Aus der Abteilung Anatomie und Zellbiologie Schwerpunktprofessur Angiogenese (Prof. Dr. rer. nat. J. Wilting) im Zentrum Anatomie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Bedeutung von Reelin beim humanen Neuroblastom

INAUGURAL – DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Johanna Fröhlich aus Potsdam

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. J. Wilting Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Kube Promotor-Vertreterin: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einl	eitung	1
	1.1	Tumoren	1
	1.2	Neuroblastom	4
	1.2.1	Klinik	5
	1.2.2	Klinische Stadieneinteilung	6
	1.2.3	Diagnostik	7
	1.2.4	Histologie	8
	1.2.5	Molekularbiologie	11
	1.3	Reelin	18
	1.3.1	Struktur	
	1.3.2	Funktion	19
	1.3.3	Reelin-Signalweg	22
	1.4	Hypothese und Zielsetzung	24
2	Mat	erial	25
	2.1	Geräte	25
	2.2	Verbrauchsmaterialien	25
	2.3	Chemikalien	
	2.4	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (Kits)	26
	2.5	Oligonukleotide	
	2.6	Antikörper	
	2.7	Eukarvotische Zelllinien	
	2.8	Zellkulturmedien	
	2.9	Puffer und Lösungen	
2	Mot	hadan	21
3	Met	hoden Zellbiologische Methoden	31
3	Met 3.1	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien	31 31
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung	31 31
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung. Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs	31 31 31 31 31
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen	31 31 31 31 31 31 31
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung. Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs. Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin	31 31 31 31 31 32 32 32
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Molekularbiologische Methoden	31 31 31 31 31 32 32 33
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung. Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs. Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Molekularbiologische Methoden Isolierung von RNA.	31 31 31 31 32 32 32 33 33
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Molekularbiologische Methoden Isolierung von RNA. Reverse Transkription	31 3131313132323333333334
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Molekularbiologische Methoden Isolierung von RNA Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (PCR)	31 31 31 31 31 32 32 33 33 34 35
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung. Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs. Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Isolierung von RNA. Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (PCR). Real-time PCR	31 31 31 31 31 32 32 32 33 33 33 34 35 36
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Molekularbiologische Methoden Isolierung von RNA. Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (PCR). Real-time PCR	31 31 31 31 31 31 32 32 32 33 33 33 33 34 35 36 38
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1	hoden	
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Molekularbiologische Methoden Isolierung von RNA Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (PCR) Real-time PCR Proteinbiochemische Methoden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Western Blot	31 31 31 31 31 32 32 32 33 33 33 34 35 36 38 38 39
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3	hoden	31 31 31 31 31 32 32 32 33 33 33 33 33 33 33 33 33 34 35 36 38 38 39 40
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.1 3.3.2 3.3.3 Erge	hoden	31 31 31 31 31 32 32 32 33 34 35 36 38 38 39 40 42
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2 4.1	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien	31 31 31 31 31 31 32 32 32 32 33 33 33 34 35 36 38 38 39 40 42 42 42
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 Erge 4.1 4.2	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Molekularbiologische Methoden Isolierung von RNA Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (PCR) Real-time PCR Proteinbiochemische Methoden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Western Blot Immundetektion der Proteine ebnisse mRNA-Expression von Reelin, ApoER2, VLDLR und Dab1	31 31 31 31 31 31 32 32 32 33 33 34 33 34 35 36 38 38 39 40 40 42 42 42 43
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 Erge 4.1 4.2 4.2.1	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Molekularbiologische Methoden Isolierung von RNA Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (PCR) Real-time PCR Proteinbiochemische Methoden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Western Blot Immundetektion der Proteine Pensese mRNA-Expression von Reelin, ApoER2, VLDLR und Dab1 Reelin-Proteinexpression in humanen NB-Zelllinien	31 31 31 31 31 32 32 32 32 33 34 35 36 38 38 39 40 42 42 42 43 43
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 Erge 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Molekularbiologische Methoden Isolierung von RNA Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (PCR) Real-time PCR Proteinbiochemische Methoden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Western Blot Immundetektion der Proteine Photeinespression von Reelin, ApoER2, VLDLR und Dab1 Proteinexpression von Reelin, ApoER2, VLDLR und Dab1 Reelin-Proteinexpression in humanen NB-Zelllinien ApoER2-Proteinexpression in humanen NB-Zelllinien	31 31 31 31 31 32 32 32 33 33 34 35 36 38 38 38 39 40 42 42 42 43 43 43 45
3	Met 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 Erge 4.1 4.2.2 4.2.1 4.2.2	hoden Zellbiologische Methoden Langzeitlagerung der NB-Zelllinien Rekultivierung Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin Molekularbiologische Methoden Isolierung von RNA Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (PCR) Real-time PCR Proteinbiochemische Methoden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Western Blot Immundetektion der Proteine ebnisse mRNA-Expression von Reelin, ApoER2, VLDLR und Dab1 Reelin-Proteinexpression in humanen NB-Zelllinien ApoER2-Proteinexpression in humanen NB-Zelllinien VLDLR-Proteinexpression in humanen NB-Zelllinien	31 31 31 31 31 32 32 32 33 33 33 34 35 36 38 38 39 40 42 42 42 43 45 45

	4.2.5	Reelin-unabhängige Grundphosphorylierung von Dab1	47
	4.3	Reelin-abhängige Dab1-Phosphorylierung in Kelly und Lan 2	49
5	Disk	russion	51
9	5.1	Reelin-Expression in humanen NB-Zelllinien	
	5.2	Reelin-Rezeptoren	
	5.2.1	ApoER2-Expression in humanen NB-Zelllinien	53
	5.2.2	VLDLR-Expression in humanen NB-Zelllinien	55
	5.2.3	Weitere Reelin-Rezeptoren	55
	5.3	Dab1-Expression in humanen NB-Zelllinien	56
	5.4	Dab1-Phosphorylierung in humanen NB-Zelllinien	57
	5.5	Reelin im Serum und Gefäßendothel	59
	5.6	Korrelation zwischen Reelin-Expression und Tumordignität	60
	5.7	Schlussfolgerung	62
6	Zusa	ammenfassung	63
7	Anh	ang	65
	7.1	Abbildungsverzeichnis	65
	7.2	Tabellenverzeichnis	65
8	Lite	raturverzeichnis	67
9	Abk	ürzungsverzeichnis	78
D	anksag	ung	81
-			

1.1 Tumoren

In Industrieländern sind Tumoren nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Sie zeigen in ihrem Verlauf und in ihrer klinischen Symptomatik heterogene Krankheitsbilder. Jedes Jahr erkranken etwa 5 von 1.000 Menschen in Deutschland an einem malignen Tumor (Böcker et al. 2004). Nach Schätzungen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (GEKID) und des Robert-Koch-Instituts (RKI) sind im Jahr 2006 in Deutschland 426.800 Menschen neu an Krebs erkrankt. Im gleichen Zeitraum lebten fast 1,4 Millionen Krebskranke in Deutschland, deren Erstdiagnose nicht länger als fünf Jahre zurückgelegen hat. In jenem Jahr verstarben 210.930 Menschen an ihrem Krebsleiden. Im Vergleich dazu lag die Gesamtanzahl der Sterbefälle bei den Herz-Kreislauf-Erkrankungen im selben Jahr bei 358.953 Menschen. Das Bronchialkarzinom ist bei Männern für die meisten Krebstodesfälle verantwortlich, gefolgt vom Kolon- und Prostatakarzinom. Bei Frauen steht als Todesursache unter den Krebserkrankungen das Mammakarzinom auf Platz eins, das Kolon- und Bronchialkarzinom auf den Plätzen zwei und drei (RKI & GEKID 2010).

Jährlich werden in Deutschland etwa 1.800 kindliche Krebserkrankungen diagnostiziert. Das Spektrum an Diagnosen bei Kindern unterscheidet sich gänzlich von dem bei Erwachsenen. Leukämien, ZNS-Tumoren, Lymphome und embryonale Tumoren wie Neuroblastome, Retinoblastome, Nephroblastome und Medulloblastome stehen hier im Vordergrund, während Karzinome nur etwa 2 % der malignen Erkrankungen ausmachen (RKI & GEKID 2010).

Tumorentstehung

Differenzierung, Proliferation sowie Apoptose von Zellen sind im gesunden Gewebe u. a. durch das Zusammenspiel von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen streng reguliert. Eine Fehlregulierung durch genetische oder epigenetische Veränderungen kann entartete Zellen entstehen lassen (Gilbert 2010). Zwei wesentliche Mechanismen liegen der Tumorentstehung zugrunde:

1) Ubiquitär vorkommende Proto-Onkogene fördern Zellproliferation, reduzieren Zelladhäsion und verhindern Apoptose. Mutationen sowie DNA-Hypomethylierungen in diesen Genen können zu einer gesteigerten Genaktivität führen und pathologische Onkogene bedingen, die Tumorwachstum sowie Metastasenbildung begünstigen. Einige Beispiele:

- Beim Blasenkarzinom führt eine Punktmutation im RAS-Proto-Onkogen zu einer Daueraktivität von RAS-Proteinen und einer daraus resultierenden ungehemmten Zellproliferation.
- Beim Mammakarzinom kann es über eine Amplifizierung des *ERBB2*-Proto-Onkogens zu einer gesteigerten Expression von EGF-Rezeptoren und zu einer ligandenunabhängigen Stimulation des Zellwachstums kommen.
- Auslöser der chronisch-myeloischen Leukämie ist die Translokation des *ABL*-Proto-Onkogens von Chromosom 9 auf Chromosom 22. Das entstehende *BCR-ABL*-Fusionsgen auf Chromosom 22 (Philadelphia-Chromosom) bewirkt eine konstitutive Aktivität einer Tyrosinkinase und begünstigt so unkontrollierte Zellproliferation.

2) Tumorsuppressorgene hemmen Zellproliferation, fördern Zell-Zell-Adhäsion und induzieren Apoptose bei sich schnell teilenden Zellen. Bei Verlust oder Inaktivierung dieser Gene durch Mutationen und DNA-Hypermethylierungen überwiegt die tumorigene Wirkung der Proto-Onkogene. Tumorsuppressorgene sind meist rezessiv, d.h. erst eine Mutation in beiden Allelen kann zu maligner Transformation führen. Beispiele:

- Das hereditäre Retinoblastom entsteht durch eine Keimbahnmutation im Retinoblastom-Gen (ein Tumorsuppressorgen) sowie durch eine somatische Mutation im homologen Allel. Das Genprodukt kann nun nicht mehr Zellzyklus-stimulierende Faktoren inaktivieren.
- Viele Tumoren, wie das Ösophaguskarzinom und das Glioblastoma multiforme, sind mit einem defekten *P53*-Gen, ebenfalls ein Tumorsuppressorgen, assoziiert. Physiologischerweise verhindert das P53-Protein bei DNA-Schäden die Zellteilung und induziert bei irreparablen Schäden die Apoptose. Entfällt dieser Kontrollmechanismus, wird unkontrolliertes Zellwachstum begünstigt.

Dignität von Tumoren

Im klinischen Alltag wird zwischen benignen und malignen Tumoren unterschieden:

- Benigne Tumoren sind begrenzte, oft mit einer fibrösen Kapsel versehene Tumoren, die kein infiltratives Wachstum zeigen und chirurgisch gut entfernbar sind. Kompressionssyndrome können entstehen, wird anliegendes Gewebe durch Zellwachstum verdrängt. Der histologische Befund zeigt gut differenzierte und monomorphe Zellen.
- Maligne Tumoren sind invasiv, destruktiv wachsend und lassen sich oft schlecht abgrenzen. Über die Infiltration benachbarter Gewebe und von Blut- und Lymphgefäßen

bilden sie Metastasen. Histologisch weisen sie eine atypische Kern- und Zellmorphologie auf und ihre Differenzierung kann bis hin zur Anaplasie verloren gehen.

 Semimaligne Tumoren, wie das Basaliom, zeigen ein lokal begrenztes, invasives und destruktives Wachstum, metastasieren jedoch nicht in entfernte Organe (Böcker et al. 2004; Dettmer 2005; Gilbert 2010).

<u>Tumorangiogenese</u>

Angiogenese, die Bildung neuer Blut- und Lymphgefäße aus schon existierenden Gefäßen, unterliegt der strengen Kontrolle endogener Stimulatoren und Inhibitoren. Häm- und Lymphangiogenese werden vor allem durch die VEGF-Familie (Vascular endothelial growth factor) reguliert. Die Tumor-induzierte Angiogenese versorgt den Tumor mit Sauerstoff sowie Nährstoffen und erleichtert dessen aggressive Progression. Hypoxie im Tumorgewebe führt über die Stabilisierung von HIF (Hypoxia inducible factor) zu einer Hochregulierung von proangiogenen Proteinen wie VEGF-A (Naumov et al. 2006). VEGF-A stimuliert hauptsächlich die Hämangiogenese, VEGF-C und -D die Lymphangiogenese (Shojaei und Ferrara 2007; Achen und Stacker 2008). VEGF-A zusammen mit bFGF (Basic fibroblast growth factor) aktivieren u. a. Endothelzellen, die Basalmembran zu durchbrechen. So können sie ins benachbarte Gewebe einwandern und proliferieren. Andere Moleküle, wie Angiopoetin 1, unterstützen die Angiogenese, indem sie für die Erhaltung der Gefäßstabilität Perizyten und Muskelzellen aus benachbartem Gewebe rekrutieren (Hanahan 1997). VEGF-A spielt eine Schlüsselrolle bei der Tumorangiogenese und dient als Grundbaustein für eine antiangiogene Therapie. Die Gabe von Antikörpern (AK) gegen VEGF-A zusätzlich zu einer zytotoxischen Chemotherapie erhöhte in einer Studie die mittlere Überlebensrate von Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen signifikant (Ferrara 2009). In einem gesunden adulten Organismus gibt es praktisch keine Angiogenese, abgesehen von Reparaturprozessen bei der Wundheilung sowie zyklusabhängigen Veränderungen in Uterus und Ovar. Im Gegensatz dazu ist die Angiogenese beim Embryo, Fetus und Kleinkind zur Sicherung eines raschen Wachstums unerlässlich (Schweigerer 1995). Der lösliche Rezeptor sVEGFR-1, eine Splice-Variante des membranständigen mbVEGFR-1, agiert als natürlicher Inhibitor der Hämangiogenese, indem er VEGF-A abfängt (Kendall und Thomas 1993). Der lösliche Rezeptor esVEGFR-2 ist eine endogene Splice-Variante des VEGFR-2-kodierenden Gens und hemmt als VEGF-C-Antagonist die Proliferation von Lymphendothelzellen (Albuquerque et al. 2009). Becker et al. (2010) konnten zeigen, dass die mRNA-Expression von esVEGFR-2 beim metastasierten Neuroblastom, einem embryonalen Tumor der

Neuralleiste, signifikant herunterreguliert ist. Auch konnten Becker et al. (2012 a) immunhistologisch beim differenzierten *low-grade*-Neuroblastom, im Vergleich zum undifferenzierten *high-grade*-Neuroblastom, eine hohe esVEGFR-2-Expression nachweisen. Über eine Herabregulierung von esVEGFR-2 wird hier vermutlich Lymphangiogenese induziert und lymphogenes Metastasieren gefördert (Becker et al. 2012 a). Die gezielte Hemmung der Lymphangiogenese im Tumorgewebe als ein neues Therapiekonzept ist Gegenstand klinischer Forschung.

1.2 Neuroblastom

Das Neuroblastom (NB) ist nach den Leukämien und Neoplasien des ZNS der dritthäufigste Tumor im Kindesalter (Papaioannou und McHugh 2005). Trotz guter Therapiefortschritte macht es als häufigster solider extrakranieller Tumor etwa 10 % der pädiatrischen Tumoren aus und ist für fast 15 % der tödlichen Ausgänge verantwortlich (Lonergan et al. 2002). Etwa 40 % der NB-Patienten gehören zur Hochrisikogruppe (Westermann und Schwab 2002). Die Inzidenz ist stark altersabhängig. Sie erreicht ihren Höhepunkt in der frühen Kindheit im Alter von etwa zwei Jahren und nimmt mit zunehmendem Alter schnell ab. Bei 90 % der betroffenen Kinder wird die Diagnose in den ersten fünf Jahren gestellt (Urayama et al. 2007).

Das NB ist ein embryonaler Tumor, der seinen Ursprung in den Zellen der Neuralleiste hat. Während der Neurulation in der 3. Embryonalwoche siedeln sich Zellen von den Neuralwülsten ab und bilden dorsolateral des Neuralrohrs die Neuralleiste. Sie enthält pluripotente neuroektodermale Stammzellen mit hohem Migrationspotenzial. Je nach Besiedlungsort im Embryo differenzieren sie sich zu den unterschiedlichsten Zellen und bilden u. a. den paravertebralen Grenzstrang des Sympathikus, die (Nor)adrenalin-produzierenen Zellen des Nebennierenmarks, die Schwannzellen und Melanozyten (Gilbert 2010). Das NB geht aus primitiven Neuroblasten, den Sympathogonien, hervor und kann sich dementsprechend überall dort, wo sich sympathisches Gewebe findet, entwickeln. Mehr als 60 % der NB sind primär intraabdominal lokalisiert, davon wiederum mehr als die Hälfte im Nebennierenmark. Der Rest hat seinen Ursprung im paravertebralen Grenzstrang, in den Paraganglien des Truncus coeliacus und im Zuckerkandl-Organ, ein sympathisches Paraganglion am Abgang der Arteria mesenterica inferior. In 20 % der Fälle ist das Mediastinum betroffen, seltener das Becken und der Hals. Vereinzelt kann der Tumor auch parasympathischen Ursprungs sein und ist dann im präsakralen Bereich lokalisiert (Hero und Berthold 2002; Rha et al. 2003; Maris 2010).

1.2.1 Klinik

Die klinischen Symptome beim NB sind vielfältig. Die Lokalisation des Tumors, sein Metastasierungsverhalten sowie seine genetisch-biologischen Charakteristika bestimmen das klinische Bild. Bei der Untersuchung ist oft ein großes und derbes Abdomen auffällig (siehe Abb. 1.1). Neben unspezifischen Anzeichen (Gewichtsverlust, Schmerzen, Fieber, Anämie) können Knochenschmerzen aufgrund ossärer Dissemination, Blasenfunktionsstörungen bei abdominellen sowie Dyspnoe bei intrathorakalen Tumoren (siehe Abb. 1.2) auftreten.



Abb. 1.1: NB im Stadium 4s. Der Tumor entstammt ursprünglich dem Nebennierenmark. Dieser Säugling hat eine massive Hepatomegalie aufgrund eines metastasierenden NB. Der hohe intraabdominale Druck wird teilweise durch eine Schusterplastik gesenkt. Quelle: Image #413720, AFIP Atlas of Tumor Pathology via <u>http://pictures.doccheck.com</u>. Stand: 14.12.2011. Mit freundlicher Genehmigung von Georg Graf von Westphalen.

Die intraspinale Ausbreitung eines NB paravertebralen Ursprungs durch die Foramina intervertebralia führt zu neurologischen Symptomen, die sich bis hin zur Querschnittslähmung erstrecken können (Sanduhrtumor). Eine metastasenbedingte vergrößerte Leber und eine Renin-assoziierte Hypertonie als Folge komprimierter renaler Vasa afferentia sind ebenfalls möglich. Retrobulbäre Infiltrationen können periorbitale Ekchymosen bedingen, klinisch auffällig als "Brillenhämatom", sowie bei Kompression des Nervus opticus Blindheit verursachen. Der Tumorbefall zervikaler Grenzstrang-Ganglien kann sich als Horner-Syndrom mit Ptosis, Miosis und Enophthalmus darstellen. Bei etwa 2 % der Patienten findet sich ein paraneoplastisches Opsomyoklonus-Syndrom, welches charakterisiert ist durch unregelmäßige, unkontrollierte und schnelle Bewegungen der Augen (Opsoklonien) sowie der Extremitäten (Myoklonien) und oft kombiniert mit einer cerebellaren Ataxie auftritt. Dieses Syndrom ist stark mit dem NB assoziiert und sollte immer, da es selten bei anderen Erkrankungen eine Rolle spielt, diesen Tumor in Betracht ziehen. Ein paraneoplastisches Syndrom kann sich aber auch, bedingt durch eine vermehrte Sekretion von

VIP (Vasointestinales Peptid), in wässrigen Durchfällen äußern, die klinisch einer intestinalen Malabsorption ähneln (Schwab et al. 2003; Papaioannou und McHugh 2005).



Abb. 1.2: CT-Bild vom Thorax in axialer Schichtführung. Auffällig ist die große intrathorakale Läsion. Diagnose: Ganglioneurom, eine benigne Form des NB (Papaioannou und McHugh 2005, S. 123).

1.2.2 Klinische Stadieneinteilung

Um Studienergebnisse von NB-Patienten weltweit effektiver miteinander vergleichen zu können und die Ausbreitung des Tumors besser zu erfassen, wurden 1986 einheitliche Kriterien hinsichtlich der anatomischen Tumorpräsenz erstellt und 1988 überarbeitet (Brodeur et al. 1988). Es entstand das *International Neuroblastoma Staging System* (INSS). Es berücksichtigt die operativ-pathologische Beurteilung der lokalen Tumorausdehnung, die Lymphknotenbeteiligung sowie Metastasen (siehe Tab. 1.1).

Stadium 1	Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter Entfernung (mit oder ohne mikroskopischem Resttumor). Ipsi- und kontralaterale Lymphknoten (LK) sind histologisch ohne Tumorbefall.
Stadium 2a	Lokalisierter Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung. Ipsi- und kontralaterale LK sind histologisch ohne Tumorbefall.
Stadium 2b	Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter oder inkompletter Entfer- nung. Ipsilaterale LK zeigen Tumorbefall, während kontralaterale LK histolo- gisch negativ sind.
Stadium 3	Nichtresektabler unilateraler Tumor mit Überschreitung der Mittellinie sowie positivem oder negativem LK-Status bzw. unilateraler lokalisierter Tumor mit kontralateralem LK-Befall.
Stadium 4	Dissemination des Tumors in Fern-LK, Knochen, Knochenmark (KM), Leber, Haut und/oder andere Organe.
Stadium 4s	Lokalisierter Primärtumor (wie im Stadium 1, 2a oder 2b) mit Dissemination in Haut, Leber und/oder ins KM. Nur bei Säuglingen im ersten Lebensjahr. Der KM-Befall muss minimal sein, d.h. weniger als 10 % aller kernhaltigen Zellen sind maligne, ansonsten wird der Tumor in das Stadium 4 eingeordnet. Spontane Regression der ursprünglich immensen Tumormasse ist möglich.

Tab.1.1: INSS (modifiziert nach Hero und Berthold 2002, S. 778).

1.2.3 Diagnostik

Das Durchschnittsalter zum Diagnosezeitpunkt liegt bei 18 Monaten (Brodeur 2003). Da das NB oft große Mengen an Katecholaminen produziert, sind bei über 80 % der Patienten Katecholaminmetabolite (Homovanillinsäure, Vanillinmandelsäure, Dopamin) im Serum und, noch sensitiver, im Urin nachweisbar. Die neuronenspezifische Enolase als nicht sehr spezifischer Tumormarker für den Krankheitsverlauf sowie LDH und Ferritin als unspezifische Prognosemarker können ebenfalls erhöht sein. Punktionen des KM zum Nachweis einer häufig auftretenden KM-Infiltration werden bei jedem Patienten durchgeführt. Mit der Sonographie sind im Abdomen lokalisierte Tumoren, auffällige Lymphknoten sowie Lebermetastasen detektierbar. Die Magnetresonanztomographie verdeutlicht die Lagebeziehung des Tumors zu seiner Umgebung und sollte aufgrund fehlender Strahlenbelastung der Computertomographie vorgezogen werden. Bei der MIBG-Szintigraphie wird das mit Jod-123 markierte Metajodbenzylguanidin (MIBG) als Noradrenalinanalogon von neuroendokrinen Zellen, also auch von NB-Zellen, aufgenommen und ermöglicht neben der physiologischen MIBG-Anreicherung eine szintigraphische Darstellung von Primärtumor und Fernmetastasen. Eine Skelettszintigraphie differenziert einen KM- von einem Knochenbefall (Hero und Berthold 2002).

