

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Klinik für Pädiatrische
Hämatologie und Onkologie
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

Klinische und molekulare Charakterisierung eines ungewöhnlichen
Stadium 4S Neuroblastoms mit Amplifikation des MYCN Onkogens

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von Greetje Kirchhoff
aus Wilhelmshaven
2012

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Schramm
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. R. Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 4. April 2013

Publiziertes Abstract

Characterisation of stable cell clones derived from an unusual neuroblastoma stage 4S with MYCN amplification

G Kirchhoff, E Mahlow , A Eggert , A Schramm, Klinische Pädiatrie, 2009, 221

B. Vorträge

Greetje Kirchhoff, Ellen Mahlow, Angelika Eggert, Alexander Schramm

Characterisation of stable cell clones derived from an unusual neuroblastoma stage 4S with MYCN amplification XXII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede 2009

C. Poster

Greetje Kirchhoff, Ellen Mahlow, Johannes H. Schulte, Angelika Eggert, Alexander Schramm *Molekulare Charakterisierung eines Neuroblastoms 4S mit MYCN-Amplifikation* Forschungstag der Universität Duisburg-Essen, 2008

In Dankbarkeit

gegenüber meinen geliebten Eltern

widme ich diese Arbeit den Eltern von Khalil

**Läßt für die Sterblichen größeres Leid · Je sich erdenken, · Als
sterben zu sehen die Kinder?**

(aus Euripides, Die Schutzflehenden 1139/41)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	9
1.1 Das Neuroblastom	9
1.2 Epidemiologie.....	9
1.3 Pathogenese	10
1.4 Früherkennung.....	12
1.5 Klinik.....	12
1.6 Diagnostik	13
1.7 Staging.....	14
1.8 Histologie	15
1.9 Molekularbiologie und -genetik	16
1.9.1 DNA-Index.....	16
1.9.2 Numerische und strukturelle chromosomale Aberrationen	16
1.9.3 Neurotrophinrezeptoren und Liganden	18
1.10 Risikoeinteilung.....	19
1.11 Therapie und Prognose	20
1.12 Das Neuroblastom im Stadium 4S.....	21
1.13 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation.....	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Zellkulturlösungen und Zusätze	24
2.1.2 Zellen und Zelllinien	24
2.1.3 Chemikalien	25
2.1.4 Lösungen und Puffer (sofern keine Bestandteile der kits)	25

2.1.5	Enzyme	26
2.1.6	Antikörper.....	26
2.1.7	Primer-Sequenzen	26
2.1.8	Kits	27
2.1.9	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.10	Geräte	28
2.1.11	Software und Datenbanken	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Kultivierung der Tumorzellen	29
2.2.2	Zellen und Zelllinien	29
2.2.3	Kulturbedingungen	29
2.2.4	Passagieren	30
2.2.5	Einstellen der Zellzahl	30
2.2.6	Kryokonservierung	30
2.2.7	Magnetische Zellsortierung (MACS)	31
2.2.8	Immunfärbung	31
2.2.9	Einzelzellklonierung	32
2.2.10	Invasionsassay	33
2.2.11	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	33
2.2.12	PCR und Gelelektrophorese	35
2.2.13	Quantitative Real-time PCR	36
2.2.14	Durchflußzytometrie	37
2.2.15	Microarray Analyse	38
2.2.16	Array CGH Analyse.....	40

3 Ergebnisse	42
3.1 Klinische Präsentation eines NBIVS mit MYCN-Amplifikation	42
3.2 Etablierung von kultivierten Zellen aus dem Primärtumor	44
3.3 Untersuchung des Genexpressionsmusters mittels qualitativer PCR und quantitativer Real-time PCR	45
3.4 Anreicherung CD56+ NB-Zellen mit Anti-CD56-MACS	47
3.5 Vergleich der Genexpressionsmuster von Primärtumor und etablierten Zellen durch Affymetrix® Genchip Analyse	47
3.6 Einzelzellklonierung zur Anreicherung Trk-exprimierender Zellen..	49
3.7 Migrationsassay zur Invasivität und Anreicherung von TrkB-positiven Zellen	50
3.8 Charakterisierung der ausklonierten Zellen durch Array CGH.....	52
4 Diskussion	55
4.1 NB4S mit MYCN-Amplifikation – ein sehr seltener und hochmaligner Tumor	55
4.2 Verhalten der Tumorzellen in der Zellkultur	56
4.3 NTR- und MYCN-Expression in Tumor und kultivierten Zellen.....	57
4.4 Veränderungen des NTR-Status im Laufe der Kultivierung	58
4.5 Differentielle Genexpression in Tumor und kultivierten Zellen.....	59
4.6 Vereinzelung der Zellen	60
4.7 Invasionspotenzial und Anreicherung der TrkB-positiven Zellen	62
4.8 Analyse der ausklonierten Zellen durch Array CGH	63
5 Zusammenfassung	66
Literaturverzeichnis	67
Abkürzungsverzeichnis	78

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	80
Danksagung.....	81
Anhang 1	82
Anhang 2	82
Lebenslauf	83

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Neuroblastome (NB) sind die häufigsten soliden extrakraniellen Malignome des Kindesalters.

Erstmals wurde 1865 ein Tumor der Nebenniere als krankhaftes Geschwulst beschrieben (Virchow 1865). 1910 prägte Wright für diese Tumore den Begriff „Neuroblastom“ (Wright 1910). Shimada schlug 1984 die Gruppe der „neuroblastischen Tumore“ vor, zu denen er das maligne Neuroblastom ebenso wie die benignen -Ganglioneurom- und nur mäßig aggressiven Formen -Ganglioneuroblastom- zählte (Shimada et al. 1984).

Bei Neuroblastomen handelt sich um embryonale Tumore, die sich aus sympathischen Vorläuferzellen entwickeln und am häufigsten im Nebennierenmark oder im Grenzstrang lokalisiert sind.

Neuroblastome zeichnen sich durch eine enorme klinische und biologische Heterogenität aus. Verläufe reichen von spontaner Regression bis hin zu äußerst schneller Tumorprogression und Metastasierung (Übersichtsartikel in Brodeur et al. 2003).

1.2 Epidemiologie

Neuroblastome machen in etwa 8-10% der kindlichen Krebserkrankungen aus. Mit einer Prävalenz von 1:7.000 Lebendgeborenen ist das Neuroblastom der häufigste maligne, extrakranielle, solide Tumor des Kindesalters (Gurney et al. 1996; 1997). Die Inzidenz beträgt 1,1 Erkrankungen auf 100.000 Kinder. Die meisten Fälle betreffen das Säuglingsalter. Bis zum Erreichen des 1. Lebensjahres sind fast 40% aller Neuroblastome diagnostiziert, bis zum Erreichen des 6. Lebensjahres über 90% (Gadner 2006). Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei 19 Monaten (Pizzo 2005). Ein Auftreten im Jugend- oder Erwachsenenalter ist entsprechend dem embryonalen Ursprung der Tumore sehr selten. Die meisten Studien zeigen eine annähernd gleiche Geschlechterverteilung (Pizzo 2005).

Als erster Hinweis auf das Phänomen der spontanen Regression ist bei Autopsien von Säuglingen, die an anderen Erkrankungen verstorben waren, eine überraschend große Anzahl so genannter „In-situ-Neuroblastome“ dokumentiert worden (Beckwith und Perrin 1963).

Ein familiäres Auftreten dieser Tumorerkrankung ist selten (Maris et al. 2002). Nur 0,3% der Erkrankten weisen eine positive Familienanamnese auf (Berthold et al. 2003).

1.3 Pathogenese

Es existieren unterschiedliche Modelle zur Pathogenese von Neuroblastomen. Beckwith detektierte in Obduktionen von aus anderen Gründen verstorbenen Säuglingen sogenannte „In-situ-Neuroblastome“ mit einer 40fach höheren Inzidenz als erwartet. Er zog die Schlussfolgerung, dass die allermeisten NB degenerieren, bevor sie klinisch auffällig werden können (Beckwith und Perrin 1963). Seine Beobachtungen trugen zum Model der Differenzierungshemmung bzw. Differenzierungsverzögerung in der Pathogenese von NB bei.

Ein von Maris und Matthay favorisiertes Modell bezieht bekannte genetische Veränderungen mit ein. Sie postulierten, dass undifferenzierte Neuroblasten während der Entwicklung des Nervensystems Ziele für Mutationsereignisse sind, die zur Entwicklung von Neuroblastomen führen. Der Grad der Differenzierung der Neuroblasten zum Zeitpunkt der malignen Transformation ist dabei ausschlaggebend für das Neurotrophinrezeptor-Expressionsmuster der entstehenden Tumore. NB, die den Neurotrophinrezeptor (NTR) TrkA exprimieren, zeichnen sich durch mitotische Instabilität und einen hyperdiploiden oder annähernd triploiden Chromosomensatz aus. Diese prognostisch günstigen Typ I-Tumore differenzieren entweder aus oder gehen durch Apoptose zugrunde. Tumore, die den NTR TrkB exprimieren, sind durch genomische Instabilität und das Auftreten von strukturellen Aberrationen gekennzeichnet. Typ II-Tumore, die häufig mit fortgeschrittenem Erkrankungsstadium und Progress assoziiert sind, weisen Zugewinne des Chromosoms 17q und Verluste der Chromosomen 11q und 14q auf. Für klinisch hoch aggressive, rapide progredierende Typ III-Tumore mit schlechter

Prognose sind neben dem 17q-Zugewinn, Verluste des Chromosoms 1p und Amplifikation des Onkogens MYCN typisch (Maris und Matthay 1999; Brodeur 2003).

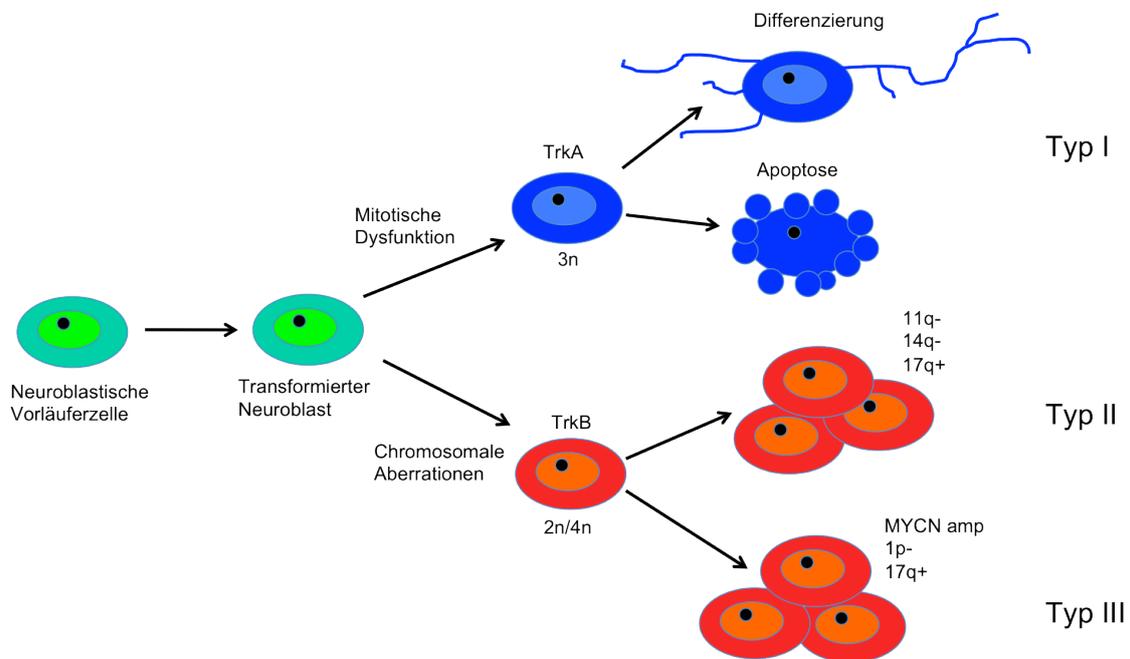


Abb. 1: Modell zur Neuroblastom-Tumorgenese (angepasst nach Maris und Matthay 1999; Brodeur 2003)

Abhängig vom Differenzierungsgrad der Neuroblasten zum Zeitpunkt der malignen Transformation ist prinzipiell die Entwicklung in 2 Richtungen möglich. Im ersten Fall entwickeln sich über mitotische Dysfunktionen Typ I-Tumore, die eher numerische chromosomale Aberrationen, einen hyperdiploiden oder annähernd triploiden DNA-Index aufweisen, den NTR TrkA exprimieren und im Verlauf entweder ausdifferenzieren oder die Apoptose durchlaufen. Im zweiten Fall entstehen über strukturelle chromosomale Aberrationen malignere Tumore mit einem annähernd diploiden oder tetraploiden DNA-Index, die den NTR TrkB exprimieren. Innerhalb dieser Gruppe sind die Typ II-Tumore durch 17q-Zugewinn und 11q- und/oder 14q-Verlust charakterisiert. In Typ III-Tumoren sind neben 17q-Zugewinn die 1p-Deletion und MYCN-Amplifikation typisch.

1.4 Früherkennung

Die Prognose von Neuroblastomen ist u.a. stadien- und altersabhängig.

Breslow und Mc Cann zeigten, dass die Überlebensrate mit zunehmendem Alter und Erkrankungsstadium sinkt. Innerhalb eines Stadiums haben jüngere Kinder eine bessere Prognose als ältere (Breslow and McCann 1971).

Die Katecholaminmetabolite Vanillinmandelsäure und Homovanillinmandelsäure sind sensitive und verlässliche Marker, die im Urin von NB-Patienten nachgewiesen werden können (Hinterberger und Bartholomew 1969).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden in den 70er Jahren NB-Screeningprogramme etabliert, die auf dem Nachweis von Katecholaminderivaten im Urin von Kindern mit 6 oder 12 Monaten basierten. Diese Programme führten zu einem starken Anstieg der Inzidenz und Prävalenz der Erkrankung, ohne aber die Mortalität zu senken. Offenbar kam es zu einer Überdiagnose von Tumoren, die ohne klinisch auffällig zu werden, eine Spontanremission erfahren hätten. Weder die Inzidenz von disseminierten Erkrankungen, noch die Anzahl von aggressiven Neuroblastomen mit schlechter Prognose, noch die Letalität wurden reduziert (Schilling et al. 2002; Woods et al. 2002). Ein allgemeines Screening von Kindern auf Neuroblastome hat sich somit nicht als sinnvoll erwiesen und folgerichtig auch nicht durchgesetzt.

1.5 Klinik

Entsprechend ihres sympathoadrenergen Ursprungs sind etwa 50% aller Neuroblastome in den Nebennieren lokalisiert. 25-30% der Primärtumore entstehen im abdominellen Grenzstrang, 15-20% im thorakalen oder zervikalen Grenzstrang (Gadner 2006). Neuroblastome metastasieren sowohl lymphogen als auch hämatogen. Von der hämatogenen Dissemination sind vorwiegend Knochen, Knochenmark, Leber und Haut betroffen (Pizzo 2005). Die klinische Symptomatik erklärt sich aus der Lokalisation von Primariis und Metastasen. Tumore im Bauchraum können ein prall gespanntes Abdomen mit Unwohlsein und Völlegefühl bis hin zu Abflußbehinderungen des venösen und

lymphatischen Systems oder des Harnabflusses verursachen. Bei massiver Hepatomegalie sind respiratorische Einschränkungen nicht selten, ebenso wie bei thorakaler Manifestation. Thorakal bzw. zervikal lokalisierte Tumore können zudem zur Kompression der Vena cava superior oder zu einem Horner-Syndrom (Miosis, Ptosis, Enophthalmus) führen. Tumore des Grenzstranges neigen dazu, durch die Neuroforamina intraspinal vorzuwachsen und so eine Querschnittssymptomatik zu verursachen. Metastasierte NB können durch Brillenhämatome, hervorgerufen durch retrobulbäre Infiltration, Knochenschmerzen bei Dissemination in den Knochen oder Anämie, Blutung oder Infektion durch Verdrängung des Knochenmarks klinisch apparent werden. Selten manifestieren sich NB erstmals durch Hirndrucksymptomatik oder Krampfanfälle bei zerebraler Metastasierung oder aber durch paraneoplastische Syndrome. Nahezu pathognomonisch ist das Opsomyoklonus-Ataxie-Syndrom, das sich durch Myoklonien von Extremitäten und Rumpf, Ataxie und Opsomyoklonie bemerkbar macht. Außerdem können paraneoplastisch therapieresistente Durchfälle durch erhöhte Sekretion des vasointestinalen Peptids (VIP) oder aber Hypertonie durch Ausschüttung von Katecholaminen auftreten.

Bei der Diagnose Neuroblastom handelt es sich nicht selten um einen Zufallsbefund. Allgemeinsymptome wie Schmerzen, Fieber und Gewichtsverlust finden sich vor allem bei fortgeschrittener Erkrankung (Gadner 2006).

1.6 Diagnostik

In der präoperativen Diagnostik sollen laut NB2004-Protokoll zunächst die Anamnese und der körperliche Untersuchungsbefund erhoben werden. Im Labor werden die Tumormarker Laktat-Dehydrogenase (LDH), Ferritin, Neuronenspezifische Enolase (NSE) sowie die Katecholaminmetabolite Vanillinmandelsäure (VMA) und Homovanillinmandelsäure (HVA) in Serum und Urin bestimmt. An bildgebender Diagnostik schließt sich zunächst die Sonographie des Abdomens, insbesondere der Leber, des Halses, des Retroperitoneums und bei offener Fontanelle des Schädels an, gefolgt von einer Röntgenaufnahme des Thorax. Im MRT sollen die beteiligten Regionen

dargestellt werden. Bei Tumorlokalisierung in der Paravertebralregion ist die kernspintomographische Darstellung des Spinalkanals indiziert. Bei der ^{123}I -MIBG-Szintigraphie handelt es sich um ein sehr geeignetes Verfahren um Neuroblastome und deren Manifestationsorte bildlich darzustellen. 85% aller NB nehmen den Tracer auf. Für die verbleibenden, nicht speichernden Tumore ist eine ^{111}In -Ocreotid-Szintigraphie vorgesehen. Die Darstellung des Skeletts mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ermöglicht es, in ^{123}I -MIBG-positiven Arealen zwischen Knochenmetastasen und Knochenmarksbeteiligung zu unterscheiden. Die Knochenmarkspunktion soll an mindestens 4 unterschiedlichen Stellen erfolgen und die Aspierte in einem Zentrallabor befundet werden. Zur Diagnosesicherung ist eine Biopsie und histologische Beurteilung, sowie eine Referenzhistologie obligat. Um eine weitere Risikoeinstufung der Patienten vornehmen zu können, sollen MYCN- und 1p-Status mittels FISH-Analyse und Southern Blot oder FISH-Analyse und PCR bestimmt werden.

1.7 Staging

Neuroblastome werden heutzutage nach dem ‚International Neuroblastoma Staging System‘ (INSS) klassifiziert (Evans et al. 1971; Brodeur et al. 1988; Brodeur et al. 1993). Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Evans-Klassifikation. Das INSS unterscheidet die Stadien 1-4, sowie das Stadium 4S. In Stadium 1 und 2 ist der Primärtumor lokal begrenzt, wobei im Gegensatz zu Stadium 1 im Stadium 2 entweder die Resektion inkomplett ist (Stadium 2a) oder ipsilaterale Lymphknoten befallen sind (Stadium 2b). Das Stadium 3 ist gekennzeichnet durch einen die Mittellinie überschreitenden Primärtumor oder einen Befall der kontralateralen Lymphknoten. Ein Stadium 4 liegt bei metastasierter Erkrankung in nicht regionale Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/ oder andere Organe vor. Das Neuroblastom im Stadium 4S (NB4S) ist charakterisiert durch einen lokal begrenzten Primärtumor (wie in Stadium 1 oder 2) und Metastasierung in Haut und/oder Leber und/ oder Knochenmark. Das Alter darf bei Diagnose dieses Stadiums 1 Jahr nicht überschreiten. Die Infiltration des Knochenmarks darf nicht mehr als

10% betragen und bei Befall der Knochen selbst ist die Diagnose NB4S ausgeschlossen.

