

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Quantitative mikroskopische Analyse der
Regulationsmechanismen der *Anaplastic Lymphoma*
Kinase in Neuroblastomzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Marten Schumacher

aus

Altena

Göttingen 2019

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

Referent: Prof. Dr. rer. nat. F. Wouters-Bunt

Ko - Referent: Prof. Dr. S. Jakobs

Drittreferent / -in:

Datum der mündlichen Prüfung: 13.01.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „**Quantitative mikroskopische Analyse der Regulationsmechanismen der *Anaplastic Lymphoma Kinase* in Neuroblastomzellen**“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 30.4.2019

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Neuroblastom.....	1
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.1.2 Klinik und Leitsymptome.....	5
1.1.3 Stadieneinteilung.....	6
1.1.4 Diagnostik.....	8
1.1.5 Therapie.....	10
1.1.6 Prognose und Nachsorge.....	12
1.2 Die <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i> und das Neuroblastom.....	13
1.2.1 Aufbau und Struktur des <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i> -Rezeptors.....	14
1.2.2 Aktivierungsmechanismen des ALK-Rezeptors.....	17
1.2.3 Mutationen des ALK-Rezeptors und das Neuroblastom.....	19
1.2.4 F1174L-Mutation.....	22
1.2.5 I1250T-Mutation.....	23
1.2.6 R1275Q-Mutation.....	23
1.2.7 Y1604F-Mutation.....	24
1.2.8 Wild Type ALK-Rezeptor.....	24
1.2.9 Die Signalwege des ALK-Rezeptors.....	25
1.2.10 Die Inhibition des ALK-Rezeptors als Therapieoption.....	26
1.2.11 Unterschiede in der Autophosphorylierung des ALK-Rezeptors.....	27
1.2.12 Ziele der Studie.....	28
2. Material.....	30
2.1 Geräte und Mikroskopie.....	30
2.2 Computersoftware und Internetadressen.....	31
2.3 Materialien.....	31
2.4 Chemikalien und Reagenzien.....	32
2.5 Puffer und Medien.....	33
2.6 Kits.....	33
2.7 Vektoren, cDNAs und verwendete Konstrukte.....	33
2.8 Zelllinien.....	34
2.9 Antikörper.....	35

3. Methoden	36
3.1 Molekularbiologische Methoden	36
3.2 Zellbiologische Methoden	37
3.2.1 Kulturbedingungen	37
3.2.2 Kultivierung der adhärennten Zellen.....	37
3.2.3 Transfektion der SK-N-AS-Zellen	37
3.3 Immunfluoreszenz	38
3.3.1 Zellfixierung	38
3.3.2 Antikörperfärbung	39
3.4 Mikroskopie.....	40
3.4.1 Quantitative Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie.....	40
3.4.2 Zeiss Cell Observer Z1	40
3.4.3 Aufnahmen der quantitativen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie	41
3.4.4 Datenanalyse	43
3.4.5 <i>Acceptor Photobleaching</i> mittels konfokaler FRET-Mikroskopie	46
3.4.6 CLSM Fluoview 1000	48
3.4.7 Aufnahmen der konfokalen FRET-Mikroskopie	48
3.4.8 Datenanalyse	49
4. Ergebnisse	52
4.1 Das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope.....	52
4.1.1 Wild Type ALK-Rezeptor	53
4.1.2 F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors	55
4.1.3 I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors	57
4.1.4 R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors	58
4.1.5 Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors.....	60
4.1.6 Das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors, der I1250T-Mutation und der Kontrollgruppe.....	63
4.1.7 Das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der F1174L-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors	67
4.1.8 Das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope im Vergleich zwischen dem Wild Type ALK-Rezeptor und seinen Mutationen	73
4.2 Das Dimerisierungsverhalten des ALK-Rezeptors.....	79
4.2.1 Das Verhältnis zwischen Donor und Akzeptor.....	79
4.2.2 Die FRET-Effizienz des Wild Type ALK-Rezeptors	81
4.2.3 Die FRET-Effizienz der F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors.....	84
4.2.4 Die FRET-Effizienz der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors.....	85