Das vor einigen Jahren durchgeführte NB-Screening auf Katecholaminmetabolite im Urin ließ die Prävalenz des NB enorm ansteigen. Es wurde jedoch nicht in die Vorsorgeuntersuchung aufgenommen, da keine Reduktion der Mortalität gezeigt werden konnte (Brodeur 2003). Die Anzahl der pränatal diagnostisierten NB nimmt aufgrund der zunehmenden Routine-Ultraschalluntersuchungen Pränatale NB werden meist nach der 32 zu. Schwangerschaftswoche diagnostiziert und befinden sich in prognostisch günstigen Stadien. Bei einem Großteil der Feten wird eine solide Masse oder eine Zyste im Bereich der Niere gefunden. Mehr als 90 % der pränatal diagnostizierten NB haben ihren Ursprung im Nebennierenmark; im Vergleich dazu nur 35 % der postnatal diagnostisierten Fälle (Bessho et al. 1991; Acharya et al. 1997). Viele neonatale Fälle werden, offenbar aufgrund spontaner Regression oder Ausdifferenzierung in benigne Formen, nicht klinisch auffällig (Papaioannou und McHugh 2005).

1.2.4 Histologie

Makroskopisch sind NB graurote und weiche, von Pseudokapseln umgebene, solide Tumoren, die in Abhängigkeit von ihrer Malignität Einblutungen, zentrale Nekrosen und Verkalkungen enthalten können. Im histologischen Bild imponieren kleine runde und blaue Neuroblasten, welche häufig in Form von Pseudorosetten (Homer Wright Rosetten) um homogen fasriges Neuropil angeordnet sind (Böcker et al. 2004).

NB gehören wie Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome zu den neuroblastischen Tumoren, die zu unterschiedlichen Anteilen aus Neuroblasten und Schwannzell-Stroma bestehen. Beide Zelltypen gehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle der Neuralleiste hervor. Ob sie nun den gleichen neoplastischen Ursprung zeigen oder ob der Tumor aus dem anliegenden, nicht entarteten Gewebe Schwannzellen mit Hilfe chemotaktischer Mediatoren rekrutiert, wird diskutiert (Ambros et al. 1996; Bourdeaut et al. 2008). Je nach Differenzierungsgrad und Verteilung beider Zelltypen lassen sich die neuroblastischen Tumoren morphologisch in drei große Gruppen einteilen (Shimada et al. 1999; Tornóczky et al. 2007):

 Benigne Ganglioneurome bestehen größtenteils aus Schwannzell-Stroma, welche die meist schon zu Gangliozyten differenzierten Neuroblasten ummanteln. Es wird vermutet, dass Schwannzellen die für eine neuronale Reifung notwendigen antiproliferativen und differenzierungsfördernden Faktoren produzieren. In der Histologie zeigen die Neuroblasten reichhaltiges Zytoplasma, große Kerne sowie Fortsätze mit Neurotubuli und Neurofilamenten. Ganglioneurome gehen mit einer günstigen Prognose einher.

- 2) Gering-maligne Ganglioneuroblastome werden in Abhängigkeit von ihrer neuroblastischen Komponente in einen prognostisch günstigen stroma-reichen und einen prognostisch ungünstigen nodulären Typ unterschieden. Das noduläre Ganglioneuroblastom ist makroskopisch erkennbar an dem hämorrhagischen stromaarmen Bereich, der sich scharf von der weißlichen stroma-reichen Komponente abhebt.
- 3) Stroma-arme maligne Neuroblastome enthalten eine Vielzahl von gering differenzierten Neuroblasten und nur wenige Schwannzellen. Das histologische Bild besteht aus kleinen und runden, eng aneinander liegenden neuroepithelialen Zellen mit dichten chromatinreichen Kernen, spärlichem Zytoplasma sowie zahlreichen Mitosen. Einige wenige Tumoren bestehen aus großen Zellen, bei denen die Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kernes verschoben ist. Sie sind mit einer extrem schlechten Prognose verbunden.

Aggressive undifferenzierte NB kommen v. a. bei Kindern \leq zwei Jahren vor, während Ganglioneurome meist ältere Kinder betreffen (Shimada et al. 1999; Papaioannou und McHugh 2005). Abb. 1.3 veranschaulicht die histologische Klassifizierung nach INPC (*The International Neuroblastoma Pathology Classification*, Shimada-System).



Abb. 1.3: Histologische Klassifizierung nach INPC. (A) Stroma-armes NB vom undifferenzierten Typ: Kleine undifferenzierte Neuroblasten. (B) Stroma-armes NB vom schlecht differenzierten Typ: Homer Wright Rosetten mit zentral gelegenem Neuropil (N). (C) Stroma-armes NB vom sich differenzierenden Typ: mehr als 5 % der Tumorzellen sind Neuroblasten im Differenzierungsprozess (siehe Pfeile). (D) Stroma-reiches Ganglioneuroblastom: Ganglienzellen und sich zu Gangliozyten differenzierende Tumorzellen sind in Nestern angeordnet und von Schwannzell-Stroma umgeben. (E) Stroma-dominiertes Ganglioneurom, ausgereift: Große, reife Ganglienzellen (siehe Pfeile) sind umgeben von schwannzellhaltigem Stroma. Tumorzellen in Ganglioneuromen sind nicht in Nestern angeordnet. (F) Stroma-dominiertes Ganglioneurom, heranreifend: Einige Tumorzellen (siehe Pfeile) sind noch nicht vollständig ausgereift und besitzen nur spärliches Zytoplasma (nach Tornóczky et al. 2007, S. 271).

Mit der INPC gibt es, basierend auf der heterogenen Morphologie neuroblastischer Tumoren, eine prognostisch signifikante und biologisch relevante, universale Klassifikation. Prognostische Marker sind das Patientenalter, der Differenzierungsgrad der Neuroblasten, der Gehalt an Schwannzellen im Tumorstroma sowie der Mitose-Karyorrhexie-Index (MKI; Anzahl der mitotisch aktiven und karyorrhektischen Tumorzellen auf 5000 Zellen) (Shimada et al. 1999). Um den Malignitätsgrad anhand histologischer und zytologischer Kriterien einstufen zu können, wird in Deutschland häufig das histologische Grading nach Hughes verwendet, bei dem das Ausmaß der Zellreifung eine zentrale Rolle spielt (Hero und Berthold 2002).

1.2.5 Molekularbiologie

NB weisen eine große klinische Heterogenität auf. Sie können sich spontan zurückbilden oder in benigne Ganglioneurome differenzieren. Jedoch ist bei einem Großteil der über einjährigen Patienten zum Diagnosezeitpunkt eine Metastasierung erfolgt und es kommt trotz intensiver Therapie zu einer lebensbedrohlichen Tumorprogression. Weder Vererbung noch Umwelteinflüsse sind scheinbar ursächlich für die Pathogenese des NB, auch gibt es keine Assoziationen zu anderen bösartigen Erkrankungen (Kushner 2004). Ob prä- oder perinatale Faktoren wie Graviditätsalter, Geburtsvorgang und -gewicht sowie sozioökonomischer Status und Ethnizität von ätiologischer Bedeutung sind, wird kontrovers diskutiert (Urayama et al. 2007). Die molekularen Mechanismen der Tumorprogression sind größtenteils noch unklar. Einige genetische Veränderungen, wie die MYCN-Amplifikation, der Allelverlust auf Chromosom 1p und die Ploidität der Zellen, werden nachfolgend beschrieben und korrelieren mit Klinik und Prognose der Patienten.

MYCN-Amplifikation

MYCN ist ein im Nukleus lokalisierter Transkriptionsfaktor der Myc-Familie. Diese interagieren mit der DNA und bilden mit anderen Proteinen Transkriptionskomplexe. Das Proto-Onkogen *MYCN* wird vorwiegend während der Embryonalentwicklung in Spinalganglien, Niere, Lunge und im Gehirn exprimiert und scheint die Zellproliferation aufrecht zu erhalten. Wird *MYCN* herunterreguliert, differenzieren sich die Zellen bis zu ihrem letztendlichen Phänotyp aus (Stanton und Parada 1992). Die Amplifikation des *MYCN*-Gens führt über die Transkription aller Gen-Kopien zu einer Protein-Überexpression und einem unkontrollierten Zellwachstum (Lutz und Schwab 1997). Die enorme Vervielfältigung des Onkogens *MYCN* bis hin zu mehreren hundert Kopien (vgl. Abb. 1.4) geht mit einer

schnell fortschreitenden Tumorprogression und Metastasierung einher. Sie wird deswegen zusammen mit der 1p-Deletion als klinischer Marker für Tumoren der Hochrisikogruppe bei der klinischen Risikostratifizierung eingesetzt.



Abb. 1.4: Detektion der MYCN-Amplifikation mit Hilfe der Fluoreszenzin-situ-Hybridisierung (FISH) in NB-Zellen (Maris et al. 2007, S. 2110).

Tab. 1.2 zeigt eine an 3000 NB-Patienten durchgeführte US-Studie. Von den Tumoren in den fortgeschrittenen Stadien 3 & 4 weisen über 30 % eine MYCN-Amplifikation auf, während es bei denen aus den niedrigen Stadien 1 & 2 nur 4 % sind:

Stadium bei der Diagnose	MYCN-Amplifikation	3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit
Benigne Ganglioneurome	0/64 (0 %)	100 %
Stadium 1 & 2	31/772 (4 %)	90 %
Stadium 4s	15/190 (8 %)	80 %
Stadium 3 & 4	612/1.974 (31 %)	30 %
Total	658/3.000 (22 %)	50 %

Tab. 1.2: Kooperierende NB-Studien in den USA zeigen den Zusammenhang zwischen Tumorstadium, MYCN-Amplifikation und Überlebenswahrscheinlichkeit (nach Brodeur 2003, S. 206).

Da eine erhöhte MYCN-Expression mit der Herunterregulierung des Angiogenese-Inhibitors Activin A korreliert, scheint die MYCN-Amplifikation zu einer gesteigerten Angiogenese und Tumorprogression beizutragen (Breit et al. 2000). Umgekehrt unterdrückt eine erhöhte Activin-A-Expression die Proliferation von MYCN-amplifizierten NB-Zellen *in vitro* und inhibiert das Tumorwachstum sowie die Tumorangiogenese *in vivo* (Schramm et al. 2005).

Die Expression von Neurotrophin-Rezeptoren der Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie (TRK A, TRK B) hat prognostische Bedeutung (siehe Abb. 1.5). Sie sind an der Regulierung synaptischer Plastizität im Nervensystem beteiligt und beeinflussen Überleben und Differenzierung von Neuronen. Die Rezeptoren der TRK-Familie binden spezifisch bestimmte Neurotrophine, wie NGF (*Neuronal growth factor*) und BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), und lösen intrazellulär Phosphorylierungskaskaden aus. Eine normale TRK-A-Expression im NB korreliert stark mit einem normalen MYCN-Status, dem Alter < 1 Jahr und einer günstigen Prognose; eine niedrige TRK-A-Expression hingegen mit einer MYCN-Amplifikation sowie einer ungünstigen Prognose. Bei einigen NB-Zelllinien wird eine durch den TRK-A-Liganden NGF induzierte neuronale Differenzierung beobachtet, während ein Mangel an NGF zum programmierten Zelltod führt. Eine hohe TRK-B-Expression ist dagegen stark assoziiert mit MYCN-amplifizierten NB. Diese exprimieren den TRK-B-Liganden BDNF, so dass über eine autokrine Sekretion das Tumorwachstum und -überleben aufrechterhalten wird (Chen et al. 1990; Nakagawara et al. 1994; Brodeur et al. 2009).

<u>1p-Deletion</u>

Deletionen des kurzen Armes von Chromosom 1 sind typisch für eine Vielzahl maligner Tumoren (Schwab et al. 1996) und werden sowohl bei lokalisierten als auch bei disseminierten NB gefunden (Caron et al. 1996). Wie eine in den USA durchgeführte Studie an 238 Patienten zeigt, wird in etwa 35 % der NB eine 1p36-Deletion erfasst, die signifikant mit dem Alter (\geq 1 Jahr zum Diagnosezeitpunkt), einem erhöhten Serum-Ferritin-Spiegel sowie einer MYCN-Amplifikation korreliert (Maris et al. 2000). Eine andere Studie zeigt, dass Patienten in den nicht-amplifizierten MYCN-Tumorstadien 1, 2 und 4s ohne 1p-Deletion eine Drei-Jahre-Überlebens-Chance von nahezu 100 % haben, Patienten mit 1p-Deletion jedoch eine von nur 34 ± 15 %. In den Stadien 3 und 4 ist bei einer 1p-Deletion die Drei-Jahre-Überlebens-Chance nahezu 0 %, ohne Deletion immerhin noch 53 \pm 10 % (Caron et al. 1996). Wie *in-vitro*-Versuche deutlich machen, induziert der Transfer von einem intakten Chromosom 1p in NB-Zellen neuronale Differenzierung. Der Verlust der Heterozygotie (LOH, *Loss of heterozygosity*) auf Chromosom 1p geht mit dem Funktionsverlust mindestens eines Tumor-Suppressor-Gens einher (Bader et al. 1991; Fujita et al. 2008, Okawa et al. 2008; Henrich et al. 2011).



Abb. 1.5: Schema des Neurotrophin-Tyrosinkinase-Rezeptor-Signalweges im NB (Maris et al. 2007, S. 2113). Neuronales TRK A (TRK A-II) ist der bevorzugte Rezeptor für NGF und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems. NB mit günstiger Prognose exprimieren in großen Mengen TRK A, jedoch kein NGF. TRK-A-exprimierende Neuroblasten differenzieren unter NGF in reife neuronale Zellen aus, während ein Mangel an NGF die Tumorzellen in Apoptose gehen lässt. NB mit ungünstiger Prognose können dauerhaft aktive TRK-A-Isoformen exprimieren (TRK A-III), die onkogen wirken und unabhängig von NGF die Angiogenese fördern. Geläufiger ist die Expression von TRK-B-Rezeptoren und ihrer Liganden BDNF in den prognostisch ungünstigen Tumorstadien, die autokrin die Proliferation, Metastasierung und Chemoresistenz aufrecht erhalten. P = Phosphorylierung. MAPK+ = *Mitogen-associated protein kinase pathway*. PI3K = Inositol-Phosphat-3-Kinase-Signalweg.

DNA-Ploidität

Auch der Karyotyp von Tumorzellen kann von prognostischer Bedeutung sein. Charakteristisch für Tumoren mit einem pseudodiploiden Chromosomensatz sind verschiedene, mit schlechter Prognose einhergehende, strukturelle Aberrationen, wie die 1p-Deletion und MYCN-Amplifikation. Die Patienten sind meistens älter als ein Jahr und befinden sich in den Stadien 3 oder 4. Tumoren mit hyperdiploiden Chromosomensätzen (>46 Chromosomen) zeigen nur wenige strukturelle Abnormalitäten und finden sich in den

prognostisch günstigen Stadien 1 und 2 (Kaneko et al. 1987). Eine MYCN-Amplifikation zeigt sich demnach häufiger in den diploiden als in den hyperdiploiden Tumoren (Look et al. 1991). Eine Studie, die den DNA-Gehalt im Zusammenhang mit dem Therapieerfolg untersuchte, zeigte, dass hyperdiploide NB besser auf Chemotherapie ansprechen als NB mit diploiden Chromosomensätzen (Look et al. 1984).

Weitere Aberrationen

Die partielle Trisomie von 17q als häufigste chromosomale Aberration wird oft hervorgerufen durch eine unbalancierte Translokation zwischen Chromosom 17 und den Chromosomen 1 oder 11. In einer deutschen Studie wurde ein 17q-Zugewinn bei 61 % der untersuchten NB gefunden. Ein Zusammenhang mit einer ungünstigen Prognose konnte jedoch nicht hergestellt werden (Spitz et al. 2003).

In einer schwedischen Studie von Carén et al. (2010), die NB-Material von 165 Patienten analysierte, wurde deutlich, dass die 11q-Deletion neben der MYCN-Amplifikation mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert ist. Beide Aberrationen zählen zu den Hochrisikotumoren und traten bei den untersuchten NB mit Ausnahme eines Patienten nicht in Kombination auf. Das Durchschnittsalter bei Diagnose MYCN-ampflifizierter NB-Patienten lag bei 21 Monaten, bei Patienten mit 11q-Deletionen hingegen bei 42 Monaten (sogenannte *late-onset*-NB), während Patienten mit einer günstigen Prognose im Durchschnitt 6 Monate alt waren. Nach Diagnosestellung lag das durchschnittliche Überleben bei NB mit 11q-Deletionen bei 40 Monaten und bei MYCN-amplifizierten NB nur noch bei 16 Monaten. Beide Hochrisikogruppen zeigten eine 8-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 35 %.

1.2.6 Risikostratifizierung

Um den Zusammenhang zwischen den molekularbiologischen Vielfältigkeiten des NB und den klinischen Erscheinungsbildern besser verstehen zu können, wurde in einer klinischen Studie die DNA sowie mRNA von Kindern untersucht und aus den Ergebnissen eine Risiko-Klassifizierung vorgenommen, die das NB bezüglich der Molekularbiologie und des klinischen Verhaltens in drei Risikogruppen einteilt (Brodeur et al. 1997):

1. Gruppe mit niedrigem Risiko: NB weisen einen hyperdiploiden Karyotyp sowie eine hohe TRK-A-Expression auf. Die Patienten sind jünger als ein Jahr und befinden sich in günstigen Stadien mit guter Prognose.

- Gruppe mit mittlerem Risiko: Diese Gruppe betrifft vor allem ältere Patienten (□1 Jahr) in fortgeschrittenen Stadien. Charakteristisch sind hier die 1p-Deletion sowie eine niedrige TRK-A-Expression. Eine MYCN-Amplifikation wird nicht nachgewiesen.
- Gruppe mit hohem Risiko: MYCN-Amplifikation, 1p-Deletion sowie geringe bis keine Expression von TRK A sind bei 1- bis 5-jährigen Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium, schneller Tumorprogression und schlechter Prognose assoziiert.

In den vergangenen zwanzig Jahren gab es große Fortschritte im Verständnis der Biologie des NB, so dass nun prognostisch signifikante Aberrationen im Genom, die stark das Outcome beeinflussen, zur Risikostratifizierung und Therapieentscheidung einsetzbar sind. Da es weltweit keine einheitliche prätherapeutische Risikoklassifizierung sowie Behandlungsstrategie im Hinblick auf die Klinik und die Biologie des Tumors gab, wurde die INRG-Klassifizierung (*International NB Risk Group*) eingeführt (siehe Tab. 1.3). Sie beinhaltet die signifikanten und klinisch relevanten Faktoren Alter, Staging, Grading sowie MYCN-Status, Anwesenheit/Abwesenheit von 11q-Aberrationen und Ploidiegrad des Tumors (Cohn et al. 2009).

Stadium L1	Lokalisierter und differenzierter Tumor. Sehr niedriges Risiko, wenn keine Risikofaktoren vorhanden sind (keine Auffälligkeiten in MYCN, der Ploidität etc.). Hohes Risiko bei MYCN-Amplifikation.
Stadium L2	Lokalisierter differenzierter bis undifferenzierter Tumor. Mindestens ein Ri- sikofaktor ist vorhanden: mittleres Risiko bei 11q-Aberration. Hohes Risiko bei MYCN-Amplifikation (Kindern < 18 Monate) bzw. bei nicht amplifizier- tem MYCN (Kindern > 18 Monate).
Stadium M	Metastasierung wie im Stadium 4 im INSS. Niedriges bzw. mittleres Risiko bei Hyperdiploidie bzw. Diploidie und fehlender MYCN-Amplifikation.
Stadium Ms	Metastasierungsmuster wie im Stadium 4s im INSS. Nur Kindern < 18 Mo- nate. Eine MYCN-Amplifikation oder 11q-Aberration geht mit hohem Risi- ko einher.

Tab. 1.3: Ausschnitte aus der INRG Klassifikation zur prätherapeutischen Stadien- und Risikoeinteilung (modifiziert nach Cohn et al. 2009, S. 295).

Die Einteilung in Risikogruppen erlaubt eine gezielte intensive Therapie, deren Spektrum von alleiniger bildgebender Beobachtung (wegen möglicher Spontanregression in lokalisierten Stadien bzw. Stadium 4s) bis zu einer aggressiven multimodalen Maximaltherapie bei Hochrisikopatienten reicht.

1.2.7 Therapie

Chemo-, Strahlentherapie, operative Maßnahmen und KM-Transplantationen werden abhängig vom Tumorstadium durchgeführt. Eine mehr auf der Tumorbiologie basierende Therapie wird vermutlich möglich sein, sind erst einmal die für die Pathogenese des NB bedeutenden Gene, Proteine sowie Signalwege identifiziert und charakterisiert (Brodeur 2003). Die Induktion der Zelldifferenzierung ist ein solcher Therapieansatz. In kultivierten NB-Zelllinien induziert Retinsäure Differenzierung, verlangsamt das Zellwachstum und reduziert die MYCN-Expression (Thiele et al. 1985; Wada et al. 1992). Wie eine klinische Studie zeigt, führt neben der myeloablativen Therapie und der autologen KM-Transplantation die Behandlung mit Retinsäure zu einer signifikant besseren Überlebenschance (Matthay et al. 1999). Die Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (Überarbeitung von: 08/2011) empfiehlt daher bei NB-Hochrisikopatienten eine Behandlung mit Retinsäure im Anschluss an die Maximaltherapie.

Signalwege, die über eine TRK-B- und BDNF-Expression in hochmalignen NB Wachstum, Differenzierung und Apoptose negativ beeinflussen, könnten über TRK-spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren blockiert werden (Evans et al. 1999). Der TRK-selektive Tyrosinkinase-Inhibitor Lestaurtinib befindet sich in der klinischen Phase-1-Studie, die an therapierefraktären NB-Patienten durchgeführt und gut vertragen wird (Brodeur et al. 2009; Minturn et al. 2011). Eine Dysregulation im HGF/c-MET-Signalweg wird mit einer Heraufregulierung von TRK B und erhöhter Tumorinvasivität sowie gesteigerter Proteaseaktivität und Degradation der extrazellulären Matrix in Zusammenhang gebracht (Hecht et al. 2004, 2005; Schweigerer et al. 2005). HGF/c-MET-Inhibitoren könnten deshalb von therapeutischer Bedeutung sein. So konnten Crosswell et al. (2009) in NB-Zelllinien den HGF/c-MET-Signalweg hemmen sowie eine Abnahme der Migration und Proliferation *in vitro* zeigen.

Einen weiteren Therapieansatz stellt die Inhibition der Tumorangiogenese im malignen reich vaskularisierten NB dar. *In-vitro-* und *in-vivo-*Versuche mit Anti-VEGF-A zeigen hier eine Abnahme der Tumorvaskularisierung (Roy Choudhury et al. 2012). Sorafenib, ein Multi-

Kinase-Inhibitor, wirkt ebenfalls hemmend auf die Tumorangiogenese und damit auf das Tumorwachstum (Kakodkar et al. 2011). Immunotherapien befinden sich in klinischer Erprobung (Seeger 2011).

In fortgeschrittenen Tumorstadien gibt es, vor allem bei älteren Kindern, trotz aggressiver multimodaler Therapien immer noch schlechte Überlebenschancen. Die Identifikation von Mechanismen, die für das heterogene biologische Verhalten von NB verantwortlich sind, ist eine wichtige Vorraussetzung, um die Tumorprogression zu verstehen und maligne Tumoren gezielt zu bekämpfen.

