kunz, A. B. (2003). Cytotoxic T cells with reciprocal antigenic peptide presentation function are not generally resistant to mutual lysis. *Immunol Cell Biol* 81, 266-74.
190. Staeger, M. S., Holtappels, R., Thomas, D., Reddehase, M. J. & Reske-Kunz, A. B. (1998). Proliferation and MHC-unrestricted bystander lysis by virus-specific cytotoxic T cells following antigen self-presentation. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 187, 17-21.
191. Staeger, M. S., Schneider, J., Eulitz, M., Scholz, S., Bornkamm, G. W., Wolfel, T. & Reske-Kunz, A. B. (2000). Consequences of antigen self-presentation by tumor-specific cytotoxic T cells. *Immunobiology* 201, 332-46.
192. Albin, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Aaronson, S. A., Kozlowski, J. M. & McEwan, R. N. (1987). A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47, 3239-45.
193. Melchiori, A., Albin, A., Ray, J. M. & Stetler-Stevenson, W. G. (1992). Inhibition of tumor cell invasion by a highly conserved peptide sequence from the matrix metalloproteinase enzyme prosegment. *Cancer Res* 52, 2353-6.
194. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
195. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1998). Molecular Cloning: a laboratory manual, 2 edn, Cold Spring Harbor Laboratory. *Cold Spring Harbor, N.Y.*
196. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
197. Staeger, M. S., Hutter, C., Neumann, I., Foja, S., Hattenhorst, U. E., Hansen, G., Afar, D. & Burdach, S. E. (2004). DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 64, 8213-21.
198. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-8.
199. Scanlan, M. J., Gordon, C. M., Williamson, B., Lee, S. Y., Chen, Y. T., Stockert, E., Jungbluth, A., Ritter, G., Jager, D., Jager, E., Knuth, A. & Old, L. J. (2002). Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis. *Int J Cancer* 98, 485-92.
200. Hiramatsu, T., Sonoda, H., Takanezawa, Y., Morikawa, R., Ishida, M., Kasahara, K., Sanai, Y., Taguchi, R., Aoki, J. & Arai, H. (2003). Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1alpha and mPA-PLA1beta. *J Biol Chem* 278, 49438-47.
201. Muskavitch, M. A. (1994). Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev Biol* 166, 415-30.
202. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. & Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-6.
203. Morrison, S. J., Perez, S. E., Qiao, Z., Verdi, J. M., Hicks, C., Weinmaster, G. & Anderson, D. J. (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 101, 499-510.
204. Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O. & Guillemot, F. (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29, 401-13.
205. Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F. & Kageyama, R. (2000). Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *Embo J* 19, 5460-72.
206. Axelson, H. (2004). The Notch signaling cascade in neuroblastoma: role of the basic helix-loop-helix proteins HASH-1 and HES-1. *Cancer Lett* 204, 171-8.
207. Grynfeld, A., Pahlman, S. & Axelson, H. (2000). Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1. *Int J Cancer* 88, 401-10.
208. Pahlman, S., Stockhausen, M. T., Fredlund, E. & Axelson, H. (2004). Notch signaling in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 14, 365-73.
209. Ichimiya, S., Nimura, Y., Seki, N., Ozaki, T., Nagase, T. & Nakagawara, A. (2001). Downregulation of hASH1 is associated with the retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma cell lines. *Med Pediatr Oncol* 36, 132-4.
210. Soderholm, H., Ortoft, E., Johansson, I., Ljungberg, J., Larsson, C., Axelson, H. & Pahlman, S. (1999). Human achaete-scute homologue 1 (HASH-1) is downregulated in differentiating neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 557-63.

211. Jogi, A., Persson, P., Grynfeld, A., Pahlman, S. & Axelson, H. (2002). Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation. *J Biol Chem* 277, 9118-26.
212. Pahlman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E. & Esscher, T. (1984). Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation. *Cell Differ* 14, 135-44.
213. Lode, H. N., Handgretinger, R., Schuermann, U., Seitz, G., Klingebiel, T., Niethammer, D. & Beck, J. (1997). Detection of neuroblastoma cells in CD34+ selected peripheral stem cells using a combination of tyrosine hydroxylase nested RT-PCR and anti-ganglioside GD2 immunocytochemistry. *Eur J Cancer* 33, 2024-30.
214. Leung, W., Chen, A. R., Klann, R. C., Moss, T. J., Davis, J. M., Noga, S. J., Cohen, K. J., Friedman, A. D., Small, D., Schwartz, C. L., Borowitz, M. J., Wharam, M. D., Paidas, C. N., Long, C. A., Karandish, S., McMannis, J. D., Kastan, M. B. & Civin, C. I. (1998). Frequent detection of tumor cells in hematopoietic grafts in neuroblastoma and Ewing's sarcoma. *Bone Marrow Transplant* 22, 971-9.
215. Tibshirani, R., Hastie, T., Narasimhan, B. & Chu, G. (2002). Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6567-72.
216. Khan, J., Wei, J. S., Ringner, M., Saal, L. H., Ladanyi, M., Westermann, F., Berthold, F., Schwab, M., Antonescu, C. R., Peterson, C. & Meltzer, P. S. (2001). Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 7, 673-9.
217. Voigt, A. & Zintl, F. (2003). Effects of retinoic acid on proliferation, apoptosis, cytotoxicity, migration, and invasion of neuroblastoma cells. *Med Pediatr Oncol* 40, 205-13.
218. Moritake, H., Sugimoto, T., Kuroda, H., Hidaka, F., Takahashi, Y., Tsuneyoshi, M., Yoshida, M. A., Cui, Q., Akiyoshi, K., Izumi, T. & Nuno, H. (2003). Newly established Askin tumor cell line and overexpression of focal adhesion kinase in Ewing sarcoma family of tumors cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 146, 102-9.
219. Schmidt, D., Harms, D. & Burdach, S. (1985). Malignant peripheral neuroectodermal tumours of childhood and adolescence. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 406, 351-65.
220. Janknecht, R. (2005). EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* 363, 1-14.
221. Dagher, R., Pham, T. A., Sorbara, L., Kumar, S., Long, L., Bernstein, D., Mackall, C., Raffel, M., Tsokos, M. & Helman, L. (2001). Molecular confirmation of Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 23, 221-4.
222. Wen, X. Y., Hegele, R. A., Wang, J., Wang, D. Y., Cheung, J., Wilson, M., Yahyapour, M., Bai, Y., Zhuang, L., Skaug, J., Young, T. K., Connelly, P. W., Koop, B. F., Tsui, L. C. & Stewart, A. K. (2003). Identification of a novel lipase gene mutated in *lpd* mice with hypertriglyceridemia and associated with dyslipidemia in humans. *Hum Mol Genet* 12, 1131-43.
223. Foell, J. L., Hesse, M., Volkmer, I., Schmiedel, B. J., Neumann, I. & Staeger, M. S. (2008). Membrane-associated phospholipase A1 beta (LIPI) is an Ewing tumour-associated cancer/testis antigen. *Pediatr Blood Cancer* 51, 228-34.
224. Miller, W. H., Jr., Jakubowski, A., Tong, W. P., Miller, V. A., Rigas, J. R., Benedetti, F., Gill, G. M., Truglia, J. A., Ulm, E., Shirley, M. & Warrell, R. P., Jr. (1995). 9-cis Retinoic Acid Induces Complete Remission But Does Not Reverse Clinically Acquired Retinoid Resistance in Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* 85, 3021-3027.
225. Reynolds, C. P., Schindler, P. F., Jones, D. M., Gentile, J. L., Proffitt, R. T. & Einhorn, P. A. (1994). Comparison of 13-cis-retinoic acid to trans-retinoic acid using human neuroblastoma cell lines. *Prog Clin Biol Res* 385, 237-44.
226. Villablanca, J. G., Krailo, M. D., Ames, M. M., Reid, J. M., Reaman, G. H. & Reynolds, C. P. (2006). Phase I trial of oral fenretinide in children with high-risk solid tumors: a report from the Children's Oncology Group (CCG 09709). *J Clin Oncol* 24, 3423-30.
227. Mariotti, A., Marcora, E., Bunone, G., Costa, A., Veronesi, U., Pierotti, M. A. & Della Valle, G. (1994). N-(4-hydroxyphenyl)retinamide: a potent inducer of apoptosis in human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 86, 1245-7.
228. Wang, H., Maurer, B. J., Reynolds, C. P. & Cabot, M. C. (2001). N-(4-hydroxyphenyl)retinamide elevates ceramide in neuroblastoma cell lines by coordinate activation of serine palmitoyltransferase and ceramide synthase. *Cancer Res* 61, 5102-5.
229. Clifford, J. L., Menter, D. G., Wang, M., Lotan, R. & Lippman, S. M. (1999). Retinoid receptor-dependent and -independent effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in F9 embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 59, 14-8.

230. Ribatti, D., Alessandri, G., Baronio, M., Raffaghello, L., Cosimo, E., Marimpietri, D., Montaldo, P. G., De Falco, G., Caruso, A., Vacca, A. & Ponzoni, M. (2001). Inhibition of neuroblastoma-induced angiogenesis by fenretinide. *Int J Cancer* 94, 314-21.
231. Villa, M. L., Ferrario, E., Trabattoni, D., Formelli, F., De Palo, G., Magni, A., Veronesi, U. & Clerici, E. (1993). Retinoids, breast cancer and NK cells. *Br J Cancer* 68, 845-50.
232. Raffaghello, L., Pagnan, G., Pastorino, F., Cosimo, E., Brignole, C., Marimpietri, D., Montaldo, P. G., Gambini, C., Allen, T. M., Bogenmann, E. & Ponzoni, M. (2003). In vitro and in vivo antitumor activity of liposomal Fenretinide targeted to human neuroblastoma. *Int J Cancer* 104, 559-67.
233. Maurer, B. J., Kalous, O., Yesair, D. W., Wu, X., Janeba, J., Maldonado, V., Khankaldyyan, V., Frgala, T., Sun, B. C., McKee, R. T., Burgess, S. W., Shaw, W. A. & Reynolds, C. P. (2007). Improved oral delivery of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide with a novel LYM-X-SORB organized lipid complex. *Clin Cancer Res* 13, 3079-86.
234. Adamson, P. C., Matthay, K. K., O'Brien, M., Reaman, G. H., Sato, J. K. & Balis, F. M. (2006). A phase 2 trial of all-trans-retinoic acid in combination with interferon-alpha2a in children with recurrent neuroblastoma or Wilms tumor: A Pediatric Oncology Branch, NCI and Children's Oncology Group Study. *Pediatr Blood Cancer*.
235. Tallman, M. S., Andersen, J. W., Schiffer, C. A., Appelbaum, F. R., Feusner, J. H., Ogden, A., Shepherd, L., Willman, C., Bloomfield, C. D., Rowe, J. M. & Wiernik, P. H. (1997). All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 337, 1021-8.
236. Li, Y. P., Andersen, J., Zelent, A., Rao, S., Paietta, E., Tallman, M. S., Wiernik, P. H. & Gallagher, R. E. (1997). RAR alpha1/RAR alpha2-PML mRNA expression in acute promyelocytic leukemia cells: a molecular and laboratory-clinical correlative study. *Blood* 90, 306-12.
237. Castaigne, S., Lefebvre, P., Chomienne, C., Suc, E., Rigal-Huguet, F., Gardin, C., Delmer, A., Archimbaud, E., Tilly, H., Janvier, M. & et al. (1993). Effectiveness and pharmacokinetics of low-dose all-trans retinoic acid (25 mg/m²) in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 82, 3560-3.
238. Gaetano, C., Matsumoto, K. & Thiele, C. J. (1992). In vitro activation of distinct molecular and cellular phenotypes after induction of differentiation in a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res* 52, 4402-7.
239. Wainwright, L. J., Lasorella, A. & Iavarone, A. (2001). Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9396-400.
240. Born, T. L., Frost, J. A., Schonthal, A., Prendergast, G. C. & Feramisco, J. R. (1994). c-Myc cooperates with activated Ras to induce the cdc2 promoter. *Mol Cell Biol* 14, 5710-8.
241. Galaktionov, K., Chen, X. & Beach, D. (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 382, 511-7.
242. Daksis, J. I., Lu, R. Y., Facchini, L. M., Marhin, W. W. & Penn, L. J. (1994). Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* 9, 3635-45.
243. Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L. & Nevins, J. R. (1997). Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 387, 422-6.
244. Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J. & Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-33.
245. Villani, M. G., Appierto, V., Cavadini, E., Bettiga, A., Prinetti, A., Clagett-Dame, M., Curley, R. W. & Formelli, F. (2006). 4-oxo-fenretinide, a recently identified fenretinide metabolite, induces marked G2-M cell cycle arrest and apoptosis in fenretinide-sensitive and fenretinide-resistant cell lines. *Cancer Res* 66, 3238-47.
246. Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J. & Bishop, J. M. (1982). Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* 42, 773-9.
247. Henriksson, M. & Luscher, B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 68, 109-82.
248. Cole, M. D. (1986). The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet* 20, 361-84.
249. Little, C. D., Nau, M. M., Carney, D. N., Gazdar, A. F. & Minna, J. D. (1983). Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306, 194-6.