Stadium	Definition
Stadium 1	Lokalisierter Primärtumor, komplette Resektion, keine Lymphknoten befallen
Stadium 2a	Lokalisierter Primärtumor, inkomplette Resektion, keine Lymphknoten befallen
Stadium 2b	Lokalisierter Primärtumor, komplette oder inkomplette Resektion, ipsilaterale Lymphknoten befallen
Stadium 3	Primärtumor überschreitet die Mittellinie oder kontralaterale Lymphknoten befallen
Stadium 4	Disseminierte Tumorerkrankung
Stadium 4S	Lokalisierter Primärtumor (wie in Stadium 1 oder 2), Kinder jünger als 1 Jahr, Metastasierung in Leber und/ oder Haut und/ oder Knochenmark (Knochenmarksinfiltration <10%)

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Neuroblastome nach dem ‚International Neuroblastoma Staging System‘ (INSS)

1.8 Histologie

Neuroblastome gehören zu den „kleinen, blauen, rundzelligen“ Tumoren des Kindesalters. Die histopathologische Beurteilung erfolgt heutzutage nach der ‚International Neuroblastoma Pathology Classification‘ (INPC) eingeführt durch Shimada (Shimada et al. 1999). Die INPC berücksichtigt dabei den Stromagehalt der Tumore, den Grad der Differenzierung („undifferenziert“, „schlecht differenziert“, „differenziert“) und den Mitosis-Karyorrhexis-Index, d.h. die Anzahl der Mitosen pro 5000 Zellen. In Zusammenschau mit dem Patientenalter ergibt sich eine „günstige“ oder „ungünstige“ Histologie. Häufig wird auch noch eine ältere Klassifizierung der Tumorzellen nach dem histologischen Reifegrad in 3 Stadien angewandt (Hughes et al. 1974). Nach dem NB2004-Protokoll sollen zudem jeweils in 4 Graden Aussagen zum Regressions- und Differenzierungsgrad getroffen werden.

1.9 Molekularbiologie und -genetik

1.9.1 DNA-Index

Der DNA-Gehalt (Ploidität) spielt für das biologische Verhalten und die Prognose von Neuroblastomen eine wichtige Rolle.

Hyperdiploide und annähernd triploide Tumore sind bei Säuglingen mit niedrigem Tumorstadium, wenig strukturellen Aberrationen, gutem Ansprechen auf Chemotherapie und entsprechend guter Prognose assoziiert. Tumore mit diploidem Chromosomensatz sind meist weiter fortgeschritten, weisen häufig strukturelle Aberrationen auf, sprechen schlecht oder gar nicht auf die Therapie an und haben eine entsprechend schlechtere Prognose (Look et al. 1984; Kaneko et al. 1987; Look et al. 1991).

Bei älteren Kindern verliert die prognostische Rolle der Ploidität an Relevanz. Diese Patienten haben trotz Aneuploidie keine günstige Prognose (Look et al. 1991).

1.9.2 Numerische und strukturelle chromosomale Aberrationen

Tumore in niedrigeren Erkrankungsstadien, also in den Stadien 1, 2 und 4S weisen typischerweise komplette chromosomale Imbalancen, d.h. numerische Aberrationen auf. Partielle Verluste und Zugewinne, d.h. strukturelle Aberrationen sind dagegen in Tumoren fortgeschrittener Erkrankungsstadien, also in den Stadien 3 und 4 nachweisbar (Vandesompele et al. 1998).

1.9.2.1 MYCN

Bei MYCN handelt es sich funktionell um einen Transkriptionsfaktor, der während der Neurogenese exprimiert wird und zusammen mit MAX und MAD Gene reguliert, die z.B. mit Zellzyklussteuerung, Differenzierung und Apoptose annotiert sind. MYCN gehört zur Familie der MYC-Onkogene, wobei N für ‚Neuroblastoma-derived‘ steht. Überexpression der MYC-Transkriptionsfaktoren kann zu dysreguliertem Wachstum und übermäßiger Proliferation führen (Übersicht in Grandori et al. 2000).

MYCN ist ein auf Chromosom 2p kodiertes Onkogen, dessen Amplifikation bei Neuroblastomen mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Prognose korreliert. Auch bei Patienten mit niedrigeren Tumorstadien ist MYCN mit schneller Tumorprogression und schlechter Prognose assoziiert (Schwab et al. 1983; Brodeur et al. 1984; Seeger et al. 1985; Brodeur et al. 1989).

Der Amplifikationsstatus von MYCN hat daher auch Eingang in die klinische NB-Diagnostik gefunden.

1.9.2.2 Deletion 1p36

Die Deletion des kurzen Armes von Chromosom 1 ist der häufigste in Neuroblastomen nachgewiesene genetische Verlust (Brodeur et al. 1981). In diesem Bereich werden Tumorsuppressorgene vermutet, deren Deletion möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Progression von Neuroblastomen spielen (Maris et al. 1995; Brodeur et al. 1997).

Die Deletion 1p korreliert mit fortgeschrittenem Erkrankungsstadium und schlechter Prognose (Maris et al. 1995; Takeda et al. 1996). Sie ist zudem häufig mit MYCN-Amplifikation vergesellschaftet (Fong et al. 1992).

Patienten in den Stadien 1,2 und 4S mit allelischem Verlust von 1p haben entgegen der sonst günstigen Prognose dieser Stadien ein höheres Risiko bezüglich Rezidiv der Erkrankung (Caron et al. 1996).

Die Untersuchung auf eine 1p-Deletion hat wegen der großen Bedeutung ebenfalls Eingang in die klinische Diagnostik gefunden.

1.9.2.3 Andere Verluste und Zugewinne

Neben der MYCN-Amplifikation und 1p-Deletion sind auch andere Chromosomenaberrationen als häufig in Neuroblastomen vorkommend beschrieben worden:

Partielle Verluste von Chromosom 3p sind mit Tumorprogression und schlechter Prognose vergesellschaftet (Ejeskär et al. 1998). Deletionen von 11q sind ebenfalls assoziiert mit schlechter Prognose (Attiyeh et al. 2005). Verluste der Heterozygotie von Chromosom 14q werden vor allem in Tumoren in

fortgeschrittenen Erkrankungsstadien nachgewiesen (Fong et al. 1992). Zugewinne von Chromosom 17q sind assoziiert mit Tumorprogression und schlechter Prognose (Bown et al. 1999).

1.9.3 Neurotrophinrezeptoren und Liganden

Neurotrophinrezeptoren (NTR oder auch Trk) sind Rezeptor-Tyrosinkinase, die nach Bindung ihres Liganden dimerisieren. Die Autophosphorylierung des Rezeptors zieht die Phosphorylierung von Adapter- und ‚second messenger‘-Proteinen nach sich. Auf diesem Wege werden verschiedene Trk-gekoppelte Signalwege in der Zelle initiiert, die u.a. Einfluss haben auf das Überleben, Proliferation und Differenzierung von Zellen. Dies sind vor allem der PI3K/Akt-, der Ras/MAPK- und der PLC γ -Signalweg.

Neurotrophine und deren Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der Funktion des Nervensystems. Es existieren 3 verschiedene NTR, nämlich TrkA, TrkB und TrkC, die spezifisch von Neurotrophinen gebunden werden. Bei TrkA handelt es sich um den Rezeptor für ‚nerve growth factor‘ (NGF). TrkB ist der Rezeptor für ‚brain-derived neurotrophic factor‘ (BDNF) und Neurotrophin 4 (NT4). TrkC wird von NT3 gebunden (Übersicht in Schramm et al. 2005).

Für das biologische Verhalten und die Prognose von Neuroblastomen spielen insbesondere TrkA und TrkB eine wichtige Rolle. Die Expression des NTR TrkA ist mit günstigen biologischen Eigenschaften, niedrigem Tumorstadium und guter Prognose korreliert (Nakagawara et al. 1993; Brodeur et al. 1997), während die Expression des NTR TrkB mit aggressiven NB mit ungünstiger Prognose assoziiert ist (Nakagawara et al. 1993).

1.10 Risikoeinteilung

Nicht nur klinische, sondern auch genetische und biologische Marker werden zur Risikostratifizierung von Neuroblastomen herangezogen.

Die Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) bedient sich im NB2004-Protokoll folgender Variablen: INSS-Stadium, Alter der Patienten und Vorliegen einer MYCN-Amplifikation und/oder 1p-Deletion. Die ‚Children’s Oncology Group‘ (COG) bezieht in die Risikostratifizierung ebenfalls INSS-Stadium, Patientenalter und MYCN-Status, aber auch die histologische Einteilung nach Shimada und den DNA-Index mit ein. Aus beiden Schemata resultiert eine Einteilung in 3 Risikogruppen, nämlich niedriges, intermediäres und hohes Risiko.

In der gängigen Literatur werden noch weitere genetische Charakteristika mit dem biologischen und klinischen Verhalten von NB und deren Prognose diskutiert. NB können abhängig von biologischen und genetischen Merkmalen in 3 Gruppen mit jeweiligem Risikoprofil und entsprechender Prognose eingeteilt werden (Tab. 2, Maris et al. 1999; Brodeur 2003). Die erste Gruppe beinhaltet vor allem Tumore der Stadien 1, 2 und 4S. Die Patienten sind jünger als 1 Jahr. Bei hyperdiploidem oder annähernd triploidem Chromosomensatz sind strukturelle Aberrationen selten; MYCN ist nicht amplifiziert. Die Tumore exprimieren TrkA, TrkB jedoch nur in einer trunkierten Form. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 95%. In die zweite und dritte Gruppe gehören Tumore der Stadien 3 und 4 bei einem Patientenalter von über einem Jahr. Der DNA-Index ist annähernd diploid oder tetraploid. Strukturelle chromosomale Aberrationen kommen in beiden Gruppen vor. Typ II-NB sind nicht MYCN-amplifiziert, weisen selten eine Deletion von 1p, aber häufig Verluste von 11q und 14q sowie Zugewinne von 17q auf. Die Expression beider NTR TrkA und TrkB ist gering oder nicht vorhanden. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 40-50%. Tumore der Gruppe III sind MYCN-amplifiziert und weisen häufig 1p-Deletionen auf. Verluste von 11q und 14q sind selten, Zugewinne von 17q häufig. TrkA wird nicht oder nur in einem geringen Maße exprimiert, während die Expressionsrate von TrkB hoch ist. Bei diesen Tumoren liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur bei 25%.

Charakteristika	Typ I	Typ II	Typ III
INSS-Stadium	1, 2, 4S	3, 4	3, 4
Alter	<1 Jahr	>1 Jahr	1-5 Jahre
DNA-Index	hyperdiploid/ annähernd triploid	annähernd diploid oder tetraploid	annähernd diploid oder tetraploid
1p-LOH	selten	selten	häufig
11q und 14q-LOH	selten	häufig	selten
17q-Zugewinn	selten	häufig	häufig
MYCN-Status	normal	normal	amplifiziert
Expression TrkA	hoch	niedrig-keine	niedrig-keine
Expression TrkB	trunkiert	niedrig-keine	hoch
5-Jahres-Überleben	95%	40-50%	25%

Tab. 2: Einteilung der Neuroblastome in 3 Gruppen anhand von biologischen und genetischen Merkmalen (angepasst nach (Maris et al.1999; Brodeur 2003))

1.11 Therapie und Prognose

Die Therapie von Neuroblastompatienten erfolgt risikoadaptiert und multimodal nach dem NB2004-Protokoll. Abhängig von Stadium, Alter, Vorliegen einer MYCN-Amplifikation und 1p-Deletion erfolgt die Einteilung in 3 Gruppen. Patienten mit niedrigem Risikoprofil werden nach initialer Tumorresektion lediglich beobachtet. Nur bei Progress der Erkrankung oder bei schwerwiegender Symptomatik wird Chemotherapie empfohlen. Die Gruppe mit intermediärem Risiko erhält nach Tumorresektion eine Polychemotherapie, evtl. Radiatio und abschließend 13-cis-Retinolsäure. Patienten der Hochrisikogruppe werden nach der Tumorresektion einer Polychemotherapie, Radiatio, 13-cis-Retinolsäurebehandlung, sowie einer ablativen Hochdosischemotherapie und autologer Stammzelltransplantation unterzogen.

Die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten liegt in Stadium 1 und 2 bei 80-100%, im Stadium 4S bei 80%. Im Stadium 3 sind die Überlebensraten sehr variabel in einem Bereich von 20-90%. Hier ist die Altersabhängigkeit der

Prognose besonders ausgeprägt. Im Stadium 4 sinkt die Überlebensrate auf 30-40% (Gadner 2006).

1.12 Das Neuroblastom im Stadium 4S

Das Stadium 4S macht etwa 10% aller Neuroblastome aus (Gadner 2006).

Evans teilte ursprünglich disseminierte NB in zwei Gruppen ein, nämlich in das Stadium IV und Stadium IV-S, wobei S für ‚special‘ steht (Evans et al. 1971). Für Kinder mit IV-S Tumoren wurden Überlebensraten von 77% gezeigt, verglichen mit 6% in Stadium IV (Breslow et al. 1971). Der überwiegende Teil der IVS-Patienten hat bei nur minimaler Therapie eine exzellente Prognose und weist spontane Tumorregression auf (D'Angio et al. 1971).

Das Stadium 4S (nach INSS) unterscheidet sich nicht wesentlich von dem von Evans als IV-S klassifizierten NB. Definitionsgemäß liegt ein lokalisierter Primärtumor, die Mittellinie nicht überschreitend (Stadium 1 oder 2 nach INSS) und eine Metastasierung in Leber und/oder Haut und/oder Knochenmark, nicht aber in den Knochen selbst vor. Die INSS fordert zur Diagnosestellung des Weiteren ein Patientenalter <1 Jahr und eine Knochenmarksinfiltration von \leq 10%.

NB4S gehören zu der Gruppe der prognostisch günstigen Typ I-Tumore (Maris et al. 1999; Brodeur 2003). Somit ist bei einem Patientenalter <1 Jahr das Vorliegen eines hyperdiploiden bis annähernd triploiden Chromosomensatzes typisch, strukturelle chromosomale Aberrationen kommen normalerweise nicht vor, also auch keine Amplifikation von MYCN. Der NTR TrkA wird im Gegensatz zu TrkB hoch exprimiert (Maris et al. 1999; Brodeur 2003).

Patienten mit NB4S fallen nach dem NB2004-Protokoll in die Beobachtungsgruppe und werden nur bei Progress oder schwerwiegender Tumorsymptomatik behandelt, es sei denn, es wird eine MYCN-Amplifikation nachgewiesen. Das Vorliegen dieser genetischen Veränderung ist bei 4S-Tumoren selten, verschlechtert die Überlebenswahrscheinlichkeit jedoch drastisch (Katzenstein et al. 1998). Sobald eine MYCN-Amplifikation diagnostiziert ist, werden die Patienten nach NB2004 der Hochrisikogruppe zugeteilt und entsprechend aggressiv therapiert.

Ein zweiter Faktor, der die ansonsten so günstige Prognose von NB4S verschlechtert, ist die Diagnosestellung innerhalb der ersten zwei Lebensmonate. Diese Säuglinge haben eine wesentlich schlechtere Prognose als ältere Kinder (Evans et al. 1980; Evans et al. 1981). Viele der Todesfälle in dieser Altersgruppe können auf die massive Hepatomegalie bei hepatischer Metastasierung und den daraus resultierenden mechanischen Komplikationen zurückgeführt werden (Evans et al. 1981; Katzenstein 1998; Nickerson et al. 2000). Laut Evans scheint es für diese Gruppe von Tumoren charakteristisch zu sein, dass es zum exzessiven Tumorwachstum kommt, bevor die Phase der spontanen Tumorregression einsetzen kann (Evans et al. 1981).

1.13 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ein seltener NB-Subtyp klinisch und molekular charakterisiert werden. Mit der Zielsetzung, in Zukunft auch für MYCN amplifizierte NB4S befriedigendere Therapieansätze finden und den betroffenen Patienten so zu einer akzeptableren Prognose verhelfen zu können, sollten neue Einblicke in die Molekularbiologie dieser Tumorentität gegeben werden. Wegen der großen Bedeutung für das biologische Verhalten und die Prognose von NB sollte der Fokus insbesondere auf die Expression der Neurotrophinrezeptoren, das Onkogen MYCN, und auf chromosomale Abberationen gelegt werden.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Fragestellungen:

Ist es möglich aus diesem Tumor stabile Zelllinien zu etablieren?

Gibt es Unterschiede zwischen den Genexpressionsprofilen von Primärtumor und kultivierten Zellen?

Entspricht das Genexpressionmuster des Tumors und der etablierten Zellen bezüglich der NTR dem malignen Verhalten des Tumors in vivo?

Welche Aufschlüsse lassen sich durch den Einsatz von Array CGH-Analysen der entstandenen Einzelzellklone bezüglich chromosomaler Abberationen dieser speziellen Tumorentität gewinnen?