4.2.5	Die FRET-Effizienz der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors.....	86
4.2.6	Die FRET-Effizienz der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors	87
4.2.7	FRET-Effizienzen repräsentativer Neuroblastomzellen	88
5.	Diskussion.....	90
5.1	Die Rezeptoraktivität und das Phosphorylierungsniveau.....	90
5.2	Die Überexpression des Wild Type ALK-Rezeptors	92
5.3	Die Punktmutationen des ALK-Rezeptors	94
5.4	Die Qualitäten der Rezeptoraktivität	98
5.5	Die biologische Aktivität des ALK-Rezeptors.....	100
5.6	Das Phosphorylierungsniveau und die Zellmorphologie	101
5.7	Die Profile der Autophosphorylierung	104
5.8	Die Dimerisierung des ALK-Rezeptors	107
6.	Zusammenfassung.....	114
7.	Anhang.....	116
8.	Literaturverzeichnis.....	125

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des ALK-Rezeptors nach Lee et al. 2010	15
Abbildung 2: Strahlengang des Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops	41
Abbildung 3: Datenanalyse quantitative Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie	45
Abbildung 4: Strahlengang des CLSM.....	47
Abbildung 5: Bilder einer Aufnahmeserie.....	51
Abbildung 6: Binäre Masken.....	51
Abbildung 7: Expression des Wild Type ALK-Rezeptors	54
Abbildung 8: Expression der F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors.....	56
Abbildung 9: Expression der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors.....	58
Abbildung 10: Expression der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors.....	60
Abbildung 11: Expression der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors	62
Abbildung 12: Analyse des Phosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors, der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors und der Kontrollgruppe.....	65
Abbildung 13: Analyse des Phosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors.	71
Abbildung 14: Analyse des Phosphorylierungsniveaus der einzelnen ALK-Phospho- Epitope im Vergleich des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der I1250T-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation.....	76
Abbildung 15: Darstellung der Beziehung zwischen dem Mengenverhältnis von Donor (EGFP) und Akzeptor (mCherry).....	80
Abbildung 16: Die FRET-Effizienzen des Wild Type ALK-Rezeptors	82
Abbildung 17: Die FRET-Effizienz des Wild Type ALK-Rezeptors im Verhältnis von Donor (EGFP) und Akzeptor (mCherry) in 3:1	83
Abbildung 18: Die Die FRET-Effizienz der F1174L-Mutation zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor.....	84
Abbildung 19: Die FRET-Effizienz der I1250T-Mutation zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor.....	86

Abbildung 20: Die FRET-Effizienz der R1275Q-Mutation zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor.....	87
Abbildung 21: Die FRET-Effizienz der Y1604F-Mutation zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor.....	88
Abbildung 22: Repräsentative Aufnahmen von Zellen der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie zur Darstellung der FRET-Effizienzen.....	89
Abbildung 23: Schematische Darstellung möglicher Effekte der Autophosphorylierung der ALK-Phospho-Epitope.....	91
Abbildung 24: Die Relationen zwischen den ALK-Phospho-Epitopen	99
Abbildung 25: Epitope, die eine Sonderstellung einnehmen.....	106
Abbildung 26: Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test (<i>one-tailed</i>) des Verhältnisses von Donor zu Akzeptor 1:5.	110
Abbildung 27: Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test (<i>one-tailed</i>) des Verhältnisses von Donor zu Akzeptor 1:3.	113
Abbildung 28: Expression der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 des Wild Type ALK-Rezeptors.....	116
Abbildung 29: Expression der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 der F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors	117
Abbildung 30: Expression der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors	118
Abbildung 31: Expression der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors	119
Abbildung 32: Expression der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors	120
Abbildung 33: Analyse des Phosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der I1250T-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors.....	121
Abbildung 34: Analyse der Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 im Vergleich	124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: INSS nach Brodeur et al. 1993, übersetzt durch Schweinitz 2013.....	7
Tabelle 2: INRGSS nach Monclair et al. 2009, übersetzt durch Schweinitz 2013.....	8
Tabelle 3: Plasmide der Firma GeneCopoeia.....	34
Tabelle 4: Antikörper	35
Tabelle 5: LED-Module der Colibri-Beleuchtungseinheit	42
Tabelle 6: Wellenlängen der Filtersets EGFP HC und Cy3 HC	42
Tabelle 7: Belichtungszeiten der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie.....	43
Tabelle 8: Fluoreszenzfarbstoffe der konfokalen FRET-Mikroskopie	49