250. Mariani-Costantini, R., Escot, C., Theillet, C., Gentile, A., Merlo, G., Lidereau, R. & Callahan, R. (1988). In situ c-myc expression and genomic status of the c-myc locus in infiltrating ductal carcinomas of the breast. *Cancer Res* 48, 199-205.
251. Augenlicht, L. H., Wadler, S., Corner, G., Richards, C., Ryan, L., Multani, A. S., Pathak, S., Benson, A., Haller, D. & Heerdt, B. G. (1997). Low-level c-myc amplification in human colonic carcinoma cell lines and tumors: a frequent, p53-independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi-institutional trial. *Cancer Res* 57, 1769-75.
252. He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-12.
253. Blackwood, E. M. & Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-7.
254. Ayer, D. E., Kretzner, L. & Eisenman, R. N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-22.
255. Mai, S. & Jalava, A. (1994). c-Myc binds to 5' flanking sequence motifs of the dihydrofolate reductase gene in cellular extracts: role in proliferation. *Nucleic Acids Res* 22, 2264-73.
256. Pusch, O., Soucek, T., Hengstschlager-Ottner, E., Bernaschek, G. & Hengstschlager, M. (1997). Cellular targets for activation by c-Myc include the DNA metabolism enzyme thymidine kinase. *DNA Cell Biol* 16, 737-47.
257. Wang, J., Xie, L. Y., Allan, S., Beach, D. & Hannon, G. J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12, 1769-74.
258. Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R. & Dang, C. V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6658-63.
259. Rosenwald, I. B., Rhoads, D. B., Callanan, L. D., Isselbacher, K. J. & Schmidt, E. V. (1993). Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6175-8.
260. Nesbit, C. E., Tersak, J. M. & Prochownik, E. V. (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18, 3004-16.
261. Lutz, W., Stohr, M., Schurmann, J., Wenzel, A., Lohr, A. & Schwab, M. (1996). Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene* 13, 803-12.
262. Hogarty, M. D. (2003). The requirement for evasion of programmed cell death in neuroblastomas with MYCN amplification. *Cancer Lett* 197, 173-9.
263. Woo, C. W., Tan, F., Cassano, H., Lee, J., Lee, K. C. & Thiele, C. J. (2007). Use of RNA interference to elucidate the effect of MYCN on cell cycle in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*.
264. Nara, K., Kusafuka, T., Yoneda, A., Oue, T., Sangkhathat, S. & Fukuzawa, M. (2007). Silencing of MYCN by RNA interference induces growth inhibition, apoptotic activity and cell differentiation in a neuroblastoma cell line with MYCN amplification. *Int J Oncol* 30, 1189-96.
265. Kang, J. H., Rychahou, P. G., Ishola, T. A., Qiao, J., Evers, B. M. & Chung, D. H. (2006). MYCN silencing induces differentiation and apoptosis in human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 192-7.
266. Bouck, N., Stellmach, V. & Hsu, S. C. (1996). How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 69, 135-74.
267. Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P. & Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-99.
268. Sakamuro, D. & Prendergast, G. C. (1999). New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene* 18, 2942-54.
269. Gupta, A., Williams, B. R., Hanash, S. M. & Rawwas, J. (2006). Cellular Retinoic Acid-Binding Protein II Is a Direct Transcriptional Target of MycN in Neuroblastoma. *Cancer Res* 66, 8100-8.
270. Slack, A., Chen, Z., Tonelli, R., Pule, M., Hunt, L., Pession, A. & Shohet, J. M. (2005). The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 731-6.
271. Momand, J., Wu, H. H. & Dasgupta, G. (2000). MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242, 15-29.

272. Nilsson, J. A. & Cleveland, J. L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22, 9007-21.
273. Eischen, C. M., Roussel, M. F., Korsmeyer, S. J. & Cleveland, J. L. (2001). Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* 21, 7653-62.
274. van Noesel, M. M. & Versteeg, R. (2004). Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'. *Gene* 325, 1-15.
275. Armstrong, J. L., Redfern, C. P. & Veal, G. J. (2005). 13-cis retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology--is changing shape the key to success? *Biochem Pharmacol* 69, 1299-306.
276. Niederreither, K., Abu-Abed, S., Schuhbauer, B., Petkovich, M., Chambon, P. & Dolle, P. (2002). Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat Genet* 31, 84-8.
277. Reijntjes, S., Blentic, A., Gale, E. & Maden, M. (2005). The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev Biol* 285, 224-37.
278. Armstrong, J. L., Ruiz, M., Boddy, A. V., Redfern, C. P., Pearson, A. D. & Veal, G. J. (2005). Increasing the intracellular availability of all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Br J Cancer* 92, 696-704.
279. Van Wauwe, J., Van Nyen, G., Coene, M. C., Stoppie, P., Cools, W., Goossens, J., Borghgraef, P. & Janssen, P. A. (1992). Liarozole, an inhibitor of retinoic acid metabolism, exerts retinoid-mimetic effects in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 261, 773-9.
280. Van Wauwe, J. P., Coene, M. C., Goossens, J., Van Nijen, G., Cools, W. & Lauwers, W. (1988). Ketoconazole inhibits the in vitro and in vivo metabolism of all-trans-retinoic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 245, 718-22.
281. Van Heusden, J., Van Ginckel, R., Bruwiere, H., Moelans, P., Janssen, B., Floren, W., van der Leede, B. J., van Dun, J., Sanz, G., Venet, M., Dillen, L., Van Hove, C., Willemsens, G., Janicot, M. & Wouters, W. (2002). Inhibition of all-TRANS-retinoic acid metabolism by R116010 induces antitumour activity. *Br J Cancer* 86, 605-11.
282. Armstrong, J. L., Taylor, G. A., Thomas, H. D., Boddy, A. V., Redfern, C. P. & Veal, G. J. (2007). Molecular targeting of retinoic acid metabolism in neuroblastoma: the role of the CYP26 inhibitor R116010 in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 96, 1675-83.
283. Taimi, M. & Breitman, T. R. (1997). N-4-hydroxyphenylretinamide enhances retinoic acid-induced differentiation and retinoylation of proteins in the human acute promyelocytic leukemia cell line, NB4, by a mechanism that may involve inhibition of retinoic acid catabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 232, 432-6.
284. Chen, A. C., Guo, X., Derguini, F. & Gudas, L. J. (1997). Human breast cancer cells and normal mammary epithelial cells: retinol metabolism and growth inhibition by the retinol metabolite 4-oxoretinol. *Cancer Res* 57, 4642-51.
285. Chapman, J. S., Weiss, K. L., Curley, R. W., Jr., Highland, M. A. & Clagett-Dame, M. (2003). Hydrolysis of 4-HPR to atRA occurs in vivo but is not required for retinamide-induced apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 419, 234-43.
286. Villani, M. G., Appierto, V., Cavadini, E., Valsecchi, M., Sonnino, S., Curley, R. W. & Formelli, F. (2004). Identification of the fenretinide metabolite 4-oxo-fenretinide present in human plasma and formed in human ovarian carcinoma cells through induction of cytochrome P450 26A1. *Clin Cancer Res* 10, 6265-75.
287. Sundelin, J., Das, S. R., Eriksson, U., Rask, L. & Peterson, P. A. (1985). The primary structure of bovine cellular retinoic acid-binding protein. *J Biol Chem* 260, 6494-9.
288. Redfern, C. P., Lovat, P. E., Malcolm, A. J. & Pearson, A. D. (1994). Differential effects of 9-cis and all-trans retinoic acid on the induction of retinoic acid receptor-beta and cellular retinoic acid-binding protein II in human neuroblastoma cells. *Biochem J* 304 (Pt 1), 147-54.
289. Giguere, V. (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 15, 61-79.
290. Plum, L. A. & Clagett-Dame, M. (1995). 9-cis-retinoic acid selectively activates the cellular retinoic acid binding protein-II gene in human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* 319, 457-63.
291. Sani, B. P., Shealy, Y. F. & Hill, D. L. (1995). N-(4-hydroxyphenyl)retinamide: interactions with retinoid-binding proteins/receptors. *Carcinogenesis* 16, 2531-4.
292. Bertucci, F., Houlgatte, R., Benziane, A., Granjeaud, S., Adelaide, J., Tagett, R., Loriod, B., Jacquemier, J., Viens, P., Jordan, B., Birnbaum, D. & Nguyen, C. (2000). Gene

- expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet* 9, 2981-91.
293. Hibbs, K., Skubitz, K. M., Pambuccian, S. E., Casey, R. C., Bureson, K. M., Oegema, T. R., Jr., Thiele, J. J., Grindle, S. M., Bliss, R. L. & Skubitz, A. P. (2004). Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. *Am J Pathol* 165, 397-414.
294. Dong, D., Ruuska, S. E., Levinthal, D. J. & Noy, N. (1999). Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem* 274, 23695-8.
295. Boylan, J. F. & Gudas, L. J. (1991). Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *J Cell Biol* 112, 965-79.
296. Boylan, J. F. & Gudas, L. J. (1992). The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 267, 21486-91.
297. Tian, K., Norris, A. W., Lin, C. L. & Li, E. (1997). The isolation and characterization of purified heterocomplexes of recombinant retinoic acid receptor and retinoid X receptor ligand binding domains. *Biochemistry* 36, 5669-76.
298. Jing, Y., Waxman, S. & Mira-y-Lopez, R. (1997). The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signaling in breast cancer cells. *Cancer Res* 57, 1668-72.
299. Vo, H. P. & Crowe, D. L. (1998). Transcriptional regulation of retinoic acid responsive genes by cellular retinoic acid binding protein-II modulates RA mediated tumor cell proliferation and invasion. *Anticancer Res* 18, 217-24.
300. Bertucci, F., Van Hulst, S., Bernard, K., Loriod, B., Granjeaud, S., Tagett, R., Starkey, M., Nguyen, C., Jordan, B. & Birnbaum, D. (1999). Expression scanning of an array of growth control genes in human tumor cell lines. *Oncogene* 18, 3905-12.
301. Blaese, M. A., Santo-Hoeltje, L. & Rodemann, H. P. (2003). CRABP I expression and the mediation of the sensitivity of human tumour cells to retinoic acid and irradiation. *Int J Radiat Biol* 79, 981-91.
302. Li, C. M., Guo, M., Borczuk, A., Powell, C. A., Wei, M., Thaker, H. M., Friedman, R., Klein, U. & Tycko, B. (2002). Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol* 160, 2181-90.
303. Delva, L., Cornic, M., Balitrand, N., Guidez, F., Miclea, J. M., Delmer, A., Teillet, F., Fenaux, P., Castaigne, S., Degos, L. & et al. (1993). Resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) therapy in relapsing acute promyelocytic leukemia: study of in vitro ATRA sensitivity and cellular retinoic acid binding protein levels in leukemic cells. *Blood* 82, 2175-81.
304. Zhou, D. C., Hallam, S. J., Lee, S. J., Klein, R. S., Wiernik, P. H., Tallman, M. S. & Gallagher, R. E. (1998). Constitutive expression of cellular retinoic acid binding protein II and lack of correlation with sensitivity to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Cancer Res* 58, 5770-6.
305. Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M. & Thaller, C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397-406.
306. Redfern, C. P. & Todd, C. (1992). Retinoic acid receptor expression in human skin keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro. *J Cell Sci* 102 (Pt 1), 113-21.
307. Redfern, C. P., Daly, A. K., Latham, J. A. & Todd, C. (1990). The biological activity of retinoids in melanoma cells. Induction of expression of retinoic acid receptor-beta by retinoic acid in S91 melanoma cells. *FEBS Lett* 273, 19-22.
308. Clagett-Dame, M., Verhalen, T. J., Biedler, J. L. & Repa, J. J. (1993). Identification and characterization of all-trans-retinoic acid receptor transcripts and receptor protein in human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* 300, 684-93.
309. Lovat, P. E., Pearson, A. D., Malcolm, A. & Redfern, C. P. (1993). Retinoic acid receptor expression during the in vitro differentiation of human neuroblastoma. *Neurosci Lett* 162, 109-13.
310. Wuarin, L., Chang, B., Wada, R. & Sidell, N. (1994). Retinoic acid up-regulates nuclear retinoic acid receptor-alpha expression in human neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 56, 840-5.
311. Goranov, B. B., Campbell Hewson, Q. D., Pearson, A. D. & Redfern, C. P. (2006). Overexpression of RARgamma increases death of SH-SY5Y neuroblastoma cells in response to retinoic acid but not fenretinide. *Cell Death Differ* 13, 676-9.