Das überraschende und außergewöhnliche NTR-Expressionsmuster von Tumor und kultivierten Zellen warf weiterhin folgende Frage auf:

Wie ist das detektierte Genexpressionsmuster mit dem am meisten favorisierten Modell zur NB-Tumorgenese vereinbar?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkulturlösungen und Zusätze

RPMI	Gibco
Collagen I	Sigma
FCS	Biochrom
ITS-G Supplement	GIBCO
Lonza	Bio Whittaker
Penicillin/ Streptomycin	Gibco
Gentamycin	Hexal
Amphotericin B	PAA
Geneticin	Gibco
SerEx! [®] Serum Substitute	PAA
Trypsin-EDTA	Gibco
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich
BDNF, rekombinant	Promokine

2.1.2 Zellen und Zelllinien

Primärzellen eines Neuroblastoms Stadium 4S wurden von A. Eggert, Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt

SH-SY5Y wurden von Garrett M. Brodeur, Children's Hospital of Philadelphia, USA, zur Verfügung gestellt

SY5Y-TrkA wurden von A. Eggert, Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt

SY5Y-TrkB wurden von A. Eggert, Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt

Kelly wurden von Garrett M. Brodeur, Children's Hospital of Philadelphia, USA, zur Verfügung gestellt

HUVEC (humane Endothelialzellen aus der Nabelschnurvene)	Fa. PromoCell
----------------------------------------------------------	---------------

2.1.3 Chemikalien

Agarose	Peqlab
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
BSA	Roth
Chloroform	Roth
DMSO	Roth
dNTP-Mix	Biobudget
DTT	Invitrogen
Ethanol	Sigma
Ethidium Bromid	Roth
Isopropanol	Sigma
Längenmarker 100bp	Invitrogen
Matrigel	BD Bioscience
MgCl ₂ 25mM	Promega
Mowiol	Roth
PBS	Biochrom
Tris	Roth
Trizol-Reagent	Invitrogen
Tween 20	Sigma
Phenol	Roth

2.1.4 Lösungen und Puffer (sofern keine Bestandteile der kits)

5 x Green GO Taq® Flexi Buffer	Promega
PBS	
<i>NaCl 140mM; KCL 10mM; Na₂HPO₄ 6,4mM; KH₂PO₄ 2mM</i>	
PBST	
<i>PBS; 0,05% Tween</i>	
TAE Puffer (50x)	
<i>Tris 2M; EDTA pH 8.0 50mM</i>	
MACS Puffer	
<i>PBS pH 7.2; BSA 0,5%; EDTA 2mM</i>	
Blockierungslösung	

Tris pH 7.5; 20% FCS; 3% BSA

DNA-Isolationspuffer

NaCl 5M; Na₂EDTA 0,5M, pH 8.0; 10% SDS

2.1.5 Enzyme

Ribonuklease RNase H	Takara
Ribonuklease Inhibitor RNase Out	Invitrogen
Reverse Transkriptase SS II	Invitrogen
Go Taq® Hotstart Polymerase	Promega
Collagenase 1	PAA
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
Proteinase K	New England Biolabs

2.1.6 Antikörper

CD56 MicroBeads®	Miltenyi Biotec
Maus-anti-CD56 FITC	BD Pharmingen
Maus-anti-CD56	BD Pharmingen
Ziege-anti-Maus IgG FITC	Southern Biotech

2.1.7 Primer-Sequenzen

Random Primer	Invitrogen
GAPDH sense	ccacctatggcaaattccatggca
GAPDH reverse	tctagacggcaggtcaggctccacc
GAPDHAE sense	catcaagaagggtggtgaagc
GAPDHAE reverse	gagcttgacaaagtggctgt
TrkA sense	accatgctgccattcgctg
TrkA reverse	gagggcaggccccagttatc
TrkB sense	gcaatgatgatgactctgcc
TrkB reverse	ggaacaattttccaaaggct
MYCN sense	catccaccagcagcacaactatg

MYCN reverse ccagaggctcccaaccgtcac

2.1.8 Kits

Affymetrix GenChip®	Affymetrix
Human Genome U133A_2	
Complete GenChip® Expression	Affymetrix
3'-Amplification Reagents	
MEGAscript T7 Kit	Ambion
Bio-Array High Yield RNA	Enzo
Labeling Kit	
MiniMACS® Separator starting kit	Miltenyi Biotec
RNeasy mini kit	Qiagen
RNeasy micro kit	Qiagen
Reverse Transcription kit	Invitrogen
Assay on Demand GAPDH	Applied Biosystems
Assay on Demand TrkA	Applied Biosystems
Assay on Demand MYCN	Applied Biosystems
QuantiTect SYBR Green	Qiagen
NTRK2 QuantiTect Primer Assay	Qiagen

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Acuvetten	Beckman Coulter
Chamber slides™	Thermo Fisher Scientific
Gewebekulturflasche 75 cm ²	Greiner
Gewebekulturflasche 25 cm ²	Corning
Gewebekulturplatten 96, 48, 24	Corning
12 und 6 Wells	
PP-Röhrchen 15 und 50 ml	Greiner
Pipetten 2, 5, 10 und 25 ml steril	Greiner
Filter Tipps 10, 100 und 1000 µl	Starlab
Pasteurpipetten	Brand

Combi-tips 1,25, 2,5 und 5 ml	Eppendorf
Matrigel Invasion Chambers	BD Bioscience
24 well plate, 8.0 micron	
Safe-lock tubes 2 ml	Eppendorf
Safe-lock tubes 1,5 ml	Sarstedt
PCR reaction tube	Peqlab
Cryovial® Einfriertube 2ml	Simport
Lysing Matrix D Microbeads	Qbiogene
FACS Röhrchen 5 ml	Greiner

2.1.10 Geräte

Coulter Counter	Beckman Coulter
Phasenkontrastmikroskop	Motic
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Zentrifuge	Heraeus, Biofuge fresco
Zentrifuge	Beckman coulter
Elektrophoresekammern	Peqlab
PCR Cyclers	Biometra
FACS-Gerät	Beckman Coulter, Cytomics FC 500
FACS-Gerät	Beckman Coulter, Epics XL
Sterilbank HERA safe®	Heraeus
Inkubator HERA cell®	Heraeus
N2-Tanks	Air Liquide, Arpege 144
Block Thermostat TCR 200	Roth
Homogenisator FastPrep FP220	Qbiogene

2.1.11 Software und Datenbanken

Microarray Suite 5.0	Affymetrix
Partek® Genomics Suite™	Partek
arrayCGHbase version 3	Universität Ghent

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Tumorzellen

Nach Exstirpation des Nebennierentumors durch die Urologie des Universitätsklinikums Essen wurde dem onkologischen Labor der Kinderklinik eine ca. 0,5 x 0,3 cm messende Tumorprobe in isotoner Kochsalzlösung zur Verfügung gestellt. Die Tumorprobe wurde aus dem Kulturgefäß entfernt und das verbleibende Medium mit den bereits aus dem Zellverband heraus gelösten Tumorzellen bei 40 x g für 2 Minuten bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. Die Zellen wurden pelletiert, um später zusammen mit Fraktionen der Tumorprobe ausgesät werden zu können.

Das Tumorexzidat wurde mit einem Skalpell zerkleinert und die einzelnen Proben bis zu zwei Stunden mit Collagenase 1 (10 mg/ml PBS) behandelt. Daraufhin wurden die Ansätze resuspendiert, abzentrifugiert, pelletiert und in Kulturgefäßen ausgesät. Einige der Kulturgefäße wurden zuvor nach Herstellerprotokoll der Firma Sigma mit Collagen I (1 mg/ml PBS) beschichtet. Zu Beginn der Kultivierung wurde ein RPMI Medium supplementiert mit FCS (10%), SerEX (5%), ITS (1%), Penicillin/Streptomycin (50 µg/ml) und Amphotericin (3 µg/ml) verwendet. Im späteren Verlauf wurde auf das in „Kulturbedingungen“ beschriebene Medium umgestellt.

2.2.2 Zellen und Zelllinien

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Großteil der Analysen mit Primärzellen aus dem o.g. NB4S durchgeführt. Als Referenzzelllinien dienten die etablierten Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y (Biedler et al. 1976; Biedler et al. 1978), deren nach retroviraler Transfektion TrkA- bzw. TrkB-exprimierende Sublinien SY5Y-TrkA und -TrkB (Eggert et al. 2002), sowie Kelly (Schwab et al. 1983).

2.2.3 Kulturbedingungen

Die etablierten Zelllinien wurden in RPMI Medium unter Zugabe von FCS (10%), Penicillin/Streptomycin (50 µg/ml) und Amphotericin B (3 µg/ml)

kultiviert. Die TrkA- und TrkB-transfizierten Zelllinien erhielten zusätzlich das Selektionsmedium Geneticin (500 µg/ml). Dem Medium der Primärzellen wurden ebenfalls die o.g. Konzentrationen an Antibiotika und Antimycotica zugesetzt, bei einer Serumkonzentration (Lonza) von 20%. Ein Medienwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Alle verwendeten Zellen wurden in sterilen Flaschen oder Wells bei 37 °C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 80 °C inkubiert. Jeder Eingriff an den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

2.2.4 Passagieren

Bei 70 bis 90 prozentiger Konfluenz der Zellen erfolgte eine Passagierung. Hierfür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit ca. 5% des Flaschenvolumens an 0,05% Trypsin/EDTA durch 3 minütige Inkubation von der Unterlage gelöst und die Reaktion dann mit dem doppelten Volumen Trypsin-Inhibitor abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 40 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml frischem Medium resuspendiert und daraufhin in der gewünschten Verdünnung in neuen Kulturgefäßen ausgesät. Die Passagezahl wurde fortlaufend dokumentiert.

2.2.5 Einstellen der Zellzahl

Die Zellen wurden wie unter „Passagieren“ beschrieben pelletiert und dann in Abhängigkeit von vorheriger Konfluenz in 1-10 ml Medium aufgenommen. Nach Kalibrierung des Coulter Counters wurden 100 µl der Zellsuspension in 9900 µl isotoner NaCl-Lösung in Accuvetten resuspendiert und die Zellzahl pro ml dann durch Messung der Impedanzänderung im Gerät ermittelt. Anschließend wurde die gewünschte Zellzahl durch weitere Verdünnung eingestellt.

2.2.6 Kryokonservierung

Um eine Konservierung der Zellen für möglichst lange Zeit zu gewährleisten, erfolgte diese in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden hierfür pelletiert und dann mit einer Zellzahl von ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in 1,5 ml Einfrierlösung,

bestehend aus FCS und DMSO im Verhältnis 10:1, aufgenommen. In Styroporboxen, die eine langsame Abkühlung von ca. 1 °C/Stunde ermöglichen, wurden die Zellen in Einfriergefäßen zunächst bei -80 °C verwahrt, und dann in Stickstofftanks transferiert.

2.2.7 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Die Anreicherung der CD56+ NB-Zellen erfolgte durch Anti-CD56 MACS. Bei dieser Methode werden bestimmte Oberflächenantigene der Zellen durch magnetisch markierte, die spezifischen Antikörper tragenden Moleküle gebunden. Während diese Antigen-Antikörper-Komplexe zunächst durch die in einem magnetischen Feld herrschenden Kräfte an einer Säule gebunden bleiben, werden die übrigen Zellen ausgewaschen. Später können die Zielzellen dann eluiert werden.

Hier wurde zunächst ein Zellpellet, bestehend aus ca. 1×10^7 Zellen in 80 µl MACS-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 20 µl Anti-CD56 tragenden Microbeads 15 Minuten bei 4-8 °C inkubiert. Es folgten ein Waschschrift mit Zugabe von 1-2 ml Puffer, Zentrifugation bei 40 x g für 10 Minuten und Abnahme des Überstandes. Nachdem eine MACS-Säule im magnetischen Feld eines MACS-Separators angebracht worden war, wurden die Zellen in 500 µl Puffer gelöst und auf die Säule gegeben. Der Durchfluß sowie die aus drei Waschschriften mit jeweils 500 µl Puffer gewonnenen Zellen wurden als Negativfraktion gesammelt. Um die CD56 markierten Zielzellen zu eluieren, wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt und die Positivfraktion unter Zuhilfenahme eines Stempels mit 1 ml Puffer ausgewaschen.

2.2.8 Immunfärbung

Durch die Verwendung eines primären, gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten und eines fluoreszenzmarkierten sekundären, gegen den primären Antikörper gerichteten Antikörper können Zielzellen markiert und so schließlich nachgewiesen werden.

In dieser Untersuchung wurde mit einem primären Anti-CD56 und einem mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC-markierten sekundären Antikörper gearbeitet. Zunächst wurden 1×10^5 Zellen pro Objektträger (2well chamber slides™) ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen wurde nach 24 h das Medium abgenommen und die Blockierungslösung (Tris pH 7.5, 20% FCS, 3% BSA) zugegeben. Es folgte eine 1 stündige Inkubation bei RT auf dem Schüttler. Nach Zugabe des primären monoklonalen Anti-CD56 Mausantikörpers (Verdünnung 1:100 in Tris, 1% BSA) wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit PBS (0,1% BSA) für jeweils 5 Minuten auf dem Schüttler. Dann wurde der sekundäre FITC-markierte Anti-Maus Antikörper (Verdünnung 1:2000) zugegeben und für 15 Minuten bei RT im Dunklen inkubiert. Wie oben beschrieben wurde erneut mit PBS gewaschen. Da sich die NB4S-Zellen bei Fixierung mit Paraformaldehyd vom Objektträger lösen, wurde auf eine Fixierung verzichtet. Die Ränder der Objektträger wurden vorsichtig mit einem Skalpell entfernt. Von dem zuvor im Heizblock erwärmten Mowiol wurde jeweils ein Tropfen auf die Objektträger gegeben und die Zellen dann im nativen Zustand eingedeckt.

2.2.9 Einzelzellklonierung

Die Ausklonierung der Zellen erfolgte mittels „limited dilution“ im 96 Well Maßstab.

Nach Pelletierung, Resuspension und Zählen der Zellen im „Coulter Counter“ wurde die Zellzahl auf 5 Zellen/ml eingestellt. Da ein Well ein Volumen von 200 μ l aufweist, entspricht eine Zellzahl von 5 Zellen/ml 1 Zelle/Well. Mit einer Multipipette wurde somit 1 Zelle/Well ausgesät. Der Erfolg der Ausklonierung wurde alle 2-3 Tage mikroskopisch kontrolliert. Die aus einer Zelle entstandenen Klone wurden markiert und später bei Konfluenz auf ein jeweils größeres Kulturgefäß umgesetzt.

2.2.10 Invasionsassay

Invasionsassays eignen sich dazu, *in vitro* das Invasions- bzw. Migrationspotential von Zellen zu untersuchen, des Weiteren auch, um invadierende von nicht invadierenden Zellen zu trennen, bzw. bestimmte Zellgruppen anzureichern.

In einer Boyden Kammer wird die Migration von Zellen durch eine extrazelluläre Matrix simuliert. Diese Kammer besteht aus einem oberen und einem unteren Kompartiment. Die Kompartimente sind durch eine Membran mit einer Porengröße von 8 μm voneinander getrennt, welche mit einer dünnen Schicht Matrigel (die extrazelluläre Matrix repräsentierend) bedeckt ist. Die zur Invasion befähigten Zellen wandern entlang eines Konzentrationsgradienten (z.B. Serum und/oder Wachstumsfaktoren) von der oberen in die untere Kammer. Der Assay wurde hier benutzt, um TrkB-positive Zellen anzureichern.

Zunächst mussten die fertig gegossenen Matrigel-Inserts für mindestens 2 Stunden in 24 Wells bei 37 °C erwärmt werden. Die Zellen wurden gezählt und die Zellzahl auf $1,6 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Die vorgewärmten Inserts wurden in 24 Wells transferiert, die mit 750 μl Medium, supplementiert mit BDNF (50 ng/ml), gefüllt waren. Jeweils 500 μl der Zellsuspension wurden in die Matrigel-Inserts gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 24 und 48 Stunden. Nach 24 Stunden wurde das Insert in ein weiteres Well mit BDNF-haltigem Medium umgesetzt. Die bis dahin migrierten Zellen wurden in BDNF (50 ng/ml) supplementiertem Medium weiter kultiviert. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Versuch beendet. Die noch nicht migrierten Zellen wurden in Trizol lysiert, die migrierten Zellen in BDNF-haltigem Medium weiter kultiviert.

2.2.11 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Um die Genexpression von Zellen mittels PCR, real-time PCR oder in Microarray Analysen untersuchen zu können, muss zunächst RNA aus dem Gewebe isoliert und in cDNA umgeschrieben werden.

Zur Extraktion der RNA wurden die Zellen pelletiert und dann mit einer Zellzahl von ca. 1×10^6 in 1 ml Trizol resuspendiert und so lysiert. Nach Überführung in

ein Safe-lock Gefäß und einigen Minuten Inkubation bei RT erfolgte die Zentrifugation bei 16000 x g für 5 Minuten. Die Zellreste, in Form des Pellets, wurden verworfen und der Überstand in ein neues Gefäß gegeben. Es folgte die Zugabe von 500 µl Chloroform, vorsichtiges Schütteln der Proben und eine Zentrifugation für 15 Minuten. Die von Proteinen und Chloroform getrennte, obere klare Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem 0,7 fachen Volumen Isopropanol gefällt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurde für weitere 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das randständige Pellet mit 80%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 100 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Die folgenden Arbeitsschritte wurden entsprechend dem Qiagen RNA Cleanup Protokoll mit den Materialien und Lösungen des „RNeasy mini-Kits“ durchgeführt. Zu den Proben wurden jeweils 350 µl RLT-Puffer, dem zuvor β-Mercaptoethanol (10 µl/ml) zugegeben worden war, pipettiert. Nach Resuspension mit 250 µl Ethanol (100 %) wurden die Proben auf die Qiagen RNeasy Säulen gegeben und für 15 Sekunden bei 9500 x g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE-Puffer und die Trockenzentrifugation der Säulen, bevor die RNA schließlich mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert wurde. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch mit dem Nano-Drop Spektrophotometer gemessen und auf 0,5 µg/µl eingestellt. Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit dem Superscript II System der Firma Invitrogen.

Jeweils 3 µg RNA wurden 1 µl dNTP-Mix (20mM) und 3 µl Random Primer zugegeben. Nach 5 minütiger Denaturierung bei 65 °C wurde den Proben ein Reaktionsgemisch, jeweils bestehend aus 5 µl 5x Puffer, 5 µl MgCl₂ (25mM), 2,5 µl DTT, 1,25 µl RNase-Inhibitor RNase Out und 1,25 µl Reverse Transkriptase Superscript II, zugegeben. Vor dem 20 minütigen RNase H-Verdau, bei dem der neu synthetisierte cDNA-Strang von dem Matrizenstrang getrennt wird, folgte zunächst das Annealing bei 25 °C für 10 Minuten, dann die Synthese bei 42 °C für 50 Minuten und die Inaktivierung bei 70 °C für 15 Minuten.

Die cDNA-Konzentration wurde wie die RNA-Konzentration mit dem Nano-Drop Spektrophotometer gemessen.

2.2.12 PCR und Gelelektrophorese

Mit der Polymerasekettenreaktion werden durch spezifische Primer definierte DNA-Abschnitte amplifiziert. Diese Methode ermöglicht die qualitative Untersuchung der Genexpression von Zellen (Saiki et al. 1985).

Hier wurden pro Ansatz 1 μ l cDNA, 11 μ l H₂O, 4 μ l Puffer, jeweils 1 μ l spezifischer Primer, 1,2 μ l MgCl₂, 0,57 μ l dNTPs und 0,1 μ l Hotstart-Polymerase pipettiert. In Thermo Cyclern der Firma Biometra wurden die Ansätze zunächst für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert um die cDNA-Doppelstränge voneinander zu trennen. Dann wurden die Proben für 30 Sekunden bei einer spezifischen Annealingtemperatur inkubiert, die dem jeweiligen Primer eine optimale Bindung an die cDNA erlaubt (Tab. 3). Nach dem Schritt der Elongation bei 72 °C (Aktivitätsmaximum der Polymerase) für 30 Sekunden folgte erneut die Denaturierung für 30 Sekunden bei 95 °C. Dieser Zyklus wurde 28 mal wiederholt und die PCR mit einer 10 minütigen Elongation bei 72 °C abgeschlossen.

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können die PCR-Amplifikate sichtbar gemacht werden.

Die auf 4 °C abgekühlten PCR-Produkte wurden neben einem 100 bp Größenmarker auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Nach einstündiger Elektrophorese bei 120 Volt und 150 mAmp in 50 fachem TAE-Puffer wurde die im Gel aufgetrennte DNA mit Ethidiumbromid gefärbt. Das Gel wurde unter UV-Licht photographiert und die nach ihrer Größe separierten PCR-Produkte so sichtbar gemacht.

Gen	Annealing-Temperatur
TrkA	62 °C
TrkB	57,3 °C
MYCN	61,7 °C

Tab. 3: Annealing-Temperaturen der spezifischen Primer für die oben aufgeführten Gene

2.2.13 Quantitative Real-time PCR

Mit der Methode der Real-time PCR kann die Menge der amplifizierten Ziel-DNA durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert werden. Die Fluoreszenz, die in einer bestimmten Anzahl von Zyklen gemessen wird, nimmt proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Dies gilt sowohl bei der Zugabe von interkalierenden Farbstoffen, die an doppelsträngige DNA binden und so die Zunahme an Amplifikaten anzeigen, als auch bei der Verwendung von FRET-Sonden. Diese Sonden sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher markiert, der durch das Prinzip des FRET Energietransfers die Fluoreszenz des Farbstoffs inhibiert, solange beide Bestandteile der Sonde sind. Die Sonde bindet komplementär auf dem Matrizenstrang zwischen den Primern. Während der Synthetisierung des komplementären Stranges durch die Polymerase, wird die Sonde durch deren Exonukleaseaktivität abgebaut. Dadurch entfernt sich der Quencher von dem Fluoreszenzfarbstoff, die Auslöschung der Fluoreszenz wird aufgehoben und die Signale so messbar. Die Messungen erfolgen nur in einem bestimmten Intervall der Amplifikation, in der sogenannten exponentiellen Phase. Den Anfang einer solchen Phase markiert der CT-Wert. Er zeigt den Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant höher ist als die Hintergrund-Fluoreszenz.