Abkürzungsverzeichnis

ALCL	<i>Anaplastic Large Cell Lymphoma</i>
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
A-Schleife	Aktivierungsschleife
AUG- α	FAM150B/Augmentor- α
AUG- β	FAM150A/Augmentor- β
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>
CT	Computertomografie
DALK	<i>Drosophila Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dp	Polymerisationsgrad
FCS	fetales Kälberserum
FDG-PET	Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomografie
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
hALK	humane <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
IDRF	<i>Image Defined Risk Factors</i>
IGF-I	<i>Insulin-Like Growth Factor I</i>
IGF-II	<i>Insulin-Like Growth Factor II</i>
IL	Interleukin
INRG	<i>International Neuroblastoma Risk Group Force</i>
INRGSS	<i>International Neuroblastoma Risk Group Staging System</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
LDH	L-Laktatdehydrogenase
LDLa	<i>Low-Density Lipoprotein Receptor Domain Class A</i>
LTK	Leukozyten-Tyrosinkinase
MAM	<i>Memprin, A5, Receptor Protein Tyrosin Phosphatase Mu</i>
MIBG	Meta-Jod-Benzylguanidin

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
NPM	Nucleophosmin
OR	<i>Odds Ratio</i>
PBS	phosphatgepuffertes Salzlösung-Gelatine-Gemisch
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC- γ	Phospholipase C- γ
ROI	<i>Region of Interest</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
WDF	Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion

1. Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein solider, maligner Tumor, der sich aus Neuroblasten, den Zellen des sympathischen Nervensystems, entwickelt. Eine Manifestation des Neuroblastoms ist überall dort im Körper möglich, wo sich sympathisches Nervengewebe befindet (Leitlinie Neuroblastom 2011).

Der Tumor tritt im Säuglingsalter auf. Im Mittel erkranken die Patienten im Alter von 19 Monaten (Brodeur et al. 2011). Durchschnittlich 40 % der Patienten zeigen das Krankheitsbild während des ersten Lebensjahres. Je älter die Kinder werden, desto unwahrscheinlicher ist eine Neuerkrankung. Insgesamt sind 90 % der Erkrankten jünger als sechs Jahre. Im Verhältnis machen Neuroblastome etwa 7 % der Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen aus und sind, nach den Tumoren des zentralen Nervensystems, die zweithäufigsten soliden Tumoren bei Kindern dieser Altersgruppe (Kaatsch und Spix 2015; Leitlinie Neuroblastom 2011).

Die Inzidenz in Deutschland liegt bei etwa 1 zu 5600. Jungen sind etwa 20 % häufiger betroffen als Mädchen. Aufgrund von ständig verbesserten diagnostischen Verfahren und Programmen zur Früherkennung der Erkrankung seit den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts stieg die Anzahl diagnostizierter Neuroblastome in den vergangenen Jahren kontinuierlich an (Kaatsch und Spix 2015). Eine frühere und häufigere Erkennung der Tumoren führte allerdings nicht zu einer Senkung der Letalität im Vergleich zu Kontrollgruppen, die nicht an den Früherkennungsprogrammen teilgenommen haben. Wegen des nicht nachweisbaren Nutzens der Programme zur Früherkennung wurden sie weltweit wieder eingestellt (Schilling et al. 2002; Tsubono und Hisamichi 2004; Woods et al. 2002). Obwohl die Früherkennungsprogramme nicht zu dem gewünschten Erfolg führten, kann aus der vermehrten Diagnose von Neuroblastomen, aufgrund von gesteigerter Diagnostik, der Schluss gezogen werden, dass die spontane Rückbildung der Tumoren - bei der Kontrollgruppe - ähnlich häufig vorkommt wie die klinische Manifestation der Erkrankung bei Patienten des Vorsorgeprogramms. Dementsprechend ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es eine Dunkelziffer an Patienten gibt, die an einem Tumor erkranken, der sich zurückbildet und nie klinisch diagnostiziert wird. Für diese Patienten ist es unerheblich, ob sie Teil des Vorsorgeprogramms oder der Kontrollgruppe sind, da die therapeutische Konsequenz davon unbeeinflusst bleibt (Brodeur et al. 2011).