312. Delia, D., Aiello, A., Formelli, F., Fontanella, E., Costa, A., Miyashita, T., Reed, J. C. & Pierotti, M. A. (1995). Regulation of apoptosis induced by the retinoid N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and effect of deregulated bcl-2. *Blood* 85, 359-67.
313. Yu, V. C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J. M., Devary, O. V., Naar, A. M., Kim, S. Y., Boutin, J. M., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. (1991). RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67, 1251-66.
314. Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J. Y., Staub, A., Garnier, J. M., Mader, S. & et al. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68, 377-95.
315. Abu-Abed, S. S., Beckett, B. R., Chiba, H., Chithalen, J. V., Jones, G., Metzger, D., Chambon, P. & Petkovich, M. (1998). Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. *J Biol Chem* 273, 2409-15.
316. Durand, B., Saunders, M., Leroy, P., Leid, M. & Chambon, P. (1992). All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* 71, 73-85.
317. Gammill, L. S. & Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* 4, 795-805.
318. Wu, J., Saint-Jeannet, J. P. & Klein, P. S. (2003). Wnt-frizzled signaling in neural crest formation. *Trends Neurosci* 26, 40-5.
319. Liem, K. F., Jr., Tremml, G., Roelink, H. & Jessell, T. M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969-79.
320. Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P. & Mayor, R. (2002). Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Dev Biol* 241, 289-301.
321. Le Douarin, N. M., Creuzet, S., Couly, G. & Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131, 4637-50.
322. Cushing, H. & Wollbach, S. B. (1927). The transformation of a malignant paravertebral sympatheticoblastoma into a benign ganglioneuroma. *Am. J. Pathol.* 3.
323. Cohen, P. S., Chan, J. P., Lipkuns kaya, M., Biedler, J. L. & Seeger, R. C. (1994). Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. The Children's Cancer Group. *Blood* 84, 3465-72.
324. Edsjo, A., Nilsson, H., Vandesompele, J., Karlsson, J., Pattyn, F., Culp, L. A., Speleman, F. & Pahlman, S. (2004). Neuroblastoma cells with overexpressed MYCN retain their capacity to undergo neuronal differentiation. *Lab Invest* 84, 406-17.
325. Forehand, C. J., Ezerman, E. B., Goldblatt, J. P., Skidmore, D. L. & Glover, J. C. (1998). Segment-specific pattern of sympathetic preganglionic projections in the chicken embryo spinal cord is altered by retinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10878-83.
326. Sockanathan, S., Perlmann, T. & Jessell, T. M. (2003). Retinoid receptor signaling in postmitotic motor neurons regulates rostrocaudal positional identity and axonal projection pattern. *Neuron* 40, 97-111.
327. Gavalas, A. (2002). ArRAnging the hindbrain. *Trends Neurosci* 25, 61-4.
328. Gavalas, A. & Krumlauf, R. (2000). Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Curr Opin Genet Dev* 10, 380-6.
329. Appel, B. & Eisen, J. S. (2003). Retinoids run rampant: multiple roles during spinal cord and motor neuron development. *Neuron* 40, 461-4.
330. Wilson, L. & Maden, M. (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282, 1-13.
331. Leonard, L., Horton, C., Maden, M. & Pizze y, J. A. (1995). Anteriorization of CRABP-I expression by retinoic acid in the developing mouse central nervous system and its relationship to teratogenesis. *Dev Biol* 168, 514-28.
332. Ulven, S. M., Gundersen, T. E., Weedon, M. S., Landaas, V. O., Sakhi, A. K., Fromm, S. H., Geronimo, B. A., Moskaug, J. O. & Blomhoff, R. (2000). Identification of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins, and receptors during early postimplantation development in mouse: important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-trans-retinoic acid. *Dev Biol* 220, 379-91.
333. Hoover, F., Gundersen, T. E., Ulven, S. M., Michaille, J. J., Blanchet, S., Blomhoff, R. & Glover, J. C. (2001). Quantitative assessment of retinoid signaling pathways in the developing eye and retina of the chicken embryo. *J Comp Neurol* 436, 324-35.

334. Werner, E. A. & Deluca, H. F. (2002). Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E672-8.
335. White, J. C., Shankar, V. N., Highland, M., Epstein, M. L., DeLuca, H. F. & Clagett-Dame, M. (1998). Defects in embryonic hindbrain development and fetal resorption resulting from vitamin A deficiency in the rat are prevented by feeding pharmacological levels of all-trans-retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13459-64.
336. Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I. & Zile, M. (1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr Biol* 6, 417-26.
337. Thiele, C. J., Reynolds, C. P. & Israel, M. A. (1985). Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313, 404-6.
338. Fleming, R. J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* 9, 599-607.
339. Mohr, O. L. (1919). Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics* 4, 275-82.
340. Joutel, A. & Tournier-Lasserre, E. (1998). Notch signalling pathway and human diseases. *Semin Cell Dev Biol* 9, 619-25.
341. Chiamonte, R., Basile, A., Tassi, E., Calzavara, E., Cecchinato, V., Rossi, V., Biondi, A. & Comi, P. (2005). A wide role for NOTCH1 signaling in acute leukemia. *Cancer Lett* 219, 113-20.
342. Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J. & Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* 5, 197-206.
343. Larsson, C., Lardelli, M., White, I. & Lendahl, U. (1994). The human NOTCH1, 2, and 3 genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. *Genomics* 24, 253-8.
344. Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P. & Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90, 281-91.
345. Li, L., Huang, G. M., Banta, A. B., Deng, Y., Smith, T., Dong, P., Friedman, C., Chen, L., Trask, B. J., Spies, T., Rowen, L. & Hood, L. (1998). Cloning, characterization, and the complete 56.8-kilobase DNA sequence of the human NOTCH4 gene. *Genomics* 51, 45-58.
346. Kopczyński, C. C., Alton, A. K., Fachtel, K., Kooh, P. J. & Muskavitch, M. A. (1988). Delta, a *Drosophila* neurogenic gene, is transcriptionally complex and encodes a protein related to blood coagulation factors and epidermal growth factor of vertebrates. *Genes Dev* 2, 1723-35.
347. Fleming, R. J., Scottgale, T. N., Diederich, R. J. & Artavanis-Tsakonas, S. (1990). The gene *Serrate* encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 4, 2188-201.
348. Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T. & Artavanis-Tsakonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus *notch* implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43, 567-81.
349. Gray, G. E., Mann, R. S., Mitsiadis, E., Henrique, D., Carcangiu, M. L., Banks, A., Leiman, J., Ward, D., Ish-Horowitz, D. & Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol* 154, 785-94.
350. Lai, E. C. (2002). Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep* 3, 840-5.
351. Fisher, A. & Caudy, M. (1998). The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *Bioessays* 20, 298-306.
352. Campuzano, S. & Modolell, J. (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet* 8, 202-8.
353. Feder, J. N., Li, L., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. (1994). Genomic cloning and chromosomal localization of HRY, the human homolog to the *Drosophila* segmentation gene, hairy. *Genomics* 20, 56-61.
354. Katoh, M. (2004). Identification and characterization of human HES2, HES3, and HES5 genes in silico. *Int J Oncol* 25, 529-34.
355. Bessho, Y., Miyoshi, G., Sakata, R. & Kageyama, R. (2001). Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes Cells* 6, 175-85.

356. Akazawa, C., Sasai, Y., Nakanishi, S. & Kageyama, R. (1992). Molecular characterization of a rat negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem* 267, 21879-85.
357. Feder, J. N., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. (1993). A rat gene with sequence homology to the Drosophila gene hairy is rapidly induced by growth factors known to influence neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 13, 105-13.
358. Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I. & Caudy, M. (1994). Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of Drosophila sensory organ formation. *Genes Dev* 8, 2743-55.
359. Takebayashi, K., Sasai, Y., Sakai, Y., Watanabe, T., Nakanishi, S. & Kageyama, R. (1994). Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. Negative autoregulation through the multiple N box elements. *J Biol Chem* 269, 5150-6.
360. Johnson, J. E., Birren, S. J. & Anderson, D. J. (1990). Two rat homologues of Drosophila achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346, 858-61.
361. Ball, D. W., Azzoli, C. G., Baylin, S. B., Chi, D., Dou, S., Donis-Keller, H., Cumaraswamy, A., Borges, M. & Nelkin, B. D. (1993). Identification of a human achaete-scute homolog highly expressed in neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5648-52.
362. Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J. & Joyner, A. L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-76.
363. Ahmad, I., Dooley, C. M. & Afiat, S. (1998). Involvement of Mash1 in EGF-mediated regulation of differentiation in the vertebrate retina. *Dev Biol* 194, 86-98.
364. Lo, L. C., Johnson, J. E., Wuenschell, C. W., Saito, T. & Anderson, D. J. (1991). Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev* 5, 1524-37.
365. Guillemot, F. & Joyner, A. L. (1993). Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech Dev* 42, 171-85.
366. Seta, Y., Toyono, T., Takeda, S. & Toyoshima, K. (1999). Expression of Mash1 in basal cells of rat circumvallate taste buds is dependent upon gustatory innervation. *FEBS Lett* 444, 43-6.
367. Ito, T., Udaka, N., Ikeda, M., Yazawa, T., Kageyama, R. & Kitamura, H. (2001). Significance of proneural basic helix-loop-helix transcription factors in neuroendocrine differentiation of fetal lung epithelial cells and lung carcinoma cells. *Histol Histopathol* 16, 335-43.
368. van Limpt, V. A., Chan, A. J., Van Sluis, P. G., Caron, H. N., Van Noesel, C. J. & Versteeg, R. (2003). High delta-like 1 expression in a subset of neuroblastoma cell lines corresponds to a differentiated chromaffin cell type. *Int J Cancer* 105, 61-9.
369. Franklin, J. L., Berechid, B. E., Cutting, F. B., Presente, A., Chambers, C. B., Foltz, D. R., Ferreira, A. & Nye, J. S. (1999). Autonomous and non-autonomous regulation of mammalian neurite development by Notch1 and Delta1. *Curr Biol* 9, 1448-57.
370. van Limpt, V., Chan, A., Schramm, A., Eggert, A. & Versteeg, R. (2005). Phox2B mutations and the Delta-Notch pathway in neuroblastoma. *Cancer Lett* 228, 59-63.
371. van Limpt, V., Chan, A., Caron, H., Sluis, P. V., Boon, K., Hermus, M. C. & Versteeg, R. (2000). SAGE analysis of neuroblastoma reveals a high expression of the human homologue of the Drosophila Delta gene. *Med Pediatr Oncol* 35, 554-8.
372. Bray, S. (1998). Notch signalling in Drosophila: three ways to use a pathway. *Semin Cell Dev Biol* 9, 591-7.
373. Savill, N. J. & Sherratt, J. A. (2003). Control of epidermal stem cell clusters by Notch-mediated lateral induction. *Dev Biol* 258, 141-53.
374. Laborda, J., Sausville, E. A., Hoffman, T. & Notario, V. (1993). dlk, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line. *J Biol Chem* 268, 3817-20.
375. Ruiz Gomez, M. & Bate, M. (1997). Segregation of myogenic lineages in Drosophila requires numb. *Development* 124, 4857-66.
376. Klein, T. & Arias, A. M. (1998). Interactions among Delta, Serrate and Fringe modulate Notch activity during Drosophila wing development. *Development* 125, 2951-62.
377. Gross, N., Favre, S., Beck, D. & Meyer, M. (1992). Differentiation-related expression of adhesion molecules and receptors on human neuroblastoma tissues, cell lines and variants. *Int J Cancer* 52, 85-91.