Bei der relativen Quantifizierung mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode müssen zunächst eine endogene Referenz und eine Kalibratorprobe definiert werden. Für die Normalisierung auf die endogene Referenz werden die ΔCT -Werte des Zielgens und der Kalibratorprobe berechnet, indem der CT-Wert des Referenzgens jeweils vom CT-Wert des Zielgens bzw. der Kalibratorprobe subtrahiert wird. Es folgt die Normalisierung auf die Kalibratorprobe, bei der sich der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert durch das Subtrahieren des ΔCT -Werts der Kalibratorprobe vom ΔCT -Wert des Zielgens ergibt. Die relative Expression des

interessierenden Gens bezogen auf die endogene Kontrolle und die Kalibratorprobe ergibt sich aus der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Für diese Dissertation wurde die TrkA-, TrkB- und MYCN-Expression von verschiedenen Sublinien des NB4S mittels Real-time PCR untersucht. Als endogene Referenz diente GAPDH, als Kalibratorprobe cDNA des Primärtumors.

Um die TrkA- und MYCN-Expression zu untersuchen wurden „Assays on demand“ (Applied Biosystems) verwendet. Die Ansätze bestanden jeweils aus 10 µl Universal PCR Mastermix (2x), 1 µl Gene Expression Assay Mix des „Assay on demand“ und 9 µl cDNA. Die PCR wurde als sogenannte 2-Schritt PCR mit 40 Zyklen (20 Sekunden ‚melting‘ bei 95 °C und 20 Sekunden ‚annealing‘ und ‚synthesis‘ bei 60 °C) durchgeführt.

Für die TrkB-Expressionsanalysen wurde ein SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Reaktionsansätze bestanden aus jeweils 10 µl SYBR Green PCR Mastermix (2x), 2 µl 10 x NTRK2 Primer (Qiagen) und 8 µl cDNA.

Die Ansätze wurden zunächst für 15 Minuten bei 95 °C denaturiert. Darauf folgte das ‚annealing‘ für 30 Sekunden bei 55 °C, die Elongation für 30 Sekunden bei 72 °C und erneut die Denaturierung für 15 Sekunden bei 95 °C. Dieser Zyklus wurde 40 Mal wiederholt. Alle Messungen wurden als Triplikate durchgeführt.

2.2.14 Durchflußzytometrie

Mit der Durchflußzytometrie gelingt der quantitative Nachweis von Zellen aufgrund ihrer antigenträgenden Eigenschaften. Spezifische Antigene werden von Fluoreszenz-markierten Antikörpern gebunden. Die Komplexe werden im Flüssigkeitsstrom an einer Laserquelle vorbeigeführt und von dieser zur Emission angeregt. Die Lichtsignale werden von einem Phospho Multiplier detektiert und ausgewertet (Shapiro 2003).

In dieser Arbeit wurden die etablierten Sublinien des untersuchten NB4S auf Positivität bezüglich des NB-Zellmarkers CD56 getestet.

Die Zellen wurden zunächst pelletiert und dann in Abhängigkeit von der Zelldichte in 1-10 ml PBS aufgenommen. Die Zellzahl wurde im Coulter Counter ermittelt und dann auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden daraufhin in FACS-Röhrchen transferiert, zentrifugiert und der Überstand bis auf 200 μ l abgenommen. Nach Zugabe von 20 μ l CD56-FITC markierten Antikörpern (BD Pharmingen) wurden die Ansätze für 30 Minuten bei RT in dunkler Umgebung inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit 1 ml PBS. Nach Zentrifugation, Abnehmen des Überstandes und erneuter Zugabe von 1 ml PBS wurden die Ansätze im FACS-Gerät der Firma Beckman Coulter gemessen und die Daten mit der CXP2.2 Software (Beckman Coulter) ausgewertet. Die Messungen wurden stets mit Antikörper-markierten und nicht markierten Zellen durchgeführt. Als Positivkontrolle fungierte die etablierte NB-Zelllinie SYSY-TrkA, als Negativkontrolle HUVEC-Zellen (PromoCell).

2.2.15 Microarray Analyse

Die Microarray Technologie basiert auf der Verwendung von immobilisierten Nukleotidsonden auf einer festen Oberfläche (Schna et al. 1995).

Die zu untersuchenden fluoreszenzmarkierten Nukleinsäureproben hybridisieren mit den immobilisierten Sonden. Durch Waschschriffe werden die nicht gebundenen Proben entfernt, so dass die Fluoreszenz der hybridisierten Zielnukleotide gemessen werden kann.

Die Verwendung dieser Genchips ermöglicht die Erstellung von umfassenden Expressionsprofilen und die Identifizierung differentiell exprimierter Gene. In der vorliegenden Arbeit wurden Genchips vom Typ HG-U133A_2 der Firma Affymetrix verwendet.

Um RNA aus dem Tumormaterial zu extrahieren, wurde dieses zunächst mit 500 μ l Trizol und Lysing Matrix D Microbeads (Qbiogene) gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Probe wurde dann für eine Minute in einem Homogenisator (Qbiogene) zerkleinert. Die zum einen das Tumormaterial und zum anderen die kultivierten Zellen enthaltenden Trizole wurden wie unter „RNA-Isolierung“ beschrieben weiter verarbeitet. Die RNA-Aufreinigung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll der Firma Qiagen mit dem RNeasy micro kit.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden in der zentralen Microarray Unit des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben und die Hybridisierung erfolgten mittels des Complete GenChip® Expression 3'-Amplification Reagents (Affymetrix), des MEGAscript T7 Kit (Ambion) und des Bio-Array HighYield RNA-Transcription Labeling Kit (Enzo) nach Herstellerprotokoll. Zunächst wurde aus 9 µg RNA cDNA synthetisiert. Die RNA wurde mit 1 µl eines Cocktails bestehend aus 3' polyadenylierten Kontroll-RNAs („Spike-in' Kontrolle) und 100 pMol T7-Oligonucleotid(dT)-Primer (Affymetrix) bei 70 °C für 10 Minuten inkubiert. Dann wurden 3 µl des „First Cycle, First-Strand Master-Mix“ (Affymetrix) zugegeben, woraufhin die Proben bei 42 °C für 1 Stunde inkubiert wurden. Es folgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 72 °C für 10 Minuten. Für die cDNA-Doppelstrangsynthese wurden 32,5 µl des „First Cycle, Second-Strand Mastermix“ (Affymetrix) zugegeben und die Ansätze bei 16 °C für 2 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl T₄ DNA-Polymerase I (5U/µl) und weiteren 10 Minuten der Inkubation wurde die Reaktion mit 0,5 µM EDTA abgestoppt. Es folgte eine Phenol-Chloroform Extraktion, woraufhin die aufgereinigte cDNA in 12 µl RNase freiem Wasser gelöst wurde.

Unter dem Einbau von biotinylierten Nukleotiden wurde die cDNA mittels des BioArray HighYield RNA Transcription labeling kit (Enzo) in cRNA umgeschrieben. Dabei wurden den Proben jeweils 40 µl des Labeling-Mixes zugegeben. Nach Inkubation bei 37 °C für 5 Stunden wurde die cRNA zunächst mit RNeasy Säulen der Firma Qiagen aufgereinigt und konzentriert und dann photometrisch gemessen. 20 µg der biotinylierten cRNA wurden mit 8 µl Fragmentierungspuffer, bestehend aus 200 mM Tris-Acetat, pH 8,1, 500 mM KAc und 150 mM MgAc gemischt. Die Ansätze wurden für 35 Minuten bei 94 °C inkubiert und dann auf 4 °C abgekühlt. Der fragmentierten cRNA wurde Hybridisierungscocktail zugegeben und die Ansätze dann mit den Affymetrix-Chips bei 45 °C im Schüttler über Nacht hybridisiert. Nach Affymetrix-Herstellerprotokoll wurden die Chips dann in der Affymetrix MicroFluidics Station gewaschen, weiter prozessiert und mittels HP-Scanner ausgewertet.

Nach Normalisierung der Microarray-Daten und Annotation mittels Partek® Genomics Suite erfolgte die statistische Auswertung unter Verwendung von Affymetrix® Mikroarray Analysis Suite (MAS 5).

2.2.16 Array CGH Analyse

Die Array CGH Technologie, eine Kombination aus vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) und Array-Technologie ermöglicht es, genomweite Veränderungen der DNA-Kopienzahl, die durch Amplifikationen oder Deletionen bestimmter chromosomaler Regionen entstanden sind, zu detektieren (Solinas-Toldo et al 1997).

Bei dieser Methode werden unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Test-DNA und Referenz-DNA auf einem Chip kohybridisiert, einem Silan-beschichteten Glasobjektträger, auf dem entweder Plasmide mit Fragmenten genomischer DNA (BAC-/PAC-Klone) oder Oligos gespottet sind. Numerische Veränderungen im Tumorgenom führen zu einer Verschiebung im Hybridisierungsverhältnis. Die daraus resultierenden Unterschiede der Fluoreszenzsignale werden erfasst und statistisch ausgewertet.

In der vorliegenden Dissertation wurden Deletionen und Amplifikationen diverser Klone des untersuchten NB4S analysiert.

Zunächst wurde genomische DNA aus den Zellen extrahiert. Hierbei wurden die Zellen pelletiert und 2 x mit PBS gewaschen. Dann wurden 500 µl DNA-Isolationspuffer und 5 µl Proteinase K (20 mg/ml PBS) zugegeben und die Ansätze über Nacht bei 50 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Nach der Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA mit 1 ml Ethanol (100%) und 50 µl Na-Acetat gefällt. Die Reaktionsgemische wurden für 10 Minuten bei RT inkubiert, dann wurde die DNA 2 x mit Ethanol (70%) gewaschen und das Pellet schließlich im Exsikkator getrocknet. Nach Resuspension in TE-Puffer (10 mM TRIS pH 8.0; 1 mM EDTA) wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Die Hybridisierung, deren Vorbereitung und die Analyse erfolgten im Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Belgien. Unter Verwendung von

„random primern“ wurden je 500 ng der zu untersuchenden DNA und Kontroll-DNA mit Cy3 und Cy5 (BioPrime ArrayCGH Genomic Labeling System, Invitrogen) markiert und dann aufgereinigt. Die Blockierung der repetitiven Sequenzen erfolgte mittels Cot 1-DNA (Invitrogen). Die Ansätze wurden mit Hybridisierungscocktails resuspendiert und dann auf Agilent aCGH 44k Arrays hybridisiert. Auf verschiedene Waschschriffe folgte das Scannen der Arrays. Die Auswertung erfolgte mittels arrayCGHbase version 3 (Menten et al. 2005). Da keine Nicht-Tumor-DNA des Patienten vorlag, wurde hier gegen eine allgemeine Kontrolle (Lymphozyten-DNA) normalisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Präsentation eines NBIVS mit MYCN-Amplifikation

Gegenstand dieser Dissertation ist ein NB4S, das 2005 in der kideronkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Essen diagnostiziert und usque ad finem behandelt wurde.

Bei dem erkrankten Patienten handelte es sich um einen 3 Monate alten Säugling, der initial mit Husten bei einem niedergelassenen Kinderarzt vorgestellt worden war. Dort fielen eine Hepatosplenomegalie und eine unklare Resistenz im linken Unterbauch auf. Daraufhin wurde der Junge zur Abklärung in die Kinderklinik des Evangelischen Krankenhauses in Oberhausen eingewiesen. Sonographisch zeigten sich dort Raumforderungen in beiden Nierenlogen sowie knotige Verdichtungen in der deutlich vergrößerten Leber. Wegen V.a. Neuroblastom (DD Nephroblastom) wurde der Patient in die Kinderklinik des Universitätsklinikums Essen verlegt.

Hier zeigte sich bei der Aufnahme ein 3 Monate alter Säugling in gutem AZ und EZ. Das Abdomen war leicht gespannt, im linken Mittelbauch war deutlich eine derbe Resistenz tastbar. Auch die Hepatosplenomegalie bestätigte sich palpatorisch. Außer einem leicht ikterischen Hautkolorit war die körperliche Untersuchung darüber hinaus unauffällig.

Im Labor zeigten sich neben einer LDH-Erhöhung sowohl die Katecholaminmetabolite Vanillin- und Homovanillinmandelsäure als auch die NSE deutlich erhöht. Sonographisch wurde der Verdacht auf ein bilaterales Neuroblastom mit Gefäßummauerung und Leberbeteiligung geäußert. Das MRT des Abdomens bestätigte diesen Verdacht ebenso wie die MIBG-Ganzkörperszintigraphie. Zur endgültigen Diagnosesicherung erfolgte eine Probeexcision aus dem Primärtumor in der Klinik für Urologie. Histologisch zeigte sich eine ausgedehnte Infiltration der linken Nebenniere durch ein Neuroblastom mit nur sehr geringen regressiven Veränderungen. Referenzpathologisch wurde der Tumor als stromaarmes, gering differenziertes Neuroblastom mit mittlerem Mitose-Karyorrhexis-Index nach der INPC-

Klassifikation beschrieben; nach Hughes handelte es sich um ein Neuroblastom Grad III. Nach dem Neuroblastomprotokoll lag ein Regressionsgrad IV und ein Differenzierungsgrad IV vor. Die übrigen durchgeführten Staging-Untersuchungen zeigten keinen Anhalt für weitere Tumormanifestationen.

Aufgrund der oben beschriebenen Präsentation des Tumors, der stattgehabten Lebermetastasierung, der fehlenden Infiltration von Knochen und Knochenmark und des Alters des Patienten wurde der Tumor zunächst als Neuroblastom Stadium IVS nach INSS klassifiziert. Hierbei handelt es sich um eine Tumorentität mit sehr günstiger Prognose, bei der von einer spontanen Regression ausgegangen werden kann und das weitere Vorgehen zunächst lediglich aus Beobachtung und Kontrolluntersuchungen besteht.

Die durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen zeigten jedoch eine 64-fache MYCN-Amplifikation und eine 1p-Deletion in der FISH-Analyse. Beide genetischen Veränderungen gehen mit deutlich aggressiverem Tumorverhalten und entsprechend schlechterer Prognose einher, so dass der Patient in die Hochrisikogruppe aufgenommen werden musste und mit einer Polychemotherapie nach dem Protokoll NB 2004 begonnen wurde. Das Protokoll sieht nach einer Randomisierung in einen experimentellen Arm oder einen Standardarm eine Polychemotherapie vor. Nach 6 bis 8 Zyklen wird nach ablativer Hochdosischemotherapie eine autologe Stammzelltransplantation angeschlossen. Danach ist eine Erhaltungskemotherapie mit Retinolsäure vorgesehen.

Der Patient erhielt zunächst 4 Zyklen mit den Substanzen Adriamycin, Vincristin und Cyclophosphamid (N4), gefolgt von 2 Zyklen mit den Substanzen Vindesin, Cisplatin, Etoposid (N5) sowie Vincristin, Dacarbazin, Ifosphamid und Adriamycin (N6). Eine periphere Stammzellsammlung wurde erfolgreich durchgeführt. Die im Verlauf durchgeführten Kontrolluntersuchungen zeigten trotz der aggressiven Therapie einen deutlichen Progress der Erkrankung. Die Tumormarker waren zunächst zwar regredient, später aber unter der Behandlung wieder progredient. Sowohl in der Sonographie als auch im MRT zeigten sich neue Rundherde der Leber z.T. exophytisch in den Bauchraum

vorwachsend, neu aufgetretene Raumforderungen der Milz und gleichbleibende Veränderungen der rechten Nebenniere.

Bevor über das weitere Procedere entschieden werden konnte, wurde der Patient mit einer akuten intraabdominellen Hb-wirksamen Blutung mit Kreislaufschock auf die Intensivstation der Universitätskinderklinik verlegt. Dort verstarb er 2 Tage später im Alter von 9 Monaten.

3.2 Etablierung von kultivierten Zellen aus dem Primärtumor

Bei dem NB4S mit MYCN-Amplifikation handelt es sich um einen sehr seltenen hochmalignen Subtyp des NB4S mit infauster Prognose. Selten in der Literatur beschrieben, erscheint dieser Subtyp bisher als nicht ausreichend verstanden. Für die Behandlung steht noch kein zufriedenstellendes Therapieschema zur Verfügung. Um zu einem besseren Verständnis beizutragen, sollte diese Arbeit weitere Einblicke in die Molekularbiologie dieser speziellen Tumorentität geben. Dazu wurden zunächst einzelne Fraktionen der Tumorprobe unter verschiedenen Bedingungen kultiviert:

In einer Serie wurden die Kulturgefäße zunächst mit Kollagen R beschichtet. Hierbei handelt es sich um eine Substanz, die den zu kultivierenden Zellen ein Anwachsen in einem bindegewebigen Milieu ermöglicht. Eine andere Serie wurde ohne diese Beschichtung durchgeführt. Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass die Kollagenbeschichtung in diesem Falle keine Vorteile bot, so dass darauf bei der weiteren Kultivierung verzichtet werden konnte. Um erstmals Primärkulturen zu etablieren, wurden die Zusätze serEX!® und ITS-G Supplement angewandt. In den einzelnen Kulturserien zeigte sich, dass sich die Ergebnisse verbesserten, wenn diese Zusätze sukzessive reduziert und gleichzeitig die übliche Serumkonzentration des Mediums von 10% auf 20% verdoppelt wurde.

Unter den oben beschriebenen Bedingungen zeigten sich die besten Voraussetzungen für ein optimales Wachstum und Proliferation der Zellen.

Aus den primären Tumorzellen konnten auf diesem Weg stabile Zellkulturen etabliert werden.

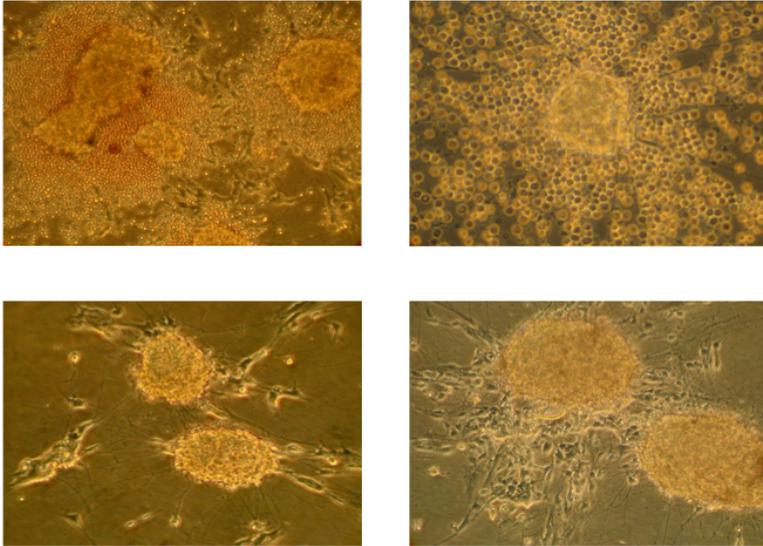


Abb 2: NB4S Zellen im Laufe der Kultivierung (Obere Reihe zu Beginn der Kultivierung, untere Reihe nach mehreren Passagen)

3.3 Untersuchung des Genexpressionsmusters mittels qualitativer PCR und quantitativer Real-time PCR

Die Expression von Neurotrophinrezeptoren und MYCN korreliert mit den biologischen Eigenschaften und der Prognose von Neuroblastomen (Seeger et al. 1985; Nakagawara et al. 1993; 1994).