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des Neuroblastoms ist nicht endgültig geklärt (Brodeur et al. 2011; Schweinitz 2013). In der Literatur wird eine Vielzahl möglicher Ursachen diskutiert. Roos et al. haben in zwei Studien im Jahr 2001 die Effekte von Chemikalien, elektromagnetischen Feldern und Bestrahlung untersucht. Dabei konnten sie feststellen, dass Kontakte mit Flüssigkeiten wie Diesel (*Odds Ratio* (OR) = 1,5) oder Lösungsmittel (OR = 10,4) das Risiko für ein Neuroblastom steigern, die Mehrzahl der untersuchten Chemikalien aber keinen schädlichen Einfluss ausübt. Es konnte keine eindeutige Korrelation zwischen elektromagnetischer Strahlung und einer vermehrten Entstehung von Neuroblastomen aufgezeigt werden (Roos et al. 2001b). Vorhandene pränatale Fehlbildungen des Kindes, besonders kardiale Fehlbildungen oder ein Schwangerschaftsdiabetes der Mutter, steigern das Risiko der Tumorgenese (Chow et al. 2007). Nachweislich protektiv gegenüber der Entstehung von Neuroblastomen wirken Infektionen mit Kinderkrankheiten wie Windpocken, Mumps oder Masern (OR = 0,6) sowie vorhandene Allergien (OR = 0,68) (Menegaux et al. 2004)

Ätiologisch bedeutsamer ist die genetische Prädisposition zur Entwicklung eines Neuroblastoms, die einem autosomal dominanten Vererbungsmuster folgt (Knudson und Strong 1972). Bei 1 % bis 2 % der Diagnosen kann eine familiäre Häufung festgestellt werden. Dabei sind vor allem Zwillinge prädestiniert (Friedman et al. 2005). Aufgrund der hohen Sterblichkeitsrate der Patienten vor ihrem Eintritt in die Pubertät sind Studien, die eine familiäre Prädisposition für diese Erkrankung belegen, wenig aussagekräftig und nicht reproduzierbar (Maris et al. 2002).

Durch eine Chromosomenanalyse bei Patienten mit erblich bedingten Neuroblastomen konnten Studien jedoch nachweisen, dass Mutationen des *Anaplastic Lymphoma Kinase*-Onkogens (ALK) zu einer erhöhten Aktivierung des ALK-Rezeptors führen. Punktmutationen innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne des ALK-Rezeptors steigern dessen Aktivität und resultieren in einem erhöhten onkogenen Potential. Daraus schließen die Autoren, dass Mutationen des ALK-Rezeptors die Hauptursache für die Entstehung eines erblich bedingten Neuroblastoms sind (Janoueix-Lerosey et al. 2008; Mosse et al. 2008). Darüber hinaus stellen sie fest, dass die Punktmutationen des ALK-Rezeptors nicht allein in den erblich bedingten Neuroblastomen vorkommen, sondern auch in sporadisch auftretenden Tumoren vorliegen (George et al. 2008; Mosse et al. 2008). Ein Gentest, mit dem Ziel Mutationen in diesem Onkogen zu finden, sollte immer dann durchgeführt werden, wenn ein Patient symptomatisch auffällig ist

oder eine familiäre Prädisposition für die Erkrankung nachgewiesen werden konnte (Brodeur et al. 2011).

Keimbahn-Mutationen, wie die des ALK-Onkogens, wirken vorausbestimmend für eine sich später manifestierende Tumorerkrankung. Die Mehrheit der von einem Neuroblastom betroffenen Patienten weist jedoch weder eine genetische Prädisposition auf noch stammen sie von einem Elternteil ab, der selbst an einem Neuroblastom erkrankt ist. Es wird angenommen, dass bei diesen Patienten zufällig entstandene Mutationen der Grund für die Tumorgenese sind (Brodeur et al. 2011). Die Ausgangsannahme ist, dass alle Neuroblastome eine gemeinsame Vorläuferzelle haben. Wie sich der Tumor klinisch verhält und welche biologische Struktur dieser schlussendlich aufweist, ist abhängig von den auftretenden Mutationen (Mosse et al. 2007).