378. Bouillon, M. & Audette, M. (1994). Retinoic acid-stimulated intercellular adhesion molecule-1 expression on SK-N-SH cells: calcium/calmodulin-dependent pathway. *Cancer Res* 54, 4144-9.
379. Bouillon, M., Tessier, P., Boulianne, R., Destrempe, R. & Audette, M. (1991). Regulation by retinoic acid of ICAM-1 expression on human tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1097, 95-102.
380. Rothlein, R., Dustin, M. L., Marlin, S. D. & Springer, T. A. (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 137, 1270-4.
381. Marlin, S. D. & Springer, T. A. (1987). Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51, 813-9.
382. Diamond, M. S., Staunton, D. E., de Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M. L. & Springer, T. A. (1990). ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 111, 3129-39.
383. Vertuani, S., De Geer, A., Levitsky, V., Kogner, P., Kiessling, R. & Levitskaya, J. (2003). Retinoids act as multistep modulators of the major histocompatibility class I presentation pathway and sensitize neuroblastomas to cytotoxic lymphocytes. *Cancer Res* 63, 8006-13.
384. Carlson, L. M., Pahlman, S., De Geer, A., Kogner, P. & Levitskaya, J. (2008). Differentiation induced by physiological and pharmacological stimuli leads to increased antigenicity of human neuroblastoma cells. *Cell Res* 18, 398-411.
385. Altmann, D. M., Hogg, N., Trowsdale, J. & Wilkinson, D. (1989). Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature* 338, 512-4.
386. Dougherty, G. J., Murdoch, S. & Hogg, N. (1988). The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an immune response. *Eur J Immunol* 18, 35-9.
387. Maio, M., Tessitori, G., Pinto, A., Temponi, M., Colombatti, A. & Ferrone, S. (1989). Differential role of distinct determinants of intercellular adhesion molecule-1 in immunologic phenomena. *J Immunol* 143, 181-8.
388. Vanky, F., Wang, P., Patarroyo, M. & Klein, E. (1990). Expression of the adhesion molecule ICAM-1 and major histocompatibility complex class I antigens on human tumor cells is required for their interaction with autologous lymphocytes in vitro. *Cancer Immunol Immunother* 31, 19-27.
389. Webb, D. S., Mostowski, H. S. & Gerrard, T. L. (1991). Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J Immunol* 146, 3682-6.
390. Pandolfi, F., Trentin, L., Boyle, L. A., Stamenkovic, I., Byers, H. R., Colvin, R. B. & Kurnick, J. T. (1992). Expression of cell adhesion molecules in human melanoma cell lines and their role in cytotoxicity mediated by tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer* 69, 1165-73.
391. Sidell, N., Sarafian, T., Kelly, M., Tsuchida, T. & Haussler, M. R. (1986). Retinoic Acid-Induced Differentiation of Human Neuroblastoma: A Cell Variant System Showing Two Distinct Responses. *Exp Cell Biol* 54, 287-300.
392. Sidell, N., Altman, A., Haussler, M. R. & Seeger, R. C. (1983). Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 148, 21-30.
393. Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283, 249-256.
394. Sudhof, T. C., Lottspeich, F., Greengard, P., Mehl, E. & Jahn, R. (1987). The cDNA and derived amino acid sequences for rat and human synaptophysin. *Nucleic Acids Res* 15, 9607.
395. Mukai, M., Torikata, C., Iri, H., Morikawa, Y., Shimizu, K., Shimoda, T., Nukina, N., Ihara, Y. & Kageyama, K. (1986). Expression of neurofilament triplet proteins in human neural tumors. An immunohistochemical study of paraganglioma, ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma, and neuroblastoma. *Am J Pathol* 122, 28-35.
396. Wiedenmann, B., Franke, W. W., Kuhn, C., Moll, R. & Gould, V. E. (1986). Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3500-4.
397. Molenaar, W. M., Baker, D. L., Pleasure, D., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. (1990). The neuroendocrine and neural profiles of neuroblastomas, ganglioneuroblastomas, and ganglioneuromas. *Am J Pathol* 136, 375-82.

398. Kamholz, J., de Ferra, F., Puckett, C. & Lazzarini, R. (1986). Identification of three forms of human myelin basic protein by cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4962-6.
399. Reeves, S. A., Helman, L. J., Allison, A. & Israel, M. A. (1989). Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5178-82.
400. Carlei, F., Polak, J. M., Ceccamea, A., Marangos, P. J., Dahl, D., Cocchia, D., Michetti, F., Lezoche, E. & Speranza, V. (1984). Neuronal and glial markers in tumours of neuroblastic origin. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 404, 313-24.
401. Patapoutian, A. & Reichardt, L. F. (2000). Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol* 10, 392-9.
402. Lee, J. E., Hollenberg, S. M., Snider, L., Turner, D. L., Lipnick, N. & Weintraub, H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-44.
403. Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C. & Guillemot, F. (1997). Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* 124, 1611-21.
404. Ross, R. A., Spengler, B. A. & Biedler, J. L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71, 741-7.
405. Persengiev, S. P., Zhu, X. & Green, M. R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *Rna* 10, 12-8.
406. Hu, Y., Wang, T., Stormo, G. D. & Gordon, J. I. (2004). RNA interference of achaete-scute homolog 1 in mouse prostate neuroendocrine cells reveals its gene targets and DNA binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5559-64.
407. Westin, E. H., Gallo, R. C., Arya, S. K., Eva, A., Souza, L. M., Baluda, M. A., Aaronson, S. A. & Wong-Staal, F. (1982). Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2194-8.
408. Tanno, B., Negroni, A., Vitali, R., Pirozzoli, M. C., Cesi, V., Mancini, C., Calabretta, B. & Raschella, G. (2002). Expression of insulin-like growth factor-binding protein 5 in neuroblastoma cells is regulated at the transcriptional level by c-Myb and B-Myb via direct and indirect mechanisms. *J Biol Chem* 277, 23172-80.
409. Cesi, V., Tanno, B., Vitali, R., Mancini, C., Giuffrida, M. L., Calabretta, B. & Raschella, G. (2002). Cyclin D1-dependent regulation of B-myb activity in early stages of neuroblastoma differentiation. *Cell Death Differ* 9, 1232-9.
410. Raschella, G., Negroni, A., Skorski, T., Pucci, S., Nieborowska-Skorska, M., Romeo, A. & Calabretta, B. (1992). Inhibition of proliferation by c-myb antisense RNA and oligodeoxynucleotides in transformed neuroectodermal cell lines. *Cancer Res* 52, 4221-6.
411. Piacentini, M., Raschella, G., Calabretta, B. & Melino, G. (1994). c-myb down regulation is associated with apoptosis in human neuroblastoma cells. *Cell Death Differ* 1, 85-92.
412. Raschella, G., Cesi, V., Amendola, R., Negroni, A., Tanno, B., Altavista, P., Tonini, G. P., De Bernardi, B. & Calabretta, B. (1999). Expression of B-myb in neuroblastoma tumors is a poor prognostic factor independent from MYCN amplification. *Cancer Res* 59, 3365-8.
413. Thiele, C. J., Cohen, P. S. & Israel, M. A. (1988). Regulation of c-myb expression in human neuroblastoma cells during retinoic acid-induced differentiation. *Mol Cell Biol* 8, 1677-83.
414. Raschella, G., Negroni, A., Sala, A., Pucci, S., Romeo, A. & Calabretta, B. (1995). Requirement of b-myb function for survival and differentiative potential of human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 270, 8540-5.
415. Li, J., Neumann, I., Volkmer, I. & Staeger, M. S. (2010). Down-regulation of achaete-scute complex homolog 1 (ASCL1) in neuroblastoma cells induces up-regulation of insulin-like growth factor 2 (IGF2). *Mol Biol Rep* 259, DOI: 10.1007 / s11033-010-0259-z
416. Lee, M. H., Reynisdottir, I. & Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9, 639-49.
417. Matsuoka, S., Edwards, M. C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J. W. & Elledge, S. J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9, 650-62.
418. Ueno, T., Suita, S. & Zaizen, Y. (1993). Retinoic acid induces insulin-like growth factor II expression in a neuroblastoma cell line. *Cancer Lett* 71, 177-82.
419. Matsumoto, K., Gaetano, C., Daughaday, W. H. & Thiele, C. J. (1992). Retinoic acid regulates insulin-like growth factor II expression in a neuroblastoma cell line. *Endocrinology* 130, 3669-76.

420. Jones, J. I. & Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16, 3-34.
421. Feldman, E. L., Sullivan, K. A., Kim, B. & Russell, J. W. (1997). Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. *Neurobiol Dis* 4, 201-14.
422. LeRoith, D., Baserga, R., Helman, L. & Roberts, C. T., Jr. (1995). Insulin-like growth factors and cancer. *Ann Intern Med* 122, 54-9.
423. Shimasaki, S. & Ling, N. (1991). Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog Growth Factor Res* 3, 243-66.
424. Daughaday, W. H. & Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10, 68-91.
425. El-Badry, O. M., Minniti, C., Kohn, E. C., Houghton, P. J., Daughaday, W. H. & Helman, L. J. (1990). Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Growth Differ* 1, 325-31.
426. Reeve, A. E., Eccles, M. R., Wilkins, R. J., Bell, G. I. & Millow, L. J. (1985). Expression of insulin-like growth factor-II transcripts in Wilms' tumour. *Nature* 317, 258-60.
427. El-Badry, O. M., Helman, L. J., Chatten, J., Steinberg, S. M., Evans, A. E. & Israel, M. A. (1991). Insulin-like growth factor II-mediated proliferation of human neuroblastoma. *J Clin Invest* 87, 648-57.
428. Martin, D. M. & Feldman, E. L. (1993). Regulation of insulin-like growth factor-IL expression and its role in autocrine growth of human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* 155, 290-300.
429. Yee, D., Favoni, R. E., Lebovic, G. S., Lombana, F., Powell, D. R., Reynolds, C. P. & Rosen, N. (1990). Insulin-like growth factor I expression by tumors of neuroectodermal origin with the t(11;22) chromosomal translocation. A potential autocrine growth factor. *J Clin Invest* 86, 1806-14.
430. Resnicoff, M., Abraham, D., Yutanawiboonchai, W., Rotman, H. L., Kajstura, J., Rubin, R., Zoltick, P. & Baserga, R. (1995). The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res* 55, 2463-9.
431. Sullivan, K. A., Castle, V. P., Hanash, S. M. & Feldman, E. L. (1995). Insulin-like growth factor II in the pathogenesis of human neuroblastoma. *Am J Pathol* 147, 1790-8.
432. Pahlman, S., Meyerson, G., Lindgren, E., Schalling, M. & Johansson, I. (1991). Insulin-like growth factor I shifts from promoting cell division to potentiating maturation during neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9994-8.
433. Mattsson, M. E., Enberg, G., Ruusala, A. I., Hall, K. & Pahlman, S. (1986). Mitogenic response of human SH-SY5Y neuroblastoma cells to insulin-like growth factor I and II is dependent on the stage of differentiation. *J Cell Biol* 102, 1949-54.
434. Sumantran, V. N. & Feldman, E. L. (1993). Insulin-like growth factor I regulates c-myc and GAP-43 messenger ribonucleic acid expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Endocrinology* 132, 2017-23.
435. Bernardini, S., Cianfarani, S., Spagnoli, A., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., Massoud, R., Boscherini, B., Finazzi-Agro, A., Rosenfeld, R. G. & Federici, G. (1994). Expression and down-regulation by retinoic acid of IGF binding protein-2 and -4 in medium from human neuroblastoma cells. *J Neuroendocrinol* 6, 409-13.
436. Chambery, D., de Galle, B. & Babajko, S. (1998). Retinoic acid stimulates IGF binding protein (IGFBP)-6 and depresses IGFBP-2 and IGFBP-4 in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J Endocrinol* 159, 227-32.
437. Menouny, M., Binoux, M. & Babajko, S. (1997). Role of insulin-like growth factor binding protein-2 and its limited proteolysis in neuroblastoma cell proliferation: modulation by transforming growth factor-beta and retinoic acid. *Endocrinology* 138, 683-90.
438. Babajko, S., Leneuve, P., Loret, C. & Binoux, M. (1997). IGF-binding protein-6 is involved in growth inhibition in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: its production is both IGF- and cell density-dependent. *J Endocrinol* 152, 221-7.
439. Grellier, P., Berrebi, D., Peuchmaur, M. & Babajko, S. (2002). The IGF system in neuroblastoma xenografts: focus on IGF-binding protein-6. *J Endocrinol* 172, 467-76.
440. Babajko, S. & Binoux, M. (1996). Modulation by retinoic acid of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein expression in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Eur J Endocrinol* 134, 474-80.
441. Chambery, D., Mohseni-Zadeh, S., de Galle, B. & Babajko, S. (1999). N-myc regulation of type I insulin-like growth factor receptor in a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res* 59, 2898-902.