Bezüglich dieser Parameter wurden der Tumor und die kultivierten Zellen zunächst mittels qualitativer PCR analysiert. Wie in Abb. 3 ersichtlich, zeigte sich ein überraschendes und außergewöhnliches Expressionsmuster. Neben MYCN wurden die beiden NTR TrkA und TrkB simultan exprimiert.

Des Weiteren wurden Primärtumor und kultivierte Zellen in frühen und späten Passagen mittels quantitativer Real-time PCR untersucht (Abb. 4). Auch hier zeigte sich ein außergewöhnliches NTR- und MYCN-Genexpressionsmuster: beide Neurotrophinrezeptoren und MYCN waren in allen Proben nachweisbar, wenn auch in unterschiedlicher Menge. Im Verlauf der Passagierung nahm die Expression von TrkA eher ab, während die Zellen in zunehmendem Maße TrkB produzierten. Diese Veränderungen der NTR-Expressionshöhe sprechen für die Beobachtung, dass im Laufe der Kultivierung auf eher undifferenzierte Zellen selektioniert wird. MYCN war auf einem insgesamt hohen Level in frühen Passagen höher exprimiert als in späteren.

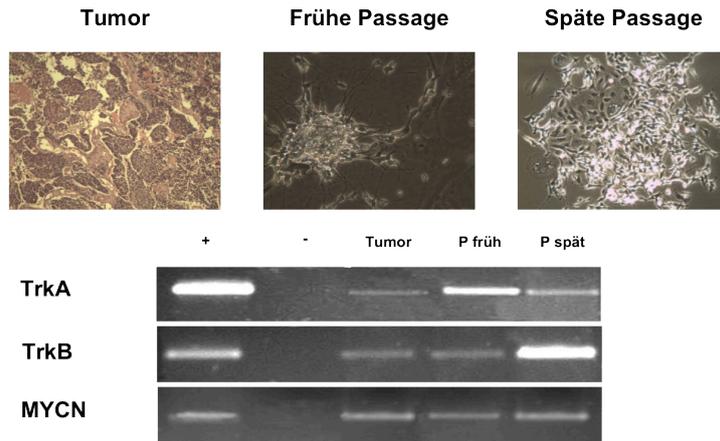


Abb 3: NTR- und MYCN-Expression von Primärtumor (Tumor) und kultivierten Zellen in früher (P früh) und späterer Passage (P spät). In der TrkA-PCR diente SY5Y-TrkA als Positiv- („+“), SY5Y-TrkB als Negativkontrolle („-“), umgekehrt in der TrkB-PCR. In der MYCN-PCR wurden als Positivkontrolle Kelly, als Negativkontrolle SY5Y-TrkA verwendet (unten). Repräsentative Bilder sind oben gezeigt.

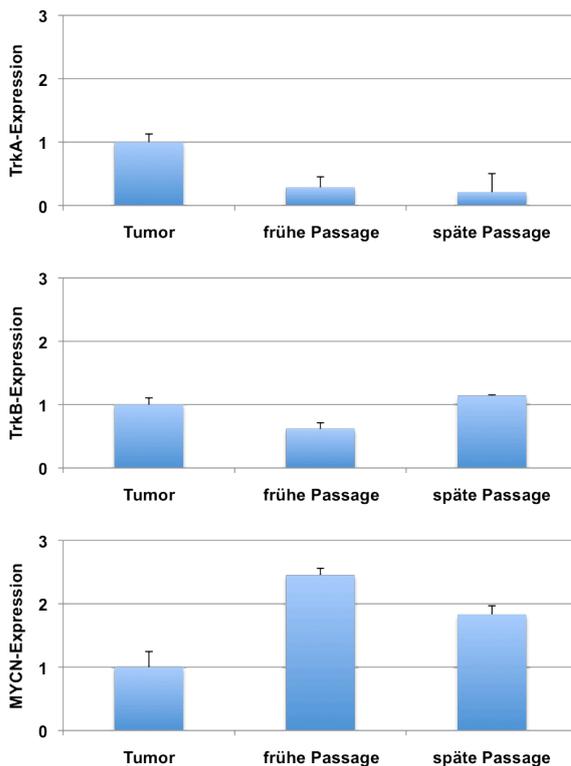


Abb 4: NTR- und MYCN-Expression von Primärtumor und kultivierten Zellen in früher und späterer Passage. Als endogene Referenz diente GAPDH, als Kalibratorprobe das Tumormaterial. Die Expressionshöhe ist in relativen Einheiten abgebildet, der Kalibrator wurde auf 1 gesetzt.

3.4 Anreicherung CD56+ NB-Zellen mit Anti-CD56-MACS

Zu Beginn der Kultivierung lagen die Tumorzellen in Mischkultur vor. Um die Zielzellen von den übrigen Zellen, insbesondere einer Zellschicht aus Fibroblasten zu separieren, wurde auf die Methode der magnetischen Zellsortierung (MACS) zurückgegriffen.

Fast alle Neuroblastomzellen tragen den neuronalen Marker CD56 (NCAM) auf ihrer Oberfläche. Dies gilt auch für das hier untersuchte NB. Die Zellseparation konnte so mittels Anti-CD56 markierten Microbeads durchgeführt werden. Mit Anwendung dieser Methode gelang es, die NB-Zellen anzureichern bzw. zu isolieren (Abb. 5).

Der Nachweis der Separation wurde durch Immunfärbung erbracht (Abb. 5). Verwendet wurden FITC-markierte Anti-CD56 Antikörper.

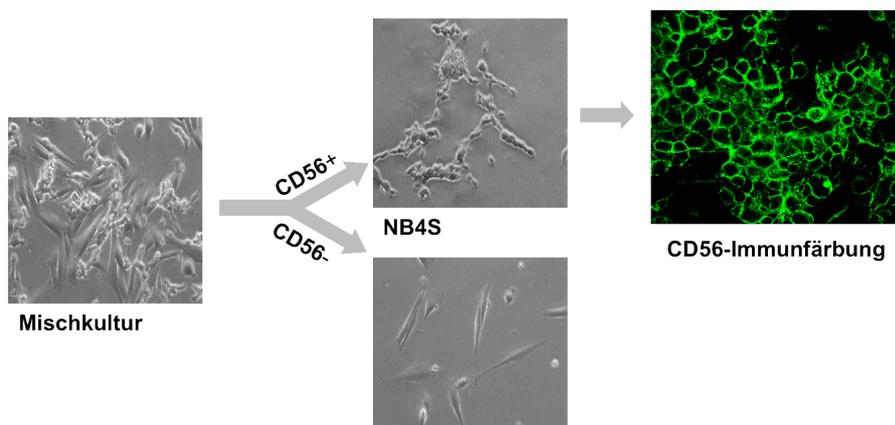


Abb 5: Anreicherung von CD56-positiven NB-Zellen mittels MACS.

Verifizierung durch Immunfärbung mit FITC-markierten Anti-CD56 Antikörpern.

3.5 Vergleich der Genexpressionsmuster von Primärtumor und etablierten Zellen durch Affymetrix® Genchip Analyse

Um die Genexpressionsprofile von Primärtumor und etablierten Zellen miteinander vergleichen zu können, erfolgte eine Microarray-Analyse. Für diese Arbeit wurden Arrays vom Typ HG-U133A_2 der Firma Affymetrix verwendet. Auf ‚gene ontology‘ basierend wurde nach unterschiedlich exprimierten funktionellen Gruppen in Tumor und kultivierten Zellen gesucht.

In der GO-Analyse fiel insbesondere eine Gruppe von Genen auf, die mit ‚nervous system development‘ (GO: 0007399) annotiert ist. Diese Gene werden in Primärtumor und etablierten Zellen differentiell exprimiert. In Abb. 6 sind repräsentative Gene dieser Gruppe auf der X-Achse, der Quotient der Expression von Primärtumor und kultivierten Zellen auf der Y-Achse aufgetragen. Gene, die mit neuronaler Entwicklung und Differenzierung assoziiert sind, wie EFNB2 werden in den kultivierten Zellen im Gegensatz zum Primärtumor signifikant herunterreguliert.

Die kultivierten Zellen weisen aber andererseits eine deutlich höhere Expression von Genen auf, die Zellen in einem undifferenzierten Zustand halten, wie beispielsweise ASH1/ ASCL1. Diese Ergebnisse stützen die Beobachtung, dass im Laufe der Kultivierung auf Zellen selektioniert wird, die in einem undifferenzierten Zustand verbleiben, bzw. Mechanismen zur Differenzierung von Zellen herunterreguliert werden.

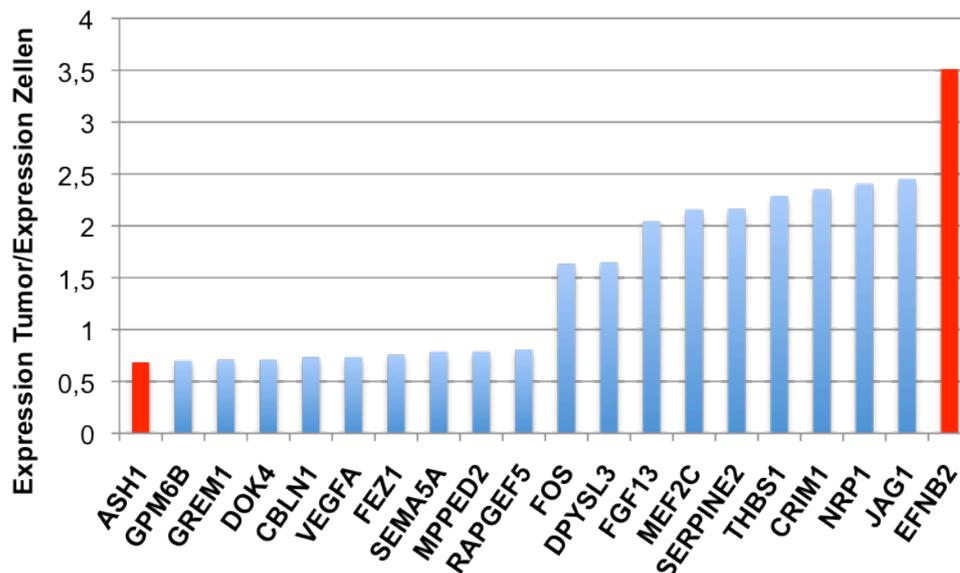


Abb. 6: Differentiell exprimierte Gene in Primärtumor und kultivierten Zellen, annotiert mit neuronaler Entwicklung und Differenzierung.

Dargestellt ist der Quotient Expression Primärtumor/ Expression kultivierte Zellen. Werte >1 zeigen höhere Expression in Primärtumor, Werte <1 höhere Expression in kultivierten Zellen an. Die rot markierten Spalten entsprechen dem Quotienten der Expression beider beispielhaft ausgewählter Gene. Pro Bedingung (Primärtumor, kultivierte Zellen) wurde ein Genchip angefertigt.

3.6 Einzelzellklonierung zur Anreicherung Trk-exprimierender Zellen

Mit dem Ziel, intrinsisch TrkA- oder TrkB-exprimierende stabile Zelllinien zu etablieren, erfolgte eine Ausklonierung mittels limitierter Verdünnung. Als Ausgangspopulation diente ein rasch proliferierender Zellpool in Passage 17. Der Nachweis, dass es sich bei der Ausgangspopulation und den Einzelzellklonen um CD56-positive NB-Zellen handelt, wurde mittels FACS-Analyse mit Anti-CD56 Antikörpern erbracht (Abb.7).

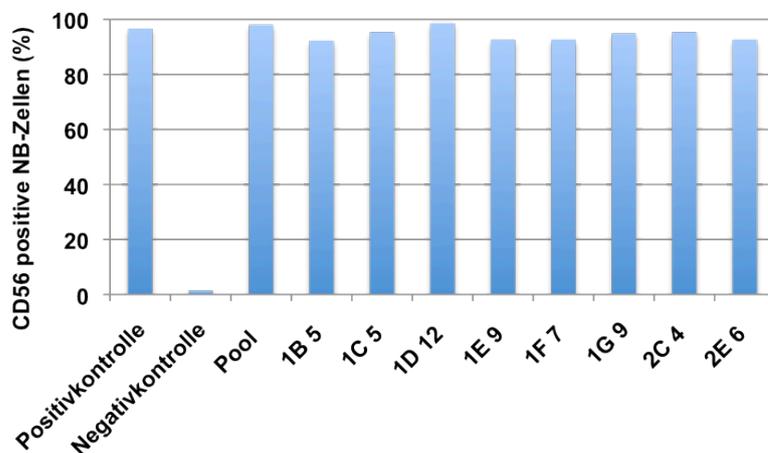


Abb. 7: Verifizierung der CD56-Positivität von Ausgangspopulation und Einzelzellklonen durch FACS-Analyse mittels Anti-CD56 Antikörpern.

Dargestellt sind CD56-positive NB-Zellen in %. Wie in der Abbildung ersichtlich, sind in dieser einfach durchgeführten Messung fast alle Zellen CD56-positiv. Als Positivkontrolle diente SY5Y, als Negativkontrolle dienten HUVEC-Zellen.

Das Neurotrophin- und MYCN-Expressionsmuster wurde mittels Real-time PCR untersucht. Auch die ausklonierten Subpopulationen zeigten hierbei ein außergewöhnliches Genexpressionsmuster. Alle Einzelzellklone exprimieren MYCN und in unterschiedlich hohem Maße TrkA. TrkB ist jedoch in keinem der untersuchten Klone nachweisbar. (Abb. 8).

Somit stehen zum ersten Mal Zellen zur Verfügung, in denen intrinsisch simultan TrkA und MYCN exprimiert wird.

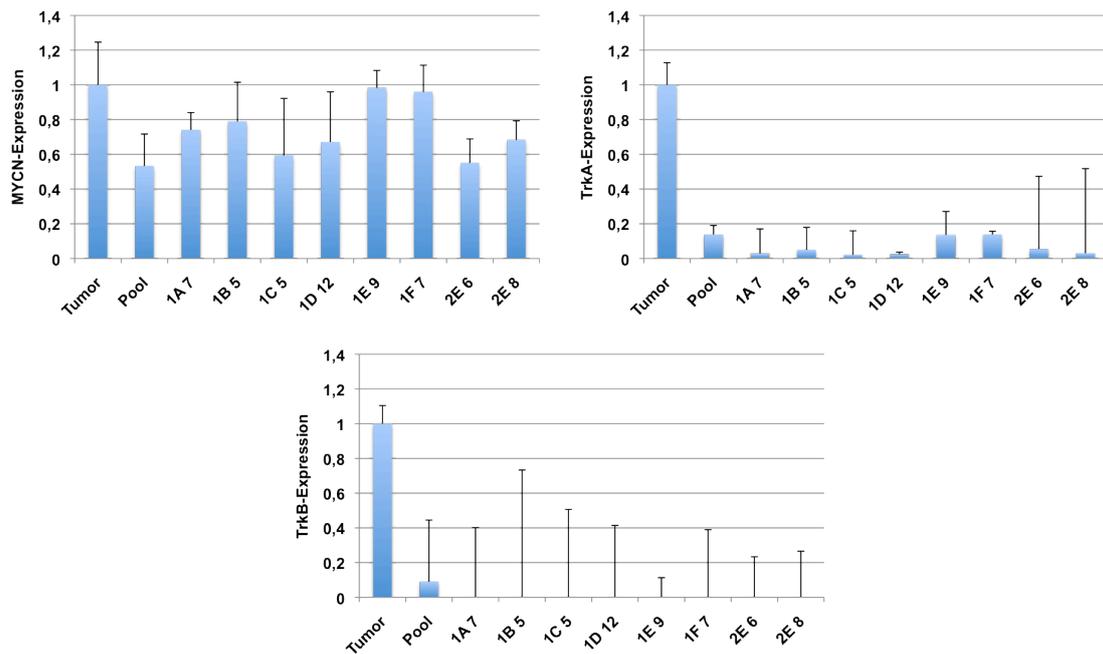


Abb.8: MYCN-, TrkA- und TrkB-Expression der Ausgangspopulation (Pool) und der Einzelzellklone.

Als endogene Referenz diente GAPDH, als Kalibratorprobe der Primärtumor (Tumor).

3.7 Migrationsassay zur Invasivität und Anreicherung von TrkB-positiven Zellen

Die Expression des NTR TrkB korreliert in primären Neuroblastomen mit einer ungünstigen Prognose (Nakagawara et al. 1994). Bis dato stehen keine intrinsisch TrkB-exprimierenden Neuroblastomzelllinien für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung. Mit dem Ziel, die kultivierten Zellen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Invasion zu analysieren und außerdem TrkB positive Zellen anzureichern, wurde ein Matrigel® Migrationsassay unter BDNF-Stimulation durchgeführt.

Im Gegensatz zur Einzelzellklonierung durch limitierte Verdünnung konnte im Migrationsassay in der Boyden-Kammer auf TrkB-positive Zellen selektioniert werden. Die Ergebnisse der Real-time PCR sprechen zum einen für die Invasivität von TrkB-positiven Zellen und belegen zum anderen die Anreicherung dieser Zellen in Abhängigkeit von der BDNF-Expositionszeit (Abb. 9).

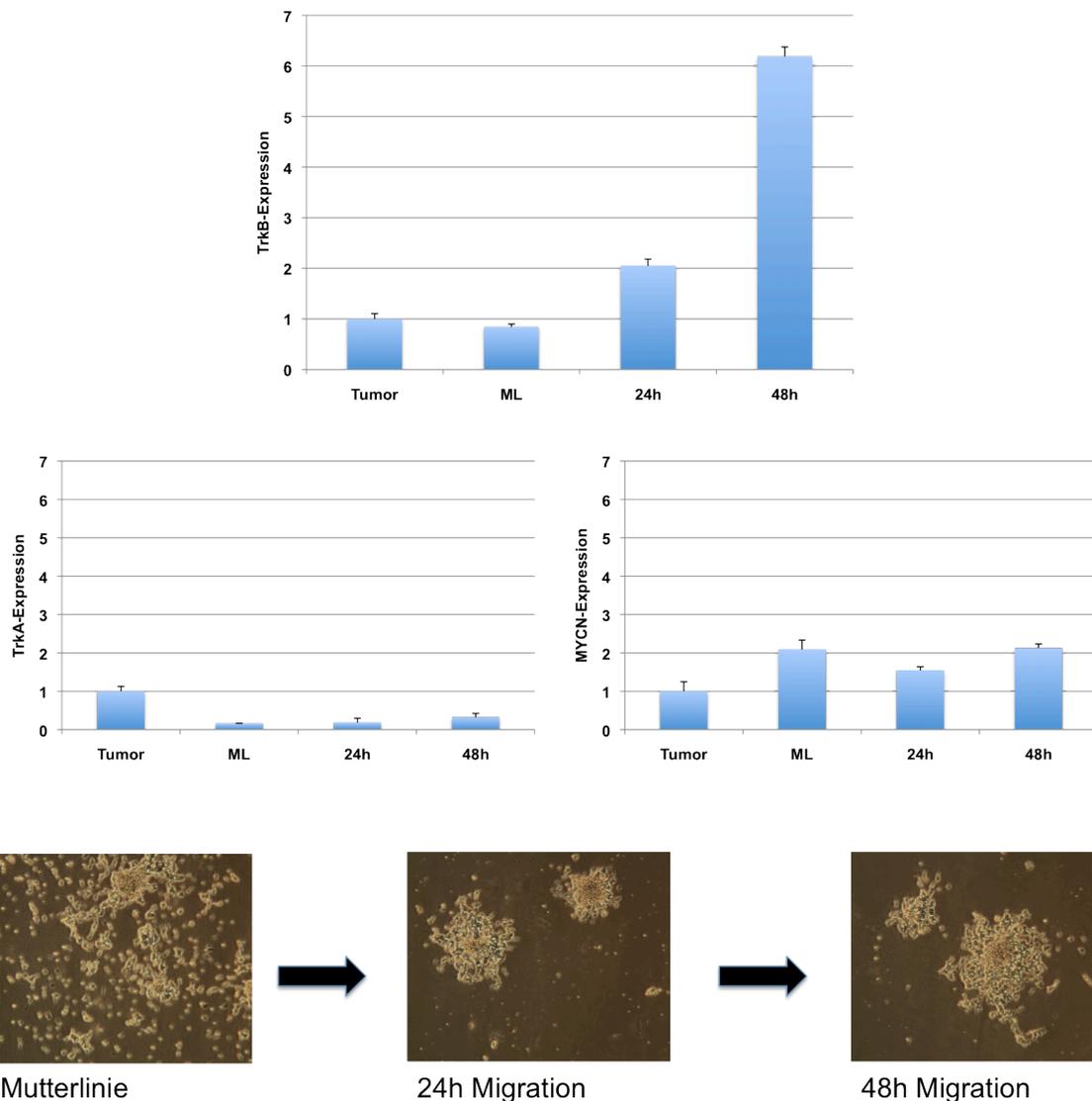


Abb. 9: Anreicherung von TrkB-positiven Zellen im Migrationsassay.