Bei der Embryonalentwicklung haben die Neurone des PNS aus der Neuralleiste besonders weite Wege zurückzulegen, um ihr entgültiges Ziel, u.a. die sympathischen Ganglien, zu erreichen. Die Zellwanderung wird, wie bei der Axogenese, von neuronalen Leitmolekülen (*Neuronal guidance proteins*) reguliert. Beispiele für solche Leitmoleküle sind die Ephrine, Eph-Rezeptoren, Netrine und Semaphorine. Diese Moleküle könnten auch Einfluss auf das Metastasieren nehmen. Ein gut untersuchtes Molekül im ZNS hinsichtlich neuronaler Navigation ist Reelin, welches auch vom Lymphendothel sezerniert wird (Lutter et al. 2012). Das lymphogene Metastasieren ist kennzeichnend für das NB in malignen Stadien, doch seine Abläufe sind noch völlig unverstanden. Kann Reelin im PNS als ein *Neuronal guidance protein* mit den NB-Zellen interagieren und die Metastasierung entlang des Lymphgefäßsystems beeinflussen? Die Bedeutung von Reelin im Zusammenhang mit dem NB soll in der vorliegenden Arbeit im Mittelpunkt stehen.

1.3 Reelin

1.3.1 Struktur

Das Reelin-Gen ist bei Menschen auf Chromosom 7, und bei Mäusen auf Chromosom 5, lokalisiert. Es kodiert in beiden Fällen eine ~12-kb-mRNA. Reelin gehört bei den Vertebraten zu einer evolutionär hoch konservierten Gruppe von Genen. Die Proteinsequenz umfasst 3461 Aminosäuren (AS) und ist bei beiden Spezies zu fast 95 % identisch (DeSilva et al. 1997). Reelin als ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix besitzt N-terminal ein Signalpeptid für die Sekretion. Nach dessen Proteolyse beträgt das Molekulargewicht ~385 kDa (D'Arcangelo et al. 1997). Eine 200-AS-Sequenz mit Homologien zum F-Spondin, einem Protein, welches stark in der Bodenplatte des Rückenmarks exprimiert ist, schließ sich dem Signalpeptid an (Klar et al. 1992). Es folgt eine 400-AS-Sequenz für die Bildung von Reelin-Homopolymeren sowie acht repetitive Domänen von jeweils 350–390 AS. Jede der repetitiven Domänen besteht aus einer A- und B-Subdomäne, die durch ein EGF-ähnliches Motif von 30 AS voneinander getrennt sind (D'Arcangelo et al. 1995). Reelin wird posttranslational hinter der zweiten und sechsten Domäne in drei Fragmente gespalten (Lambert de Rouvroit et al. 1999). Das zentrale Fragment enthält demnach die dritte bis sechste Domäne und ist notwendig für die Bindung an die Reelin-Rezeptoren. Die kurze C-terminale Region (CTR), 32 AS umfassend, führt möglicherweise zu einer verstärkten Interaktion zwischen Reelin und seinen Rezeptoren und ermöglicht so eine effiziente Aktivierung des Signalweges (Nakano et al. 2007). Abb. 1.6 gibt einen Überblick über die Proteinstruktur.



Abb. 1.6: Reelin-Proteinstruktur. Die Reelin AS-Sequenz beginnt mit einem N-terminalen Signalpeptid, auf die eine F-Spondin-ähnliche Region (SP) folgt. Die acht Repeats bestehen aus A- sowie B-Subdomänen und sind jeweils durch ein EGF-ähnliches Motif voneinander getrennt. Die letzte Region im Protein bildet die kurze C-terminale Region (CTR) (Abb. nach Daten aus Quattrocchi et al. 2002).

1.3.2 Funktion

Reelin ist essentiell für die Laminierung des Gehirns, indem es die Anordnung der Neurone in Neocortex, Hippocampus und Cerebellum reguliert (Frotscher 1998). Zum besseren Verständnis der Rolle von Reelin folgt zunächst ein kurzer Einblick in die Entwicklung der Großhirnrinde, die histologisch in sechs Schichten eingeteilt wird. Die laminäre Entwicklung beginnt mit der Bildung einer neuroepithelialen Vorplatte (*preplate*), einer plexiformen Schicht aus den ersten kortikalen Neuronen. Die in der ventrikulären Zone entstehenden Projektionsneurone formen die zelldichte, radiär organisierte Kortikalplatte. Sie dringen in die Vorplatte ein und spalten diese in zwei Teile. Einige Zellen der Vorplatte bilden die äußere subpiale Marginalzone, während andere Zellen sich unter der Kortikalplatte absetzten und die innere subkortikale Platte hervorbringen. Die Marginalzone, das spätere *Stratum moleculare*

(Schicht 1), besteht u. a. aus den Reelin-produzierenden Cajal-Retzius-Zellen, die zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt apoptotisch untergehen werden. Während die Kortikalplatte durch Zellproliferation stetig wächst, findet eine inverse Entwicklung der Kortexschichten statt: Neu entstandene Neurone durchwandern schon bestehende Schichten aus älteren Neuronen. Durch diesen *inside-to-outside* Gradienten entsteht die typisch kortikale Schichtanordnung mit den ältesten Neuronen in der am weitesten nach innen verlagerten Schicht 6, die sich ursprünglich unter der Marginalzone befand und von den Neuronen der anderen Schichten durchwandert wurde (González et al. 1997; Tissir et al. 2002).

Die Reeler-Maus trägt eine Mutation in beiden Allelen des Reelin-Gens und zeigt neurologische Auffälligkeiten wie Tremor und Ataxie. Sie dient als Modell für die Regulation neuronaler Migration während der Kortexentwicklung. In Folge einer gestörten Reelin-Funktion kommt es zu Anomalien in der Laminierung von Cortex und Cerebellum. Vergleicht man das embryonale Telencephalon einer normalen Maus mit dem einer Reeler-Maus, so ist der Unterschied in der Kortikalplatte am größten. Bei der Reeler-Maus differenzieren sich zwar die Projektionsneurone der Kortikalplatte normal, sie sind jedoch durcheinander und regellos unter der superfizialen Vorplatte angeordnet, anstatt in sie einzuwandern und zu spalten. Die eigentliche Marginalzone und subkortikale Platte befinden sich somit gemeinsam subpial. Die Reifung der kortikalen Schichten läuft hier von außen nach innen ab, anstatt von innen nach außen. Neu entstandene Zellen wandern nicht durch schon gebildete Schichten, sondern siedeln sich progressiv immer weiter distal der Pia mater an (González et al. 1997; Tissir et al. 2002). Die histologische Struktur wird durch die Besiedlung der eigentlich zellarmen Marginalzone mit zahlreichen Neuronen aufgehoben.

Reelin wirkt zum einen promigratorisch, indem es das Eindringen der Neurone in die Vorplatte ermöglicht und die frühen kortikalen Neurone in Richtung Marginalzone lenkt. Zum anderen stoppt Reelin die Migration von Neuronen in die Marginalzone und sorgt für ein zellarmes *Stratum moleculare* mit darunter gelegenem dichtgepacktem *Stratum granulosum* (Frotscher 1998; Zhao und Frotscher 2010). Auch im Hippocampus scheint Reelin der entscheidende Faktor für eine korrekte Schichtausbildung während der Entwicklung zu sein (Förster et al. 2002; Noctor et al. 2002; Frotscher et al. 2003; Weiss et al. 2003). Abb. 1.7 gibt schematisch die bisher bekannte Funktion von Reelin im *Gyrus dentatus* des Hippokampus wieder.



Abb.1.7: Schema der dualen Funktion von Reelin im Gyrus dentatus. (A) Reelin (blau) wird in der Marginalzone (m) von den Cajal-Retzius-Zellen (dunkelblau) synthetisiert und dient als Positionierungssignal für die Radiärglia (grün, Pfeile). Die Somata der Gliazellen sind in der Proliferationszone des zukünftigen Hilus (h) lokalisiert. (B) Gliafortsätze haben die piale Oberfläche erreicht und bilden ein Gerüst für die Migration von Neuronen (rot). (C) Reelin scheint für die Ablösung der Granulosazellen von den Radiärfasern sowie für deren Migrationstopp und Akkumulation direkt unterhalb der Marginalzone wichtig zu sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass Zellen der Radiärglia durch Einziehen ihrer langen Fortsätze wandern und unterhalb der Marginalzone akkumulieren, wenn die Soma-Translokation durch Reelin gestoppt wird. Hier erfolgt dann die Ausdifferenzierung der Radiärglia zu Neuronen (nach Zhao et al. 2004, S. 5124).

Im adulten Gehirn wird Reelin in den dendritischen Stacheln (*spines*) von GABAergen Neuronen des cerebralen Cortex sowie in glutamatergen Neuronen des Cerebellums und *Bulbus olfactorius* exprimiert. Im cerebralen Cortex spielt es möglicherweise eine Rolle in der synaptischen Plastizität, indem es modulierend auf Adhäsionskräfte zwischen prä- und postsynaptischen Elementen einwirkt und so die Effizienz der synaptischen Transmission lokal beeinflusst (Quattrocchi et al. 2002).

Neurologische Erkrankungen, wie Schizophrenie, Lissencephalie, Epilepsie und Autismus werden mit einem Mangel an Reelin in Zusammenhang gebracht. Die Herunterregulierung der Reelin-Expression im Gehirn von Schizophreniepatienten wird mit einer Abnahme der Expression in dendritischen Stacheln assoziiert (Costa et al. 2001).

Während der Entwicklung des Rückenmarks reguliert Reelin die Migration der sympathischen präganglionären Neurone von der primitiven motorischen Kernsäule im ventrolateralen Rückenmark in die intermediolaterale Region. Wie im Cortex meiden auch hier die Neurone reelinhaltige Gebiete. Reelin agiert vermutlich als Stoppsignal für wandernde präganglionäre Neurone und hält sie so vom Zentralkanal des Rückenmarks fern (Yip et al. 2000).

Im adulten peripheren Gewebe wird Reelin in den Testes, den Ovarien, den Nieren (Ikeda und Terashima 1997), den Odontoblasten (Maurin et al. 2004), der Pankreas (Sato et al. 2006), aber auch im Serum, in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, in der Hypophyse (Pars intermedia) sowie in den Ito-Zellen der Leber exprimiert (Smalheiser et al. 2000). Welche Rolle es in den peripheren Geweben spielt, ist unklar. Des Weiteren wird Reelin sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten Lymphendothel exprimiert und scheint eine Rolle in der Lymphangiogenese zu spielen (Samama und Boehm 2005). Die autosomal-rezessive Form der Lissencephalie wie auch kongenitale Lymphödeme sind mit Mutationen im humanen Reelin-Gen assoziiert (Hong et al. 2000).

1.3.3 Reelin-Signalweg

ApoE-Rezeptor 2 (Apolipoprotein-E-Rezeptor 2, ApoER2) und VLDL-Rezeptor (very low density lipoproteinreceptor, VLDLR) - zwei Rezeptoren der Lipoprotein-Rezeptor-Familie gehören zu den Komponenten des kanonischen Reelin-Signalweges. Die Bindung von Reelin-Multimeren an VLDLR und ApoER2 bewirkt eine räumliche Akkumulation der Rezeptoren. Das Clustering der Rezeptoren führt zur Oligomerisierung des Adaptorproteins Dab1, welches mit den zytoplasmatischen Domänen beider Rezeptoren assoziiert (Kubo et al. 2002; Strasser et al. 2004). Reelin induziert die essentielle Tyrosinphosphorylierung von Dab1, indem es Tyrosinkinasen der Src-Familie (SFKs, Familie von proto-onkogenen Tyrosinkinasen) aktiviert. Dab1 enthält fünf Tyrosinreste (Y185, Y198, Y200, Y220 und Y232), die von SFKs phosphoryliert werden können (Howell et al. 2000). Phosphoryliertes Dab1 kann wiederum SFKs rekrutieren. Dieser Verstärkermechanismus bewirkt eine schnelle lokale Amplifikation Reelin-induzierter Tyrosinkinaseaktivität sowie eine effiziente Dab1-Phosphorylierung (Bock und Herz 2003). Der Reelin-Signalweg hat über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und über die Inaktivierung der Tau-Kinase Gsk3ß Einfluss auf das Mikrotubulus-System (Penuel und Martin 1999). Abb. 1.8 gibt vereinfacht das Schema der Reelin-Signalkaskade wieder.



Abb. 1.8: Reelin-Signalweg.

Nach den Untersuchungen von Hiesberger et al. (1999) beeinflusst Reelin die Organisation des Zytoskeletts, dessen Funktionieren für das Wanderungsverhalten von Zellen essentiell ist, indem es über die Inhibition von Gsk3ß die Phosphorylierung des mikrotubulusstabilisierenden Proteins Tau hemmt. Ein dephosphorylierter Tau-Status fördert die Zusammenlagerung von Tubulin-Dimeren zu Mikrotubuli und stabilisiert diese. Eine also ein Gleichgewicht zwischen dynamische Instabilität, Polymerisation und Depolymerisation von Tubulin, ist Vorraussetzung für mechanische Stabilität und aktive Bewegung der Zelle. Ist Tau hyperphosphoryliert, wie es in Reelin-defizienten Mäusen zu beobachten ist, dissoziiert es vom Mikrotubulus und bewirkt dessen Zerfall. Eine verstärkte intraneuronale Bildung und Ablagerung von Fibrillenbündeln aus Tau sind ursächlich für den Morbus Alzheimer, der bekanntesten Tauopathie.

Reelin beschränkt sich selbst über einen Rückkopplungsmechanismus in seiner Wirkung, da tyrosinphosphoryliertes Dab1 ubiquitiniert und durch Proteasomen degradiert wird. Die phosphorylierte Form von Dab1 scheint als Erkennungssignal für die Ubiquitinierungsmaschinerie zu dienen. Reelin-Signale gehen so mit einem Abfall des Dab1-Spiegels einher (Arnaud et al. 2003; Bock et al. 2004). Gleichzeitig korrelieren Reelin-Signale mit einem Anstieg von phosphoryliertem Dab1. Bei Mäusen, denen beide Reelin-Rezeptoren (ApoER2 und VLDLR) fehlen und die phänotypisch den Reeler-Mäusen gleichen, wird eine Akkumulation von Dab1, aufgrund fehlender Phosphorylierung und Ubiquitinierung, beobachtet. Fehlen entweder ApoER2 oder VLDLR, so ist die Auswirkung weniger schwerwiegend, als wenn beide Rezeptoren fehlen (Trommsdorff et al.1999).

1.4 Hypothese und Zielsetzung

Zellmigration stellt einen wichtigen Faktor für Tumorinvasivität und Metastasenbildung dar. Die Rolle von Reelin ist im Zusammenhang mit Tumoren nahezu unerforscht. Ausgehend von der Hypothese, dass Reelin im peripheren, wie im zentralen, Nervensystem als wirksamer Regulator der Migration fungieren und als Stoppsignal Einfluss auf die Tumorprogression und das Metastasierungsverhalten des NB ausüben könnte, sind die Ziele meiner Arbeit:

- Nachweis der Expression von Reelin und den dazugehörigen Komponenten des Signalweges ApoER2, VLDLR sowie Dab1 auf mRNA- und Protein-Ebene in NB-Zelllinien. Eine etwaige unterschiedliche Expressivität kann die Heterogenität des Tumors verdeutlichen.
- Untersuchung der Auswirkung einer Reelin-Stimulation auf den Dab1-Phosphorylierungszustand in NB-Zelllinien. Damit wäre gezeigt, dass Reelin vom NB erkannt wird und die Signalkaskade aktiviert.

Ich erhoffe mir mit dieser Arbeit, NB-Zelllinien im Hinblick auf den Reelin-Signalweg zu charakterisieren, um den Einfluss von Reelin auf das NB nachzuvollziehen. Möglicherweise kann Reelin als Marker für die Risikostratifizierung oder als Kriterium zur Therapiestrategie von Bedeutung sein.

2 Material

Es folgt eine Auflistung von Geräten und Substanzen sowie deren Herstellern, die für diese Arbeit verwendet wurden.

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage	Sartorius; Göttingen
Autoklav Systec VE-65	Systec; Wettenberg
CO ₂ -Inkubator	Sanyo; Bad Nenndorf
Dot-Blot-Apparatur	Roth; Karlsruhe
Einfrierbox "Mr. Frosty"	Nalgene; Roskilde, Dänemark
Gelelektrophorese-Kammer Mini Protean II	Bio-Rad Laboratories; München
Phasenkontrastmikroskop, invers	Nikon; Japan
pH-Meter	Knick; Helloo, Niederlande
Pipettierhilfe	Gilson; Middleton, WI-USA
Reinstwasser-Anlage	Millipore; Schwalbach
Semi-Dry Western-Blot-Apparatur	Biometra; Göttingen
Spannungsgerät P24	Biometra; Göttingen
Spektralphotometer	Eppendorf; Hamburg
Sterilbank Steril Gard III Advance	The Baker Company; Sanford, ME-USA
Thermocycler MJ Research DNA Engine	American Laboratory Trading; East Lyme,
Opticon 2	CT-USA
Thermocycler T-Personal	Biometra; Göttingen
Vortex Reax 2000	Heidolph; Kelheim
Wasserbad	GFL; Großburgwedel
Wippschüttler DRS-12	LTF Labortechnik; Wasserburg
Zell-Zähler Coulter	Beckman Coulter; Krefeld
Zentrifuge Rotina 380R	Andreas Hettich; Tuttlingen

Tab. 2.1: Geräte.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	
96-Well-Platten	Bio-Rad; München	
Blotting-Papier	Heinemann Labortechnik; Duderstadt	
Centrifugal Filter Devices Centricon	Millipore; Schwalbach	
15-ml-Röhrchen	Sarstedt; Nümbrecht	
Fertig-Minigradientengele (4–20 %)	Roth; Karlsruhe	
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One; Frickenhausen	
Membranfilter FP 30/0,2 CA-S	Whatman; Dassel	
Membranfilter Vivaspin2 100,000 MWCO	Sartorius Stedin Biotech; Göttingen	
PVDF-Membran	Roth; Karlsruhe	
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt; Nümbrecht	
Röntgenfilm Super RX	FUJI Film Europe; Düsseldorf	
Serologische Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml	Sarstedt; Nümbrecht	
Serologische Pipetten 10, 200, 1000 µl	Sarstedt; Nümbrecht	
Spritzen 5 ml BD Discardit II	Becton Dickinson; Heidelberg	
Zellkulturflaschen	Sarstedt; Newton, NC-USA	

Zellkulturschalen 60x15 und 100x20 mm	Becton Dickinson; Le Pont Declaix-Frankreich		
Zellschaber	TPP; Trasadingen-Schweiz		

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterialien.

2.3 Chemikalien

Substanz	Lotnummer	Hersteller
Acrylamid-Lösung Rotiphorese Gel 30	17731571	Roth; Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	48575673	Roth; Karlsruhe
BenchMark Prestained Protein-Ladder	688736	Invitrogen; Carlsbad, CA-USA
Beta-Mercaptoethanol	4227.2	Roth; Karlsruhe
Bovines Serum-Albumin (BSA)	9V003246	AppliChem; Darmstadt
Bromphenolblau	8579977	Merck; Darmstadt
Dimethylsulphoxid (DMSO)	472301	Sigma-Aldrich; München
Dithiothreitol (DTT)	8Q009949	AppliChem; Darmstadt
Glycin	117206	AppliChem; Darmstadt
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	090204.45	Chemie-Vertrieb Hannover
Isopropanol	190764	Sigma-Aldrich; München
Luminol	A4685-1G	Sigma-Aldrich; München
Methanol (CH ₄ O)	377364/1129	Fluka; Neu-Ulm
Methylenblau	611K548240	Merck; Darmstadt
Magermilchpulver (max. 1 % Fett)	_	Saliter; Obergünzburg/Allgäu
Natriumchlorid (NaCl)	49468601	Roth; Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	80373	Sigma-Aldrich; München
Natriumvanadat (NaVO ₃)	18040	Th. Geyer; Renningen
Para-Hydroxycoumarinsäure	089K0982	Sigma-Aldrich; München
Ponceau-Rot	834K104313	Merck; Darmstadt
Protease-Inhibitor-Cocktail	04693116001	Roche; Mannheim
Röntgenentwickler EURO MED E1000	0058	Christiansen; Planegg
Röntgenfixierer EURO MED F1000	1061	Christiansen; Planegg
Salzsäure (HCl) 1M	17.2122403.1	Th. Geyer GmbH; Renningen
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)	211107	GERBU; Gaiberg
TEMED	28563897	Roth; Karlsruhe
Tris	05675968	Roth; Karlsruhe
Triton X-100	240604	GERBU; Gaiberg
Tween 20	110707	GERBU; Gaiberg
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	24465206	Roth; Karlsruhe

Tab. 2.3: Chemikalien.

2.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (Kits)

Reaktionssystem	Hersteller
Omniscript RT Kit	Qiagen; Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden
SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix	Sigma-Aldrich; München

Tab. 2.4: Reaktionssysteme.

2.5 Oligonukleotide

Die für die Real-time PCR verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma IBA (Göttingen) hergestellt.

Primer	Basen-Sequenz
β-Actin_fwd	5' - GCATCCCCCAAAGTTCACAA - 3'
β-Actin_rev	5' - AGGACTGGGCCATTCTCCTT - 3'
Dab1_fwd	5' - GCCTGGACACATTGACTGAA - 3'
Dab1_rev	5' - TCTTGCTGAGTGCAGTGTCC - 3'
LRP8_fwd	5' - CTGATGGCTCCGATGAGTC - 3'
LRP8-rev	5' - GGTCCACAGCTCAGCTTCTC - 3'
Reelin_fwd	5' - CATGGCTACAGCAACACACC - 3'
Reelin_rev	5' - GTGGGTGCACAGTGACATCT - 3'
VLDLR_fwd	5' - GGCAGTGTAATGGTATCCGAGACT - 3'
VLDLR_rev	5' - AGGGCCCAAGCACTGATTG - 3'

Tab. 2.5: Oligonukleotide.

2.6 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Lotnummer	Hersteller
Dab1 (mouse polyclonal)	1:1000	08277	Abnova
Phospho Y220 Dab1 (rabbit polyclonal)	1:1000	834345	Abcam
Reelin E-5 (mouse monoclonal)	1:1000	60207	Santa Cruz
Reelin CR-50 (mouse monoclonal)	1:1000	D223-3	MBL
VLDLR 6A6 (mouse monoclonal)	1:1000	B1010	Santa Cruz
ApoER2 (rabbit polyclonal)	1:1000	443029	Abcam
β-Actin C4 (mouse monoclonal)	1:10 000	L2309	Santa Cruz
goat anti-mouse IgG-HRP	1:10 000	K2009	Santa Cruz
donkey anti-goat IgG-HRP	1:10 000	G0709	Santa Cruz
goat anti-rabbit IgG- HRP	1:10 000	F1909	Santa Cruz

Tab. 2.6: Antikörper.

2.7 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
CHP 100	Humane Neuroblastom-Zelllinie
GI-ME-N	Humane Neuroblastom-Zelllinie
IMR 32	Humane Neuroblastom-Zelllinie
KELLY	Humane Neuroblastom-Zelllinie
LAN 2	Humane Neuroblastom-Zelllinie
NB 69	Humane Neuroblastom-Zelllinie
NGP	Humane Neuroblastom-Zelllinie
SK-N-AS	Humane Neuroblastom-Zelllinie
SK-N-SH	Humane Neuroblastom-Zelllinie
SMS-Kan	Humane Neuroblastom-Zelllinie
HEK 293	Human embryonic kidney cells
HEK-293-Reelin (HEK-Reln)	Reelin-transfizierte HEK-Zellen

HEK-293-Vektor (HEK-vec)	GFP-transfizierte HEK-Zellen
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
LEC II	Lymphatic endothelial cell

Tab. 2.7: Eukaryotische Zelllinien.

Die humanen NB-Zelllinien stammen aus Laborbeständen (Referenzen in Becker et al. 2010, Cancer Res.). Die Reelin- und GFP-exprimierenden HEK-293-Zellen sind ein Konstrukt von D'Arcangelo et al. (1997). Sie wurden uns von Prof. Eckart Förster (Institut für Neuroanatomie, UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die aus Lymphangiomen stammende Zelllinie LEC II sowie die venösen Endothelzellen aus humanen Nabelschnüren (HUVEC) wurden in unserem Labor von Frau S. Schwoch isoliert und kultiviert.