Aus diesen Annahmen lassen sich drei Untergruppen ableiten: Die erste Gruppe beinhaltet Chromosomensätze, die einem hyperdiploiden oder nahezu triploiden Karyotyp entsprechen. Die Ausdehnung der Tumoren ist zumeist lokal begrenzt, und sie weisen ein niedriges Tumorstadium auf. Die Patienten sind in der Regel jünger als ein Jahr und ihre Prognose ist gut (Brodeur und Nakagawara 1992). Diese Untergruppe kann durch den Zugewinn oder den Verlust von ganzen Chromosomen beschrieben werden. Bei der zweiten Untergruppe handelt es sich um die aggressivste Gruppe unter den Neuroblastomen. Sie zeichnet sich durch eine existierende Amplifikation des N-Myc-Protoonkogens aus, die auch in Zusammenhang mit einer 1p-Deletion und einem 17p-Chromosomenzuwachs steht. Das klinische Verhalten der Tumoren der dritten Untergruppe ist ebenfalls aggressiv. Die Neuroblastome weisen häufig Deletionen an 3p, 4p und 11q sowie Zuwächse an 1q, 2p, 12q und 17q auf (Mosse et al. 2007).

Neben Mutationen im ALK-Protoonkogen spielt auch die Amplifikation des Protoonkogens MYCN eine Rolle bei der Entstehung von Neuroblastomen. Das MYCN-Onkogen befindet sich am kurzen distalen Arm des zweiten Chromosoms (2p24). Kommt es zu einer DNA-Amplifikation, entsteht diese in einer dort vorliegenden homogen gefärbten Region oder einem Doppel-Chromatinstück (Corvi et al. 1994). Etwa 25 % aller Neuroblastome weisen eine Amplifikation des MYCN-Gens auf (Brodeur und Fong 1989). Im Falle einer Genamplifikation an diesem DNA-Abschnitt ist das MYCN-Onkogen in der Regel immer Teil dieser Amplifikation. Eine Koamplifikation umliegender Genabschnitte ist möglich, jedoch scheint diese abhängig von der Amplifikation des MYCN-

Onkogens zu sein (Reiter und Brodeur 1996). Tumoren, die eine MYCN-Amplifikation aufweisen, enthalten zwischen 50 und 400 Kopien der DNA-Sequenz (Brodeur et al. 2011). Das MYCN-Onkogen kodiert einen Transkriptionsfaktor, der zu einem aggressiveren Tumorverhalten führt, sollte er vermehrt exprimiert werden. Eine MYCN-Amplifikation ist der wichtigste prognostische Faktor zur Beurteilung von Stadium und Prognose eines Neuroblastoms (Schweinitz 2013). Assoziiert wird sie mit Tumoren fortgeschrittener Stadien und einer schlechten Prognose für den betroffenen Patienten (Brodeur et al. 1984). In Verbindung mit einer MYCN-Amplifikation steht eine hohe Expression der MYCN-Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) (Nakagawara et al. 1992). Im Umkehrschluss bedeutet das jedoch nicht, dass ein hohes Expressionsniveau der MYCN-mRNA in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose für den Patienten steht. Stattdessen zeigen Cohn et al. in ihrer Studie, dass bei Tumoren mit hoher MYCN-mRNA Expression ohne MYCN-Amplifikation die Prognose für den Patienten unter Umständen sogar günstiger sein kann. Sie betonen, dass die MYCN-Amplifikation und nicht die Expression der MYCN-mRNA ausschlaggebend ist.