442. Elliott, M. & Maher, E. R. (1994). Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 31, 560-4.
443. Wiedemann, H. R. (1964). [Familial Malformation Complex with Umbilical Hernia and Macroglossia--a "New Syndrome"?]. *J Genet Hum* 13, 223-32.
444. Cohen, M. M., Jr. (2005). Beckwith-Wiedemann syndrome: historical, clinicopathological, and etiopathogenetic perspectives. *Pediatr Dev Pathol* 8, 287-304.
445. Emery, L. G., Shields, M., Shah, N. R. & Garbes, A. (1983). Neuroblastoma associated with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Cancer* 52, 176-9.
446. Tilghman, S. M. (1999). The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 96, 185-93.
447. Diaz-Meyer, N., Day, C. D., Khatod, K., Maher, E. R., Cooper, W., Reik, W., Junien, C., Graham, G., Algar, E., Der Kaloustian, V. M. & Higgins, M. J. (2003). Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 40, 797-801.
448. Lee, M. P., DeBaun, M. R., Mitsuya, K., Galonek, H. L., Brandenburg, S., Oshimura, M. & Feinberg, A. P. (1999). Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5203-8.
449. Fitzpatrick, G. V., Soloway, P. D. & Higgins, M. J. (2002). Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. *Nat Genet* 32, 426-31.
450. Horike, S., Mitsuya, K., Meguro, M., Kotobuki, N., Kashiwagi, A., Notsu, T., Schulz, T. C., Shirayoshi, Y. & Oshimura, M. (2000). Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 9, 2075-83.
451. Alders, M., Hodges, M., Hadjantonakis, A. K., Postmus, J., van Wijk, I., Blik, J., de Meulemeester, M., Westerveld, A., Guillemot, F., Oudejans, C., Little, P. & Mannens, M. (1997). The human Achaete-Scute homologue 2 (ASCL2, HASH2) maps to chromosome 11p15.5, close to IGF2 and is expressed in extravillous trophoblasts. *Hum Mol Genet* 6, 859-67.
452. Guillemot, F., Nagy, A., Auerbach, A., Rossant, J. & Joyner, A. L. (1994). Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* 371, 333-6.
453. Grandjean, V., Smith, J., Schofield, P. N. & Ferguson-Smith, A. C. (2000). Increased IGF-II protein affects p57kip2 expression in vivo and in vitro: implications for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5279-84.
454. DeChiara, T. M., Robertson, E. J. & Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64, 849-59.
455. Ferguson-Smith, A. C., Cattanaach, B. M., Barton, S. C., Beechey, C. V. & Surani, M. A. (1991). Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature* 351, 667-70.
456. Rossi, D. & Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-42.
457. Rottman, J. B. (1999). Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia, and infectious disease. *Vet Pathol* 36, 357-67.
458. Gerard, C. & Rollins, B. J. (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2, 108-15.
459. Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T. & Gutierrez-Ramos, J. C. (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 185, 111-20.
460. Hollinger, S. & Hepler, J. R. (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54, 527-59.
461. Johnson, E. N. & Druey, K. M. (2002). Functional characterization of the G protein regulator RGS13. *J Biol Chem* 277, 16768-74.
462. Druey, K. M., Blumer, K. J., Kang, V. H. & Kehrl, J. H. (1996). Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature* 379, 742-6.
463. Murdoch, C. & Finn, A. (2000). Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95, 3032-43.
464. Murdoch, C. (2000). CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev* 177, 175-84.
465. Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M. & Moser, B. (1994). Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 269, 232-7.

466. Geminder, H., Sagi-Assif, O., Goldberg, L., Meshel, T., Rechavi, G., Witz, I. P. & Ben-Baruch, A. (2001). A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *J Immunol* 167, 4747-57.
467. Airoidi, I., Raffaghello, L., Piovan, E., Cocco, C., Carlini, B., Amadori, A., Corrias, M. V. & Pistoia, V. (2006). CXCL12 does not attract CXCR4+ human metastatic neuroblastoma cells: clinical implications. *Clin Cancer Res* 12, 77-82.
468. Russell, H. V., Hicks, J., Okcu, M. F. & Nuchtern, J. G. (2004). CXCR4 expression in neuroblastoma primary tumors is associated with clinical presentation of bone and bone marrow metastases. *J Pediatr Surg* 39, 1506-11.
469. Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4, 540-50.
470. Scotton, C. J., Wilson, J. L., Scott, K., Stamp, G., Wilbanks, G. D., Fricker, S., Bridger, G. & Balkwill, F. R. (2002). Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 62, 5930-8.
471. Scala, S., Ottaiano, A., Ascierto, P. A., Cavalli, M., Simeone, E., Giuliano, P., Napolitano, M., Franco, R., Botti, G. & Castello, G. (2005). Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 11, 1835-41.
472. Marchesi, F., Monti, P., Leone, B. E., Zerbi, A., Vecchi, A., Piemonti, L., Mantovani, A. & Allavena, P. (2004). Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4. *Cancer Res* 64, 8420-7.
473. Smith, M. C., Luker, K. E., Garbow, J. R., Prior, J. L., Jackson, E., Piwnica-Worms, D. & Luker, G. D. (2004). CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 64, 8604-12.
474. Salmaggi, A., Gelati, M., Pollo, B., Frigerio, S., Eoli, M., Silvani, A., Broggi, G., Ciusani, E., Croci, D., Boiardi, A. & De Rossi, M. (2004). CXCL12 in malignant glial tumors: a possible role in angiogenesis and cross-talk between endothelial and tumoral cells. *J Neurooncol* 67, 305-17.
475. Burger, M., Glodek, A., Hartmann, T., Schmitt-Graff, A., Silberstein, L. E., Fujii, N., Kipps, T. J. & Burger, J. A. (2003). Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene* 22, 8093-101.
476. Hwang, J. H., Chung, H. K., Kim, D. W., Hwang, E. S., Suh, J. M., Kim, H., You, K. H., Kwon, O. Y., Ro, H. K., Jo, D. Y. & Shong, M. (2003). CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 408-16.
477. Corcione, A., Ottonello, L., Tortolina, G., Facchetti, P., Airoidi, I., Guglielmino, R., Dadati, P., Truini, M., Sozzani, S., Dallegri, F. & Pistoia, V. (2000). Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells. *J Natl Cancer Inst* 92, 628-35.
478. Schimanski, C. C., Schwald, S., Simiantonaki, N., Jayasinghe, C., Gonner, U., Wilsberg, V., Junginger, T., Berger, M. R., Galle, P. R. & Moehler, M. (2005). Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 11, 1743-50.
479. Taichman, R. S., Cooper, C., Keller, E. T., Pienta, K. J., Taichman, N. S. & McCauley, L. K. (2002). Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 62, 1832-7.
480. Sun, Y. X., Wang, J., Shelburne, C. E., Lopatin, D. E., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., Pienta, K. J. & Taichman, R. S. (2003). Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 89, 462-73.
481. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-7.
482. Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F., Loetscher, M., Baggiolini, M. & Moser, B. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-5.
483. Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J. & Springer, T. A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-33.
484. Kury, P., Greiner-Petter, R., Cornely, C., Jurgens, T. & Muller, H. W. (2002). Mammalian achaete scute homolog 2 is expressed in the adult sciatic nerve and regulates the expression of Krox24, Mob-1, CXCR4, and p57kip2 in Schwann cells. *J Neurosci* 22, 7586-95.

485. Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A. & Springer, T. A. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184, 1101-9.
486. Nagasawa, T., Kikutani, H. & Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2305-9.
487. Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T. & Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500.
488. Villablanca, E. J., Zhou, D., Valentinis, B., Negro, A., Raccosta, L., Mauri, L., Prinetti, A., Sonnino, S., Bordignon, C., Traversari, C. & Russo, V. (2008). Selected natural and synthetic retinoids impair CCR7- and CXCR4-dependent cell migration in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*.
489. Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U. & Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo J* 6, 3341-51.
490. Geissler, E. N., Ryan, M. A. & Housman, D. E. (1988). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55, 185-92.
491. Nocka, K., Majumder, S., Chabot, B., Ray, P., Cervone, M., Bernstein, A. & Besmer, P. (1989). Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev* 3, 816-26.
492. Radtke, F., Wilson, A. & MacDonald, H. R. (2004). Notch signaling in T- and B-cell development. *Curr Opin Immunol* 16, 174-9.
493. Miettinen, M. & Lasota, J. (2005). KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13, 205-20.
494. Kindblom, L. G., Remotti, H. E., Aldenborg, F. & Meis-Kindblom, J. M. (1998). Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 152, 1259-69.
495. Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad Tunio, G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y. & Kitamura, Y. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279, 577-80.
496. Ernst, S. I., Hubbs, A. E., Przygodzki, R. M., Emory, T. S., Sobin, L. H. & O'Leary, T. J. (1998). KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab Invest* 78, 1633-6.
497. Rubin, B. P., Singer, S., Tsao, C., Duensing, A., Lux, M. L., Ruiz, R., Hibbard, M. K., Chen, C. J., Xiao, S., Tuveson, D. A., Demetri, G. D., Fletcher, C. D. & Fletcher, J. A. (2001). KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 61, 8118-21.
498. Longley, B. J., Jr., Metcalfe, D. D., Tharp, M., Wang, X., Tyrrell, L., Lu, S. Z., Heitjan, D. & Ma, Y. (1999). Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1609-14.
499. Meshinchi, S., Stirewalt, D. L., Alonzo, T. A., Zhang, Q., Sweetser, D. A., Woods, W. G., Bernstein, I. D., Arceci, R. J. & Radich, J. P. (2003). Activating mutations of RTK/ras signal transduction pathway in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 102, 1474-9.
500. Kemmer, K., Corless, C. L., Fletcher, J. A., McGreevey, L., Haley, A., Griffith, D., Cummings, O. W., Wait, C., Town, A. & Heinrich, M. C. (2004). KIT mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol* 164, 305-13.
501. Korja, M., Finne, J., Salmi, T. T., Haapasalo, H., Tanner, M. & Isola, J. (2005). No GIST-type c-kit gain of function mutations in neuroblastic tumours. *J Clin Pathol* 58, 762-5.
502. Neumann, I., Foell, J. L., Bremer, M., Volkmer, I., Korholz, D., Burdach, S. & Staeger, M. S. (2010). Retinoic acid enhances sensitivity of neuroblastoma cells for imatinib mesylate. *Pediatr Blood Cancer* 55, 464-70.
503. Foster, R., Byrnes, E., Meldrum, C., Griffith, R., Ross, G., Upjohn, E., Braue, A., Scott, R., Varigos, G., Ferrao, P. & Ashman, L. K. (2008). Association of paediatric mastocytosis with a polymorphism resulting in an amino acid substitution (M541L) in the transmembrane domain of c-KIT. *Br J Dermatol* 159, 1160-9.
504. Crosier, P. S., Ricciardi, S. T., Hall, L. R., Vitas, M. R., Clark, S. C. & Crosier, K. E. (1993). Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia. *Blood* 82, 1151-8.