2.8 Zellkulturmedien

Substanz	Hersteller
EBM-2-Medium	Lonza, Lot: 0000243756
EGM-2-SingleQuots	Lonza, Lot: 0000236882
DMSO	Sigma, Lot: RNBB3308
DPBS	Lonza, Lot: 0MB109
EDTA Trypsin	Lonza, Lot: 0MB083
FBS	Biochrom, Lot: 00745
Geneticin G-418	Gibco, Lot: 658541
L-Glutamin	Lonza, Lot: 1MB005
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Lot: 8MB257
PC-1-Medium	Lonza, Lot: 0000209933
RPMI-1640-Medium mit L-Glutamin	Lonza, Lot: 9MB259
VEGF-C	Reliatech

Tab. 2.8: Zellkulturmedien, Zusätze und Puffer.

Zelltyp	Kulturmedium
NB-Zelllinien	RPMI-1640-Medium
	10 Vol% FBS
	1 Vol% Penicillin/Streptomycin-Lösung
	(10.000 u/ml)
NB-Zelllinien	PC-1-Medium
	2 mM L-Glutamin
HEK-Reln, HEK-vec	RPMI-1640-Medium
	10 Vol% FBS
	1 Vol% Penicillin/Streptomycin-Lösung
	100µg/ml Geneticin G-418
HUVEC	EBM-2-Medium + EGM-2-SingleQuots
LEC II	EBM-2-Medium + EGM-2-SingleQuots
	200 ng/ml VEGF-C

Tab. 2.9: Zusammensetzung der Kulturmedien in Abhängigkeit vom Zelltyp.

FBS stellt Wachstumsfaktoren, die zur Kultivierung von Zellen notwendig sind, zur Verfügung. Das β-Lactam-Antibiotikum Penicillin sowie das Aminoglykosid-Antibiotikum Streptomycin hemmen das Wachstum sowohl von gram-positiven als auch von gramnegativen Bakterien im Medium. Die SingleQuots werden dem EBM-2-Medium hinzugefügt und enthalten FBS, Kortisol, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, Ascorbinsäure, GA-1000 und hEGF. Das Kulturmedium wurde bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.9 Puffer und Lösungen

Proteinextrak	tionspuffer_			
Tris	30 mM	frisch hinzugeben:	DTT	5 mM
NaCl	150 mM		NaF	1 mM
EDTA	1 mM		NaVO	3 1 mM
Triton X-100	1 %		Protea	se-Inhibitor-Cocktail
SDS-Probenp	uffer (6x)			
Tris/HCl (pH	6,8)	350 mM		
SDS (w/v)		10 %		
Glycerin (v/v))	36 %		
DTT (w/v)		9,3 %		
Bromphenol	blau	0,015 %		
<u>SDS-PAGE I</u>	<u>.ösung</u>			

Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
Acrylamid (AA)-Lösung	Rotiphorese Gel 30 (30 % AA, 0,8 % Bis-AA)
SDS-Lösung	20 % SDS in destilliertem Wasser
APS-Lösung	10 % APS in destilliertem Wasser
TEMED	99 % TEMED

Laufpuffer	<u>r (5x)</u>	
Tris	0,125 M	
Glycin	1,25 M	
SDS	0,5 %	(in H ₂ O _{dest} , pH 8,3)

Material

	Trenngel 1	Trenngel 2	Sammelgel
Acrylamidkonzentration	10 %	8 %	4 %
H ₂ O _{dest}	4,1 ml	4,8 ml	3,0 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	
Sammelgelpuffer			1,25 ml
SDS-Lösung	50 µl	50 µl	25 μl
Acrylamid-Lösung	3,3 ml	2,6 ml	650 μl
APS-Lösung	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Zusammensetzung der SDS-Gele

Tab. 2.10: Zusammensetzung der SDS-Gele für die Gelelektrophorese.

Transfer-Puffer

Tris	48 mM	
Glycin	39 mM	
Methanol	20 %	
SDS	1 %	(in H ₂ O _{dest})

Zusammensetzung der Chemilumineszenz-Lösung

Lösung A	50 mg Luminol in 200 ml 0,1M TRIS-HCl (pH 8,6)
Lösung B	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO

 $H_2O_2 (30\%)$

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Das Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgte an einer sterilen Werkbank.

3.1.1 Langzeitlagerung der NB-Zelllinien

Die Stammkulturen sind in Flüssigstickstoff bei -196°C langfristig aufbewahrt. Dazu wurden die frisch trypsinierten Zellen zentrifugiert und in Einfriermedium (FBS, 10 Vol.-% DMSO) überführt. DMSO als Gefrierschutzmittel im Einfriermedium verhindert zellschädigende Kristallbildung. Die Zellsuspension wurde in verschließbare Kryoröhrchen aliquotiert und schrittweise in einer Isopropanol-haltigen Einfrierbox mit einer Abkühlrate von 1°C pro Minute auf -80°C eingefroren. Anschließend erfolgte die Überführung in den Flüssigstickstoff zur Langzeitkonservierung bei -196°C.

3.1.2 Rekultivierung

Die in Flüssigstickstoff gelagerten Stammkulturen wurden zur Rekultivierung im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, mit RPMI-Medium versehen und zentrifugiert (5 min, 2000 rcf). Das Zellpellet wurde mit frischem Kulturmedium in Kulturflaschen ausplattiert.

3.1.3 Kultivierung der NB-Zelllinien, HEK-293-Zellen, LECs und HUVECs

NB-Zellen wurden im Kulturmedium (RPMI-1640-Medium mit L-Glutamin, 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin) bei 37°C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen angezogen. Da ich erhebliche Mengen an Reelin im FBS nachweisen konnte, habe ich ausgewählte NB-Zelllinien für Stimulierungsversuche in serumfreiem PC-1-Medium kultiviert (siehe 2.9). Reelin überexprimierende HEK-293-Zellen sowie mit GFP-Kontrollplasmiden transfizierte HEK-293-Zellen wurden zusätzlich zum RPMI-Medium mit dem Antibiotikum Geneticin (G-418) zur Aufrechtherhaltung des Selektionsdruckes kultiviert. Die in unserem Labor isolierten LEC II und HUVEC wurden im EBM-2-Medium mit EGM-2-SingleQuots angereichert und kultiviert. Der Zelllinie LEC II wurde zusätzlich VEGF-C als Lymphangiogenesefaktor hinzugefügt.

In Kultur befindliche Zellen wurden für eine gleichmäßige Zellproliferation regelmäßig auf neue Platten umgesetzt und dabei verdünnt. Die Kulturüberstände wurden hierfür abgesaugt, die Zellen mit dem Puffer DPBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert.

Methoden

Trypsin, eine Endopeptidase aus der Pankreas, löst durch Andauung der Zell-Matrix-Verbindungen die adhärenten Zellen von der Kulturoberfläche. EDTA löst als Ca²⁺-Chelator die Zell-Zell-Verbindungen. Zur Abschätzung der Einwirkzeit wurde der Trypsinierungsprozess unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Sobald sich die Zellen von der Petrischale abgelöst haben, erfolgte die Inaktivierung der Trypsinwirkung durch Zugabe von serumhaltigem Medium bzw. für die in serumfreiem PC-1-Medium kultivierten Zellen durch DPBS und 0,5 % BSA. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 2000 rcf für 5 min zentrifugiert und der Trypsin-EDTA-Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und, der Zelllinie entsprechend, für die weitere Kultur gesplittet. Regelmäßig erfolgte zwischen den Teilungsvorgängen zur Sicherung des Bedarfs an essentiellen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren ein Kulturmediumwechsel. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zelllinie unter dem Phasenkontrastmikroskop nach ihrer Vitalität und Morphologie beurteilt.

3.1.4 Herstellen und Aufkonzentrieren von Überständen

Zellüberstände von Reelin- und GFP-transfizierten HEK-293-Zellen sowie von ausgewählten NB-Zelllinien, LECs und HUVECs wurden für den Nachweis einer Reelin-Sekretion gewonnen. Reelinhaltige Zellüberstände aus HEK-293-Zellen dienten mir zur Stimulation von NB-Zelllinien mit Reelin. Für die Gewinnung der Überstände befanden sich $1,5\cdot10^6$ Zellen pro Zellkulturflasche in Kultur und wurden für 48h auf serum- und antibiotikafreies RPMI-1640-Medium umgestellt. Danach wurden die Überstände für 10 min bei 2000 rcf zentrifugiert, sterilfiltriert und tiefgefroren. Die 60fache Aufkonzentrierung der Zellüberstände von 3 ml auf 50 µl erfolgte durch Zentrifugation (2000 rcf, 4°C, bis zu 12h) mit einer 100-kDa-MWCO-Säule.

3.1.5 Stimulierung der NB-Zellen mit Reelin

Ich habe die Tumorzellen mit reelinhaltigen Überständen von HEK-293-Zellen stimuliert, um anhand einer Dab1-Phosphorylierung eine Aktivierung des Reelin-Signalweges nachzuweisen. Als Kontrolle dienten mir Überstände von HEK-293-Zellen, die mit einem GFP-Konstrukt transfiziert waren. Die NB-Zellen wurden ein bis zwei Tage vor jedem Stimulierungsversuch zu $1,5\cdot10^6$ Zellen in 6-Well-Platten ausplattiert. Die Bestimmung der Zellanzahl erfolgte mit einem elektronischen Zellzähler.
Durchführung:

- Nährmedium in den Kulturschalen absaugen, Zellen mit PBS waschen und erneut absaugen
- pro Petrischale 1 ml vom reelinhaligen HEK-Zellüberstand bzw. HEK-Zellüberstand der Kontrolle zugeben
- Inkubationszeit: 0 min, 5 min, 10 min und 30 min
- Überstände absaugen
- 250 µl Proteinextraktionspuffer (siehe Kapitel 2.10) pro Petrischale hinzufügen
- Zellen mit einem Zellschaber lösen und die Suspension in einem Eppendorf-Cup sofort auf Eis überführen
- Zelllysate mit sechsfachem SDS-Probeauftragpuffer (siehe Kapitel 2.10) versehen und bei -20°C einfrieren.

Der Proteinextraktionspuffer enthält neben Protease- und Phosphataseinhibitoren (Protease-Inhibitor-Cocktail und NaVO₃, NaF) folgende Chemikalien: Triton X-100, EDTA sowie DTT. Das Detergenz Triton X-100 zerstört die Zellmembran durch Herauslösen der Membranproteine und ermöglicht so den Zugang zu den Zytoplasma- und Kernproteinen. Der Chelatbildner EDTA unterdrückt die Proteolyse, indem er die katalytische Aktivität von Metalloproteasen und anderen Enzymen, die zweiwertige Metallionen als Co-Faktor verwenden, inhibiert. DTT (<u>Dithiothreitol</u>), reduzierende Thiole, spalten durch Reduktionsreaktionen Disulfidbrücken von Polypeptiden ab, sodass die Proteine ihre Tertiärstruktur verlieren und monomerisiert sowie inaktiv vorliegen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von RNA

Die Gewinnung eukaryontischer RNA aus NB-Zelllinien erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kit-Systems nach Anleitung des Herstellers. Die Zellen wurden zweifach mit PBS gewaschen und direkt in den Zellkulturplatten lysiert. Hierbei ermöglichte der spezielle RLT-Puffer aus Guanidiniumthiocyanat und β-Mercaptoethanol die Zelllyse sowie die Denaturierung von Proteinen wie z.B. RNasen. Anschließend wurde das Zelllysat von der Platte geschabt, mit der QIA*shredder*-Säule homogenisiert und mit gleicher Menge Ethanol versetzt, der geeignete Bedingungen für eine selektive Bindung der Nukleinsäuren an die Filtermembran

Methoden

der RNeasy-Säule schafft. Das homogenisierte Lysat wurde auf die RNeasy-Säule geladen und zentrifugiert, so dass die Gesamt-RNA an die Silica-Membran bindet. Der Waschgang mit dem RW1-Puffer spült potenzielle Kontaminanten wie Polysaccharide und DNA heraus. Es folgte zur Vermeidung von DNA-Verunreinigungen eine 30-minütige DNAse-Behandlung. Nach mehreren Waschschritten wurde die aufgereinigte RNA mit RNase-freiem Wasser vom Filter gelöst und das Eluat bei -80 °C langfristig gelagert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers. Die optische Dichte (OD) wurde bei λ =260 nm, dem Absorptionsmaximum der aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleinsäuren, gemessen. Mit folgender Formel lässt sich die RNA-Konzentration in den Proben bestimmen, wobei einer OD₂₆₀ von 1,0 eine RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht:

Konzentration $[\mu g/ml] = OD_{260} \cdot 40 \ \mu g/ml \cdot Verdünnungsfaktor$

Um eine Aussage über die Reinheit der RNA zu treffen wurde eine zweite Messung mit einer Wellenlänge λ =280 nm durchgeführt, dem Absorptionsmaximum der aromatischen Seitenketten von Aminosäuren. Ein Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0 spricht für eine hohe RNA-Reinheit, während Werte darunter auf eine Kontamination mit Proteinen hinweisen.

3.2.2 Reverse Transkription

Mit der Reversen Transkription und der Real-time PCR konnte die Expression von bestimmten Genen in NB-Zelllinien untersucht werden. Als Ausgangsmaterial für den Nachweis spezifischer Gen-Transkripte dient einzelsträngige mRNA, die mit Hilfe einer reversen Transkriptase in einen komplementären cDNA-Strang umgeschrieben wird. Der Schritt der reversen Transkription ist notwendig, da DNA-Polymerasen nur DNA als Vorlage erkennen. Das von uns verwendete Qiagen-Omniscript-RT-Kit-System umfasste eine RNA-abhängige DNA-Polymerase als Reverse Transkriptase (RT), Pufferlösung, einen RNase-Inhibitor, Primer sowie Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) zur Generierung von cDNA-Fragmenten. Die Lösungen wurden nach den Angaben des Herstellers gemischt und pro Ansatz 2 µg aufgereinigte RNA hinzugefügt:

10x Omniscript-RT-Puffer	2	μl
dNTPs Mix (5 mM)	2	μl
Oligo-dT-Primer (100 pmol/µl)	2	μl
Omniscript RT (4 u/µl)	1	μl
RNase-Inhibitor (40 u/µl)	0,5	μl
RNA	2	μg
H ₂ 0 _{dest} ad	20	μl

Die cDNA-Synthese wurde in einem Thermocycler von Biometra durchgeführt:

Reverse Transkription	37 °C	90 min
Inaktivierung der RT	75 °C	10 min

Die hergestellte cDNA wurde 1:5 mit H₂O verdünnt (entspricht 20 ng/ μ l cDNA) und bis zur baldigen Verwendung bei 4°C aufbewahrt bzw. bei -20°C gelagert.

3.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt die Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten. Vorraussetzung ist die Kenntnis über Sequenzen im Anfangs- und Endbereich des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, damit spezifische Primer eingesetzt werden können. Für die PCR-Reaktion sind das DNA-Template, eine Taq-Polymerase, dNTPs, spezifische *forward*- (fwd) und *reverse*-(rev) Primer sowie Reaktionspuffer notwendig. Mit jedem PCR-Zyklus verdoppelt sich der durch die Primer eingegrenzte gewünschte DNA-Abschnitt. Ein PCR-Zyklus beinhaltet folgende Schritte:

- Denaturierung: Bei ~90°C lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen und es entstehen zwei DNA-Einzelstränge.
- Annealing: Beim Abkühlen der Lösung binden die spezifischen Primer an die Einzelstränge.
- 3. Extension: Bei 72°C hat die hitzestabile Taq-Polymerase ihre höchste Aktivität und synthetisiert von einem Primer ausgehend den komplementären DNA-Strang.
- 4. Wiederholung des Zyklus.

3.2.4 Real-time PCR

Die Real-time RT-PCR wurde in dieser Arbeit zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression bestimmter Gene eingesetzt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in doppelsträngige DNA interkaliert, kann die Produktzunahme nach jedem Zyklus indirekt anhand der Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Für die Quantifizierung wird zu Beginn der ex-ponentiellen Phase, in der sich die Zielsequenzen unter optimalen Reaktionsbedingungen verdoppeln, der sogenannte Ct-Wert (*Cycle threshold* – "Schwellenwert-Zyklus") ermittelt. Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmalig einen definierten Schwellenwert überschreitet. Je niedriger der Ct-Wert liegt, desto höher ist die Ausgangskonzentration an cDNA, die der Menge an RNA-Transkripten in der Probe entspricht.

Zur Durchführung der Real-Time PCR wurde der SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix verwendet. Dieses System enthielt zur Detektion doppelsträngiger DNA den DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, dessen Emissionsmaximum für grünes Licht bei einer Wellenlänge von λ =605nm liegt. Des Weiteren umfasste der Kit eine Taq Polymerase, Desoxynukleotide sowie Reaktionspuffer. Ein ebenfalls im Kit enthaltener Taq-AK verhinderte bis zur ersten Denaturierung einen unspezifischen "Frühstart" der Taq-Polymerase. Während der initialen Erhitzung auf 95°C erfolgte die Denaturierung des AK mit Dissoziation des Polymerase-AK-Komplexes sowie die Aktivierung der Polymerase. Die Lösungen wurden nach den Angaben des Herstellers gemischt, die verdünnten cDNA-Proben (1:100) und die spezifischen Primer (siehe Tab. 2.5) hinzugefügt:

SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix		12,5 µl
Reference Dye		0,2 µl
Primer Mix (10 pmol/µl)		0,1 µl
cDNA		<u>5 μl</u>
H ₂ O _{dest}	ad	25 µl

Ein gemeinsamer Master Mix Ansatz ohne DNA-Template wurde für alle Reaktionen mit gleichen Primern vorbereitet. Der Master Mix und die cDNA wurden dann getrennt voneinander in die 96-Well-Platten pipettiert und zentrifugiert, wobei jede cDNA-Probe dreifach bestimmt wurde. Zur Überprüfung auf Verunreinigung wurde bei jedem Versuch eine Negativkontrolle ohne cDNA-Template mit angesetzt.

Methoden

Sowohl Amplifikation als auch Messung der cDNA erfolgten im Thermocycler DNA Engine Opticon 2 unter folgenden Reaktionsbedingungen:

1.	Aktivierung der Taq-Polymerase	95 °C	2 min
2.	Denaturierung der cDNA	95 °C	^{15 s} ک
3.	Annealing	60 °C	1 min 40 Zyklen
4.	Extension (Messung der Floureszenzstärke)	72 °C	$1 \min \int$

Am Ende jedes PCR-Laufes wurde eine (in der Software integrierte) Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Homogenität entstandener Produkte durchgeführt. Hierbei wurde die Temperatur von 60°C auf 90°C schrittweise erhöht. Ab einer bestimmten Temperatur findet die Denaturierung der DNA-Doppelstränge statt, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme registriert wird. Unspezifische DNA-Fragmente als unerwünschte Nebenprodukte zeigen in der Schmelzkurve aufgrund unterschiedlicher Fragmentlänge verschiedene Maxima und damit unterschiedliche Schmelzpunkte, während eine spezifisch abgelaufene Reaktion nur einen Peak in der Schmelzkurve erzeugt.

Zur Durchführung einer relativen Quantifizierung wird parallel zu den untersuchenden Genen ein Referenzgen als Bezugspunkt gemessen. Etwaige Abweichungen der eingesetzten cDNA-Menge werden so ausgeglichen. Wir verwendeten als Referenzgen β -Aktin, das in allen Proben gleichermaßen exprimiert sein sollte. Die Berechnung der relativen Expression fand nach der Delta-Delta-Ct-Methode ($\Delta\Delta$ Ct) statt (Livak und Schmittgen 2001): Die mRNA-Expression des Zielgens wird in Relation zur Expression des Referenzgens β -Aktin gesetzt, indem der Ct-Wert des Referenzgens von dem Ct-Wert des zu untersuchenden Gens in selbiger Probe subtrahiert wird. Die Proben sind so, trotz ihrer potentiell unterschiedlichen Ausgangsmenge, semiquantitativ miteinander vergleichbar:

$Ct_{Zielgen}$ - $Ct_{Referenzgen} = \Delta Ct_{Probe}$

Der Δ Ct-Wert einer Vergleichsprobe wird nun von den anderen Proben abgezogen, so dass die Expression des Zielgens aus unterschiedlichen Proben in Relation zu der Vergleichsprobe gebracht werden:

$\Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{Vergleichsprobe} = \Delta \Delta Ct$

Mit der nun folgenden Potenzierung der $\Delta\Delta$ Ct-Werte wird die Genexpression der Vergleichsprobe gleich 1 gesetzt:

Relative Genexpression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte geben die relative Genexpression wieder und werden graphisch dargestellt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine in den Zelllysaten von NB-Zelllinien wurden mithilfe der SDS-PAGE in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Die Zelllysate wurden dafür mit einem 6-fach konzentrierten SDS-Probenpuffer versehen (siehe 2.10) sowie für etwa 10 min bei 95°C denaturiert, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. SDS (Sodium Dodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, weist also neben einer negativ geladenen funktionellen Gruppe einen polaren und einen unpolaren Teil auf. Die negativ geladenen SDS-Moleküle überdecken die Eigenladung der Proteine, so dass alle SDS-Protein-Komplexe mit einer konstant negativen Ladung versehen sind und die Proteine im elektrischen Feld, in gleicher Richtung laufend, nur noch nach ihrer Masse aufgetrennt werden.

Herstellung des Polyacrylamidgels:

Das Polyacrylamid-Gel wurde nach dem Lämmli-System als diskontinuirliches Gel hergestellt (Zusammensetzung des Gels siehe Kapitel 2.10). Dabei werden die Proteine unterschiedlicher Größe zunächst in einem großporigen Sammelgel auf eine Bande fokussiert und dann in einem feinporigen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

SDS-Gele enthalten APS, welches die radikalische Polymerisation der monomeren Acrylamide zu quervernetzten Polyacrylamiden initiiert, sowie TEMED als Katalysator dieser Reaktion. Die Konzentrationen von Acrylamidmonomeren bestimmen die Porengröße des Gels. Gele mit einem niedrigen Gehalt an Acrylamid weisen weite Poren auf, in denen auch große Proteine gut wandern können. Um das ~390-kDa-Protein Reelin nachzuweisen, verwendete ich fertige Gradientengele mit einem Acrylamidkonzentrationsgradienten von 4–20 %. Die Durchführung der SDS-PAGE war hierbei identisch mit der von selbstgegossenen Gelen.

Methoden

Durchführung der SDS-PAGE:

Das frisch angesetzte Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Auspolymerisierung des Trenngels wurde der Alkohol abgegossen und die Sammelgellösung über das Trenngel pipettiert. Ein Kamm im Sammelgel diente als Schablone für die Probetaschen. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, mit Laufpuffer umgeben und mit den Zelllysaten (50 µl pro Tasche) beladen. Über das Anlegen einer elektrischen Spannung von 100–200 Volt wandern die negativ geladenen Proteine entlang des elektrischen Stroms Richtung Anode (Plus-Pol). Kleine Proteine laufen dabei schneller als große durch das Polyacrylamid-Netzwerk. Alle Proteine ordnen sich nach ihrer Größe im Gel an. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes der Proteine wurde ein Größenmarker (5 µl) aus Proteinen bekannter Größen mit aufgetragen.

3.3.2 Western Blot

Beim Blotten wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine proteinbindene hydrophobe PVDF-Membran, die zuvor mit Methanol für wässrige Lösungen benetzbar gemacht werden musste, transferiert. Für den Blotvorgang verwendete ich eine Blot-Kammer mit Edelstahl-Elektroden. Auf vier in Transferpuffer getränkte Filtermembranen befand sich die ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtete PVDF-Membran. Das proteingeladene Gel und vier weitere Filtermembranen lagen über der Membran. Der Stapel befand sich zwischen der unten liegenden Anodenplatte und der oben liegenden Kathodenplatte in der Semi-Dry-Blot-Kammer (siehe Abb. 3.1). Bei einer Stromstärke von 5 mA/cm² für 60–120 min (abhängig von der Proteingröße) fand die Übertragung der von Kathode zu Anode wandernden Proteine auf die Blotmembran statt.