Real-time PCR Ergebnisse zur Höhe der TrkB-Expression der Mutterlinie (ML), und der nach 24 Stunden (24h) und 48 Stunden (48h) migrierten Zellen (oben) im Vergleich zur TrkA- und MYCN-Expressionshöhe der jeweiligen Zellpopulation (Mitte), jeweils bezogen auf die Expressionshöhe im Tumor. Unten: Bilder der Mutterlinie und der nach 24 und 48 Stunden migrierten Zellen.

Um den Einfluss von BDNF auf die migrierten Zellen zu untersuchen, wurde jeweils eine Charge der mit BDNF stimulierten Zellen weiter mit dem Wachstumsfaktor kultiviert, der anderen wurde das BDNF entzogen. Es zeigte sich, dass für das Fortbestehen der Zellkultur dem Medium kontinuierlich BDNF zugesetzt werden musste. Wurde den während der Migration mit BDNF

stimulierten Zellen der Wachstumsfaktor entzogen, kam es zum Absterben der Zellpopulation.

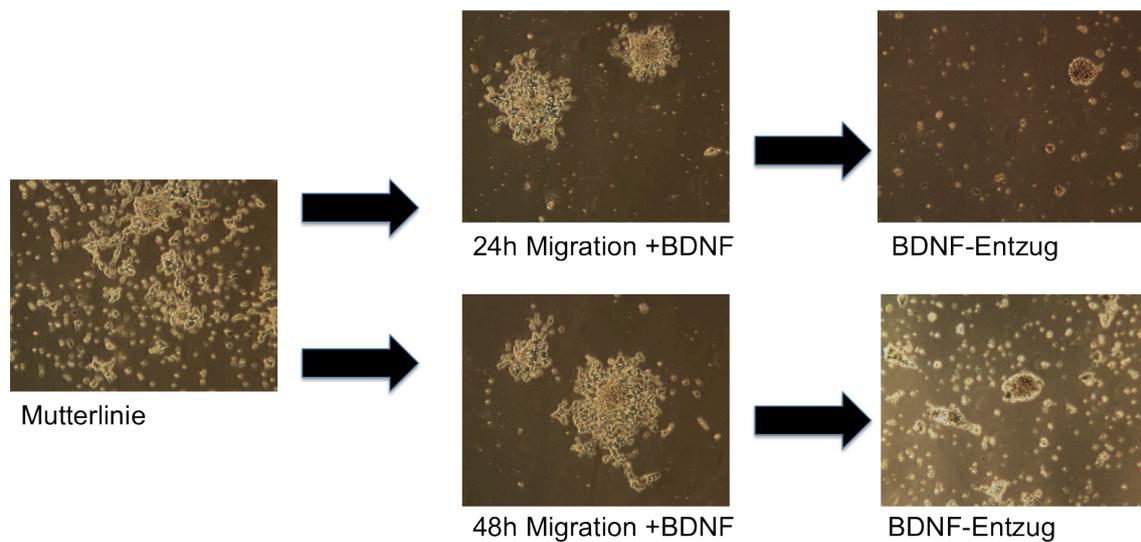


Abb. 10: BDNF-Auslassversuch

Wurde den nach 24 und 48 Stunden migrierten Zellen das BDNF entzogen, kam es zum Absterben der Zellpopulation.

3.8 Charakterisierung der ausklonierten Zellen durch Array CGH

Mit dem Ziel, die entstandenen Einzelzellklone weiter molekular zu charakterisieren, wurden CGH Analysen mit Agilent Arrays angefertigt. Zunächst wurden die ausklonierten Zellen bezüglich interklonaler Heterogenität untersucht.

Das in Abb. 11 gezeigte Muster des Klons ist relativ stabil, unterscheidet sich also nicht wesentlich von denen der fünf anderen untersuchten Einzelzellklone. Ein nennenswerter genetischer Drift hat nicht stattgefunden und sich somit kein Hinweis für eine intratumorale Heterogenität ergeben.

In der linearen Darstellung zeigten sich multiple, für NB4S untypische Verluste und Zugewinne. Die auch im Primärtumor nachgewiesene fokale MYCN-Amplifikation auf Chromosom 2p wurde hier verifiziert.

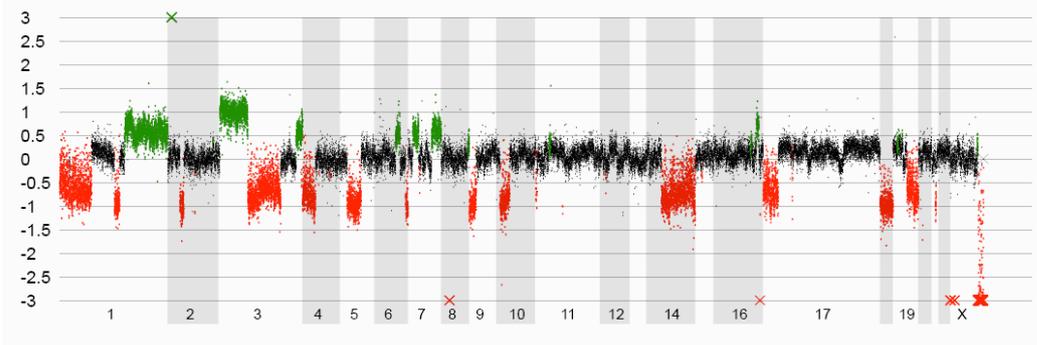


Abb. 11: Lineare Darstellung des Genoms des Einzelzellklons 1B5.

Auf der x-Achse sind die Chromosomen, auf der y-Achse die genetische Balance dargestellt, wobei „0“ 2n entspricht, und die grün markierten Areale Zugewinnen und die rot markierten Bereiche Verlusten entsprechen. Das grüne Kreuz im linken oberen Bildbereich markiert die fokale MYCN-Amplifikation auf Chromosom 2p.

Einige Chromosomen wurden aufgrund ihrer Bedeutung für das biologische Verhalten von NB genauer analysiert. Es ist bekannt, dass insbesondere Veränderungen der Chromosomen 1, 3, 11, 14 und 17 mit dem klinischen Verlauf und der Prognose von Neuroblastomen korrelieren (Fong et al. 1992; Maris et al. 1995; Brodeur et al. 1997; Ejeskär et al. 1998; Bown et al. 1999; Attiyeh et al. 2005).

In der Nahaufnahme von Chromosom 3 (Abb. 12) kommen diverse Amplifikationen und Deletionen zur Ansicht. Partielle Verluste auf Chromosom 3 korrelieren mit ungünstiger Prognose (Ejeskär et al. 1998).

Abb. 13 zeigt die auf Chromosom 14q vorkommenden terminalen LOHs. Aberrationen in diesem Bereich sind fast ausschließlich bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen nachweisbar (Fong et al. 1992).

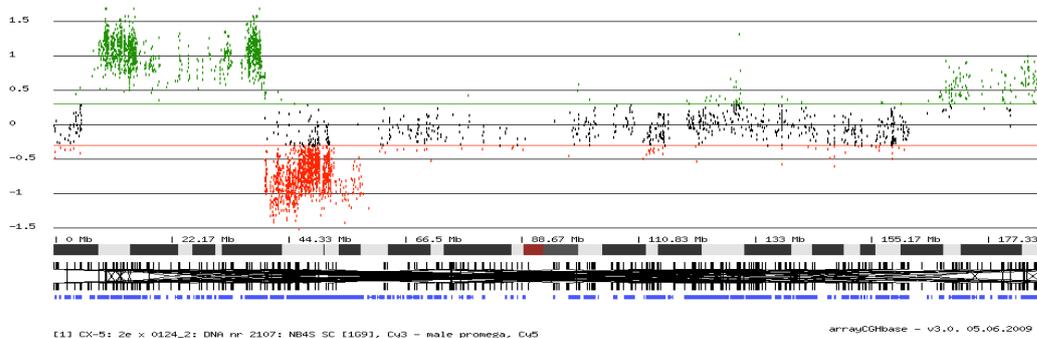


Abb. 12: Amplifikationen und Deletionen auf Chromosom 3 .

Grün markierte Areale entsprechen Zugewinnen, rot markierte Verlusten.

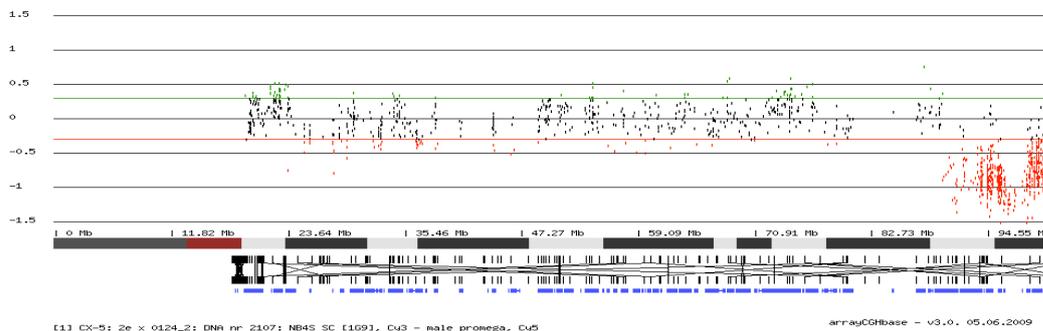


Abb. 13: Terminale LOHs auf Chromosom 14q.

Grün markierte Bereiche entsprechen Zugewinnen, rot markierte Verlusten.

Die hier gezeigten chromosomalen Veränderungen korrelieren mit dem hochmalignen Verhalten des untersuchten Tumors. Sie stützen zudem die Beobachtung, dass auf Klone selektioniert wird, die bezüglich ihrer unbalancierten Chromosomen-Aberrationen malignen Tumoren in vivo ähneln.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein seltener Neuroblastom-Subtyp klinisch und molekular charakterisiert. Der Stadieneinteilung nach INSS folgend, handelte es sich um ein NB4S, allerdings mit der Besonderheit einer MYCN-Amplifikation. Zunächst wurde der klinische Verlauf des an diesem Tumor erkrankten und auch verstorbenen Patienten aufgearbeitet. Durch Etablierung der Tumorzellen, Untersuchung und Vergleich der Genexpressionsprofile von Primärtumor und kultivierten Zellen, Anreicherung und Ausklonierung von intrinsisch NTR exprimierenden Zelllinien und die Analyse der vergleichenden genomischen Hybridisierung der Klone konnten weiterführende Einblicke in die Molekularbiologie dieses Tumors gewonnen werden.

4.1 NB4S mit MYCN-Amplifikation – ein sehr seltener und hochmaligner Tumor

Bei einem Neuroblastom im Stadium 4S handelt es sich um eine Erkrankung mit sehr guter Prognose, bei der es in vielen Fällen zur spontanen Regression des Tumors kommt (D'Angio et al. 1971).

Es existiert ein NB4S-Subtyp mit Amplifikation des Onkogens MYCN. Diese Tumore stellen bezüglich Klinik, Therapie und Prognose eine völlig andere Tumorentität dar. Das Vorliegen einer MYCN-Amplifikation ist bei 4S-Tumoren selten, verschlechtert die Überlebenswahrscheinlichkeit jedoch drastisch (Katzenstein et al. 1998). Sobald diese genetische Veränderung diagnostiziert ist, werden die Patienten nach NB2004-Protokoll der Hochrisikogruppe zugeteilt und entsprechend aggressiv therapiert.

Trotz der großen Fortschritte der letzten Jahre in der onkologischen Forschung allgemein und speziell auch in der Diagnostik und Therapie von kindlichen Tumoren, scheint der hier untersuchte Tumor molekularbiologisch wenig verstanden, und die Möglichkeiten der Therapie sind vollkommen unzureichend. Mit der Zielsetzung, in Zukunft Patienten mit dieser speziellen Erkrankung zufriedenstellendere Therapiekonzepte anbieten und zu einer

akzeptableren Prognose verhelfen zu können, sollten in dieser Arbeit Einblicke in die Molekularbiologie dieses Tumors gegeben werden.

4.2 Verhalten der Tumorzellen in der Zellkultur

Neuroblastome im Stadium 4S mit Amplifikation von MYCN sind äußerst selten und in der Literatur nur wenig charakterisiert. Um diesen Subtyp molekularbiologisch und -genetisch untersuchen zu können, wurden Zellen der Tumorprobe kultiviert.

Bei der Kultivierung von Tumoren müssen initial meist spezielle Methoden in der Zellkultur angewandt werden. Für Primärzellen existieren diverse Protokolle zur Beschichtung der Kulturgefäße und zur Zusammensetzung des Mediums.

Auch bei dem hier untersuchten NB4S wurden dem Medium zunächst Supplemente wie SerEX!® und ITS-G zugefügt, die als geeignet beschrieben sind, Primärzellen zu kultivieren. Um den Zellen ein initiales Anwachsen in einem bindegewebigen Milieu zu ermöglichen, wurden einige Kulturgefäße mit Collagen R beschichtet. Es zeigte sich, dass auch die Chargen des Tumors, die ohne spezielle Mediumsupplemente in nicht kollagenbeschichteten Flaschen kultiviert wurden, ebenso schnell adhärent wurden und zügig proliferierten. Einzig die Konzentration des Serums wurde im Vergleich zu dem Medium, das regelmäßig zur Kultur von etablierten NB-Zelllinien verwendet wird, verdoppelt. Dies führte zur rascheren Konfluenz der Zellen und verminderte das Absterben von Populationen.

Nach Brodeur et al. wurden alle Neuroblastomzelllinien aus Tumoren in fortgeschrittenem Stadium etabliert (Brodeur et al. 1984). Insbesondere MYCN-amplifizierte Tumore eignen sich, um in vitro stabile Zelllinien zu etablieren (Brodeur et al. 1984; Nakagawara et al. 1993). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnten wir zeigen, dass sich der hier untersuchte NB4S-Subtyp für die Etablierung von stabilen Zelllinien und weiterführende Untersuchungen eignet. Die hochmaligne Potenz des Tumors in vivo fand in vitro seine Bestätigung durch das schnelle Anwachsen der Zellen und deren rasche Proliferation ohne spezielle Anforderungen an Medium oder Beschaffenheit des Kulturgefäßes.

4.3 NTR- und MYCN-Expression in Tumor und kultivierten Zellen

Die Expression der Neurotrophinrezeptoren TrkA und TrkB spielt für das heterogene biologische Verhalten und die Prognose von Neuroblastomen eine wichtige Rolle (Nakagawara et al. 1993; 1994). Nach dem u.a. von Marris und Matthay favorisierten Modell zur molekularen Pathogenese des Neuroblastoms entwickelt sich ein transformierter Neuroblast während der Tumorgenese entweder zu einer weniger malignen, TrkA exprimierenden Form, oder es entwickelt sich ein höhergradig maligner, TrkB exprimierender Tumor, der durch chromosomale Veränderungen wie die MYCN-Amplifikation oder 1p-Deletion gekennzeichnet ist (Marris et al. 1999; Brodeur et al. 2003).

Neuroblastomzellen sind also bezüglich der NTR entweder TrkA- oder TrkB-positiv.

In dieser Arbeit wurden der Primärtumor und die kultivierten Zellen auf ihren NTR-Status hin analysiert. Es zeigte sich ein überraschendes, außergewöhnliches Genexpressionsmuster. Sowohl der Primärtumor als auch die kultivierten Zellen in frühen und späteren Passagen exprimieren neben MYCN die beiden NTR TrkA und TrkB. Dieser Umstand ist in Anbetracht des am meisten favorisierten Modells zur NB-Tumorgenese bemerkenswert und führt zu einer der zentralen Fragen dieser Arbeit: Kommt das außergewöhnliche Genexpressionsmuster zustande, weil innerhalb des Tumors zwei unterschiedliche Zelltypen existieren, nämlich einerseits TrkB exprimierende Zellen mit MYCN-Amplifikation, die das hochmaligne Verhalten des Tumors erklären und gleichzeitig Areale, die TrkA exprimierende Zellen enthalten, sich aber auf das Verhalten des Tumors nicht positiv auswirken?

In Zusammenhang mit der MYCN-Amplifikationsrate schlug Brodeur die Existenz von NB vor, die sich aus genetisch unterschiedlichen Gruppen zusammensetzen (Brodeur et al. 1984).

Die Existenz von NB, die aus genetisch unterschiedlichen Zellgruppen bezogen auf die Expression der NTR bestehen, wäre erstaunlich und würde dem Grundverständnis der Biologie dieser Tumore widersprechen. Denn während die Expression des NTR TrkA mit niedrigem Tumorstadium und guter Prognose korreliert, ist die Expression des NTR TrkB assoziiert mit aggressiven NB mit

ungünstiger Prognose. Aggressive Neuroblastome, insbesondere solche mit MYCN-Amplifikation, exprimieren kein oder kaum messbares TrkA (Nakagawara et al. 1993; 1994).

4.4 Veränderungen des NTR-Status im Laufe der Kultivierung

Es gilt weiterhin, dass in Neuroblastomen die Expression von TrkA mit günstigen biologischen Charakteristika und guter Prognose assoziiert ist, die Expression von TrkB dagegen mit ungünstiger Biologie und schlechterer Prognose (Nakagawara 1993; 1994).

In initialen Analysen des NTR-Status von Tumor und kultivierten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von TrkA im Laufe der Kultivierung abnahm, während TrkB in zunehmendem Maße nachweisbar war. Dass sich im Laufe der Kultivierung die Zellpopulationen mit den aggressiveren biologischen Charakteristika durchsetzen, steht im Einklang mit der Literatur.

Ho et al. zeigten, dass die Expressionshöhe von TrkB in vitro mit der Überlebenswahrscheinlichkeit von transfizierten NB-Zellen korreliert (Ho et al. 2002). Auch die von uns durchgeführten Untersuchungen sprechen dafür, dass TrkB den Zellen in vitro einen Überlebensvorteil bietet. Denn im Rahmen der Kultivierung wurde entweder auf TrkB-positive Zellen selektioniert, oder aber die TrkA-Expression wurde in den Zellen herunterreguliert.

4.5 Differentielle Genexpression in Tumor und kultivierten Zellen

Die Bedeutung von Genexpressionsanalysen für das Verständnis des biologischen Verhaltens von NB nimmt stetig zu.