505. Caruana, G., Cambareri, A. C. & Ashman, L. K. (1999). Isoforms of c-KIT differ in activation of signalling pathways and transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 18, 5573-81.
506. Rygaard, K., Nakamura, T. & Spang-Thomsen, M. (1993). Expression of the proto-oncogenes c-met and c-kit and their ligands, hepatocyte growth factor/scatter factor and stem cell factor, in SCLC cell lines and xenografts. *Br J Cancer* 67, 37-46.
507. Ricotti, E., Fagioli, F., Garelli, E., Linari, C., Crescenzo, N., Horenstein, A. L., Pistamiglio, P., Vai, S., Berger, M., di Montezemolo, L. C., Madon, E. & Basso, G. (1998). c-kit is expressed in soft tissue sarcoma of neuroectodermic origin and its ligand prevents apoptosis of neoplastic cells. *Blood* 91, 2397-405.
508. Smithey, B. E., Pappo, A. S. & Hill, D. A. (2002). C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 26, 486-92.
509. Beck, D., Gross, N., Brognara, C. B. & Perruisseau, G. (1995). Expression of stem cell factor and its receptor by human neuroblastoma cells and tumors. *Blood* 86, 3132-8.
510. Scotlandi, K., Manara, M. C., Strammiello, R., Landuzzi, L., Benini, S., Perdichizzi, S., Serra, M., Astolfi, A., Nicoletti, G., Lollini, P. L., Bertoni, F., Nanni, P. & Picci, P. (2003). C-kit receptor expression in Ewing's sarcoma: lack of prognostic value but therapeutic targeting opportunities in appropriate conditions. *J Clin Oncol* 21, 1952-60.
511. Vitali, R., Cesi, V., Nicotra, M. R., McDowell, H. P., Donfrancesco, A., Mannarino, O., Natali, P. G., Raschella, G. & Dominici, C. (2003). c-Kit is preferentially expressed in MYCN-amplified neuroblastoma and its effect on cell proliferation is inhibited in vitro by STI-571. *Int J Cancer* 106, 147-52.
512. Strippoli, P., Bagnara, G. P., Montanaro, L., Timeus, F., Ferreri, A. M. & Rocchi, P. (2000). Retinoic acid modulates stem cell factor secretion by human neuroblastoma cell lines. *Anticancer Res* 20, 4361-6.
513. Timeus, F., Crescenzo, N., Valle, P., Pistamiglio, P., Piglione, M., Garelli, E., Ricotti, E., Rocchi, P., Strippoli, P., Cordero di Montezemolo, L., Madon, E., Ramenghi, U. & Basso, G. (1997). Stem cell factor suppresses apoptosis in neuroblastoma cell lines. *Exp Hematol* 25, 1253-60.
514. Iemura, A., Tsai, M., Ando, A., Wershil, B. K. & Galli, S. J. (1994). The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis. *Am J Pathol* 144, 321-8.
515. Hassan, H. T. & Zander, A. (1996). Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis. *Acta Haematol* 95, 257-62.
516. Krams, M., Parwaresch, R., Sipos, B., Heidorn, K., Harms, D. & Rudolph, P. (2004). Expression of the c-kit receptor characterizes a subset of neuroblastomas with favorable prognosis. *Oncogene* 23, 588-95.
517. Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J. & Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2, 561-6.
518. Lugo, T. G., Pendergast, A. M., Muller, A. J. & Witte, O. N. (1990). Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247, 1079-82.
519. Joensuu, H., Roberts, P. J., Sarlomo-Rikala, M., Andersson, L. C., Tervahartiala, P., Tuveson, D., Silberman, S., Capdeville, R., Dimitrijevic, S., Druker, B. & Demetri, G. D. (2001). Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 344, 1052-6.
520. Kilic, T., Alberta, J. A., Zdunek, P. R., Acar, M., Iannarelli, P., O'Reilly, T., Buchdunger, E., Black, P. M. & Stiles, C. D. (2000). Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Cancer Res* 60, 5143-50.
521. Sjoblom, T., Shimizu, A., O'Brien, K. P., Pietras, K., Dal Cin, P., Buchdunger, E., Dumanski, J. P., Ostman, A. & Heldin, C. H. (2001). Growth inhibition of dermatofibrosarcoma protuberans tumors by the platelet-derived growth factor receptor antagonist STI571 through induction of apoptosis. *Cancer Res* 61, 5778-83.
522. Krystal, G. W., Honsawek, S., Litz, J. & Buchdunger, E. (2000). The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. *Clin Cancer Res* 6, 3319-26.
523. Te Kronnie, G., Timeus, F., Rinaldi, A., Crescenzo, N., Spinelli, M., Rosolen, A., Ricotti, E. & Basso, G. (2004). Imatinib mesylate (STI571) interference with growth of neuroectodermal tumour cell lines does not critically involve c-Kit inhibition. *Int J Mol Med* 14, 373-82.

524. Merchant, M. S., Woo, C. W., Mackall, C. L. & Thiele, C. J. (2002). Potential use of imatinib in Ewing's Sarcoma: evidence for in vitro and in vivo activity. *J Natl Cancer Inst* 94, 1673-9.
525. Druker, B. J. (2002). Taking aim at Ewing's sarcoma: is KIT a target and will imatinib work? *J Natl Cancer Inst* 94, 1660-1.
526. Hotfilder, M., Lanvers, C., Jurgens, H., Boos, J. & Vormoor, J. (2002). c-KIT-expressing Ewing tumour cells are insensitive to imatinib mesylate (STI571). *Cancer Chemother Pharmacol* 50, 167-9.
527. Bond, M., Bernstein, M. L., Pappo, A., Schultz, K. R., Krailo, M., Blaney, S. M. & Adamson, P. C. (2007). A phase II study of imatinib mesylate in children with refractory or relapsed solid tumors: A Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer*.
528. Beppu, K., Jaboine, J., Merchant, M. S., Mackall, C. L. & Thiele, C. J. (2004). Effect of imatinib mesylate on neuroblastoma tumorigenesis and vascular endothelial growth factor expression. *J Natl Cancer Inst* 96, 46-55.
529. Uccini, S., Mannarino, O., McDowell, H. P., Pauser, U., Vitali, R., Natali, P. G., Altavista, P., Andreano, T., Coco, S., Boldrini, R., Bosco, S., Clerico, A., Cozzi, D., Donfrancesco, A., Inserra, A., Kokai, G., Losty, P. D., Nicotra, M. R., Raschella, G., Tonini, G. P. & Dominici, C. (2005). Clinical and molecular evidence for c-kit receptor as a therapeutic target in neuroblastic tumors. *Clin Cancer Res* 11, 380-9.
530. Rossler, J., Zambrzycka, I., Lagodny, J., Kontny, U. & Niemeyer, C. M. (2006). Effect of STI-571 (imatinib mesylate) in combination with retinoic acid and gamma-irradiation on viability of neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 1405-12.
531. Antonescu, C. R., Besmer, P., Guo, T., Arkun, K., Hom, G., Koryotowski, B., Leversha, M. A., Jeffrey, P. D., Desantis, D., Singer, S., Brennan, M. F., Maki, R. G. & DeMatteo, R. P. (2005). Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* 11, 4182-90.
532. Heinrich, M. C., Corless, C. L., Blanke, C. D., Demetri, G. D., Joensuu, H., Roberts, P. J., Eisenberg, B. L., von Mehren, M., Fletcher, C. D., Sandau, K., McDougall, K., Ou, W. B., Chen, C. J. & Fletcher, J. A. (2006). Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 24, 4764-74.
533. Koscielniak, E., Gross-Wieltsch, U., Treuner, J., Winkler, P., Klingebiel, T., Lang, P., Bader, P., Niethammer, D. & Handgretinger, R. (2005). Graft-versus-Ewing sarcoma effect and long-term remission induced by haploidentical stem-cell transplantation in a patient with relapse of metastatic disease. *J Clin Oncol* 23, 242-4.
534. Eibl, B., Schwaighofer, H., Nachbaur, D., Marth, C., Gachter, A., Knapp, R., Bock, G., Gassner, C., Schiller, L., Petersen, F. & Niederwieser, D. (1996). Evidence for a graft-versus-tumor effect in a patient treated with marrow ablative chemotherapy and allogeneic bone marrow transplantation for breast cancer. *Blood* 88, 1501-8.
535. Robertson, M. J. & Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421-38.
536. Farag, S. S., Fehniger, T. A., Ruggeri, L., Velardi, A. & Caligiuri, M. A. (2002). Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100, 1935-47.
537. von Mehren, M. (2006). Beyond imatinib: second generation c-KIT inhibitors for the management of gastrointestinal stromal tumors. *Clin Colorectal Cancer* 6 Suppl 1, S30-4.
538. Gonzalez, I., Andreu, E. J., Panizo, A., Inoges, S., Fontalba, A., Fernandez-Luna, J. L., Gaboli, M., Sierrasumaga, L., Martin-Algarra, S., Pardo, J., Prosper, F. & de Alava, E. (2004). Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway, and sensitizes cells to vincristine and doxorubicin-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 10, 751-61.
539. Lord, B. I. & Dexter, T. M. (1995). Which are the hematopoietic stem cells? [or: don't debunk the history!]. *Exp Hematol* 23, 1237-41.
540. Gunji, Y. & Suda, T. (1995). Characterization and Enrichment of Human Hematopoietic Stem Cells. in: Levitt, D., Mertelsmann, R.: *Hematopoietic Stem Cell Marcell Dekker, Inc. 1995*.
541. Spangrude, G. J., Smith, L., Uchida, N., Ikuta, K., Heimfeld, S., Friedman, J. & Weissman, I. L. (1991). Mouse hematopoietic stem cells. *Blood* 78, 1395-402.
542. Andrews, R. G., Singer, J. W. & Bernstein, I. D. (1986). Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 67, 842-5.

543. Cheng, J., Baumhueter, S., Cacalano, G., Carver-Moore, K., Thibodeaux, H., Thomas, R., Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Hague, N., Moore, M. & Lasky, L. A. (1996). Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood* 87, 479-90.
544. Andrews, R. G., Bryant, E. M., Bartelmez, S. H., Muirhead, D. Y., Knitter, G. H., Bensinger, W., Strong, D. M. & Bernstein, I. D. (1992). CD34+ marrow cells, devoid of T and B lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated allogeneic baboons. *Blood* 80, 1693-701.
545. Peault, B., Weissman, I. L., Baum, C., McCune, J. M. & Tsukamoto, A. (1991). Lymphoid reconstitution of the human fetal thymus in SCID mice with CD34+ precursor cells. *J Exp Med* 174, 1283-6.
546. Castleberry, R. P. (1997). Biology and treatment of neuroblastoma. *Pediatr Clin North Am* 44, 919-37.
547. Seeger, R. C. & Reynolds, C. P. (1991). Treatment of high-risk solid tumors of childhood with intensive therapy and autologous bone marrow transplantation. *Pediatr Clin North Am* 38, 393-424.
548. Klingebiel, T., Handgretinger, R., Herter, M., Eppinger, T., Bader, P., Lang, P., Dopfer, R., Scheel-Walter, H., Haus, U. & Niethammer, D. (1995). Autologous transplantation with peripheral blood stem cells in children and young adults after myeloablative treatment: nonrandomized comparison between GM-CSF and G-CSF for mobilization. *J Hematother* 4, 307-14.
549. Moss, T. J., Sanders, D. G., Lasky, L. C. & Bostrom, B. (1990). Contamination of peripheral blood stem cell harvests by circulating neuroblastoma cells. *Blood* 76, 1879-83.
550. Kuroda, T., Saeki, M., Nakano, M. & Mizutani, S. (1997). Clinical application of minimal residual neuroblastoma cell detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Pediatr Surg* 32, 69-72.
551. Reynolds, C. P., Seeger, R. C., Vo, D. D., Black, A. T., Wells, J. & Ugelstad, J. (1986). Model system for removing neuroblastoma cells from bone marrow using monoclonal antibodies and magnetic immunobeads. *Cancer Res* 46, 5882-6.
552. Civin, C. I., Trischmann, T., Kadan, N. S., Davis, J., Noga, S., Cohen, K., Duffy, B., Groenewegen, I., Wiley, J., Law, P., Hardwick, A., Oldham, F. & Gee, A. (1996). Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* 14, 2224-33.
553. Donovan, J., Temel, J., Zuckerman, A., Gribben, J., Fang, J., Pierson, G., Ross, A., Diller, L. & Grupp, S. A. (2000). CD34 selection as a stem cell purging strategy for neuroblastoma: preclinical and clinical studies. *Med Pediatr Oncol* 35, 677-82.
554. Gazitt, Y., Reading, C. C., Hoffman, R., Wickrema, A., Vesole, D. H., Jagannath, S., Condino, J., Lee, B., Barlogie, B. & Tricot, G. (1995). Purified CD34+ Lin- Thy+ stem cells do not contain clonal myeloma cells. *Blood* 86, 381-9.
555. Schiller, G., Vescio, R., Freytes, C., Spitzer, G., Sahebi, F., Lee, M., Wu, C. H., Cao, J., Lee, J. C., Hong, C. H. & et al. (1995). Transplantation of CD34+ peripheral blood progenitor cells after high-dose chemotherapy for patients with advanced multiple myeloma. *Blood* 86, 390-7.
556. Williams, S. F., Lee, W. J., Bender, J. G., Zimmerman, T., Swinney, P., Blake, M., Carreon, J., Schilling, M., Smith, S., Williams, D. E., Oldham, F. & Van Epps, D. (1996). Selection and expansion of peripheral blood CD34+ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood* 87, 1687-91.
557. Burchill, S. A., Kinsey, S. E., Picton, S., Roberts, P., Pinkerton, C. R., Selby, P. & Lewis, I. J. (2001). Minimal residual disease at the time of peripheral blood stem cell harvest in patients with advanced neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 36, 213-9.
558. Baersch, G., Baumann, M., Ritter, J., Jurgens, H. & Vormoor, J. (1999). Expression of AC133 and CD117 on candidate normal stem cell populations in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 107, 572-80.
559. Gordon, P. R., Leimig, T., Babarin-Dorner, A., Houston, J., Holladay, M., Mueller, I., Geiger, T. & Handgretinger, R. (2003). Large-scale isolation of CD133+ progenitor cells from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 31, 17-22.
560. Lang, P., Bader, P., Schumm, M., Feuchtinger, T., Einsele, H., Fuhrer, M., Weinstock, C., Handgretinger, R., Kuci, S., Martin, D., Niethammer, D. & Greil, J. (2004). Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol* 124, 72-9.
561. Emerson, S. G. (1996). Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood* 87, 3082-8.