Methoden

Nach dem Blot-Vorgang wurde die Membran für einige Stunden in einer Blockierlösung mit 6 % BSA bzw. 5 % entfettetem Milchpulver inkubiert. Diese Behandlung blockiert noch freie Protein-Bindungstellen der PVDF-Membran und verhindert unspezifisches Binden von AK an die Membran. Die AK wurden ebenfalls in der Blockierlösung verdünnt (siehe Tab. 3.2).

Eine vereinfachte Form der Western-Blot-Analyse ist der Immunoblot (Dot-Blot), den ich für den Nachweis von Reelin im serumhaltigen RPMI-Zellkulturmedium durchführte. Die Proben wurden ohne gelelektrophoretische Auftrennung direkt auf eine in Methanol aktivierte und in Transferpuffer getränkte PVDF-Membran mit Hilfe einer Vakuum-Blotting-Apparatur gespottet. Unter Vakuum fand die Adsorbtion der Proteine an die Membran statt. Der Blockiervorgang sowie die Immundetektion erfolgten analog zum Semi-Dry Western Blot.

3.3.3 Immundetektion der Proteine

AK werden zum spezifischen Nachweis von Proteinen eingesetzt. Primär-AK binden an ihre Antigene auf der PVDF-Membran nach dem Antigen-Antikörper-Bindungs-Prinzip. Enzymgekoppelte Sekundär-AK binden wiederum an die Fc-Regionen der primären AK. Unspezifisch gebundene AK werden in mehreren Waschschritten entfernt. Die Detektion gebundener AK und damit der Nachweis gesuchter Proteine erfolgten in meiner Arbeit mittels einer Chemilumineszenzreaktion, bei der die Sekundär-AK an gekoppelte Merrettichperoxidase die Oxidation von Luminol katalysiert. Die Lichtemission wurde durch Exposition gegen einen Röntgenfilm detektiert. Blockierlösungen und Waschprotokolle wurden an die benutzten AK angepasst, wie in Tab. 3.1 beschrieben:

Antikörper	Waschvorgang
Reelin in 5 % MP/TBST 0,02 %	2.15 min in TBS 0,02 %
VLDLR, ApoER2 in 6 % BSA/TBST 0,02 %	2.15 min in TBS 0,02 %
Dab1, pDab1 in 5 % MP/TBST 0,02 %	2·10 min in TBS 0,005 %
β-Aktin in 5 % MP bzw. 6 % BSA/TBST 0.02 %	2.15 min in TBS 0.02 %

Tab. 3.1: Überblick über die AK und Waschvorgänge. Die Sekundär-AK wurden im selben Schema wie die dazugehörigen Primär-AK gewaschen. MP = Milchpulver. TBST 0,02% = TBS + Tween 0,02%. TBST 0,005% = TBS + Tween 0,005%. Die unterschiedlichen Verdünnungen der Primär- und Sekundär-AK sind in Tab. 2.6 aufgelistet. Konstitutiv exprimiertes β-Aktin wurde zum Nachweis gleichmäßiger Proteinbeladung detektiert. Vorgehensweise:

- Inkubation der Membran mit Primär-AK in Blockierlösung über Nacht bei 4°C auf einem Rüttler
- Waschvorgang: wie in Tab. 3.2 angegeben
- Inkubation der Membran mit Sekundär-AK in Blockierlösung 1h bei Raumtemperatur auf dem Rüttler
- Waschvorgang wie zuvor
- Chemilumineszenzreaktion: 1 ml der Lösung A mit 100 µl der Lösung B und 1 µl H₂O₂ (30%) mischen (siehe 2.10) und die Membran für einige Sekunden darin inkubieren. Überschüssige Flüssigkeit von der Membran entfernen und die Membran in eine Autoradiographiekassette legen. In der Dunkelkammer Röntgenfilm auflegen und je nach Signalintensität exponieren. Film entwickeln, in destilliertem Wasser ausspülen und fixieren. Film gründlich auswässern und trocknen.

Die Blots konnten für den Nachweis weiterer Proteine mit anderen AK-Lösungen wieder verwendet werden. Dafür wurden die AK von den Blots entfernt, indem die Membranen für 10 min in 0,1M NaOH inkubiert sowie für 2x15 min in TBS/Tween 0,02 % gewaschen wurden.

4 Ergebnisse



4.1 mRNA-Expression von Reelin, ApoER2, VLDLR und Dab1

Abb. 4.1: Relative mRNA-Expression von Reelin, ApoER2, VLDLR und Dab1 als Vielfaches der Expression von CHLA 20 in humanen NB-Zelllinien. Graphische Auswertung der Realtime RT-PCR Analyse: Als Referenzgen diente β -Aktin. Der Δ Ct-Wert der Zelllinie CHLA 20 als zufällig ausgewählte Bezugsgröße wurde gleich 1 gesetzt. Die angegebene relative Expression entspricht 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}.

Um die Expression der Moleküle Reelin, ApoER2, VLDLR und Dab1 beim humanen NB zu untersuchen, wurde aus 24 NB-Zelllinien RNA isoliert, revers transkribiert und die mRNA-Menge mittels semiquantitativer Real-time PCR bestimmt (siehe Abb. 4.1). Beta-Aktin wurde als Referenzgen verwendet und der Δ Ct-Wert der zufällig ausgewählten Zelllinie CHLA 20 gleich 1 gesetzt ($\Delta\Delta$ Ct=1). Die relative Expression der untersuchten Moleküle wurde mit dem Wert 2- $\Delta\Delta$ Ct-Wert angegeben. Die untersuchten NB-Zelllinien zeigen unterschiedlich starke Expressionen von Reelin, des Rezeptors VLDLR und des Adapterproteins Dab1, während der Rezeptor ApoER2 quantitativ annähernd gleichmäßig exprimiert wird. Ein sehr heterogenes Expressionsmuster hinsichtlich der Moleküle des Reelin-Signalweges ist somit in den Zelllinien zu beobachten.

4.2 Proteinexpression von Reelin, ApoER2, VLDLR und Dab1

Um zu überprüfen, ob die mRNA-Expression Rückschlüsse auf die tatsächliche Proteinmenge der einzelnen Moleküle zulässt, habe ich Zelllysate von ausgewählten NB-Zelllinien hergestellt und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Bei der Auswahl der Zelllinien habe ich mich an der relativen Expression von Dab1-RNA orientiert und Zellen mit einer hohen, geringen bzw. keiner messbaren relativen Expression herausgesucht. Da Reelin in den untersuchten Lysaten nicht unmittelbar nachweisbar war, habe ich für dessen Nachweis 60fach aufkonzentrierte Kulturüberstände verwendet.

4.2.1 Reelin-Proteinexpression in humanen NB-Zelllinien

Ich habe serumfreie Zellkultur-Überstände von ausgewählten NB-Zelllinien aufkonzentriert, sie mit Hilfe einer kontinuierlichen gradienten SDS-PAGE aufgetrennt und Reelin mittels Western-Blot-Analysen auf einer PVDF-Membran nachgewiesen. Bei etwa 250 kDa ist für die Zelllinie SK-N-AS eine deutliche Immunoreaktion gegen Reelin detektierbar. Die Zelllinien NGP, SH-SY5Y sowie SMS-Kan zeigen nur ein sehr schwaches Signal bei dieser Größe, hingegen sind sowohl für Kelly- wie auch für Lan-2-Zellen keine Immunoreaktionen detektierbar. Jedoch sind in Lan 2 und NGP markante Banden auf Höhe von 82 kDa auffällig (Abb. 4.2).

Um die Identität der gefundenen Bande bei 250 kDa in SK-N-AS (Ab. 4.2) zu verifizieren, habe ich Reelin auch in Lymphendothelzellen (LEC) nachgewiesen. Podgrabinska et al. (2002) sowie Norgall et al. (2007) konnten im Lymphendothel bereits eine gegenüber Blutendothel erhöhte mRNA-Expression von Reelin nachweisen. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, habe ich Kulturüberstände der Zelllinie SK-N-AS zusammen mit Überständen

Ergebnisse

von Blut- und Lymphendothel gleicher Zellzahl mittels Western-Blot-Analysen untersucht. Die Blutendothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) dienten dabei als Negativ-Kontrolle (Abb. 4.3). Meine Ergebnisse zeigen eine gleichstarke Reelin-Expression auf Höhe von 250 kDa in SK-N-AS und LEC. HUVECs zeigen keinerlei Immunoreaktivität gegen Reelin.



Abb. 4.2: Western-Blot-Analyse der Reelin-Expression in ausgewählten NB-Zelllinien. Aufkonzentrierte Zellkulturüberstände wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Expressionen von Reelin mit einem AK nachgewiesen. Die in die Geltaschen pipettierten Überstände entsprechen jeweils der Reelin-Expression von $1,5\cdot10^6$ Zellen. Der Größenmarker ist mit Mangegeben.



Abb. 4.3: Western-Blot-Analyse der Reelin-Expression in SK-N-AS, LEC und HUVEC. In aufkonzentrierten Zellkulturüberständen von jeweils $1,5\cdot10^6$ Zellen wurde die Reelin-Expression immunoreaktiv nachgewiesen. LEC wurde als Positiv-Kontrolle und HUVEC als Negativ-Kontrolle für die Reelin-Expression in SK-N-AS verwendet.

4.2.2 ApoER2-Proteinexpression in humanen NB-Zelllinien

ApoER2 gehört zur Lipoprotein-Rezeptor-Familie und bindet seinen Liganden Reelin. Das erwartete Molekulargewicht des Rezeptors liegt bei etwa 100 kDa. Starke Immunoreaktivität bei 64 kDa zeigt sich für die Zelllinien CHP 100, Lan 2 und Gimen, während Kelly, NGP und SH-SY5Y auf dieser Höhe nur schwache Signale aufweisen. Für SMS-Kann und SK-N-AS kann keine eindeutige Immunoreaktivität gegen ApoER2 nachgewiesen werden. Interessanterweise detektierte der verwendete AK in allen Zelllysaten eine deutliche Proteinbande im Bereich um 37 kDa bei relativ konsistentem mRNA-Level (Abb. 4.4).



Abb. 4.4: Western-Blot-Analyse der ApoER2-Expression in ausgewählten NB-Zelllinien. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expressionen von ApoER2 mit einem polyklonalen ApoER2-AK nachgewiesen. Die aufgetragenen Zelllysate entsprechen jeweils $1,5\cdot10^6$ Zellen. Der Größenmarker ist mit M angegeben.

4.2.3 VLDLR-Proteinexpression in humanen NB-Zelllinien

VLDLR ist ebenfalls ein Mitglied der Lipoprotein-Rezeptor-Familie und als funktioneller Reelin-Rezeptor identifiziert. Für VLDLR lassen sich kräftige Banden zwischen 115– 181 kDa in CHP 100 und Lan 2 nachweisen. Kelly, NGP und Gimen zeigen hier schwächere Signale. Ungefähr auf Höhe von 70 kDa ist beachtliche Immunoreaktivität in Kelly-, NGP-, Lan 2- und SMS-Kan-Lysaten detektierbar. Lysate der Zelllinie Gimen weisen bei diesem Molekulargewicht nur eine sehr schwache Bande auf. Die Zelllysate von SH-SY5Y und SK-N-AS lassen keine Reaktion mit dem VLDLR-AK erkennen (Abb. 4.5).



Abb. 4.5: Western-Blot-Analyse der VLDLR-Expression in ausgewählten NB-Zelllinien. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expressionen von VLDLR mit einem monoklonalen VLDLR-AK nachgewiesen. Die aufgetragenen Zellysate entsprechen jeweils 1,5·10⁶ Zellen. Der Größenmarker ist mit M angegeben.

4.2.4 Dab1-Proteinexpression in humanen NB-Zelllinien

Dab1, welches als Adapterprotein für ApoER2 und VLDLR fungiert, ist in meinen Western-Blot-Analysen als Monomer bei dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 80 kDa detektierbar. Die Zelllinien CHP 100, NGP und SH-SY5Y weisen bei dieser Höhe die höchste Dab1-Expression auf, gefolgt von Lan 2 und Kelly. SMS-Kan und SK-N-AS zeigen schwache und Gimen keine Signale. Eine zweite auffällige Bande zwischen 82 und 115 kDa wird nur in Lan 2 nachgewiesen (Abb. 4.6).



Abb. 4.6: Western-Blot-Analyse der Dab1-Expression in ausgewählten NB-Zelllinien. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expressionen von Dab1 mit einem polyklonalen Dab1-AK nachgewiesen. Die aufgetragenen Zelllysate entsprechen jeweils 1,5·10⁶ Zellen. Der Größenmarker ist mit M angegeben.

Ergebnisse

4.2.5 Reelin-unabhängige Grundphosphorylierung von Dab1

Dab1 ist nur in seiner phosphorylierten Form wirksam. Ich habe daher mit einem AK, der spezifisch phosphoryliertes Tyrosin an Positon 220 der AS-Sequenz erkennt, den Aktivierungszustand von Dab1 untersucht. Die phosphorylierte Form von Dab1 (pDab1) ist in den untersuchten NB-Zelllinien auf Proteinebene unterschiedlich stark nachweisbar. Für CHP 100, Kelly, NGP und LAN 2 sind spezifische Banden zwischen 82 und 100 kDa nachweisbar. Ein weiteres schwaches Signal bei 82 kDa ist dagegen in fast allen Zelllinien zu finden. Eine dritte starke Bande bei 48 kDa ist in allen Zelllinien mit Ausnahme von Gimen detektierbar (Abb. 4.7).



Abb. 4.7: Western-Blot-Analyse der Dab1-Phosphorylierung in ausgewählten NB-Zelllinien. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und eine Phosphorylierung von Dab1 mit einem polyklonalen pDab1-AK nachgewiesen. Der AK ist gegen phosphoryliertes Tyrosin 220, eine von fünf phosphorylierbaren Tyrosinstellen im Dab1, gerichtet. Die aufgetragenen Zelllysate entsprechen jeweils $1,5\cdot10^6$ Zellen. Der Größenmarker ist mit M angegeben.

Für die oben dargestellten Experimente wurden die NB-Zelllinien in RPMI-Medium mit 10 % FBS kultiviert. Wie ich in späteren Experimenten bemerkt habe, enthält FBS große Mengen an Reelin (Abb. 4.8) und führt so möglicherweise zu einer konstitutiven Dab1-Phosphorylierung und Aktivierung des Reelin-Signalweges. Die Zellen für die nachfolgenden Stimulierungsversuche mit Reelin habe ich daher in einem serumfreien Medium (PC-1) kultiviert.

Abb. 4.8 zeigt einen Immunoblot (Dot-Blot) mit deutlicher Reelin-Expression in den serumfreien Überständen Reelin-transfizierter HEK-293-Zellen (HEK-Reln) sowie im serumhaltigen RPMI-Medium. Im serumfreien Medium und in serumfreien Überständen GFPtransfizierter HEK-Zellen (HEK-vec) ist jedoch keine Expression von Reelin nachweisbar. Auf eine gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wird in diesem Verfahren verzichtet, sodass keine Informationen über die Größe der detektierten Zielmoleküle vorliegen.



Abb. 4.8: Immunoblot-Analyse von Reelin in serumhaltigen sowie serumfreien RPMI-Medien und in serumfreien Überständen von Reelin-transfizierten HEK-293-Zellen (HEK-Reln) sowie GFP-transfizierten HEK-293-Zellen (HEK-vec). Es wurden jeweils 2,8 μ l der serumfreien Überstände von HEK-Zellen gleicher Zellzahl (1,5·10⁶ Zellen) entnommen und auf 180 μ l mit serumfreien Medium aufpipettiert. Die RPMI-Medien wurden jeweils zu 180 μ l aufgetragen. Für den Nachweis von Reelin im Kulturserum habe ich HEK-Reln-Zellen als Positiv-Kontrolle und HEK-vec-Zellen sowie serumfreies Medium als Negativ-Kontrolle verwendet. Mit Hilfe einer Vakuum-Blotting-Apparatur wurden die Zellkultur-Medien und Überstände von HEK-Zellen auf eine PVDF-Membran gespottet und mit Reelin-AK inkubiert. Die Chemilumineszenzreaktion diente der Detektion einer Reelin-Expression.

4.3 Reelin-abhängige Dab1-Phosphorylierung in Kelly und Lan 2

Abb. 4.9 zeigt aufkonzentrierte Überstände von Reelin-transfizierten HEK-293-Zellen (HEK-Reln) und GFP-transfizierten HEK-293-Zellen (HEK-vec). Deutlich ist eine Reelin-Sekretion von HEK-Reln bei 400, 300, 250 und 180 kDa zu erkennen. HEK-vec wurde als Negativkontrolle eingesetzt.



Abb. 4.9: Western-Blot-Analyse der Reelin-Expression in HEK-Reln und HEK-vec. Die aufkonzentrierten Überstände wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von Reelin wurde mit einem mono-klonalen AK nachgewiesen. Die aufgetragenen Überstände geben die Expression von jeweils 1,5·10⁶ Zellen wieder.

Ich habe die NB-Zelllinien Kelly und Lan 2 unterschiedlich lang mit Überständen von HEK-Reln und GFP-Kontrollzellen inkubiert und die Dab1-Expression sowie den Dab1-Phosphorylierungszustand in Western-Blot-Analysen untersucht. Da beide Zelllinien die Rezeptoren ApoER2 und VLDLR sowie Dab1 exprimieren, erwartete ich in diesem Experiment anhand einer Dab1-Phosphorylierung die Aktivierung des Reelin-Signalwegs nachweisen zu können. Die Zelllinie Kelly weist zwei kräftige pDab1-Banden zwischen 64– 82 kDa auf. Nach fünf Minuten Inkubation zeigt sich, dass in den mit Kontrollüberstand behandelten Zellen die Phosphorylierung der 64-kDa-Bande schwächer erscheint. Eine Dab1-Expression konnte leider nicht dargestellt werden. Bei der Zelllinie Lan 2 ist sowohl für Dab1 als auch für pDab1 nur eine Bande bei etwa 82 kDa darstellbar. Die Intensität der pDab1-Banden ändert sich allerdings weder durch die Behandlung mit reelinhaltigen Überständen noch im Zeitverlauf.

Ergebnisse



Abb. 4.10: Western-Blot-Analyse: Reelin-induzierte Dab1-Phosphorylierung bei der Zelllinie Kelly. Die Zellen wurden mit aufkonzentrierten Überständen von HEK-Reln-Zellen bzw. GFP-Kontrollzellen (K) für 0, 5, 10 sowie 30 min inkubiert und anschließend lysiert. Die Zelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinexpressionen mit polyklonalen AK gegen pDab1 und Dab1 nachgewiesen. Die aufgetragenen Zelllysate entsprechen jeweils $1,5\cdot10^6$ Zellen. Der Nachweis von β -Aktin zeigt eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen mit den Zelllysaten.



Abb. 4.11: Western-Blot-Analyse: Reelin-induzierte Dab1-Phosphorylierung bei der Zelllinie Lan 2. Die Zellen wurden mit aufkonzentrierten Überständen von HEK-Reln-Zellen bzw. GFP-Kontrollzellen (K) für 0, 5, 10 sowie 30 min inkubiert und anschließend lysiert. Die Zelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinexpressionen mit polyklonalen AK gegen pDab1 und Dab1 nachgewiesen. Die aufgetragenen Zelllysate entsprechen jeweils $1,5\cdot10^6$ Zellen. Der Nachweis von β -Aktin zeigt eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen mit den Zelllysaten.

5 Diskussion

Das Neuroblastom (NB) ist der häufigste solide extrakranielle Tumor bei Kindern und überwiegend im Nebennierenmark sowie entlang der sympathischen Ganglien lokalisiert. Sein Ursprung sind primitive pluripotente Zellen der Neuralleiste. Das NB ist in seiner Genetik, Biologie und klinischen Symptomatik sehr heterogen, was Diagnostik und Therapie erschwert. Die Mehrheit der pränatal diagnostizierten NB bildet sich spontan zurück oder differenziert in benigne Ganglioneurome aus. Auch im Säuglingsalter wird spontane Regression von ursprünglich schnell wachsenden Tumoren in den lokalisierten Stadien 1-3 sowie im Stadium 4s beobachtet. Oft ist hier bei symptomfreien Patienten ohne molekulargenetische Risikofaktoren abwartendendes Beobachten nach einer initialen Operation ausreichend. Kommt es dennoch zur Progression des NB, kann Chemotherapie die Tumorregression induzieren. Symptomatische Patienten in den lokalisierten Stadien sprechen vor allem im ersten Lebensjahr gut auf eine adjuvante bzw. neoadjuvante Chemotherapie an. Im Gegensatz dazu sind ältere Kinder, die eine MYCN-Amplifikation aufweisen oder sich im metastasierten Stadium 4 befinden, trotz intensiver multimodaler Therapie immer noch schlecht zu behandeln. Hier sorgen Tumorprogression und Metastasierung sowie Zytostatika-Resistenzen in der Rezidivsituation für eine ungünstige Prognose (Hero und Berthold 2002; Brodeur 2003; Schwab et al 2003).

Neue Tumormarker könnten für die Risikostratifizierung des NB eingesetzt werden und eine mehr auf den Patienten zugeschnittene Therapie ermöglichen, um akute Nebenwirkungen sowie Spätfolgen einer Radio- und Chemotherapie zu reduzieren bzw. zu verhindern. Prognostische Relevanz hat u. a. die lymphogene Metastasierung des NB, doch völlig unverstanden sind die hier zugrunde liegenden Mechanismen. Im Lymphendothel ist die Expression des Matrixproteins Reelin belegt, seine Bedeutung dort ist jedoch ungeklärt. Reelin ist ein extrazelluläres Glykoprotein, dessen Funktion im ZNS intensiv erforscht wird. Inverse Cortexschichtung sowie cerebelläre Hypoplasie sind kennzeichnend für die Reelindefiziente Reeler-Maus. Beim Menschen wird die Dysfunktion von Reelin im ZNS mit neuropsychiatrischen Erkrankungen wie der Schizophrenie, Lissenzephalie, dem Autismus und der Depression in Zusammenhang gebracht (Fatemi 2001). Auch wird die Position des ersten vegetativen Neurons im Rückenmark von Reelin kontrolliert (Yip et al. 2000), über die Bedeutung von Reelin im peripheren Nervensystem ist aber praktisch nichts bekannt.

Das Ziel meiner Arbeit war es, die Bedeutung von Reelin und den dazugehörigen Molekülen der Signalkaskade (VLDLR, ApoER2 sowie Dab1) im NB zu untersuchen und deren Eignung als Marker für eine Risikostratifizierung und individualisierte Therapie beim humanen NB zu prüfen. Zusätzlich stellten sich folgende Fragen: Übt Reelin einen Einfluss auf das Verhalten des NB aus? Welche Rolle spielt Reelin als Navigator neuronaler Zellen hinsichtlich der lymphogenen Metastasierung des NB?

5.1 Reelin-Expression in humanen NB-Zelllinien

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass murines Reelin extrazellulär in Fragmenten verschiedener Größen vorliegt. So detektierten Lambert de Rouvroit et al. (1999) neben dem 400-kDa-Gesamtmolekül Spaltprodukte in den Größenordnungen von 300 und 180 kDa. Quattrocchi et al. (2002) zeigten in ihren Western-Blot-Analysen Reelin-Banden bei 400, 350 und 140 kDa, während Benhayon et al. (2003) Reelin-Produkte bei 400, 250, 220 und 180 kDa nachweisen konnten.