Schramm et al. konnten durch die Untersuchung von Genexpressionsprofilen von NB eine Gruppe von vielversprechenden putativen Zielgenen identifizieren (Schramm et al. 2005) und des Weiteren zeigen, dass sich die Analyse des Genexpressionsmusters eignet, um prognostische Vorhersagen zu treffen. Sie schlugen diese Methode als geeignetes Instrument für die Risikostratifizierung einzelner Patienten vor (Schramm et al. 2009).

Um zu untersuchen, ob sich die Regulation von Genen in Primärtumor und kultivierten Zellen voneinander unterscheidet, wurden im Rahmen dieser Arbeit Genexpressionsprofile angefertigt. Auf ‚Gene Ontology‘ basierend wurde eine Gruppe von Genen identifiziert, die mit neuronaler Entwicklung und Differenzierung annotiert sind. Viele Gene dieser Gruppe werden in Tumor und kultivierten Zellen signifikant differentiell exprimiert. Gene, die Zellen in einem undifferenzierten Zustand halten, wie beispielsweise ASH1 werden in den kultivierten Zellen deutlich heraufreguliert. Untersuchungen von Söderholm zeigten, dass die Induktion der Differenzierung von NB-Zellen zum Herunterregulieren von ASH1 führte (Söderholm et al. 1999).

Gene wie EFNB2, die mit neuronaler Entwicklung und Differenzierung assoziiert sind, werden in den kultivierten Zellen im Gegensatz zum Primärtumor signifikant herunterreguliert. In Neuroblastomen korreliert die Expression von EFNB2 mit der von TrkA. Hohe Expressionsraten von EFNB2 sind mit niedrigem Tumorstadium assoziiert (Tang et al. 1999).

Hierbei muss methodenkritisch angemerkt werden, dass eine experimentelle Bestätigung der Chip-Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode genutzt werden sollte, um diese Resultate zu validieren.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss zudem berücksichtigt werden, dass im analysierten Gewebe des Primärtumors möglicherweise auch Nicht-Tumorzellen vorlagen, die für die gezeigten Unterschiede in der mRNA-Messung mitverantwortlich sein könnten.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse im Einklang mit der Literatur, dass im Laufe der Kultivierung auf aggressivere Zellen selektioniert wird. Mechanismen, die zur Differenzierung von Zellen beitragen, werden herunterreguliert und die Zellen verbleiben in einem undifferenzierten Zustand.

4.6 Vereinzelung der Zellen

MYCN amplifizierte Tumore sind mit fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert und eignen sich für die Etablierung stabiler Zelllinien (Brodeur et al. 1984).

Die gängigen NB-Zelllinien exprimieren NTR erst durch Manipulation auf genetischer Ebene. So generierten Eggert et al. aus der Zelllinie SH-SY5Y die NTR exprimierenden Zelllinien SY5Y-TrkA und SY5Y-TrkB durch retrovirale Transfektion (Eggert et al. 2002).

Im Rahmen dieser Dissertation konnten wir durch limitierte Verdünnung intrinsisch NTR exprimierende Zelllinien etablieren. Obwohl die Ausgangspopulation neben TrkA und MYCN auch TrkB exprimierte, konnte in keinem der Einzelzellklone TrkB nachgewiesen werden. In Anbetracht der Beobachtungen von Ho et al., dass die Expressionshöhe von TrkB positiv mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der etablierten Zellen korreliert ist, erscheint dieses Ergebnis zunächst widersprüchlich (Ho et al. 2002). Andererseits fanden andere Arbeitsgruppen, dass NB-Zelllinien aus aggressiven, TrkB exprimierenden Tumoren etabliert werden, die NTR-Expression aber typischerweise in den Zellen nicht mehr nachweisbar ist (Kaplan et al. 1993; Nakagawara et al. 1994). Die Frage bleibt, warum sich TrkB, assoziiert mit aggressiverem Verhalten, bei der Vereinzelung von Zellen nicht durchsetzt.

In hier nicht gezeigten Untersuchungen fanden wir, dass sich die Ausklonierung von stärker TrkB-positiven Ausgangspopulationen als überaus problematisch erweist. In den meisten Fällen waren keine lebenden vereinzelt Zellen nachweisbar. Wurden Klone adhärent, so kam es bereits nach wenigen Zellteilungen zum Absterben der Zellpopulation. Douma et al. beschrieben Wachstum und Proliferation von TrkB-exprimierenden epithelialen Zellen auch losgelöst vom Zellverband. TrkB ist ein potenter Inhibitor der Anoikis und kann als Marker für Metastasierung gelten (Douma et al. 2004).

Bei dem hier untersuchten NB hingegen scheint die Expression von TrkB den Zellen einen Überlebensvorteil *in vitro* nur zu bieten, solange sich diese im Zellverband befinden. Bei Vereinzelung der Zellen scheinen sich diese nur sehr langsam bzw. gar nicht mehr zu teilen.

Unsere Beobachtungen sprechen dafür, dass TrkB-positive NB4S-Zellen auf eine Existenz im Zellverband angewiesen sind.

Es ist bekannt, dass die Signalkaskaden in TrkB-positiven Zellen, die durch das Binden ihres spezifischen Liganden BDNF an den TrkB-Rezeptor ausgelöst werden, wichtig für das Überleben der Zellen sind. Ho et al. vermuteten dabei einen autokrinen Mechanismus (Ho et al. 2002). Acheson beschreibt bezüglich Ganglienzellen einen für das Überleben der Zellen verantwortlichen BDNF-Signalweg, für den er autokrine Mechanismen favorisiert, parakrine Mechanismen jedoch nicht ausschließt (Acheson et al. 1995).

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass in dem von uns untersuchten Modell neben autokrinen auch parakrine Signaltransduktionsmechanismen existieren, ohne die ein Überleben von TrkB-positiven Zellen nicht möglich ist. Die Vereinzelung führt zu einem Wegfall der interzellulären Kontakte und zu diesem Zeitpunkt zu einem Abreißen der parakrinen Signaltransduktion. In wieweit diese gemachten Beobachtungen weiter *in vitro* zu verifizieren und auf die Bedingungen *in vivo* zu übertragen sind, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Auffällig war außerdem, dass die ausklonierten Zellen in einem höheren Maße MYCN exprimierten als die Ausgangspopulation. Brodeur zeigte, dass die Amplifikation von MYCN mit der Möglichkeit korreliert, stabile Zelllinien zu etablieren (Brodeur et al. 1984).

Auch unsere Untersuchungen sprechen nachhaltig dafür, dass dem Onkogen MYCN als Selektionsfaktor *in vitro* eine größere Bedeutung zukommt als dem NTR TrkB. Die von Schulte et al. beschriebene Induktion von onkogener microRNA könnte hierbei eine wesentliche Rolle spielen (Schulte et al. 2008).

4.7 Invasionspotenzial und Anreicherung der TrkB-positiven Zellen

Durch Vereinzelung konnten keine TrkB-positiven Zellklone gewonnen werden. Unsere Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass parakrine Signaltransduktionsmechanismen für das Überleben von TrkB-positiven Zellen *in vitro* unabdingbar sind. Hier sollte untersucht werden, welche Rolle BDNF in diesem Zusammenhang spielt. Matsumoto zeigte, dass die Aktivierung des TrkB-Signalweges durch BDNF das Überleben, die Desaggregation und die Invasion von NB-Zellen fördert (Matsumoto et al. 1995).

Die Ergebnisse von Cimmino et al. konnten hier bestätigt werden: die Stimulation von TrkB-positiven Zellen mit BDNF erhöht die Invasivität und Migration *in vitro* (Cimmino et al. 2009). Schulte et al. zeigten, dass das Gen MCSP, assoziiert mit Invasivität, in mit BDNF behandelten TrkB-positiven Zellen deutlich heraufreguliert wurde. Diese Zellen wiesen ein erhöhtes Invasionspotential auf (Schulte et al. 2005).

Zellen der TrkB-positiven Ausgangspopulation migrierten unter BDNF-Stimulation in der Boydenkammer durch das Matrigel und ließen sich so in einem hohen Maße anreichern.

Um die Bedeutung von BDNF für das Überleben der Zellen weiter zu untersuchen, wurde diesen nach mehrwöchiger Stimulation mit ihrem Liganden das BDNF entzogen. Wir zeigten, dass ein Überleben der an das BDNF habituierten Zellpopulation nach Entzug des Neurotrophins nicht möglich ist.

Die Stimulation von TrkB-positiven Zellen mit ihrem spezifischen Liganden scheint die Genexpression so zu verändern, dass es nach Entzug des BDNF's zur Apoptose der Zellen kommt. Das Phänomen der BDNF-Abhängigkeit für das Überleben von Zellen wurde bereits aus anderen Arbeitsgruppen berichtet (Ho et al. 2002).

Bei dem hier untersuchten NB4S scheint BDNF für das Überleben von TrkB-positiven Zellen eine wichtige Rolle zu spielen. Welche Faktoren hier neben BDNF durch parakrine Signaltransduktionsmechanismen das Überleben und das Invasionsvermögen der Zellen fördern, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen.

4.8 Analyse der ausklonierten Zellen durch Array CGH

Neuroblastome zeichnen sich durch enorme klinische und biologische Heterogenität aus. CGH-Analysen haben sich als nützliche Methode erwiesen, um Tumorgenome zu screenen und dadurch häufige Verluste und Zugewinne zu identifizieren (Kallioniemi et al. 1992; Du Mahoir et al. 1993).

Genomische Aberrationen spielen für das biologische Verhalten und die Prognose von NB eine große Rolle. Neben der Amplifikation des Onkogens MYCN korreliert auch die Deletion von Chromosom 1p mit fortgeschrittenem Erkrankungsstadium (Maris et al. 1995; Takeda et al. 1996). Beide Parameter haben bereits Eingang in die klinische Diagnostik gefunden.

In der vorliegenden Arbeit sollten die entstandenen Einzelzellklone durch Array CGH-Analysen weiter molekular charakterisiert werden. Zunächst fielen multiple, für NB4S-Tumore untypische Verluste und Zugewinne auf. Vandesompele et al. zeigten, dass Tumore in den Stadien I, II und IVS typischerweise komplette chromosomale Imbalancen, d.h. numerische Aberrationen aufweisen, partielle Verluste und Zugewinne, d.h. strukturelle Aberrationen dagegen in Tumoren der Stadien III und IV nachgewiesen werden können (Vandesompele et al. 1998).

Da keine Nicht-Tumor-DNA des Patienten für eine Kontroll-Array CGH vorlag und so bei den gefundenen Verlusten und Zugewinnen nicht sicher zwischen somatischem Ursprung in den Tumorzellen und Keimbahnpolymorphismen differenziert werden konnte, wurden hier nur große, häufig in NB beschriebene chromosomale Veränderungen analysiert.

Neben der fokalen MYCN-Amplifikation auf Chromosom 2p, die auch wir verifizieren konnten, wurden noch weitere unbalancierte Chromosomenaberrationen identifiziert, die in vivo mit höhergradig malignen Tumoren vergesellschaftet sind. Die ausklonierten Zellen zeigen diverse strukturelle Veränderungen des Chromosoms 3 und terminale LOH's auf Chromosom 14. Ejeskär zeigte, dass der komplette Verlust von Chromosom 3p, der auch in IVS-Tumoren nachgewiesen werden konnte, mit günstiger Prognose assoziiert ist. Partielle Verluste dieser Region korrelieren dagegen mit ungünstiger Prognose ebenso wie andere nachgewiesene chromosomale

Veränderungen wie die Amplifikation von MYCN und 1p LOH (Ejeskär et al. 1998).

Fong beschrieb, dass 14q LOH fast ausschließlich bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen nachweisbar war (Fong et al. 1992).

Etliche Autoren postulieren, dass die Chromosomenabschnitte, die häufig von Deletionen betroffen sind, Lokalisation von Tumorsuppressorgenen darstellen.

Alle aufgezeigten chromosomalen Aberrationen der Zellklone sind mit aggressivem Tumorverhalten und schlechter Prognose in vivo assoziiert.

Die Genmuster der untersuchten Klone unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Ein nennenswerter genetischer Drift hat nicht stattgefunden und sich somit kein Hinweis für eine intratumorale Heterogenität ergeben.

Die eingangs erwähnte These der intratumoralen Heterogenität erscheint in der Zusammenschau unserer Ergebnisse nicht haltbar. Hierfür spricht u.a. Folgendes:

Wir haben gezeigt, dass im Laufe der Kultivierung auf undifferenzierte, malignere Zellen selektioniert wird. Hätten im Tumor TrkA-exprimierende neben TrkB-exprimierenden Zellen existiert, dann wäre dem Verständnis von NB und NTR folgend im Laufe der Kultivierung gegen die differenzierteren, weniger malignen, TrkA-positiven Zellen und ausschließlich auf TrkB-positive Zellen selektioniert worden. Zu jedem Zeitpunkt waren aber TrkA-exprimierende Zellen nachweisbar.

Deswegen sprechen unsere Ergebnisse gegen eine intratumorale Heterogenität und eher dafür, dass dieser spezielle Tumor aus Zellen besteht, die beide NTR koexprimieren.

Als Ergebnis dieser Arbeit steht ein Modell zur Verfügung, in dem MYCN amplifizierte Zellen intrinsisch TrkA exprimieren. In wieweit dieses Modell zu einem besseren Verständnis der NB im Stadium 4S mit MYCN-Amplifikation beitragen wird, kann noch nicht abschließend beurteilt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Neuroblastome im Stadium 4S mit Amplifikation des Onkogens MYCN eine eigene Klasse von Tumoren darstellen, die auch als solche diagnostiziert und therapiert werden müssen.

Molekulare Analysen einer möglichst großen Kohorte dieser Tumorentität müssen zeigen, inwiefern die Beobachtungen der vorliegenden Dissertation repräsentativ für diese spezielle Erkrankung sind.

Zukünftige Studien werden zeigen, welche molekularen Charakteristika spezifisch für diese Tumore sind und somit die Identifikation von Zielgenen für befriedigendere Therapiestrategien ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Neuroblastome (NB) sind die häufigsten soliden extrakraniellen Malignome des Kindesalters. Die Prognose von NB im Stadium 4S (NB4S) ist exzellent, nicht aber bei Vorliegen einer Amplifikation des Onkogens MYCN.

Gegenstand dieser Dissertation ist ein MYCN amplifiziertes NB4S eines Patienten, der in der Universitätskinderklinik Essen ad finem behandelt wurde. Durch die Charakterisierung des Tumors und der daraus etablierten Zelllinien konnten neue Einblicke in die Molekularbiologie dieser seltenen Tumorentität gewonnen werden.

Eine wesentliche Rolle für das biologische Verhalten und die Prognose von NB spielt die Expression von Neurotrophinrezeptoren (NTR). Wir zeigten, dass der Tumor über ein außergewöhnliches NTR-Expressionsmuster verfügt, das in Anbetracht des Modells zur NB-Tumorgenese einzigartig ist und sich im Laufe der Kultivierung verändert. Durch den Vergleich von Genexpressionsprofilen fanden wir, dass im Laufe der Kultivierung Mechanismen zur Differenzierung von Zellen herunterreguliert werden. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass nicht nur autokrine, sondern vor allem auch parakrine Mechanismen für das Überleben von TrkB-positiven Zellen *in vitro* verantwortlich sind. MYCN kommt als Selektionsfaktor eine größere Bedeutung zu als TrkB. Der Einfluss von BDNF auf die Migration und Invasion von TrkB-positiven Zellen konnte hier bestätigt werden. Wir etablierten stabil kultivierbare Zelllinien, die ebenfalls über ein überraschendes und außergewöhnliches Genexpressionsmuster verfügen.

Die Analyse der chromosomalen Aberrationen der Zellklone muss in der Zusammenschau mit den übrigen Ergebnissen dieser Arbeit zu dem Schluss führen, dass es sich bei NB im Stadium 4S mit Amplifikation von MYCN um eine eigene Tumorentität handelt, die auch als solche diagnostiziert und therapiert werden muss, um zufriedenstellendere Konzepte für betroffene Patienten entwickeln zu können.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit aus einem sehr seltenen NB-Subtyp stabile Zelllinien etabliert und durch verschiedene Analysen Einblicke in die Molekularbiologie dieses Tumors gewonnen werden.

Literaturverzeichnis

1. Acheson, A., J. C. Conover, J. P. Fandl, T. M. DeChiara, M. Russell, A. Thadani, S. P. Squinto, G. D. Yancopoulos and R. M. Lindsay (1995). "A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death." Nature **374**(6521): 450-3.
2. Attiyeh, E. F., W. B. Londen, Y. P. Mosse, Q. Wang, C. Winter, D. Khazi, P. W. McGrady, R. C. Seeger, A. T. Look, H. Shimada, G. M. Brodeur, S. L. Cohn, K. K. Matthay and J. M. Maris (2005). "Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma." N Engl J Med **353**(21): 2243-53.
3. Beckwith, J.B. and E.V. Perrin (1963). "In Situ Neuroblastomas: A Contribution To The Natural History Of Neural Crest Tumors." Am J Pathol **43**: 1089-104.
4. Berthold F, B. Hero, B. Kremens R. Handgretinger, G. Henze, F. H. Schilling, M. Schrappe and C. Spix (2003). "Long-term results and risk profiles of patients in five consecutive trials (1979–1997) with stage 4 neuroblastoma over 1 year of age." Cancer Lett **197**(1-2): 11–17
5. Biedler, J. L. and B. A. Spengler (1976). "A novel chromosome abnormality in human neuroblastoma and antifolate-resistant Chinese hamster cell lines in culture." J Natl Cancer Inst **57**(3): p. 683-95.
6. Biedler, J.L., S. Roffler-Tarlov, M. Schachner and L.S. Freedman (1978). "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones." Cancer Res **38**(11 Pt 1): 3751-7.
7. Bown, N., S. Cotterill, M. Lastowska, S. O'Neill, A. D. Pearson, D. Plantaz, M. Meddeb, G. Danglot, C. Brinkschmidt, H. Christiansen, G. Laureys, F. Speleman, J. Nicholson, A. Bernheim, D. R. Betts, J. Vandesompele and N.

Van Roy (1999). "Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma." N Engl J Med **340**(25): 1954-61.

8. Breslow, N. and B. McCann (1971). "Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma." Cancer Res **31**(12): 2098-103.

9. Brodeur, G. M., A. A. Green, F. A. Hayes, K. J. Williams, D. L. Williams and A. Tsiatis (1981). "Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines." Cancer Res **41**(11 Pt 1): 4678-86.

10. Brodeur, G. M., R. C. Seeger, M. Schwab, H. E. Varmus and J. M. Bishop (1984). "Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage." Science **224**(4653): 1121-4.

11. Brodeur, G. M., R. C. Seeger, H. Sather, A. Dalton, S. E. Siegel, K. Y. Wong and D. Hammond (1986). "Clinical implications of oncogene activation in human neuroblastomas." Cancer **58**(2 Suppl): 541-5.

12. Brodeur, G. M., R. C. Seeger, A. Barrett, R. P. Castleberry, G. D'Angio, B. De Bernardi, A. E. Evans, M. Favrot, A. I. Freeman et al. (1988). "International criteria for diagnosis, staging and response to treatment in patients with neuroblastoma." Prog Clin Biol Res **271**: 509-24.

13. Brodeur, G. M. (1989). "Clinical significance of genetic rearrangements in human neuroblastomas." Clin Chem **35**: 38-42.

14. Brodeur, G. M., J. Pritchard, F. Berthold, N. L. Carlsen, V. Castel, R. P. Castleberry, B. De Bernardi, A. E. Evans, M. Favrot, F. Hedborg et al. (1993). "Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment." J Clin Oncol **11**(8): 1466-77.