-
562. Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A. H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J. T., Bray, R. A., Waller, E. K. & Buck, D. W. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90, 5013-21.
563. Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J. & Buck, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-12.
564. Handgretinger, R., Leung, W., Ihm, K., Lang, P., Klingebiel, T. & Niethammer, D. (2003). Tumour cell contamination of autologous stem cells grafts in high-risk neuroblastoma: the good news? *Br J Cancer* 88, 1874-7.
565. Maine, G. N. & Mule, J. J. (2002). Making room for T cells. *J Clin Invest* 110, 157-9.
566. Dummer, W., Niethammer, A. G., Baccala, R., Lawson, B. R., Wagner, N., Reisfeld, R. A. & Theofilopoulos, A. N. (2002). T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity. *J Clin Invest* 110, 185-92.

8 ANHANG

8.1 Individueller Heilversuch durch kombinierte Therapie von Retinsäure mit STI-571

Auf Basis der Sensibilisierung von Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen gegenüber STI-571 wurde zur Verbesserung der Heilungsprognose das Therapieprotokoll einer mehrfach rezidivierenden Neuroblastom-Patientin durch kombinierte Applikation von Retinsäure und STI-571 modifiziert. Die in Zusammenarbeit mit OA Dr. J. Föll produzierten Ergebnisse des individuellen Heilversuches werden in diesem Abschnitt kurz beschrieben. Die Anamnese und das Protokoll zur Behandlung der Neuroblastom-Patientin ist in Abbildung 8-1 vereinfacht dargestellt.

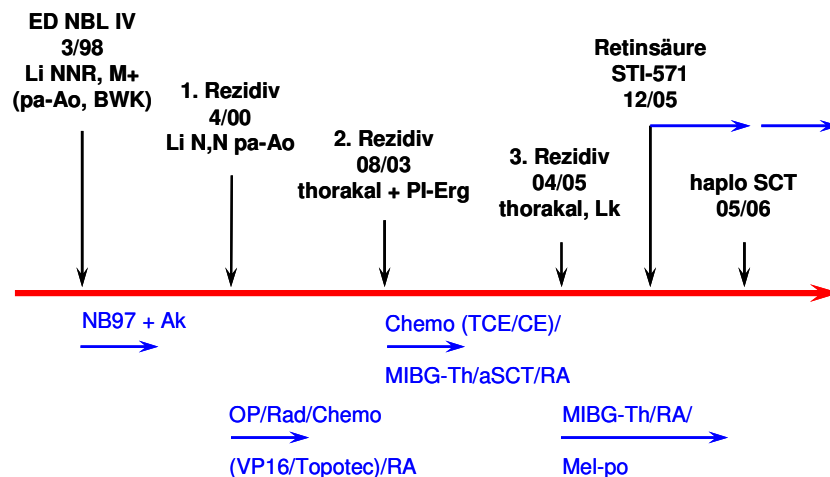


Abbildung 8-1: Vereinfachtes Therapieschema eines individuellen Heilversuches zur Behandlung einer mehrfach rezidivierenden Neuroblastom-Patientin durch Kombination von Retinsäure und STI-571.

Die Erstdiagnose des Neuroblastoms mit dem Stadium IV (ED NBL IV) wurde bei dem 11 Jahre alten Mädchen im März des Jahres 1998 (3/98) gestellt. Der Primärtumor befand sich an der linken Nebennierenrinde (Li NNR) mit Metastasen (M+), die para-aortal (pa-Ao) und am Brustwirbelkörper (BWK) lokalisiert waren. Die chemotherapeutische Behandlung erfolgte wechselseitig in 6 Zyklen nach dem N5- (Vindesin, Cisplatin, Etoposid) und N6-Protokoll (Vincristin, Decarbazin, Ifosfamid, Doxyrubicin). Beide Protokolle sind Bestandteil der multizentrischen Therapiestudie NB97. Nach 4 Chemotherapie-Zyklen wurde der Tumor vollständig entfernt. Eine anschließende genetische Untersuchung des entnommenen Tumorgewebes ergab keine MYCN-Amplifikation oder 1p-Deletion. Eine vollständige Tumorremission wurde erstmals nach 4 Zyklen mit einer oralen Chemotherapie bestehend aus Cyclophosphamid (N7-Protokoll: 150 mg/m² am Tag 1-8 alle 4 Wochen) und einer gekoppelten Immuntherapie mit 6 Infusionszyklen (1 Zyklus alle 2 Monate) des monoklonalen Anti-GD2 Antikörpers (Ak) (Ch14.18; 20 mg/m²/Tag) für 8 bis 12 h über einen Zeitraum von 1-5 Tagen pro Zyklus beobachtet. 6 Monate nach der ersten Therapie wurden im April 2000 (04/00) erstmals ein Lokalrezidiv und Metastasen mit para-aortalem Lymphknotenbefall (Li N,N, pa-Ao) diagnostiziert. Nach einer nahezu vollständigen operativen Entfernung des Tumorrezidives (OP) wurde die Patientin weiterhin mit einer gut ansprechenden 40 Gy starken Strahlen- und Chemotherapie (RAD/Chemo) unterzogen. Die aus 4 Zyklen bestehende Chemotherapie beinhaltete die Komponenten Etoposid (VP16), Topotecan (Topotec) und Retinsäure (RA; 160

mg/m²/Tag am Tag 1-14 alle 4 Wochen für 6 Monate). Trotz dieser Therapiemaßnahmen bildete sich 3 Jahre später bzw. 5 Jahre nach der initialen Diagnose (08/03) ein zweites Rezidiv. Hierbei zeigte sich eine thorakal und abdominal lokalisierte Metastasierung der linken para-aortalen Lymphknoten. Nach weiteren drei Chemotherapie-Zyklen, bestehend aus Topotecan, Cyclophosphamid und Etoposid (TCE) im Wechsel mit Caroplatin und Etoposid (CE), wurde die Patientin mit einer ¹³¹I-MIBG- und myeloablativen Megatherapie (Melphalan, Etoposid und Caroplatin) sowie einer Transplantation autologer Stammzellen (aSCT) behandelt.

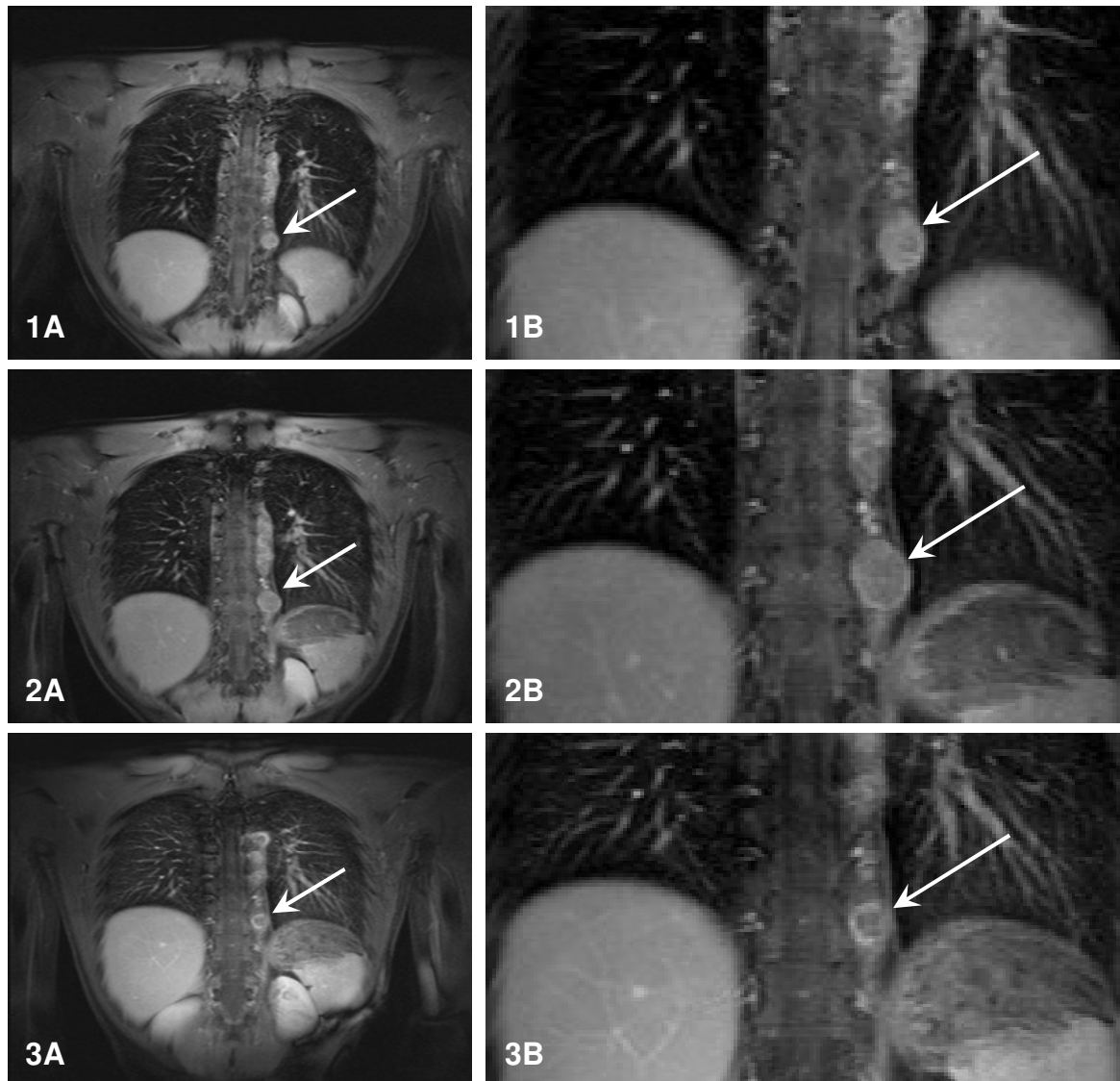


Abbildung 8-2: Verlaufskontrolle eines individuellen Heilversuches einer mehrfach rezidivierenden Neuroblastom-Patientin durch Kombination von Retinsäure mit STI-571 und Visualisierung mittels Computertomographie. Die Aufnahmen zeigen die Lokalisation und Größe des Tumors vor der Behandlung (1A-1B), nach dem ersten (2A-2B) und zweiten Zyklus (3A-3B) der kombinierten Therapie, bestehend aus Retinsäure und STI-571.