In Zelllysaten von NB-Zellen konnte ich mit Western-Blot-Analysen kein Reelin zeigen, wahrscheinlich, weil es sehr rasch nach extrazellulär sezerniert wird. Mit Western-Blot-Analysen von aufkonzentrierten Kulturüberständen ausgesuchter NB-Zelllinien ist Reelin jedoch nachweisbar, allerdings zeigt nur die Zelllinie SK-N-AS ein deutliches Signal bei etwa 250 kDa. Die Zelllinien SMS-Kan, SH-SY5Y sowie NGP zeigen auf gleicher Höhe nur sehr schwache Signale. In Kelly-Zellen ist keine Immunoperoxidase-Reaktion mit AK gegen Reelin zu beobachten. Des Weiteren ist jeweils eine ~90-kDa-Bande in den Zellüberständen von NGP und Lan 2 zu sehen. Es kann sich bei den 250- und 90- kDa-Banden um proteolytische Fragmente handeln. Die Protein-Expression in den NB-Zelllinien spiegelt sich auch in meinen Ergebnissen der Real-time RT-PCR für Reelin-mRNA wider.

In Überständen Reelin-transfizierter HEK-293-Zellen, welche das Reelin-Gen aus der Maus enthalten, ist im Gegensatz zu den Überständen humaner NB-Zellen eine 400-kDa-Bande detektierbar. Die Expression eines 400-kDa-Reelins in den NB-Zelllinien ist dennoch nicht auszuschließen. Da in Überständen der HEK-293-Zellen die 400-kDa-Bande im Vergleich zu der 250-kDa-Bande nur schwach exprimiert wird, liegt das meiste Reelin in diesen Überständen gespalten vor. Bei einer Verdünnung der 250-kDa-Bande der HEK-293-Zellen auf die Reelin-Menge in den NB-Überständen wäre die 400-kDa-Bande der HEK-293-Zellen vermutlich auch nicht mehr im Western Blot detektierbar. Isoformen von Reelin könnten auch

Diskussion

gewebs- und speziesspezifisch sein und daher von den NB-Zellen in einem anderen Molekulargewicht als im ZNS der Maus sezerniert werden. Möglicherweise werden auch zusätzlich Reelin spaltende Proteasen von NB-Zellen sezerniert. Invasive Tumorzellen weisen oft eine hohe Produktion von Proteasen, wie z.B. Matrixmetalloproteasen auf, die für die Degradation extrazellulärer Matrixproteine und für die Dissemination maligner Zellen von essentieller Bedeutung sind. Da HEK-293-Zellen keine Tumorzellen sind, fehlt bei ihnen die enorme Sekretion dieser Proteasen. Eine weitere Erklärung für die fehlende 400-kDa-Bande geben Quattrochi et al. (2002), die zeigen konnten, dass sich das 400-kDa-Vorläuferprotein als autokatalytische Serin-Protease durch proteolytisches Prozessieren in kleinere funktionell aktive Isoformen spaltet. Dies wird jedoch durch jüngste Ergebnisse in Frage gestellt. Kohno und Hattori (2010) konnten für Reelin keine Serin-Protease-Aktivität nachweisen.

5.2 Reelin-Rezeptoren

Die Reelin-Rezeptoren ApoER2 und VLDLR sind in Neuronen des ZNS hoch exprimiert und während der Kortikogenese von Groß- und Kleinhirn von Bedeutung. Mutationen in diesen Rezeptoren führen zu neurologischen Auffälligkeiten wie Tremor und Ataxie, die auch für die Reeler-Maus kennzeichnend sind (D'Arcangelo et al. 1999; May et al. 2005). Beide Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Affinität zu Reelin. ApoER2 scheint eine höhere Reelin-Affinität zu haben und ist essentiell für eine Glia-vermittelte Migration der sich spät entwickelnden Neurone in die äußeren kortikalen Schichten (Benhayon et al. 2003). Hack et al. (2007) konnten diese Ergebnisse bestätigen und zeigten darüber hinaus, dass im Gegensatz dazu Reelin über VLDLR als Stoppsignal für wandernde Neurone agiert und so deren Migration in die Marginalzone verhindert. Was das ZNS anbelangt, sind schon viele Ansätze unternommen worden, um die Fragen der unterschiedlichen Reelinwirkung auf die beiden Rezeptoren aufzudecken, dennoch bleiben viele Fragen unbeantwortet. Für das periphere Nervensystem ist dies bis jetzt noch ein weitgehend unerforschtes Gebiet.

5.2.1 ApoER2-Expression in humanen NB-Zelllinien

Die Analysen der Real-time RT-PCR zeigen in allen NB-Zelllinien eine nahezu gleich hohe ApoER2-Expressionstärke. Allerdings ist das Protein in der postulierten Größe von etwa 100 kDa in meinen Western-Blot-Analysen nicht detektierbar. Es ist jedoch bekannt, dass ApoER2 bedingt durch alternatives Spleißen ein komplexes Bandenmuster erzeugt, welches spezies- und gewebsspezifisch unterschiedlich sein kann (Brandes et al. 1997; Reddy et al. 2011). Die starken Signale bei 65 kDa in den NB-Zelllinien CHP100, Lan 2 und Gimen könnten somit Spleißvarianten darstellen. Bei den Zelllinien Kelly, NGP, SH-SY5Y, SK-N-AS und SMS-Kan gibt es eine beträchtliche Diskrepanz zwischen schwachen 65-kDa-Proteinbanden und relativ hohen mRNA-Expressionen. Eine gestörte Expression von ApoER2 in den Tumorzellen muss in Betracht gezogen werden. Hierfür verantwortlich könnte eine Frameshift-Mutation sein, die ein zusätzliches Stop-Codon entstehen lässt, welches zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation führt. Eine Erklärung für diese mRNA-Protein-Diskrepanz könnten jedoch auch die 30-kDa-Banden liefern, die sich auffällig in der Western-Blot-Analyse durch alle Zelllinien ziehen (Becker et al. 2012 b). Diese 30kDa-Banden könnten einerseits als falsch positives Signal aus einer unspezifischen AK-Reaktion entstehen, andererseits konnten Koch et al. (2002) eine lösliche Form von ApoER2 in einer Größe von etwa 30 kDa in murinen neuronalen Primärkulturen zeigen. Die sezernierte lösliche Splicevariante bindet Reelin extrazellulär und verhindert eine Interaktion mit dem membranständigen Rezeptor. Dieser Mechanismus könnte beim humanen NB das Reelin-Signaling extrazellulär unterbinden und Auswirkungen auf die Dignität von NB-Zellen haben. Die von mir untersuchten Zelllinien stammen aus fortgeschrittenen NB. Es scheint also möglich, dass Reelin in diesen Zellen durch die Expression des löslichen Rezeptors ApoER2 nicht mehr als Stoppsignal erkannt und so die Tumorprogression gefördert wird. Weitere Untersuchungen zur Funktion der löslichen Rezeptorvariante müssen nun zeigen, ob diese wirklich Einfluss auf den Reelin-Signalweg und das Migrationsverhalten der NB-Zellen hat. Handelt es sich bei dem 30-kDa-Signal wirklich um eine lösliche Isoform des Rezeptors, sollte sie in den Überständen der NB-Zelllinien akkumulieren und im Western Blot detektierbar sein. Die Inkubation der Tumorzellen mit reelinhaltigen Überständen, die löslichen ApoER2 enthalten, müsste, im Gegensatz zu reelinhatigen Überständen ohne löslichen ApoER2, im Western Blot eine abgeschwächte Dab1-Phosphorylierung in, auf Reelin reagierenden, NB-Zelllinien aufzeigen.

Das ApoER2-Gen ist wie das Dab1-Gen auf Chromosom 1p lokalisiert: ApoER2 auf 1p34 und Dab1 auf 1p32-31 (Kim et al. 1997; Bar et al. 2003). Beim NB sind strukturelle Chromosomenaberrationen auf diesem Chromosom häufig zu beobachten und korrelieren mit einer schlechten Prognose. So stammt die Zelllinie Gimen aus KM-Metastasen eines 2-jährigen Patienten im Stadium 4 und weist eine 1p-Deletion auf (Donti et al. 1988). 1p-Deletionen sind auch in SMS-Kan, SK-N-AS und Lan 2 nachweisbar (Reynolds et al. 1986; Thiele 1998). NGP zeigt neben einer 1p-Deletion auch eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 1p und 15q (Amler et al. 1995; Thiele 1998). In diesen aberranten Zellen

könnten fehlerhafte Transkripte von ApoER2 und Dab1 zu einer Beeinträchtigung der Proteinstruktur und Störungen im Reelin-Signalweg führen. Möglicherweise sind solche Chromosomenaberrationen der Grund für die fehlende Rezeptor-Expression in seiner Gesamtgröße von etwa 100 kDa in meinen Western-Blot-Analysen. Da jedoch in der Zelllinie SH-SY5Y ein intaktes Chromosom 1p existiert (Carén et al. 2007) und für die Zelllinien Kelly sowie CHP 100 keine Daten hinsichtlich einer Aberrationen auf Chromosom 1p vorliegen, muss auch an andere Ursachen gedacht werden, die in einer gestörten Proteinexpression einmünden können.

5.2.2 VLDLR-Expression in humanen NB-Zelllinien

Der Rezeptor VLDLR ist in den NB-Zelllinien unterschiedlich hoch reguliert. Die Ergebnisse der Real-time RT-PCR sind in allen Zelllinien konkordant mit den Western-Blot-Analysen. SH-SY5Y und SK-N-AS zeigen weder auf mRNA- noch auf Proteinebene eine VLDLR-Expression. Das gefundene Signal um 150 kDa in den Western-Blot-Analysen entspricht der publizierten Rezeptorgröße und ist in Lan 2 und CHP100 stark, in Kelly, NGP sowie Gimen schwächer und in SMS-Kan kaum präsent. Des Weiteren sind starke 70-kDa-Banden für VLDLR in Kelly, NGP, Lan 2 und SMS-Kan und eine schwache Bande in Gimen zu beobachten (Becker et al. 2012 b). 70-kDa-Banden sind nur in Kombination mit den 150-kDa-Banden vorhanden und entsprechen möglicherweise Isoformen oder Spaltprodukten von VLDLR. Verschiedene durch alternatives Spleißen bedingte Isoformen et al. 1997; Sakai et al. 2009).

5.2.3 Weitere Reelin-Rezeptoren

Neben den Rezeptoren ApoER2 und VLDLR könnten weitere Reelin-Rezeptoren beim NB vorzufinden sein und Einfluss auf die Dignität ausüben. So berichten Hoe et al. (2009) über Interaktionen von Reelin mit Amyloid Precursor Protein (APP) und α 3 β 1-Integrin und deren regulierenden Einfluss auf die Migration von Neuronen. Das Zusammenspiel dieser drei Proteine führt über eine erhöhte Konzentration von APP an der Zelloberfläche zu einer gesteigerten proteolytischen Prozessierung von APP sowie vermehrter Bildung von Alzheimer-assoziiertem β -Amyloid. Sentürk et al. (2011) konnten kürzlich die Affinität der Eph-B-Rezeptoren zum Reelin und deren Notwendigkeit für eine regelrechte Übertragung des Reelinsignals im Gehirn von Mäusen nachweisen. Die Eph-Familie zählt zur größten Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Sie und ihre membranständigen Liganden, die Ephrine, lassen

Diskussion

über direkte Kommunikation Zell-Zell-Kontakte entstehen, interagieren mit einer Vielzahl von Signalwegen und bilden so ein komplexes System bei der Zellkommunikation. Kennzeichnend für die Wechselbeziehung zwischen Eph-Rezeptoren und Ephrine ist die bidirektionale Signalübertragung - das sogenannte forward/reverse signalling. Eph-Rezeptoren/Ephrine sind bei der Embryonalentwicklung an der Neuro- und Angiogenese beteiligt und in pathophysiologische Prozesse wie der Tumorangiogenese involviert. Da sie über Signaltransduktion die Organisation des Zytoskeletts und die Zellmotilität mitregulieren, kann ihre Dysregulation Auswirkungen auf Tumorprogression und Metastasierung haben (Mosch et al. 2010). Sie sind in verschiedenen humanen Karzinomen wie z.B. der Brustdrüse, Leber, Prostata, des Kolons sowie im malignen Melanom hochreguliert und mit Tumorprogression und Metastasenbildung assoziiert (Dodelet und Pasquale 2000). Andererseits kann auch die Herunterregulierung bestimmter Eph-Rezeptoren zu einer gesteigerten Karzinogenese und Metastasenneigung führen, wie z.B. beim malignen Melanom (Hafner et al. 2003) und kolorektalem Karzinom (Dong et al. 2009). Untersuchungen zum Zusammhang zwischen Ephrinen/Eph-Rezeptoren und dem NB hinsichtlich der Tumordignität müssen noch durchgeführt werden.

5.3 Dab1-Expression in humanen NB-Zelllinien

Dab1 ist ein 80-kDa-Adapterprotein für die Rezeptoren ApoER2 sowie VLDLR und in meinen Western-Blot-Analysen in dieser Größenordnung nachweisbar (Becker et al. 2012 b). Real-time RT-PCR und Western-Blot-Analysen zeigen in den Zelllinien CHP100 sowie Lan 2 eine sehr hohe, in Kelly und NGP eine hohe und in SMS-Kan sowie SK-N-AS eine sehr schwache Dab1-Expression. Die Zelllinie Gimen zeigt im Western Blot eine sehr geringe Dab1-Expression, allerdings kann ich auch in der Real-time RT-PCR kein Transkript nachweisen. SH-SY5Y und SK-N-AS zeigen ebenfalls keine nachweisbare mRNA-Expression, jedoch sind im Western Blot auf Höhe von 80 kDa Proteinbanden detektierbar. Da beide Zelllinien in den Western-Blot-Analysen weder eine VLDLR-Expression noch phosphoryliertes Dab1 zeigen, scheint hier kein Abbau von Dab1 nach einer Dab1-Phosphorylierung am Rezeptor stattzufinden. Eine Neusynthese von Dab1-Protein ist demnach nicht notwendig. Möglicherweise liegt aber auch ein fehlendes Dab1-Turnover als Hinweis auf Störungen im Reelin-Signalweg vor.

Lan 2 ist die einzige Zelllinie, die neben einer 80-kDa-Bande eine sehr starke Bande zwischen 115–181 kDa exprimiert (Becker et al. 2012 b). Möglicherweise handelt es sich um eine

Diskussion

dimerisierte Form oder ein Hybridprotein, verursacht durch eine genetische Instabilität im Genom von Lan 2, einer aus KM-Metastasen gewonnenen Zelllinie im Tumorstadium 4 (Seeger et al. 1977). Hybride Onkogene kommen in verschiedenen Tumorentitäten vor. Ein bekanntes Beispiel ist das durch Translokation entstehende *BCR-ABL*-Genprodukt auf dem Philadelphia-Chromosom bei der chronisch-myeloischen Leukämie.

5.4 Dab1-Phosphorylierung in humanen NB-Zelllinien

Die phosphorylierte Form von Dab1 (pDab1) mit einer Größe zwischen 82 und 115 kDa ist deutlich in CHP100, Kelly, NGP und Lan 2 nachweisbar. SH-SY5Y, SMS-Kan, SK-N-AS und Gimen zeigen bei diesem Proteingewicht keine Dab1-Phosphorylierung. Dab1 ist bei ihnen, mit Ausnahme von SH-SY5Y, konform dazu nicht bzw. nur schwach vorhanden (Becker et al. 2012 b). Ohne das Adapterprotein Dab1 kann das Reelin-Signal, nach aktuellem Verständnis des Signalweges, nicht nach intrazellulär weitergeleitet werden. Es sind jedoch weitere Adapterproteine gefunden worden, die an die zytoplasmatische Region von ApoER2 und VLDLR binden (Gotthardt et al. 2000; Stockinger et al. 2000) und das Reelinsignal intrazellulär weiterleiten könnten. Die physiologische Bedeutsamkeit dieser Kommunikation ist größtenteils ungeklärt.

Auffällig sind in den Western-Blot-Analysen die starken Phosphorylierungssignale bei 45 kDa, die in allen Zelllinien, ausgenommen Gimen, zu finden sind. Diese Banden entstehen nur mit dem AK, der phosphoryliertes Tyrosin 220 als eine von fünf phosphorylierbaren Tyrosinstellen in Dab1 erkennt, jedoch nicht mit dem AK gegen unphosphoryliertes Dab1, welcher N-terminal angreift und auch die PTB-Region (*Phosphothyrosin binding domaine*) bindet. 45-kDa-Isoformen von Dab1 sind bekannt und besitzen die N-terminale PTB-Region als Bindungsdomäne für den zytoplasmatischen Bereich der Rezeptoren (Howell et al. 1997; Trommsdorff et al. 1998; Costagli et al. 2006). Da der Dab1-AK gegen ein Epitop der PTB-Domäne gerichtet ist, sollte er auch die 45-kDa-Isoform erkennen. Bei den 45-kDa-Banden in meinen Western-Blot-Analysen scheint es sich demnach nicht um Isoformen zu handeln, sondern vielmehr um ein Signal, bei dem der AK mit einem anderen phosphorylierten Protein kreuzreagiert. Abb. 5.1 veranschaulicht die Struktur der humanen Dab1-Gensequenz. Zu sehen sind hier die von Exon 3–6 kodierte N-terminal gelegene PTB-Region, die der Dab1-AK erkennt.



Abb. 5.1: Organisation des Dab1-Gens. Exons (rot durchnummerierte Blöcke) und Introns (innerhalb der blauen Linien). Die die PTB-Domaine kodierenden Exons sind schwarz unterstrichen und der Dab1-AK (grün) eingezeichnet. Die Position der fünf phosphorylierbaren Tyrosine sind mit "Y" dargestellt. Y220 wird vom pDab1-AK (grün) gebunden. Start (ATG)- und Stopcodone am N- und C-terminalen Ende sind angegeben (modifiziert nach Costagli et al. 2006, S. 12).

Die NB-Zelllinien wurden zu Beginn meiner Untersuchungen in RPMI-Vollmedium kultiviert. Da ich jedoch im Verlauf meiner Untersuchungen zeigen konnte, dass das verwendete Kälberserum reelinhaltig ist, wundert es nicht, eine starke Dab1-Phosphorylierung in den Western-Blot-Analysen vorzufinden. Um eine Reelin-induzierte Phosphorylierung darzustellen, habe ich deshalb ausgewählte NB-Zelllinien in serum- und damit reelinfreiem Medium kultiviert, die starke Phosphorylierung blieb jedoch erhalten. Es kann sich hierbei um eine Reelin-unabhängige basale Phosphorylierung handeln. Eine solche Grundphosphorylierung zeigen auch Reeler-Mäuse, bei denen die Dab1-Phosphorylierung vermindert, jedoch nicht vollständig unterbunden ist (Howell et al. 2000). In meinen Stimulationsversuchen sowohl mit reelinhaltigen Überständen von transfizierten HEK-293-Zellen als auch mit entsprechenden Kontroll-Überständen von nicht Reelin-exprimierenden HEK-293-Zellen ist in Kelly und Lan 2 eine nahezu gleichstarke Expression von Dab1 sowie dessen Phosphorylierungstatus erkennbar. Eine zusätzliche Phosphorylierung durch Reelin ist nicht zu beobachten. Möglicherweise trägt der 30-kDa-Rezeptor ApoER2, welcher von allen untersuchten NB-Zelllinien exprimiert wird, zum unveränderten Phosphorylierungszustand bei, indem er Reelin bereits abfängt, bevor es an die membranständigen Rezeptoren ApoER2 und VLDLR binden kann. Die Induktion einer Dab1-Phosphorylierung wäre somit inhibiert. Aber es können auch alternative Reelin-Signalwege in Betracht kommen, die die Phosphorylierung von Dab1 umgehen. Da in Lan-2-Zellen Reelin auf RNA- und Proteinebene nachweisbar ist, könnte hier die Phoshorylierung über einen autokrinen Reelin-Mechanismus im Vordergrund stehen, sodass zusätzliches Reelin im Überstand keinen Effekt mehr auf

Diskussion

bereits phosphoryliertes Dab1 hat. Anzumerken ist an dieser Stelle jedoch auch, dass der AK nur eine von fünf phosphorylierbaren Tyrosinresten im Dab1-Protein nachweist. Eine vollständige Phosphorylierung des Dab1 lässt sich deshalb mit diesem AK nicht beweisen. Eine konstitutive Phosphorylierung, wie in den NB-Zellen offensichtlich der Fall ist, könnte auch auf Mutationen in den Tumorzellen zurückzuführen sein; beispielsweise in *SRC*-Kinasen, die für eine permanente Übertragung der Phosphate auf Dab1 sorgen. Um solche Mutationen exakt lokalisieren zu können, sind Sequenzanalysen von Genen für Rezeptoren und intrazelluläre Proteine notwendig. Eine Dab1-Phosphorylierung kann vermutlich auch durch die Vernetzung mit anderen Signalwegen erreicht werden. So werden die komplexe Beziehungen zwischen Komponenten des Reelin-Signalweges und der Wnt-Signalwege, die u. a. bei der Zell-Zell-Interaktion und Regulation der Genexpression involviert sind, untersucht (Reiner und Sapir 2005).

5.5 Reelin im Serum und Gefäßendothel

Neben der Reelin-Expression in einigen NB-Zelllinien kommen zwei weitere Reelinquellen in Frage, die Einfluss auf die Tumorzellen ausüben können: Zum einen konnte ich Reelin im fetalen Kälberserum mit Hilfe des Dot-Blot-Verfahrens nachweisen. Kinder besitzen demnach möglicherweise einen hohen Reelinspiegel im Serum, was die Tumorprogression beeinflussen könnte. Leider konnte ich diesen Aspekt nicht näher untersuchen. Zum anderen konnte ich in serumfreien Überständen von LECs eine vergleichbar hohe Reelin-Konzentration wie in SK-N-AS zeigen, jedoch nicht in Überständen von HUVECs (Becker et al. 2012 b). Meine Western-Blot-Analysen bestätigen damit die Transkriptomanalysen, in denen eine erhöhte Reelin-Expression in humanen Lymphendothelzellen aus gesundem Gewebe sowie aus Lymphangiomen im Gegensatz zu Blutendothel nachgewiesen werden konnte (Podgrabinska et al. 2002; Norgall et al. 2007). Unsere Arbeitsgruppe detektierte Reelin in primären NB immunhistochemisch nicht nur in Lymphgefäßen, sondern auch in Blutgefäßen, die normalerweise keine Reelin-Expression zeigen (Becker et al. 2012 b). Blut- und Lymphendothel des Tumorgewebes sowie gesundes Lymphendothel produzieren demnach Reelin.

Unsere Arbeitsgruppe (Becker et al. 2012 b) konnte weiterhin in Migrationsassays zeigen, dass Reelin als chemotaktisch wirksamer Lockstoff agiert und die Migration von NB-Zellen begünstigt. Die untersuchten NB-Zellen wanderten in Boyden-Kammern schneller auf reelinhaltiges Medium zu als auf Kontrollmedium. Waren die Zellen vor dem Versuchsbeginn Da meine in vitro durchgeführten Stimulationsversuche mit Reelin keine Aktivierung des kanonischen Reelin-Signalweges in NB-Zelllinien erkennen lassen, ein reelinabhängiges Wanderungsverhalten in den Migrationsversuchen jedoch nachzuweisen ist, scheint das Vorhandensein alternativer Reelin-Signalwege denkbar. Eine Reelinwirkung über bislang unbekannte Signalwege ist jedoch auch nur in Abwesenheit einer inhibitorisch wirksamen löslichen ApoER2-Variante möglich. Eine chemotaktisch wirksame exogene Reelinquelle aus dem Gefäßendothel bzw. Blutserum fördert möglicherweise die Migration maligner NB-Zellen über einen intakten alternativen Reelin-Signalweg, sofern die Tumorzellen aufgrund ihres eigenen fehlenden Reelin-Status sensibel auf eine externe Reelinsekretion reagieren. Reelin als "Lock-Molekül" könnte so die Tumorprogression begünstigen. Das würde z.B. auf die MYCN-amplifizierte Zelllinie Kelly zutreffen, die eine fehlende endogene Reelinexpression sowie eine signifikante Migration hin zu einer reelinhaltigen Umgebung zeigt (Becker et al. 2012 b). Die Wirkung von Reelin scheint hier nicht über den herkömmlichen Reelin-Signalweg zu gehen, da in meinen Western-Blot-Analysen unter Reelin-Stimulation keine Zunahme von phosphoryliertem Dab1 detektierbar ist. Eine eingeschränkte Migrationstendenz lassen die ebenso MYCN-amplifizierten, jedoch Reelinexprimierenden NB-Zelllinien Lan 2 und SMS-Kan erkennen, sodass hier die endogene Reelinproduktion über eine autokrine Stimulierung alternativer Reelin-Signalwege ein Tumorfortschreiten verzögern könnte. Reelin würde in diesem Fall als "Stopp-Signal" fungieren.