66 % aller Neuroblastome weisen einen DNA-Zuwachs am langen Arm des 17q-Chromosoms auf. Damit ist diese genetische Anomalie nachweislich die häufigste im Zusammenhang mit Neuroblastomzellen (Bown et al. 2001; Godfried et al. 2002). Entwickeln kann sie sich idiopathisch oder durch eine Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 17 (van Roy et al. 1997). Sehr häufig tritt sie zusammen mit einer MYCN-Amplifikation auf. Die Folge für den Patienten ist eine unverkennbar schlechtere prognostische Aussicht auf Heilung (Godfried et al. 2002). Das ist allerdings nur dann der Fall, wenn sich der Zuwachs auf Teile des Chromosoms beschränkt. Ist das gesamte Chromosom 17 mehrfach vorhanden, charakterisiert das den Tumor eher als prognostisch gut, da es vornehmlich in Tumoren der niedrigen Stadien vorkommt (Mosse et al. 2007).

Eine weitere sehr häufig auftretende Anomalie ist eine Deletion am Chromosom 1p36, die nahezu 25 % der Neuroblastome und ca. 87 % der Neuroblastomzelllinien aufweisen (White et al. 2005). Genauso wie der Zuwachs am 17q-Chromosom tritt die Deletion am Chromosom 1p zusammen mit der MYCN-Amplifikation bei Tumoren in fortgeschrittenen Stadien auf (Fong et al. 1989). Okawa et al. konnten einen Bereich auf dem Chromosom identifizieren, der 23 Gene enthält, die bei der Deletion dieser DNA-Sequenz verloren gehen. Das Tumorsuppressorgen CHD5 ist in dieser Region codiert

und von dem Genverlust betroffen. Patienten, die unter dem Verlust des Tumorsuppressorgens CHD5 leiden, kämpfen mit klinisch aggressiven Tumoren und sehen sich mit einer unverkennbar schlechteren Prognose konfrontiert (Fujita et al. 2008). Da die Region, die bei der 1p36-Deletion verloren geht, relativ groß ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dort weitere Tumorsuppressorgene, die bisher noch unbekannt sind, verloren gehen (Brodeur et al. 2011).

1.1.2 Klinik und Leitsymptome

Das Tumorwachstum ist für die betroffenen Patienten schmerzlos. Symptome entstehen durch das lokal verdrängende Wachstum des Tumors oder durch die von ihm ausgehenden Metastasen. Je nach Lokalisation des malignen Geschehens manifestieren sich andere ortstypische Symptome (Leitlinie Neuroblastom 2011). Häufig wird die Anwesenheit eines Neuroblastoms erst dann entdeckt, wenn der Tumor benachbarte Organe in ihrer Funktion einschränkt. Auch Zufallsbefunde im Zusammenhang mit bildgebenden Untersuchungen anderer Indikation sind bekannt (Schweinitz 2013).

65 % bis 75 % der Tumoren wachsen im Retroperitonealraum. Die Mehrzahl davon, etwa 50 %, entsteht im Gebiet des Nebennierenmarks, das andere Viertel liegt entlang des Truncus sympathicus. Dieser kann sowohl zervikal, thorakal als auch abdominal betroffen sein. 20 % der Neuroblastome am Grenzstrang sind thorakal zu finden, die verbleibenden Prozente verteilen sich auf die Beckenregion (3 % bis 4 %) und die Halsregion (1 % bis 2 %). Bei 1 % der Patienten kann kein Primärtumor identifiziert werden (Brodeur et al. 2011; Schweinitz 2013).

Die klinisch auftretenden Symptome sind vielfältig. Neuroblastome im Bereich der Orbita zeigen die Symptomatik eines Brillenhämatoms, jedoch ohne die typische Anamnese eines stumpfen Traumas. Ist der Tumor in der Halsregion lokalisiert, löst er bei etwa 10 % bis 15 % der Patienten ein Horner-Syndrom aus, einen Symptomkomplex aus Miosis, Ptosis und Enophthalmus. Im Falle der Thoraxinfiltration können Atemwege verlegt werden, was zu Husten, Dyspnoe oder vermehrt auftretenden Pneumonien führen kann. Übt der Tumor Druck auf den sympathischen Grenzstrang aus, können neurologische Ausfälle bis hin zur Querschnittslähmung die Folge sein. Manifestiert sich der Tumor hingegen im abdominalen Bereich, erleiden die Patienten Miktionsstörungen, z. B. durch Verlegungen der Harnwege (Brodeur et al. 2011; Leitlinie Neuroblastom 2011; Schweinitz 2013).