Die angewandte Szintigraphie mit Meta-Iodbenzylguanidin (¹³¹I-MIBG) diente unter Ausnutzung der Strahlung sowohl zur Therapie als auch zur Tumorlokalisierung (MIBG-Th). Die Differenzierungs- und Erhaltungstherapie unter Anwendung von Retinsäure (RA) startete 4 bis 6 Wochen im Anschluß an die Megatherapie mit 160 mg/m²/Tag oraler Retinsäure an den Tagen 1-14, gefolgt von einer 14 tägigen Pause innerhalb eines Zeitraumes von 9 Monaten. Ein Jahr nach der Megatherapie und etwa zwei Monate nach der letzten Retinsäure-Therapie entwickelte die Patientin im April 2005 (04/05) ein drittes Rezidiv. Dieses Rezidiv war ebenfalls an den

thorakalen und abdominalen Lymphknoten lokalisiert. Die Patientin wurde daraufhin erneut einer ^{131}I -MIBG-Therapie unterzogen. Aufgrund der weiteren Tumorprogression wurde eine palliative orale Chemotherapie mit dem DNA-Alkylanz Melphalan (8 mg/m^2 für 5 Tage in 4 wöchigem Abstand) peroral (Mel-po) initiiert. Unter diesen Bedingungen schritt laut computertomographischer Auswertung die Tumorprogression weiter voran. Basierend auf den *in-vitro* Erkenntnissen wurde die Patientin seit Dezember 2005 (12/05) mit einem individuellen Heilversuch therapiert, der aus einer wechselnden Kombination von Retinsäure und STI-571 (Gleevec) bestand. Der Ausgangszustand des Tumors vor der kombinierten Therapie mit Retinsäure und STI-571 ist in Form der unterschiedlich vergrößerten Aufnahmen 1A-1B aus der Computer-Tomographie in Abbildung 8-2 dargestellt und durch Pfeile zusätzlich markiert. Der Tumor war zu diesem Zeitpunkt am Grenzstrang der Rückenwirbelsäule lokalisiert. Nach dem ersten Zyklus (2A-2B) ist durch die Applikation der Retinsäure und des Tyrosinkinase-Inhibitors STI-571 keine Reduktion des Tumorumfanges zu beobachten. Eine weitere Aufnahme nach dem zweiten Applikationszyklus mit Retinsäure und STI-571 verdeutlichte hingegen eine deutliche Reduktion des Tumors (3A-3B). Der Tumor war zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig eliminiert, jedoch zeigte das am Grenzstrang restlich verbliebende Neuroblastom eine partielle Reduktion des Tumorumfanges. Trotz einer weiteren haploidentischen allogenen Stammzelltransplantation (haplo SCT) im Mai 2006 (05/06) verstarb die Patientin in Folge einer erneuten Tumorprogression.

8.2 Genübersicht

OMIM ¹	Gen	Genname
102630	ACTB	β-Aktin
100790	ASCL1	<i>Achaete-scute complex, drosophila, homolog of, 1</i>
190080	c-MYC	<i>V-MYC avian myelocytomatosis viral oncogene homolog; MYC</i>
142230	CD34	Hämatopoetisches Vorläuferzellantigen CD34
147840	CD54	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1; ICAM1
164920	CD117	<i>V-KIT hardy-zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog; c-KIT</i>
604365	CD133	Prominin 1
162643	CD184	Chemokin-Rezeptor CXCR4
168461	CCND1	Cyclin D1
600856	CDKN1C	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1c
189990	c-MYB	<i>V-MYB avian myeloblastosis viral oncogene homolog; MYB</i>
180230	CRABP1	Retinsäure-bindendes Protein Typ 1
180231	CRABP2	Retinsäure-bindendes Protein Typ 2
602239	CYP26A1	Cytochrom P450, Subfamilie XXVIA, Polypeptid 1
605207	CYP26B1	Cytochrom P450, Subfamilie XXVIB, Polypeptid 1
608428	CYP26C1	Cytochrom P450, Subfamilie XXVIC, Polypeptid 1
176290	DLK1	<i>Delta, drosophila, homolog-like 1</i>
133450	EWS	Ewing-Sarkom-Gen
193067	FLI1	<i>Friend leukemia virus integration 1</i>
138400	GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
137780	GFAP	Saures Gliafaserprotein
139605	HES-1	<i>Hairy/enhancer of split, drosophila, homolog of, 1</i>
147470	IGF-2	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 2
146731	IGFBP2	Insulin-ähnliches Wachstumsfaktor-bindendes Protein 2
146733	IGFBP4	Insulin-ähnliches Wachstumsfaktor-bindendes Protein 4
146735	IGFBP6	Insulin-ähnliches Wachstumsfaktor-bindendes Protein 6
609252	LIP1	Lipase I
159430	MBP	Basisches Myelinprotein
164840	MYCN	<i>V-MYC avian myelocytomatosis viral-related oncogene, neuroblastoma-derived</i>
162230	NF-H	Neurofilament H, schweres Polypeptid
162280	NF-L	Neurofilament L, leichtes Polypeptid
162250	NF-M	Neurofilament M, mittelschweres Polypeptid
601724	NeuroD1	<i>Neurogenic differentiation 1</i>
162640	NPY	Neuropeptid Y
600275	NOTCH-2	<i>Notch, drosophila, homolog of, 2</i>
180240	RARA	Retinsäure-Rezeptor A
180220	RARB	Retinsäure-Rezeptor B
180245	RXRA	Retinoid-X-Rezeptor A
180246	RXRB	Retinoid-X-Rezeptor B
184745	SCF	Stammzellfaktor; c-KIT-Ligand
600835	SDF-1	Stromalzell-sezernierender Faktor 1; CXCL12
313475	SYP	Synaptophysin
164820	Wnt1	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 1</i>

¹OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) ist eine Datenbank des NCBI, die eine umfassende und aktuelle Sammlung aller 20.000 menschlichen Gene, genetischen Phänotypen und bekannten Erbkrankheiten beinhaltet.

8.3 Abkürzungsverzeichnis²

μ	mikro
°C	Grad Celsius
A	Ampère
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
BM	Knochenmark; <i>bone marrow</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CTP	Cysteintriphosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbeccos' modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure (α -L-Aminosäure)
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFT	<i>Ewing family tumor</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
F	Phenylalanin (α -L-Aminosäure)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FC	<i>Fold change</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
Fl	Fluoreszenz
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-phosphat-dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
I	Isoleucin (α -L-Aminosäure)
Ig	Immunglobulin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IVT	<i>In-vitro</i> Transkription
k	Kilo
K	Lysin (α -L-Aminosäure)
L	Leucin (α -L-Aminosäure)
l	Liter

LDH	Laktat-Dehydrogenase
m	milli
M	molar
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MES	2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure
min	Minute
miRNA	<i>microsomale Ribonucleic Acid</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
N	Asparagin (α -L-Aminosäure)
n	nano
nt	Nukleotide
Oac	Acetat
OD	Optische Dichte
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p	pico
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMCs	<i>Periphere blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer, dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
PI	Propidiumiodid
PLL	Poly-L-Lysin
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
S	Serin (α -L-Aminosäure)
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	<i>short interfering Ribonucleic Acid</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X100	4-(2',2',4',4',-Tetramethylbutyl)-phenyldecaethylglycol
Tween 20 [®]	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaureat
TTP	Thymidintriphosphat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Unit
UTP	Uridintriphosphat
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
w/v	Verhältnis Gewicht/Volumen

²*Begriffe in englischer Sprache sind in kursiv gehalten.*

8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. S. Burdach für die Überlassung des Forschungsthemas und die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe sowie für die stets vertiefenden Diskussionen und Anregungen. Für die Fortführung der Forschung unter der wechselnden Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Horneff, Herrn Prof. Dr. R. Grabitz und Herrn Prof. Dr. D. Körholz möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn PD Dr. M.S. Staeger für die wissenschaftliche Anleitung, den hilfreichen Diskussionen und nützlichen Anregungen bedanken.

Herrn OA Dr. J. Föll danke ich für die anregenden Diskussionen und für die Zusammenarbeit und Durchführung des individuellen Heilversuches.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Prof. A.B. Reske-Kunz (Uniklinik Mainz; Hautklinik; Abteilung Allergie), Herrn Prof. Dr. J. Langner (Uniklinik Halle; Institut für medizinische Immunologie) und Herrn Prof. Dr. F. Berthold (Uniklinik Köln; Kinderklinik und Poliklinik für Kinderheilkunde) für die Bereitstellung diverser Zelllinien bedanken.

Darüber hinaus gilt der gesamten Arbeitsgruppe des Forschungszentrums für krebskranke Kinder mein herzlicher Dank für das entspannte und sehr gute Arbeitsklima und die gemeinsamen, unvergesslichen Abende in fröhlicher Runde.

Bei Frau I. Volkmer möchte ich mich recht herzlich für die Einführung in die DNA-Microarray-Technologie, die ausdauernde Hilfsbereitschaft und das sprichwörtlich offene Ohr bei kleinen und großen Fragen rund um den Laboralltag bedanken.

Meinem Arbeitgeber Hans-Otto Schudlach danke ich für die Geduld und Motivation sowie den Druck meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern und Bruder Jörg bedanken, die mir das Studium ermöglicht haben und mich stets auf meinen Weg moralisch und finanziell unterstützten. Für die Geduld meiner Eltern und Freunde mit meiner Promotion gilt ebenfalls mein Dank.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Manuela, die mich sowohl im Labor als auch im privaten Alltag stets motivierte und an mich glaubte.

8.5 Lebenslauf

Zur Person

Name: Ingo Neumann
 Anschrift: Jägerweg 5
 19053 Schwerin
 E-Mail: ingo.neumann@medlabor-wm.de
 Geburtsdatum: 13.12.1975
 Geburtsort: Perleberg
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: Bundesrepublik Deutschland

Schulbildung

1982 - 1992 Polytechnische Oberschule III „Karl Liebknecht“ Wittenberge
 1992 - 1995 Gymnasium „Marie Curie“ Wittenberge

Hochschulstudium

1996 - 2001 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle (Saale)
 Durchführung der Diplomarbeit im Forschungslabor Kardiologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III; MLU Halle-Wittenberg
 Thema: „Die Rolle von Proteasen bei entzündlichen und apoptotischen Prozessen in Zellen des Herz- und Kreislaufsystems“
 Abschluss: Diplom, Note gut
 10.2001 - 06.2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Forschungslabor Kardiologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III der MLU Halle-Wittenberg

Promotion

10.2002 - 05.2006 Promotion im Forschungslabor für krebskranke Kinder der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, MLU Halle-Wittenberg
 Leitung: PD Dr. M.S. Staeger, Prof. Dr. med. S.G. Burdach

Berufstätigkeit

07.2006 Mitarbeiter und Leiter der Abteilungen klinische Chemie, HPLC (Pharmaka, Drogen, Tumormarker und Vitamine) und Molekularbiologie (PCR) im Labor-MVZ Westmecklenburg Schmudlach-Oswald-Kettermann & Kollegen (Schwerin)

Publikationen

Staeger, M. S., Hattenhorst, U. E., Neumann, I., Hutter, C., Foja, S. & Burdach, S. (2003). DNA-microarrays as tools for the identification of tumor specific gene expression profiles: applications in tumor biology, diagnosis and therapy. *Klin Padiatr* 215, 135-9.

Staeger, M. S., Hutter, C., Neumann, I., Foja, S., Hattenhorst, U. E., Hansen, G., Afar, D. & Burdach, S. E. (2004). DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 64, 8213-21.

Westphal, E., Herzberg, M., Neumann, I., Beibei, L., Pilowski, C., Li, C., Werdan, K. & Loppnow, H. (2006) Neutrophils process interleukin-1beta and interleukin-18 precursors in a caspase-1-like fashion -- processing is inhibited by human vascular smooth muscle cells. *Eur Cytokine Netw* 17, 19-28.

Foell, J. L., Hesse, M., Volkmer, I., Schmiedel, B. J., Neumann, I. & Staeger, M. S. (2008). Membrane-associated phospholipase A1 beta (LIPI) Is an Ewing tumour-associated cancer/testis antigen. *Pediatr Blood Cancer* 51, 228-34.

Neumann, I., Foell, J. L., Bremer, M., Volkmer, I., Korholz, D., Burdach, S. & Staeger, M. S. (2010). Retinoic acid enhances sensitivity of neuroblastoma cells for imatinib mesylate. *Pediatr Blood Cancer* 55, 464-70.

Li, J., Neumann, I., Volkmer, I. & Staeger, M. S. (2010). Down-regulation of achaete-scute complex homolog 1 (ASCL1) in neuroblastoma cells induces up-regulation of insulin-like growth factor 2 (IGF2). *Mol Biol Rep* 259, DOI: 10.1007 / s11033-010-0259-z.

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne andere als die aufgeführten Hilfsmittel angefertigt wurde. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Ich bewerbe mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades. Diese Arbeit wurde in keiner anderen Hochschule oder Universität zur Promotion eingereicht.

Schwerin, Oktober 2010

Ingo Neumann