Die Ergebnisse machen eine duale Rolle von Reelin beim NB über einen nicht-kanonischen Reelin-Signalweg wahrscheinlich, wobei Reelin über parakrine Mechanismen Migration von Tumorzellen fördert, jedoch über eine autokrine Wirkform Zellwanderung erschwert.

5.6 Korrelation zwischen Reelin-Expression und Tumordignität

Die NB-Zelllinien, die ich für meine Experimente verwendete, stammen aus malignen Tumoren, meist im Stadium 4. Meine Ergebnisse zeigen:

- Diese Tumoren exprimieren kaum Reelin.
- Die Tumoren exprimieren möglicherweise alle eine lösliche Rezeptorvariante, die das Reelin-Signalling stört.
- Die Proteine des Reelin-Signalweges werden zum Teil in sehr unterschiedlichen

Formen exprimiert und könnten auf fehlerhaften Transkripten beruhen.

• Reelin hat keinen Einfluss auf den Dab1-Phosphorylierungsstatus.

Meine Ergebnisse machen deutlich, dass fast alle beobachteten NB-Zelllinien Defizite im kanonischen Reelin-Signalweg aufweisen, sei es der Verlust von Reelin, die fehlende bzw. veränderte Rezeptor- und/oder Adapterproteinausstattung sowie eine fehlende Dab1-Aktivierung. Der Verlust von Reelin sowie Veränderungen, die eine Störung im Reelin-Signalweg bewirken, scheinen bei der Progression des NB beteiligt zu sein. Die Funktion als Stopp-Signal kann Reelin bei defizientem Signalweg sowie bei fehlender Reelin-Expression nicht erfüllen. Diese Beobachtung stimmt auch mit den Ergebnissen aus dem Screening des Patientenmaterials unserer Arbeitsgruppe überein. Bei primären NB von Patienten, die zu diesem Zeitpunkt weder Radio- noch Chemotherapie erhalten hatten, konnten interessante Expressionsmuster von Reelin, ApoER2, VLDLR und Dab1 mittels Real-time RT-PCR und Immunhistochemie nachgewiesen werden (Becker et al. 2012 b). Reelin sowie Dab1 sind hierbei in den metastasierten Stadien 3, 4 und 4s signifikant herunterreguliert, während ApoER2 gleichmäßig in allen Stadien exprimiert wird und VLDLR von Stadium 1-4 signifikant zunimmt. In differenzierten NB und NB niedriger Stadien ist eine erhebliche Expression von Reelin, ApoER2 und Dab1 im Vergleich zu wenig differenzierten NB und fortgeschrittenen Tumorstadien zu sehen. In unserer Arbeitsgruppe führte auch die Behandlung von NB-Zelllinien mit ATRA (all-trans-Retinsäure) zu einer Heraufregulierung von Reelin- und Dab1-mRNA (Becker et al. 2012 b). ATRA findet in Kombination mit Chemotherapie bei der Therapie des NB sowie der akuten myeloischen Leukämie Anwendung und induziert eine Differenzierung der Tumorzellen.

Die Korrelation des Reelin-Status mit dem NB-Stadium (Becker et al. 2012 b) stimmt mit den Ergebnissen von Sato et al. (2006) überein, wonach beim Pankreas-Karzinom ebenso eine Herunterregulierung von Reelin und anderen Komponenten des Reelin-Signalweges zu beobachten ist. Ein Knock-down des Reelin-Gens in Pankreaskarzinom-Zellen führte hier zu einer erhöhten Zellmotilität und Invasivität. Auch Dohi et al. (2010) konnten zeigen, dass fehlende Reelin-Expression signifikant mit fortgeschrittenen Stadien des Magen-Karzinoms korreliert. Reelin wird auch in den Epithelien und Myoepithelien des gesunden Brustgewebes exprimiert und ist beim Mamma-Karzinom ebenfalls herunterreguliert (Stein et al. 2010). Der Verlust von Reelin ist hier signifikant mit einem positiven LK-Status und einer verminderten Gesamtüberlebensrate assoziiert. Die Zellen zeigen bei Überexpression von Reelin hingegen

Diskussion

eine reduzierte Migration und Invasivität. Die verminderte Reelin-Expression ist auch in diesen Fällen charakteristisch für maligne Tumoren. Andererseits scheint die Wirkung von Reelin auch gewebsspezifisch heterogen zu sein. So wird Reelin beim hochmalignen Prostata-Karzinom exprimiert, jedoch nicht bei der benignen Prostatahyperplasie (Perrone et al. 2007). Auch ist Reelin beim Retinoblastom und Ösophagus-Karzinom im Vergleich zum gesunden Gewebe hochreguliert (Wang et al. 2002; Seigel et al. 2007).

Die Diskussion gibt erste Hinweise auf einen möglichen Einfluss von Reelin auf die Progression beim NB und anderen Tumoren. Wie weit das Reelin-Signalling letztendlich noch in den NB-Zelllinien funktionell ist, bleibt zu klären.

5.7 Schlussfolgerung

Die Hypothese, wonach Reelin beim humanen NB als Stopp-Signal fungiert und mit einer günstigen Prognose einhergeht, muss differenzierter betrachtet werden: Das fortgeschrittene aggressive NB mit hoher Migrationstendenz zeigt einen gestörten kanonischen Reelin-Signalweg, über den Reelin keinen inhibierenden Einfluss mehr auf die Tumorzellen ausüben kann. Darüber hinaus können auf Grundlage der Ergebnisse alternative Reelin-Signalwege vermutet werden, in denen Reelin eine Doppelfunktion beim NB zukommt. Externe Reelinquellen, beispielsweise aus dem Blutserum oder dem Lymphendothel, fördern möglicherweise über parakrine Mechanismen die Migration nicht Reelin-exprimierender NB-Zellen in fortgeschrittenen Tumorstadien entlang eines hohen Reelin-Gradienten. Voraussetzung hierfür ist jedoch die fehlende inhibitorische Wirksamkeit löslicher ApoER2-Varianten. Produziert im Gegensatz dazu der Tumor hohe Mengen an Reelin, wirkt möglicherweise die tumoreigene Reelinquelle autokrin inhibitorisch auf die Zellmigration.

Eine hohe endogene Reelin-Expression könnte als ein gewebespezifischer Marker für weniger maligne, differenziertere NB angesehen werden. Reelin als prognostischer Marker zur Risikostratifizierung könnte eine individualisierte Therapie ermöglichen und einer Übertherapie entgegenwirken.

6 Zusammenfassung

Das Neuroblastom (NB) ist ein hochmaligner embryonaler Tumor des Kindesalters. Seine Heterogenität spiegelt sich sowohl auf molekularbiologischer Ebene als auch im klinischen Erscheinungsbild und bei der Prognose wider. Das Spektrum erstreckt sich von spontaner Tumorregression über ausdifferenzierende benigne Formen bis hin zu hochaggressiver Tumorinvasivität und Metastasierung. Die Kenntnis über die Pathogenese des NB ermöglicht eine individuelle Risikostratifizierung und eine gezielte patientenbezogene Therapie. Die Entschlüsselung der Tumorgenetik und die Identifizierung von bedeutenden Molekülen und Signalwegen sind essentiell für die Entwicklung prognostisch relevanter Tumormarker beim NB. Das lymphogene Metastasieren ist kennzeichnend für das NB in malignen Stadien, doch die zugrunde liegenden Mechanismen dafür sind noch unverstanden.

Ich habe in dieser Arbeit die Bedeutung des sezernierten Glykoproteins Reelin untersucht, das im Lymphendothel exprimiert wird und dessen Funktion beim NB noch ungeklärt ist. Im ZNS spielt Reelin bei der neuronalen Migration sowohl als Attraktions- als auch als Stoppsignal eine wichtige Rolle. Die Bedeutsamkeit von Reelin als prognostischer Marker und beim lymphogenen Metastasieren des NB stand im Fokus meiner Arbeit. Reelin konnte ich zum einen im fetalen Kälberserum und zum anderen im Lymphendothel nachweisen. Ich habe die Expression von Reelin und den Molekülen der dazugehörigen Signalkaskade VLDLR, ApoER2 sowie Dab1 und phospho-Dab1 in verschiedenen NB-Zelllinien untersucht. Ich konnte zeigen, dass sich die Heterogenität des Tumors in variablen Expressionsmustern der untersuchten Moleküle auf mRNA- und Proteinebene widerspiegelt. Ich konnte darstellen, dass die NB-Zelllinien, aus malignen Tumoren stammend, kaum Reelin exprimieren und aufgrund fehlender bzw. veränderter Rezeptor- und/oder Adapterproteinausstattung Defizite im kanonischen Reelin-Signalweg aufzeigen. Auch konnte ich in Stimulierungsversuchen zeigen, dass Reelin keinen Einfluss auf den Dab1-Phosphorylierungsstatus ausübt und somit nicht über den kanonischen Signalweg beim NB zu wirken scheint. In meinen Western-Blot-Analysen exprimieren die NB-Zelllinien alle eine ApoER2-Variante, bei der es sich möglicherweise um eine lösliche, das Reelin-Signalling störende, Rezeptorvariante handelt. Im Kontext weiterer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe deuten die Ergebnisse auf eine duale Funktion von Reelin beim NB hin und machen alternative Signalwege denkbar: Autokrin wirksames Reelin als Stoppsignal hemmt die Migration von NB-Zellen. Reelin hingegen aus dem Gefäßendothel oder Blutserum wirkt über positive Chemotaxis attraktiv auf NB-Zellen, die in fortgeschrittenen Stadien kein endogenes Reelin bilden, und fördert das lymphogene und hämatogene Metastasieren. Die Hypothese, wonach Reelin als ein Inhibitor der Tumorzellmigration beim NB fungiert, muss somit differenzierter betrachtet werden: Reelin aus Tumorzellen als Marker für *low-grade*-NB begünstigt über autokrine Wirkmechanismen ein Stop der Zellmigration, während parakrin sezerniertes Reelin im *high-grade*-NB als Attraktionsmolekül Zellmigration fördert. In weiteren Studien sollte geprüft werden, ob eine fehlende oder herabgesetzte Reelin-Expression in NB-Zellen ein Malignitätskriterium darstellt und zur Risikostratifizierung sowie Therapieentscheidung herangezogen werden kann.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: NB im Stadium 4s.	5
Abb. 1.2: CT-Bild vom Thorax in axialer Schichtführung.	6
Abb. 1.3: Histologische Klassifizierung nach INPC.	10
Abb. 1.4: Detektion der MYCN-Amplifikation.	12
Abb. 1.5: Schema des Neurotrophin-Tyrosinkinase-Rezeptor-Signalweges im NB	14
Abb. 1.6: Reelin-Proteinstruktur.	19
Abb. 1.7: Schema der dualen Funktion von Reelin im Gyrus dentatus	21
Abb. 1.8: Reelin-Signalweg.	23
Abb. 3.1: Schema Semi-Dry Blot	39
Abb. 4.1: Relative mRNA-Expression von Reelin, ApoER2, VLDLR und Dab1	42
Abb. 4.2: Western-Blot-Analyse der Reelin-Expression	44
Abb. 4.3: Western-Blot-Analyse der Reelin-Expression in SK-N-AS, LEC und HUVEC.	44
Abb. 4.4: Western-Blot-Analyse der ApoER2-Expression.	45
Abb. 4.5: Western-Blot-Analyse der VLDLR-Expression	46
Abb. 4.6: Western-Blot-Analyse der Dab1-Expression.	46
Abb. 4.7: Western-Blot-Analyse der Dab1-Phosphorylierung	47
Abb. 4.8: Immunoblot Analyse von Reelin.	48
Abb. 4.9: Western-Blot-Analyse der Reelin-Expression in HEK-Reln und HEK-vec	49
Abb. 4.10: Western-Blot-Analyse: Reelin-induzierte Dab1-Phosphorylierung in Kelly	50
Abb. 4.11: Western-Blot-Analyse: Reelin-induzierte Dab1-Phosphorylierung in Lan 2	50
Abb. 5.1: Organisation des Dab1-Gens.	58

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: INSS	7
Tab. 1.2: Kooperierende NB-Studien in den USA.	12
Tab. 1.3: Ausschnitte aus der INRG-Klassifikation.	16
Tab. 2.1: Geräte.	25
Tab. 2.2: Verbrauchsmaterialien.	25
Tab. 2.3: Chemikalien.	26
Tab. 2.4: Reaktionssysteme.	26
Tab. 2.5: Oligonukleotide.	27

Anhang

Tab. 2.6: Antikörper.	27
Tab. 2.7: Eukaryotische Zelllinien.	27
Tab. 2.8: Zellkulturmedien, Zusätze und Puffer.	28
Tab. 2.9: Zusammensetzung der Kulturmedien in Abhängigkeit vom Zelltyp.	28
Tab. 2.10: Zusammensetzung der SDS-Gele f Gelelektrophorese.	30
Tab. 3.1: Überblick über die AK und Waschvorgänge.	40

8 Literaturverzeichnis

Acharya S, Jayabose S, Kogan SJ, Tugal O, Beneck D, Leslie D, Slim M (1997): Prenatally diagnosed neuroblastoma. Cancer <u>80</u>, 304 - 310

Achen MG, Stacker SA (2008): Molecular control of lymphatic metastasis. Ann N Y Acad Sci <u>1131</u>, 225 - 234

Aktas S, Altun Z, Erbayraktar Z, Aygun N, Olgun N (2010): Effect of cytotoxic agents and retinoic acid on Myc-N protein expression in neuroblastoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol <u>18</u>, 86 - 89

Albuquerque RJC, Hayashi T, Cho WG, Kleinman ME, Dridi S, Takeda A, Baffi JZ, Yamada K, Kaneko H, Green MG (2009): Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. Nat Med <u>15</u>, 1023 - 1030

Ambros IM, Zellner A, Roald B, Amann G, Ladenstein R, Printz D, Gadner H, Ambros PF (1996): Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. N Engl J Med <u>334</u>, 1505 - 1511

Amler LC, Corvi R, Praml C, Savelyeva L, Le Paslier D, Schwab M (1995): A reciprocal translocation (1;15) (36.2;q24) in a neuroblastoma cell line is accompanied by DNA duplication and may signal the site of a putative tumor suppressor-gene. Oncogene <u>10</u>, 1095 -1101

Arnaud L, Ballif BA, Cooper JA (2003): Regulation of protein tyrosine kinase signaling by substrate degradation during brain development. Mol Cell Biol <u>23</u>, 9293 - 9302

Bader SA, Fasching C, Brodeur GM, Stanbridge EJ (1991): Dissociation of suppression of tumorigenicity and differentiation in vitro effected by transfer of single human chromosomes into human neuroblastoma cells. Cell Growth Differ 2, 245 - 255

Bar I, Tissir F, Lambert de Rouvroit C, De Backer O, Goffinet AM (2003): The gene encoding disabled-1 (Dab1), the intracellular adaptor of the Reelin pathway, reveals unusual complexity in human and mouse. J Biol Chem <u>278</u>, 5802 - 5812

Becker J, Pavlakovic H, Ludewig F, Wilting F, Weich HA, Albuquerque R, Ambati J, Wilting J (2010): Neuroblastoma progression correlates with downregulation of the lymphangiogenesis inhibitor sVEGFR-2. Clin Cancer Res <u>16</u>, 1431 - 1441

Becker J, Fröhlich J, Hansen J, Zelent C, Perske C, Wilting J (2012 a): The lymphangiogenesis inhibitor esVEGFR-2 in human embryos: expression in sympatho-adrenal tissues and differentiation-induced up-regulation in neuroblastoma. Histol Histopathol <u>27</u>, 721 - 733

Becker J, Fröhlich J, Perske C, Pavlakovic H, Wilting J (2012 b): Reelin signalling in neuroblastoma: Migratory switch in metastatic stages. Int J Oncol <u>41</u>, 681 - 689

Benhayon D, Magdaleno S, Curran T (2003): Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of Disabled-1. Brain Res Mol Brain Res <u>112</u>, 33 - 45

Bessho F, Hashizume K, Nakajo T, Kamoshita S (1991): Mass screening in Japan increased the detection of infants with neuroblastoma without a decrease in cases in older children. J Pediatr <u>119</u>, 237 - 241

Bock HH, Herz J (2003): Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. Curr Biol 13, 18 - 26

Bock HH, Jossin Y, May P, Bergner O, Herz J (2004): Apolipoprotein E receptors are required for reelin-induced proteasomal degradation of the neuronal adaptor protein Disabled 1. J Biol Chem <u>279</u>, 33471 - 33479

Bourdeaut F, Ribeiro A, Paris R, Pierron G, Couturier J, Peuchmaur M, Delattre O (2008): In neuroblastic tumours, Schwann cells do not harbour the genetic alterations of neuroblasts but may nevertheless share the same clonal origin. Oncogene <u>27</u>, 3066 - 3071

Böcker W, Kleinhues P, Höfler HK, Lax S, Poremba Ch, Moll R: Allgemeine Tumorpathologie; in: Pathologie; hrsg. v. Böcker W, Denk H und Heitz PhU unter Mitarbeit namhafter Autoren; Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München 2004, 169 - 197

Brandes C, Novak S, Stockinger W, Herz J, Schneider WJ, Nimpf J (1997): Avian and murine LR8B and human apolipoprotein E receptor 2: differentially spliced products from corresponding genes. Genomics <u>42</u>, 185 - 191

Breit S, Ashman K, Wilting J, Rössler J, Hatzi E, Fotsis T, Schweigerer L (2000): The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells: down-regulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A. Cancer Res <u>60</u>, 4596 - 4601

Brodeur GM (2003): Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. Nat Rev Cancer <u>3</u>, 203 - 216

Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D'Angio G, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Freeman AI (1988): International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. J Clin Oncol <u>6</u>, 1874 - 1881

Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS (1997): Biology and genetics of human neuroblastomas. J Pediatr Hematol Oncol <u>19</u>, 93 - 101

Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR, Light JE, Kolla V, Evans AE (2009): TRK Receptor Expression and Inhibition in Neuroblastomas. Clin Cancer Res <u>15</u>, 3244 - 3250

Carén H, Fransson S, Ejeskär K, Kogner P, Martinsson T (2007): Genetic and epigenetic changes in the common 1p36 deletion in neuroblastoma tumours. Br J Cancer <u>97</u>, 1416 - 1424

Carén H, Kryh H, Nethander M, Sjöberg R-M, Träger C, Nilsson S, Abrahamsson J, Kogner P, Martinsson T (2010): High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset. Proc Natl Acad Sci U.S.A <u>107</u>, 4323 - 4328
Caron H, van Sluis P, de Kraker J, Bökkerink J, Egeler M, Laureys G, Slater R, Westerveld A, Voûte PA, Versteeg R (1996): Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. N Engl J Med <u>334</u>, 225 - 230

Chen J, Chattopadhyay B, Venkatakrishnan G, Ross AH (1990): Nerve growth factor-induced differentiation of human neuroblastoma and neuroepithelioma cell lines. Cell Growth Differ 1, 79 - 85

Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D u. a. (2009): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. J Clin Oncol <u>27</u>, 289 - 297

Costa E, Davis J, Grayson DR, Guidotti A, Pappas GD, Pesold C (2001): Dendritic spine hypoplasticity and downregulation of reelin and GABAergic tone in schizophrenia vulnerability. Neurobiol Dis <u>8</u>, 723 - 742

Costagli A, Felice B, Guffanti A, Wilson SW, Mione M (2006): Identification of alternatively spliced dab1 isoforms in zebrafish. Dev Genes Evol <u>216</u>, 291 - 299

Crosswell HE, Dasgupta A, Alvarado CS, Watt T, Christensen JG, De P, Durden DL, Findley HW (2012): PHA665752, a small-molecule inhibitor of c-Met, inhibits hepatocyte growth factor-stimulated migration and proliferation of c-Met-positive neuroblastoma cells. BMC Cancer <u>9</u>, 411

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995): A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. Nature <u>374</u>, 719 -723

D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T (1997): Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. J Neurosci <u>17</u>, 23 - 31

D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T (1999): Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. Neuron <u>24</u>, 471 - 479

DeSilva U, D'Arcangelo G, Braden VV, Chen J, Miao GG, Curran T, Green ED (1997): The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7. Genome Res <u>7</u>, 157 - 164

Dettmer U: Tumorentstehung und Tumortherapie: die Vorgänge auf Gen-Ebene; in: Genetik, Intensivkurs Biochemie; hrsg. v. Dettmer U, Folkerts M, Kächler E, Sönnichsen A; Urban & Fischer Verlag München 2005, 266 - 268

Dodelet VC, Pasquale EB (2000): Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. Oncogene <u>19</u>, 5614 - 5619

Dohi O, Takada H, Wakabayashi N, Yasui K, Sakakura C, Mitsufuji S, Naito Y, Taniwaki M, Yoshikawa T (2010): Epigenetic silencing of RELN in gastric cancer. Int J Oncol <u>36</u>, 85 - 92

Dong Y, Wang J, Sheng Z, Li G, Ma H, Wang X, Zhang R, Lu G, Hu Q, Sugimura H, Zhou X (2009): Downregulation of EphA1 in colorectal carcinomas correlates with invasion and

metastasis. Mod Pathol 22, 151 - 160

Donti E, Longo L, Tonini GP, Verdona G, Melodia A, Lanino E, Cornaglia-Ferraris P (1988): Cytogenetic and molecular study of two human neuroblastoma cell lines. Cancer Genet Cytogenet <u>30</u>, 225 - 231

Eggert A, Ho R, Ikegaki N, Liu XG, Brodeur GM (2000): Different effects of TRKA expression in neuroblastoma cell lines with or without MYCN amplification. Med Pediatr Oncol <u>35</u>, 623 - 627

Evans AE, Kisselbach KD, Yamashiro DJ, Ikegaki N, Camoratto AM, Dionne CA, Brodeur GM (1999): Antitumor activity of CEP-751 (KT-6587) on human neuroblastoma and medul-loblastoma xenografts. Clin Cancer Res <u>5</u>, 3594 - 3602

Fatemi SH (2001): Reelin mutations in mouse and man: from reeler mouse to schizophrenia, mood disorders, autism and lissencephaly. Mol Psychiatry <u>6</u>, 129 - 133

Ferrara N (2009): Vascular endothelial growth factor. Arterioscler Thromb Vasc Biol <u>29</u>, 789 - 791

Förster E, Tielsch A, Saum B, Weiss KH, Johanssen C, Graus-Porta D, Müller U, Frotscher M (2002): Reelin, Disabled 1, and β 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci USA <u>99</u>, 13178 - 13183

Frotscher M (1998): Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. Curr Opin Neurobiol <u>8</u>, 570 - 575

Frotscher M, Haas CA, Förster E (2003): Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold. Cereb Cortex <u>13</u>, 634 - 640

Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Kolla V, Kim J, Zhao H, Pawel BR, London WB, Maris JM, White PS, Brodeur GM (2008): CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. J Natl Cancer Inst <u>100</u>, 940 - 949

Gilbert SF: Neuronal Crest Cells and Axonal Specificity; in: Developmental Biology, Ninth Edition; hrsg. v. Sinauer AD; Sinauer Associates, Inc., Sunderland (Massachusetts, USA) 2010, 373 - 410 und 643 - 645

González JL, Russo CJ, Goldowitz D, Sweet HO, Davisson MT, Walsh CA (1997): Birthdate and cell marker analysis of scrambler: a novel mutation affecting cortical development with a reeler-like phenotype. J Neurosci <u>17</u>, 9204 - 9211

Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, Nimpf J, Herz J (2000): Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. J Biol Chem <u>275</u>, 25616 - 25624

Hack I, Hellwig S, Junghans D, Brunne B, Bock HH, Zhao S, Frotscher M (2007): Divergent roles of ApoER2 and VLDLR in the migration of cortical neurons. Development <u>134</u>, 3883 - 3891