15. Brodeur, G. M., J. M. Maris, D. J. Yamashiro, M. D. Hogarty and P. S. White (1997). "Biology and genetics of human neuroblastomas." J Pediatr Hematol Oncol **19**(2): 93-101.
16. Brodeur, G. M., A. Nakagawara, D. J. Yamashiro, N. Ikegaki, X. G. Liu, C. G. Azar, C. P. Lee and A. E. Evans (1997). "Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas." J Neurooncol **31**(1-2): 49-55.
17. Brodeur, G.M. (2003). "Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma." Nat Rev Cancer **3**(3): 203-16.
18. Caron, H., P. van Sluis, J. de Kraker, J. Bokkerink, M. Egeler, G. Laureys, R. Slater, A. Westerveld, P. A. Voute and R. Versteeg (1996). "Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma." N Engl J Med **334**(4): 225-30.
19. Cimmino, F., J. H. Schulte, M. Zollo, J. Koster, R. Versteeg, A. Iolascon, A. Eggert and A. Schramm (2009). "Galectin-1 is a major effector of TrkB mediated neuroblastoma aggressiveness." Oncogene **28**(19): 2015-23.
20. D'Angio G. J., A. E. Evans, and C. E. Koop (1971). "Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis." Lancet **1**(7708): 1046-9.
21. Douma S., T. Van Laar, J. Zevenhoven, R. Meuwissen, E. Van Garderen, D. S. Peeper (2004). "Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB." Nature **430**(7003): 1034-9.
22. Du Manoir, S., M. R. Speicher, S. Joos, E. Schröck, S. Popp, H. Döhner, G. Kovacs, M. Robert-Nicoud, P. Lichter and T. Cremer (1993). "Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization." Hum Genet **90**(6): 590-610.

23. Eggert, A., M. A. Grotzer, N. Ikegaki, X. G. Liu, A. E. Evans and G. M. Brodeur (2000). "Expression of neurotrophin receptor TrkA inhibits angiogenesis in neuroblastoma." Med Pediatr Oncol **35**(6): 569-72.
24. Eggert, A., R. Ho, N. Ikegaki, X. G. Liu and G. M. Brodeur (2000). "Different effects of TrkA expression in neuroblastoma cell lines with or without MYCN amplification." Med Pediatr Oncol **35**(6): 623-7.
25. Eggert, A., M. A. Grotzner, N. Ikegaki, X. G. Liu, A.E. Evans and G. M. Brodeur (2002). "Expression of the neurotrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells." Cancer Res **62**(6): 1802-8.
26. Ejeskär, K., H. Aburatani, J. Abrahamsson, P. Kogner and T. Martinsson (1998). "Loss of heterozygosity of 3p markers in neuroblastoma tumours implicate a tumour-suppressor locus distal to the FHIT gene." Br J Canc **77**(11): 1787-91.
27. Evans, A. E., G. J. D'Angio and J. Randolph (1971). "A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A." Cancer **27**(2): 374-8.
28. Evans, A. E., J. Chatten, G. J. D'Angio, J. M. Gerson, J. Robinson and L. Schnauffer (1980). "A review of 17 IV-S neuroblastoma patients at the children's hospital of philadelphia." Cancer **45**(5): 833-9.
29. Evans A. E., E. Baum and R. Chard (1981). "Do infants with stage IV-S neuroblastoma need treatment?" Arch Dis Child **56**(4): 271-4.
30. Fong, C. T., P. S. White, K. Peterson, C. Sapienza, W. K. Cavenee, S. E. Kern, B. Vogelstein, A. B. Cantor, A. T. Look and G. M. Brodeur (1992). "Loss

of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas." Cancer Res **52**(7): 1780-5

31. Gadner, H., G. Gaedicke, C. Niemeyer and J. Ritter (2006). Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Springer Medizin Verlag.

32. Grandori, C., S. M. Cowley, L. P. James and R. N. Eisenman (2000). "The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 653-99.

33. Gurney, J. G., S. Davis, R. K. Severson, J. Y. Fang, J. A. Ross and L. L. Robison (1996). "Trends in cancer incidence among children in the U.S." Cancer **78**(3): 532-41

34. Gurney, J. G., J. A. Ross, D. A. Wall, W. A. Bleyer, R. K. Severson and L. L. Robison (1997). "Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992." J Pediatr Hematol Oncol **19**(5): 428-32.

35. Hinterberger, H. and R. J. Bartholomew (1969). "Catecholamines and their acidic metabolites in urine and in tumour tissue in neuroblastoma, ganglioneuroma and phaeochromocytoma." Clin Chim Acta **23**(1): 169-75

36. Ho, R., A. Eggert, T. Hishiki, J. E. Minturn, K. Ikegaki, P. Foster, A. M. Camoratto, A. E. Evans and G. M. Brodeur (2002). "Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas." Cancer Res **62**(22): 6462-6.

37. Hughes, M., H. B. Marsden and M. K. Palmer (1974). "Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging." Cancer **34**(5): 1706-11.

38. Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, D. Sudar, D. Rutovitz, J. W. Gray, F. Waldman and D. Pinkel. (1992). "Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors." Science **258**(5083): 818-21.
39. Kaneko, Y., N. Kanda, N. Maseki, M. Sakurai, Y. Tsuchida, T. Takeda, I. Okabe and M. Sakurai (1987). "Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas." Cancer Res **47**(1): 311-8.
40. Kaplan, D. R., K. Matsumoto, E. Lucarelli, C. J. Thiele (1993). "Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. Eukaryotic Signal Transduction Group." Neuron **11**(2): 321-31.
41. Katzenstein, H. M., L. C. Bowman, G. M. Brodeur, P. S. Thorner, V. V. Joshi, E. Smith, A. T. Look, S. T. Rowe, M. B. Nash, T. Holbrook, C. Alvarado, P. V. Rao, R. P. Castleberry and S. L. Cohn (1998). "Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and histology in 110 infants with stage D(S) neuroblastoma: the pediatric oncology group experience—a pediatric oncology group study." J Clin Oncol **16**(6): 2007-17.
42. Look, A. T., F. A. Hayes, R. Nitschke, N. B. McWilliams and A. A. Green (1984). "Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma." N Engl J Med **311**(4): 231-5.
43. Look, A. T., F. A. Hayes, J. J. Shuster, E. C. Douglas, R. P. Castleberry, L. C. Bowman, E. I. Smith and G. M. Brodeur (1991). "Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study." J Clin Oncol **9**(4): 581-91.
44. Maris, J.M., P. S. White, C. P. Beltinger, E. P. Sulman, R. P. Castleberry, J. J. Shuster, A. T. Look and G. M. Brodeur (1995). "Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma." Cancer Res **55**(20): 4664-9.

45. Maris, J.M. and K.K. Matthay (1999). "Molecular biology of neuroblastoma." J Clin Oncol **17**(7): 2264-79.
46. Maris, J. M., M. J. Weiss, Y. Mosse, G. Hii, C. Guo, P. S. White, M. D. Hogarty, T. Mirensky, G. M. Brodeur, T. R. Rebbeck, M. Urbanek and S. Shusterman (2002). "Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12–13." Cancer Res **62**(22): 6651–8
47. Matsumoto, K., R. K. Wada, J. M. Yamashiro, D. R. Kaplan and C. J. Thiele (1995). "Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells." Cancer Res **55**(8): 1798-806.
48. Menten, B., F. Pattyn, K. De Preter, p. Robbrecht, E. Michels, K. Buysse, G. Mortier, A. De Paepe, S. van Vooren, J. Vermeesch, Y. Moreau, B. De Moor, S. Vermeulen, F. Speleman, and J Vandesompele (2005). "arrayCGHbase: an analysis platform for comparative genomic hybridization microarrays." BMC Bioinformatics **6**: 124.
49. Nakagawara, A., M. Arima-Nakagawara, N. J. Scarvada, C. G. Azar, A. B. Cantor and G. M. Brodeur (1993). "Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma." N Engl J Med **328**(12): 847-54.
50. Nakagawara A., C. G. Azar, N. J. Scarvada and G. M. Brodeur (1994). "Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas." Mol Cell Biol **14**(1): 759-67.
51. Nickerson, H. J., K. K. Matthay, R. C. Seeger, G. M. Brodeur, H. Shimada, C. Perez, J. B. Atkinson, M. Selch, R. B. Gerbing, D. O. Stram and J. Lukens (2000). "Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with

supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study." J Clin Oncol **18**(3): 477-86.

52. Pizzo, P.A. and D.G. Poplack (2005). Principles and Practice of Pediatric Oncology, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins (LWW).

53. Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science. **230**(4732):1350-1354.

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

55. Schilling, F. H., C. Spix, F. Berthold, R. Erttman, N. Fehse, B. Hero, G. Klein, J. Sander, K. Schwarz, J. Treuner, U. Zorn and J. Michaelis (2002). "Neuroblastoma screening at one year of age." N Engl J Med **346**(14): 1047-53.

56. Schramm, A., J. H. Schulte, K. Astrahantseff, O. Apostolov, V. V. Limpt, H. Sieverts, S. Kuhfittig-Kulle, P. Pfeiffer, R. Versteeg and A. Eggert (2005). "Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma." Cancer Lett **228**(1-2): 143-53.

57. Schramm, A., J. H. Schulte, L. Klein-Hitpass, W. Havers, H. Sieverts, B. Berwanger, H. Christiansen, P. Warnat, B. Brors, L. Eils, R. Eils and A. Eggert (2005). "Prediction of clinical outcome and biological characterization of neuroblastoma by expression profiling." Oncogene **24**(53): 7902-12.

58. Schramm, A., I. Mierswa, L. Kaderali, K. Morik, A. Eggert and J. H. Schulte. (2009). "Reanalysis of neuroblastoma expression profiling data using improved

methodology and extended follow-up increases validity of outcome prediction.” Cancer Lett **282**(1): 55-62.

59. Schulte, J. H., A. Schramm, L. Klein-Hitpass, M. Klenk, H. Wessels, B. P. Hauffa, J. Eils, R. Eils, G. M. Brodeur, L. Schweigerer, W. Havers and A. Eggert (2005). "Microarray analysis reveals differential gene expression patterns and regulation of single target genes contributing to the opposing phenotype of TrkA- and TrkB-expressing neuroblastomas." Oncogene **24**(1): 165-77.

60. Schulte, J. H., S. Horn, T. Otto, B. Samans, L. C. Heukamp, U. C. Eilers, M. Krause, K. Astrahantseff, L. Klein-Hitpass, R. Buettner, A. Schramm, H. Christiansen, M. Eilers, A. Eggert and B. Berwanger (2008). "MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma." Int J Cancer **122**(3): 699-704.

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

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

63. Shapiro, H. M. (2003). Practical Flow Cytometry, Wiley-Liss.

64. Shimada, H., J. Chatten, W. A. Newton, Jr., N. Sachs, A. B. Hamoudi, T. Chiba, H. B. Marsden and K. Misugi (1984). "Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas." J Natl Cancer Inst **73**(2): 405-16.

65. Shimada, H., I. M. Ambros, L. P. Dehner, J. Hata, V. V. Joshi, B. Roald, D. O. Stram, R. B. Gerbing, J. N. Lukens, K. K. Matthay and R. P. Castleberry (1999). "The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system)." Cancer **86**(2): 364-72.
66. Söderholm, H., E. Ortoft, I. Johansson, J. Ljungberg, C. Larsson, H. Axelson, S. Pahlman (1999). "Human achaete-scute homologue 1 (HASH-1) is downregulated in differentiating neuroblastoma cells." Biochem Biophys Res Commun **256**(3): 557-63.
67. Solinas-Toldo, S., S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Benner, H. Döhner, T. Cremer and P. Lichter (1997). "Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances." Genes Chromosomes Cancer **20**(4): 399-407.
68. Takeda, O., M. Handa, T. Uehara, N. Maseki, A. Sakashita, M. Sakurai, N. Kanda, Y. Arai and Y. Kaneko (1996). "An increased NM23H1 copy number may be a poor prognostic factor independent of LOH on 1p in neuroblastomas." Br J Cancer **74**(10): 1620-6.
69. Tang, X. X., A. E. Evans, H. Zhao, A. Cnaan, W. London, S. L. Cohn, G. M. Brodeur and N. Ikegaki (1999). "High-level expression of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 is associated with low tumor stage and high TrkA expression in human neuroblastomas." Clin Cancer Res **5**(6): 1491-6.
70. Vandesompele J., N. Van Roy, M. Van Gele, G. Laureys, P. Ambros, P. Heiman, C. Devalck, E. Schuurin, P. Brock, J. Otten, J. Gyselinck, A. De Paepe and F. Speleman (1998). "Genetic heterogeneity of neuroblastoma studied by comparative genomic hybridization." Genes Chromosomes Cancer **23**(2): 141-52.

71. Virchow, R. (1865). Die Krankhaften Geschwulste: Hyperplasie der Zirbel und der Nebennieren. Berlin, August Hirschwald.

72. Woods, W. G., R. N. Gao, J. J. Shuster, L. L. Robison, M. Bernstein, S. Weitzman, G. Bunin, I. Levy, J. Brossard, G. Dougherty, M. Tuchman and B. Lemieux (2002). "Screening of infants and mortality due to neuroblastoma". N Engl J Med **346**(14): 1041-6.

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

Abkürzungsverzeichnis

amp	amplifiziert
AZ	Allgemeinzustand
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
CGH	Comparative Genomic Hybridization
COG	Children's Oncology Group
CT	Cycle Threshold
DD	Differentialdiagnose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZ	Ernährungszustand
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GO	Genontologie
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
Hb	Hämoglobin
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HVA	Homovanillinmandelsäure
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
INSS	International Neuroblastoma Staging System
ITS-G	Insulin-Transferrin-Selenium-G-Supplement

LDH	Laktatdehydrogenase
LOH	Loss of Heterozygosity
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MIBG	Metaiodobenzylguanidin
MRT	Magnetresonanztomographie
NB	Neuroblastom
NB4S	Neuroblastom Stadium 4S
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NGF	Nerve Growth Factor
NSE	Neuron-spezifische Enolase
NTR	Neurotrophinrezeptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time Polymerase-Kettenreaktion
SS	Superscript
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Trk	Tropomyosin-related Kinase
V.a.	Verdacht auf
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
VMA	Vanillinmandelsäure

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Stadieneinteilung der Neuroblastome nach INSS
Tabelle 2	Einteilung der Neuroblastome anhand von biologischen und genetischen Merkmalen
Tabelle 3	Bedingungen in der PCR
Abbildung 1	Modell zur Neuroblastom-Tumorgenese
Abbildung 2	Photodokumentation der Kultivierung von NB4S-Zellen
Abbildung 3	Analyse der NTR- und MYCN-Expression im zeitlichen Verlauf der Kultivierung mittels qualitativer PCR
Abbildung 4	Analyse der NTR- und MYCN-Expressionshöhe im zeitlichen Verlauf der Kultivierung mittels quantitativer Real-time PCR
Abbildung 5	Separation der Tumorzellen durch MACS und Verifizierung durch Immunfluoreszenz
Abbildung 6	Auswertung der Microarray-Daten zur differentiellen Genexpression in Tumor und kultivierten Zellen
Abbildung 7	Durchflußzytometrische Verifizierung der CD56-Positivität von Ausgangspopulation und Einzelzellklonen
Abbildung 8	Analyse der NTR- und MYCN-Expressionshöhe der etablierten Klone mittels quantitativer Real-time PCR
Abbildung 9	Verifizierung der Anreicherung von TrkB-positiven Zellen im Migrationsassay mittels Real-time PCR
Abbildung 10	Photographische Darstellung der BDNF-Abhängigkeit von BDNF-stimulierten TrkB-positiven Zellen
Abbildung 11	Analyse des Genoms eines Einzelzellklons mittels array CGH
Abbildung 12	Detektion von Deletionen und Amplifikationen auf Chromosom 3 eines Einzelzellklons mittels array CGH
Abbildung 13	Detektion von terminalen LOH's auf Chromosom 14q eines Einzelzellklons mittels array CGH

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die einnehmende Art von Univ-Prof. Dr. med A. Eggert und ihr umfassendes Engagement haben mich dazu bewogen, eine experimentelle Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe zu beginnen. Ihr habe ich das interessante Thema meiner Arbeit zu verdanken. Durch sie ist mein Interesse für eine klinische Tätigkeit in der Pädiatrie erst geweckt worden.

PD Dr. rer. nat. A. Schramm hat mich als mein Betreuer über den gesamten Zeitraum begleitet und mir in den entscheidenden Momenten den Rücken gestärkt. Ihm habe ich mein Verständnis für wissenschaftliche Denkweisen und wissenschaftliches Arbeiten zu verdanken.

Die Arbeitsgruppe hat in ihrer Gesamtheit eine Umgebung geschaffen, in der ich gerne gearbeitet und wo ich stets ein offenes Ohr gefunden habe.

Eine wichtige Rolle hat hier Prof. Dr. med. J.H. Schulte gespielt. Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. rer. nat. K. Astrahantseff, Dr. rer. nat. H. Stephan, S. Dreesmann sowie E. Mahlow. Frau Mahlow hat mir alle für eine wissenschaftliche Labortätigkeit benötigten Fähigkeiten vermittelt. Ihre tatkräftige Unterstützung hat mir viel bedeutet.

Meine Familie, meine Freunde und mein Partner haben mir zu dem nötigen Durchhaltevermögen verholfen und mir durch ihren Zuspruch und ihr Zutun sehr geholfen. Meinen geliebten Eltern danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung und Akzeptanz.

Anhang 1

Liste der Gene, die mit ‚nervous system development‘ (GO: 0007399) annotiert sind und in Primärtumor und etablierten Zellen differentiell exprimiert werden.

Expression [Tumor]	Expression [Zellen]	Quotient	Unigene	Gene Symbol	Entrez Gene	FC Absolute ([Tumor] Vs [Celline])	regulation ([Tumor] Vs [Celline])
8,25488	12,048487	0,685138308	Hs.695945	ASCL1	429	13,867221	down
6,502166	9,295509	0,699495423	Hs.495710	GPM6B	2824	6,9323454	down
6,5045485	9,205265	0,70661176	Hs.40098	GREM1	26585	6,501247	down
6,7335787	9,492981	0,709321835	Hs.279832	DOK4	55715	6,771157	down
6,872842	9,367616	0,733681013	Hs.458423	CBLN1	869	5,6363993	down
6,567984	8,944615	0,734294768	Hs.73793	VEGFA	7422	5,193227	down
8,819182	11,682788	0,754886762	Hs.224008	FEZ1	9638	7,2783203	down
8,226696	10,464261	0,786170758	Hs.27621	SEMA5A	9037	4,7160044	down
6,811762	8,652465	0,787262589	Hs.289795	MPPED2	744	3,5818453	down
8,19519	10,139475	0,808245989	Hs.642736	RAPGEF5	9771	3,8484685	down
9,952272	6,097099	1,632296277	Hs.25647	FOS	2353	14,471811	up
9,350218	5,68218	1,64553358	Hs.519659	DPYSL3	1809	12,711285	up
8,915857	4,368866	2,04077145	Hs.6540	FGF13	2258	23,37657	up
8,4793005	3,9299638	2,157602699	Hs.654474	MEF2C	4208	23,414598	up
11,942854	5,522152	2,162717361	Hs.38449	SERPINE2	5270	85,66904	up
8,465541	3,6980631	2,28918241	Hs.164226	THBS1	7057	27,236662	up
7,756871	3,303431	2,348125631	Hs.332847	CRIM1	51232	21,908825	up
9,617228	4,00011	2,404240883	Hs.131704	NRP1	8829	49,08184	up
10,780252	4,397046	2,451703257	Hs.224012	JAG1	182	83,47118	up
8,6130905	2,4527643	3,511585072	Hs.149239	EFNB2	1948	71,52254	up

Anhang 2

Die Rohdaten der array CGH sind hinterlegt unter:
<http://medgen.ugent.be/arrayCGHbasecmgg/>

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.