Hafner C, Bataille F, Meyer S, Becker B, Roesch A, Landthaler M, Vogt T (2003): Loss of

EphB6 expression in metastatic melanoma. Int J Oncol 23, 1553 - 1559

Hanahan D (1997): Signaling vascular morphogenesis and maintenance. Science 277, 48 - 50

Hecht M, Papoutsi M, Tran HD, Wilting J, Schweigerer L (2004): Hepatocyte growth factor/c-Met signaling promotes the progression of experimental human neuroblastomas. Cancer Res <u>64</u>, 6109 - 6118

Hecht M, Schulte JH, Eggert A, Wilting J, Schweigerer L (2005): The neurotrophin receptor TRKB cooperates with c-Met in enhancing neuroblastoma invasiveness. Carcinogenesis 26, 2105 - 2115

Henrich K-O, Bauer T, Schulte J, Ehemann V, Deubzer H, Gogolin S, Muth D, Fischer M, Benner A, König R, Schwab M, Westermann F (2011): CAMTA1, a 1p36 tumor suppressor candidate, inhibits growth and activates differentiation programs in neuroblastoma cells. Cancer Res <u>71</u>, 3142 - 3151

Hero B, Berthold F (2002): Neuroblastom. Monatsschr Kinderheilkd 6, 775 - 788

Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J (1999): Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. Neuron <u>24</u>, 481 - 489

Hoe H-S, Lee KJ, Carney RSE, Lee J, Markova A, Lee J-Y, Howell BW, Hyman BT, Pak DTS, Bu G, Rebeck GW (2009): Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. J Neurosci <u>29</u>, 7459 - 7473

Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA (2000): Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human Reln mutations. Nat Genet $\underline{26}$, 93 - 96

Howell BW, Gertler FB, Cooper JA (1997): Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development. EMBO J <u>16</u>, 121 - 132

Howell BW, Herrick TM, Hildebrand JD, Zhang Y, Cooper JA (2000): Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development. Curr Biol <u>10</u>, 877 - 885

Ikeda Y, Terashima T (1997): Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. Dev Dyn <u>210</u>, 157 - 172

Kakodkar NC, Peddinti RR, Tian Y, Guerrero LJ, Chlenski A, Yang Q, Salwen HR, Maitland ML, Cohn SL (2011): Sorafenib inhibits neuroblastoma cell proliferation and signaling, blocks angiogenesis, and impairs tumor growth. Pediatr Blood Cancer, Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22147414

Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, Sakurai M, Tsuchida Y, Takeda T, Okabe I, Sakurai M (1987): Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas. Cancer Res <u>47</u>, 311 - 318

Kendall RL, Thomas KA (1993): Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity

by an endogenously encoded soluble receptor. Proc Natl Acad Sci USA 90, 10705 - 10709

Kim D-H, Magoori K, Inoue TR, Mao CC, Kim H-J, Suzuki H, Fujita T, Endo Y, Saeki S, Yamamoto TT (1997): Exon/Intron Organization, Chromosome Localization, Alternative Splicing, and Transcription Units of the Human Apolipoprotein E Receptor 2 Gene. J Biol Chem <u>272</u>, 8498 - 8504

Klar A, Baldassare M, Jessell TM (1992): F-spondin: a gene expressed at high levels in the floor plate encodes a secreted protein that promotes neural cell adhesion and neurite extension. Cell <u>69</u>, 95 - 110

Koch S, Strasser V, Hauser C, Fasching D, Brandes C, Bajari TM, Schneider WJ, Nimpf J (2002): A secreted soluble form of ApoE receptor 2 acts as a dominant-negative receptor and inhibits Reelin signaling. EMBO J <u>21</u>, 5996 - 6004

Kohno T, Hattori M (2010): Molecular mechanism and physiological significance of proteolytic cleavage of Reelin. Seikagaku <u>82</u>, 963 - 971

Kubo K-ichiro, Mikoshiba K, Nakajima K (2002): Secreted Reelin molecules form homodimers. Neurosci Res $\underline{43}$, 381 - 388

Kushner BH (2004): Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. J Nucl Med <u>45</u>, 1172 - 1188

Lambert de Rouvroit C, de Bergeyck V, Cortvrindt C, Bar I, Eeckhout Y, Goffinet AM (1999): Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase. Exp Neurol <u>156</u>, 214 - 217

Lonergan GJ, Schwab CM, Suarez ES, Carlson CL (2002): Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. Radiographics <u>22</u>, 911 - 934

Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA (1984): Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. N Engl J Med <u>311</u>, 231 - 235

Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM (1991): Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. J Clin Oncol <u>9</u>, 581 - 591

Lutter S, Xie S, Tatin F, Makinen T (2012): Smooth muscle-endothelial cell communication activates Reelin signaling and regulates lymphatic vessel formation. J Cell Biol <u>197</u>, 837 - 849

Lutz W, Schwab M (1997): In vivo regulation of single copy and amplified N-myc in human neuroblastoma cells. Oncogene <u>15</u>, 303 - 315

Maris JM (2010): Recent Advances in Neuroblastoma. N Engl J Med 362, 2202 - 2211

Maris JM, Weiss MJ, Guo C, Gerbing RB, Stram DO, White PS, Hogarty MD, Sulman EP, Thompson PM, Lukens JN, u. a. (2000): Loss of heterozygosity at 1p36 independently pre-

dicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. J Clin Oncol <u>18</u>, 1888 - 1899

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007): Neuroblastoma. Lancet 369, 2106 - 2120

Martensen PM, Oka K, Christensen L, Rettenberger PM, Petersen HH, Christensen A, Chan L, Heegaard CW, Andreasen PA (1997): Breast carcinoma epithelial cells express a very lowdensity lipoprotein receptor variant lacking the O-linked glycosylation domain encoded by exon 16, but with full binding activity for serine proteinase/serpin complexes and Mr-40,000 receptor-associated protein. Eur J Biochem <u>248</u>, 583 - 591

Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, u. a. (1999): Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cisretinoic acid. Children's Cancer Group N Engl J Med <u>341</u>, 1165 - 1173

Maurin J, Couble M, Didier-Bazes M, Brisson C, Magloire H, Bleicher F (2004): Expression and localization of reelin in human odontoblasts. Matrix Biol <u>23</u>, 277 - 285

May P, Herz J, Bock HH (2005): Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. Cell Mol Life Sci <u>62</u>, 2325 - 2338

Minturn JE, Evans AE, Villablanca JG, Yanik GA, Park JR, Shusterman S, Groshen S, Hellriegel ET, Bensen-Kennedy D, Matthay KK, Brodeur GM, Maris JM (2011): Phase I trial of lestaurtinib for children with refractory neuroblastoma: a new approaches to neuroblastoma therapy consortium study. Cancer Chemother Pharmacol <u>68</u>, 1057 - 1065

Mosch B, Reissenweber B, Neuber C, Pietzsch J (2010): Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis. J Oncol <u>2010</u>, 135285

Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM (1994): Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. Mol Cell Biol <u>14</u>, 759 - 767

Nakano Y, Kohno T, Hibi T, Kohno S, Baba A, Mikoshiba K, Nakajima K, Hattori M (2007): The extremely conserved C-terminal region of Reelin is not necessary for secretion but is required for efficient activation of downstream signaling. J Biol Chem <u>282</u>, 20544 - 20552

Naumov GN, Akslen LA, Folkman J (2006): Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. Cell Cycle <u>5</u>, 1779 - 1787

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR (2002): Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J Neurosci <u>22</u>, 3161 - 3173

Norgall S, Papoutsi M, Rössler J, Schweigerer L, Wilting J, Weich HA (2007): Elevated expression of VEGFR-3 in lymphatic endothelial cells from lymphangiomas. BMC Cancer <u>7</u>, 105

Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Igarashi J, Fujita T, Silverman KA, Xhao H, Mosse YP, White PS, Brodeur GM (2008): Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tu-

mor suppressor gene deleted in neuroblastomas. Oncogene 27, 803 - 810

Papaioannou G, McHugh K (2005): Neuroblastoma in childhood: review and radiological findings. Cancer Imaging <u>5</u>, 116 - 127

Penuel E, Martin GS (1999): Transformation by v-Src: Ras-MAPK and PI3K-mTOR mediate parallel pathways. Mol Biol Cell <u>10</u>, 1693 - 1703

Perrone G, Vincenzi B, Zagami M, Santini D, Panteri R, Flammia G, Verzì A, Lepanto D, Morini S, Russo A. (2007): Reelin expression in human prostate cancer: a marker of tumor aggressiveness based on correlation with grade. Mod Pathol <u>20</u>, 344 - 351

Podgrabinska S, Braun P, Velasco P, Kloos B, Pepper MS, Skobe M (2002): Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA <u>99</u>, 16069 - 16074

Quattrocchi CC, Wannenes F, Persico AM, Ciafré SA, D'Arcangelo G, Farace MG, Keller F (2002): Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. J Biol Chem <u>277</u>, 303 - 309

Reddy SS, Connor TE, Weeber EJ, Rebeck W (2011): Similarities and differences in structure, expression, and functions of VLDLR and ApoER2. Mol Neurodegener <u>6</u>, 30

Reiner O, Sapir T (2005): Similarities and differences between the Wnt and reelin pathways in the forming brain. Mol Neurobiol <u>31</u>, 117 - 134

Reynolds CP, Biedler JL, Spengler BA, Reynolds DA, Ross RA, Frenkel EP, Smith RG (1986): Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. J Natl Cancer Inst <u>76</u>, 375 - 387

Rha SE, Byun JY, Jung SE, Chun HJ, Lee HG, Lee JM (2003): Neurogenic tumors in the abdomen: tumor types and imaging characteristics. Radiographics <u>23</u>, 29 - 43

RKI & GEKID: Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends, 7. Ausgabe; hrsg. v. Robert Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.; Westkreuz-Druckerei, Berlin 2010, 11 - 113

Roy Choudhury S, Karmakar S, Banik NL, Ray SK (2012): Targeting angiogenesis for controlling neuroblastoma. J Oncol <u>2012</u>, 782020

Sakai K, Tiebel O, Ljungberg MC, Sullivan M, Lee H-J, Terashima T, Li R, Kobayashi K, Lu H-C, Chan L, Oka K (2009): A neuronal VLDLR variant lacking the third complement-type repeat exhibits high capacity binding of apoE containing lipoproteins. Brain Res <u>1276</u>, 11 - 21

Samama B, Boehm N (2005): Reelin immunoreactivity in lymphatics and liver during development and adult life. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol <u>285</u>, 595 - 599

Sanada K, Gupta A, Tsai L (2004): Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis. Neuron <u>42</u>, 197 - 211

Sato N, Fukushima N, Chang R, Matsubayashi H, Goggins M (2006): Differential and epige-

netic gene expression profiling identifies frequent disruption of the RELN pathway in pancreatic cancers. Gastroenterology $\underline{130}$, 548 - 565

Schramm A, von Schuetz V, Christiansen H, Havers W, Papoutsi M, Wilting J, Schweigerer L (2005): High activin A-expression in human neuroblastoma: suppression of malignant potential and correlation with favourable clinical outcome. Oncogene <u>24</u>, 680 - 687

Schwab M, Praml C, Amler LC (1996): Genomic instability in 1p and human malignancies. Genes Chromosomes Cancer <u>16</u>, 211 - 229

Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F (2003): Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. Lancet Oncol $\underline{4}$, 472 - 480

Schweigerer L (1995): Antiangiogenesis as a novel the rapeutic concept in pediatric oncology. J Mol Med $\underline{73},\,497$ - 508

Schweigerer L, Rave-Fränk M, Schmidberger H, Hecht M (2005): Sublethal irradiation promotes invasiveness of neuroblastoma cells. Biochem. Biophys Res Commun <u>330</u>, 982 - 988

Seeger RC (2011): Immunology and immunotherapy of neuroblastoma. Semin Cancer Biol 21, 229 - 2376

Seeger RC, Rayner SA, Banerjee A, Chung H, Laug WE, Neustein HB, Benedict WF (1977): Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines. Cancer Res <u>37</u>, 1364 - 1371

Seigel GM, Hackam AS, Ganguly A, Mandell LM, Gonzalez-Fernandez F (2007): Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. Mol Vis <u>13</u>, 823 - 832

Sentürk A, Pfennig S, Weiss A, Burk K, Acker-Palmer A (2011): Ephrin Bs are essential components of the Reelin pathway to regulate neuronal migration. Nature <u>472</u>, 356 - 360

Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B (1999): Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. Cancer <u>86</u>, 349 - 363

Shojaei F, Ferrara N (2007): Antiangiogenesis to treat cancer and intraocular neovascular disorders. Lab Invest <u>87</u>, 227 - 230

Smalheiser NR, Costa E, Guidotti A, Impagnatiello F, Auta J, Lacor P, Kriho V, Pappas GD (2000): Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci USA <u>97</u>, 1281 - 1286

Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F (2003): Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. Clin Cancer Res <u>9</u>, 52 - 58

Stanton BR, Parada LF (1992): The N-myc proto-oncogene: developmental expression and in vivo site-directed mutagenesis. Brain Pathol 2, 71 - 83

Stein T, Cosimo E, Yu X, Smith PR, Simon R, Cottrell L, Pringle M-A, Bell AK, Lattanzio L, Sauter G (2010): Loss of reelin expression in breast cancer is epigenetically controlled and

associated with poor prognosis. Am J Pathol 177, 2323 - 2333

Stockinger W, Brandes C, Fasching D, Hermann M, Gotthardt M, Herz J, Schneider WJ, Nimpf J (2000): The reelin receptor ApoER2 recruits JNK-interacting proteins-1 and -2. J Biol Chem <u>275</u>, 25625 - 25632

Strasser V, Fasching D, Hauser C, Mayer H, Bock HH, Hiesberger T, Herz J, Weeber EJ, Sweatt JD, Pramatarova A (2004): Receptor clustering is involved in Reelin signaling. Mol Cell Biol <u>24</u>, 1378 - 1386

Suenaga Y, Kaneko Y, Matsumoto D, Hossain MS, Ozaki T, Nakagawara A (2009): Positive auto-regulation of MYCN in human neuroblastoma. Biochem Biophys Res Commun <u>390</u>, 21 - 26

Thiele CJ (1998): Neuroblastoma Cell Lines; in: Human Cell Culture, Band 1; hrsg. v. Masters J und Palsson B; Kluwer Academic Publishers, Lancaster (UK) 1998, 21 - 53

Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA (1985): Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid induced morphological differentiation of human neuroblastoma. Nature <u>313</u>, 404 - 406

Tissir F, Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM (2002): The role of reelin in the development and evolution of the cerebral cortex. Braz J Med Biol Res <u>35</u>, 1473 - 1484

Tornóczky T, Semjén D, Shimada H, Ambros IM (2007): Pathology of peripheral neuroblastic tumors: significance of prominent nucleoli in undifferentiated/poorly differentiated neuroblastoma. Pathol Oncol Res <u>13</u>, 269 - 275

Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J (1998): Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. J Biol Chem <u>273</u>, 33556 - 33560

Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J (1999): Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. Cell <u>97</u>, 689 - 701

Urayama KY, Von Behren J, Reynolds P (2007): Birth characteristics and risk of neuroblastoma in young children. Am J Epidemiol <u>165</u>, 486 - 495

Utsunomiya-Tate N, Kubo K, Tate S, Kainosho M, Katayama E, Nakajima K, Mikoshiba K (2000): Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. Proc Natl Acad Sci USA <u>97</u>, 9729 - 9734

Wada RK, Seeger RC, Reynolds CP, Alloggiamento T, Yamashiro JM, Ruland C, Black AC, Rosenblatt JD (1992): Cell type-specific expression and negative regulation by retinoic acid of the human N myc promoter in neuroblastoma cells. Oncogene <u>7</u>, 711 - 717

Wang Q, Lu J, Yang C, Wang X, Cheng L, Hu G, Sun Y, Zhang X, Wu M, Liu Z (2002): CASK and its target gene Reelin were co-upregulated in human esophageal carcinoma. Cancer Lett <u>179</u>, 71 - 77

Weiss KH, Johanssen C, Tielsch A, Herz J, Deller T, Frotscher M, Förster E (2003): Malformation of the radial glial scaffold in the dentate gyrus of reeler mice, scrambler mice, and ApoER2/VLDLR-deficient mice. J Comp Neurol <u>460</u>, 56 - 65 Westermann F, Schwab M (2002): Genetic parameters of neuroblastomas. Cancer Lett <u>184</u>, 127 - 147

Yip JW, Yip YP, Nakajima K, Capriotti C (2000): Reelin controls position of autonomic neurons in the spinal cord. Proc Natl Acad Sci USA <u>97</u>, 8612 - 8616

Zhao S, Frotscher M (2010): Go or stop? Divergent roles of Reelin in radial neuronal migration. Neuroscientist $\underline{16}$, 421 - 434

Zhao S, Chai X, Förster E, Frotscher M (2004): Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. Development <u>131</u>, 5117 - 5125

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B (PKB)
ApoER2	Apolipoprotein-E-Rezeptor 2
APP	Amvloid precursor protein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATRA	all-trans-Retinsäure
her-ahl	Fusionsgen aus ber (<i>breaknoint cluster region</i>) und abl (<i>V-abl</i>
001-001	Abalson muring laukamig viral oncogene homolog 1)
DDME	Abelson murine leukemiu virui oncogene nomolog 1) Prain derived neurotrophic factor
DDNF	Drain-aerivea neuroirophic jacior
DEC	Diooa vascular enaoinellai cells
DFGF	Basic Jibroblast growth factor
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
Ca ₂	Kalzium
cDNA	komplementäre DNA
CH ₃ OH	Methanol
C ₂ H ₅ OH	Ethanol
cm	Zentimeter
c-Met	Mesenchymal-epithelial transition factor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	cycle threshold (Schwellenwertzyklus)
СТ	Computertomographie
C-terminal	Carboxy-terminal
CTR	C-terminale Region
Dab 1	Disabled-1
del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTDS	Dithiothreitol
FDTA	Fthylendiamintetraessigsäure
EGE	Enigermal growth factor
Eol	Ephiermal grown jacion
Epil EnhD1 2	Ephilin Enhrin Dozontoron D1 2
orbD2	$E_{\mu} = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{2} \sum_{n=1}^$
ciub2	v-ero-o2 eryinroolastic teukemia viral oncogene nomolog
et al.	et attait (und andere)
	ei ceiera
e. V.	eingetragener verein
FR2	Fetales Bovines Serum

Fc-Region	fragment crystallizable region
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
fwd	forward
g	Gramm
Ğ-418	Geneticin
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V.
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H2Odest	destilliertes Wasser
HEK-cell	Human embryonic kidney cell
HEK-Reln	Reelin-transfizierte HEK-Zellen
HEK-vec	Vektor (GFP)-transfizierte HEK-Zellen
HGF	Henatocyte growth factor
HIF	Hyporia inducible factor
HRP	Hypoma inaciste jacion Horseradish nerovidase
HIVEC	Human umbilical vein endothelial cell
Ig	Immunglobulin
INIPC	The International Neuroblastoma Pathology Classification
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INSS	International Neuroblastoma Staging System
in vitro	im Glas
	im Glas im Lebendigen
In VIVO Von	Kapital
Kap.	Kapiter
	Kilouase
	kilo Daltan
KDa VM	Kilo-Daltoli Vnoshanmark
	Liter
	Lilter Laktat Dahudraganaga
	Lymphatic enaothelial cell
LOH	Loss of heterozygosity
M	Marker
M	Molar $M^{(1)}$ (1, 10 ⁻³)
m-	$M1111-(1 \cdot 10^{-6})$
μ-	$Mikro(1.10^{\circ})$
MAPK	Mitogen-associated protein kinase pathway signalling
mIBG	Metajodbenzylguanidin
min	Minute
mind.	mindestens
MKI	Mitose-Karyorrhexis-Index
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
mVEGFR-1	membrane-bound isoform vom VEGFR
MWCO	Molecular Weight Cut Off (Einheit: Dalton)
MYCN	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma
	derived (avian)
NB	Neuroblastom(e)
NGF	Neuronal growth factor

OD	Optische Dichte
Р	Phosphorylierung
p53	Protein 53
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDab1	phosphoryliertes <i>Disabled-1</i>
рН	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PI3K	Inositol-Phosphat-3-Kinase Signalling
PNS	Peripheres Nervensystem
PTB-Region	Phoshothyrosin binding domaine
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	Rat sarcoma (Proto-Onkogen)
rcf	Relative centrifugal force
rev	reverse
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase</i> PCR
S.	Seite
S	Sekunde
s. a.	siehe auch
SDS	Sodium-Dodecvlsulfat
SFK	Sarc family kinase
Src	sarcoma
sVEGFR-12	soluble Vascular endothelial growth factor receptor 1. 2
SYBR Green I	asymmetrischer Cyanin-Farbstoff
Tab.	Tabelle
Tag	Thermus aquaticus
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TEMED	N.N.N'.N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Triton X-100	Octvlphenoxypolvethoxyethan
TRK A	Neurotrophin-Rezeptor A (<i>Neurotrophic tvrosine kinase. tvpe 1</i>)
TRK B	Neurotrophin-Rezeptor B (<i>Neurotrophic tyrosine kinase, type 2</i>)
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u	Einheit (unit)
u. a.	unter anderem
V	Volumen
v. a.	vor allem
vec	Vector, GFP-transfizierte HEK293-Zellen
VEGF-A, -C, -D	Vascular endothelial growth factor A, C, D
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
VIP	Vasointestinales Peptid
VLDLR	Verv-low-density-lipoprotein receptor
W	weight
Y185, -198, -200, -220, -232	Position von Tyrosinresten im Dab1-Protein
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Es ist mir ein Bedürfnis, meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wilting für das spannende Thema und für die hervorragend gute Betreuung während meiner Zeit in der Anatomie zu danken.

Großer Dank gebührt meinem Zimmergenossen Herrn Dr. Jürgen Becker für die unmittelbare Betreuung meiner Arbeit und die zahlreichen Gespräche und Diskussionen, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin Sonja Schwoch für die Einführung in die Zellkultur und die proteinbiochemischen Methoden. Auch Fabian Ludewig und Berti Manshausen habe ich für das Einarbeiten im Labor, insbesondere bei der Real-Time PCR und beim Western Blotting, sehr zu danken. Weiterhin zu nennen sind die technische Assistentin Christina Zelent sowie die Praktikanten Florian und Madeleine, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen. Auch danke ich Rod Dungan für die Unterstützung bei der Bearbeitung meiner Abbildungen.

Ich möchte der gesamten Abteilung danken für die wunderbare Zeit.

Last but not least sei meinen Eltern und Olaf für die Hilfe bei den Korrekturarbeiten gedankt.

... und wenn sie nicht gestorben sind, so blotten sie noch heute...!

Lebenslauf

Am 13. Mai 1984 wurde ich, Johanna Fröhlich, als erstes Kind meiner Eltern Elke Zagadzki (geb. Dall) und Hans-Erich Fröhlich in Potsdam geboren.

Von 1991 bis 1997 besuchte ich die Grundschule Bruno H. Bürgel und ab 1997 das evangelische Gymnasium Hermannswerder in Potsdam, an welchem ich im Juni 2004 meine Schulausbildung mit der Allgemeinen Hochschulreife abschloss.

Nach der Schulzeit absolvierte ich mein Freiwilliges Soziales Jahr in Matema/Tansania am Malawi-See und arbeitete in einem lutheranischen Krankenhaus.

Zum Sommersemester 2007 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August Universität zu Göttingen. Voraussichtlich werde ich das Studium im Sommer 2014 mit der 2. Ärztlichen Prüfung abschließen. Meine Famulaturen in Senftenberg und Itete/Tansania absolvierte ich in den Fächern Kardiologie, Onkologie, Endokrinologie sowie in der Ambulanz.

Nach Absolvierung der 1. Ärztlichen Prüfung im Frühjahr 2009 nahm ich die experimentellen Arbeiten meiner vorliegenden Dissertation mit dem Thema "Die Bedeutung von Reelin beim humanen Neuroblastom" in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wilting auf.