Neuroblastome metastasieren lymphogen (Brodeur et al. 2011; Leitlinie Neuroblastom 2011; Schweinitz 2013). Bei Diagnosestellung zeigen sich bei 70,5 % der Patienten Knochenmarksmetastasen, bei 55,7 % Knochenmetastasen, bei 30,9 % Metastasen in Lymphknoten, bei 29,6 % Metastasen in der Leber, bei 18,2 % intrakranielle Metastasen und Metastasen in der Orbita, bei 3,3 % Lungenmetastasen und in 0,6 % der Fälle Metastasen im zentralen Nervensystem (DuBois et al. 1999). Vor allem die Existenz von Lungenmetastasen ist ein negativer prognostischer Faktor, da sie sich in der Regel erst bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf manifestieren (Dubois et al. 2008).

Wie bei anderen Tumorerkrankungen leiden die Patienten auch beim Neuroblastom unter einer ausgeprägten B-Symptomatik. Reduzierter Allgemeinzustand, Fieber, Blässe, Kachexie, therapieresistenter Durchfall durch tumorbedingte Ausschüttung von vasoaktivem intestinalem Peptid oder Bluthochdruck durch die Katecholaminausschüttung begleiten die primären Symptome der Erkrankung. Eine stark ausgeprägte B-Symptomatik kann auf eine bereits stattgefundenene Metastasierung hindeuten (Leitlinie Neuroblastom 2011; Schweinitz 2013).

1.1.3 Stadieneinteilung

Aktuell werden Neuroblastome nach zwei gängigen Klassifikationen eingeteilt: Dem *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) (Tabelle 1) und dem *International Neuroblastoma Risk Group Staging System* (INRGSS) (Tabelle 2).

Das INSS wurde erstmals 1988 von Brodeur et al. vorgestellt und 1993 überarbeitet, um es dem klinischen Alltag und dem aktuellen wissenschaftlichen Stand anpassen zu können. Die Stadieneinteilung des Tumors erfolgt postchirurgisch, d. h. nach histologischer Aufbereitung des Tumorgewebes, welches nach einer Biopsie oder nach der gesamtheitlichen chirurgischen Entfernung des Tumors kategorisiert wird. Dies hat den Nachteil, dass das INSS nur bedingt bis gar nicht zur Therapieplanung eingesetzt werden kann. Des Weiteren wird die postoperative Stadieneinteilung durch den Operateur und die angewendete Operationstechnik beeinflusst (Schweinitz 2013). Die Kriterien des INSS sind: Die Resektabilität des Primärtumors und die lokale Ausdehnung des Tumors, bezogen auf eine mögliche Überschreitung der Körpermittellinie und/oder Metastasierung in lokoregionäre Lymphknoten sowie das Vorkommen von Fernmetastasen. Daneben werden noch spezielle Tumoren bei Säuglingen, die jünger als ein

Jahr sind, berücksichtigt, die trotz ihrer Einteilung in Stadium 4 eine günstige Prognose haben (Brodeur et al. 1993).

Tabelle 1: INSS nach Brodeur et al. 1993, übersetzt durch Schweinitz 2013

International Neuroblastoma Staging System (INSS)

Stadium 1	Lokalisierte Tumor mit makroskopisch kompletter Entfernung (mit oder ohne makroskopischer Resttumor); repräsentative ipsi- und kontralaterale Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall; mit dem Tumor entfernte anhängende Lymphknoten dürfen befallen sein
Stadium 2a	Lokalisierte Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung; repräsentative ipsilaterale (nicht am Tumor adhärenzte) Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall
Stadium 2b	Lokalisierte Tumor mit oder ohne makroskopisch komplette Entfernung; ipsilaterale, nicht adhärenzte Lymphknoten zeigen Tumorbefall, vergrößerte, kontralaterale Lymphknoten müssen histologisch negativ sein
Stadium 3	Nicht-resektabler, unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie mit oder ohne Lymphknotenbefall <ul style="list-style-type: none"> – Oder unilateral lokalisierte Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall – Oder Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration (nicht resektabel) oder durch Lymphknotenbefall <p>(Das Überschreiten der Mittellinie ist definiert durch infiltratives Erreichen/Überschreiten der Wirbelkante der Gegenseite)</p>
Stadium 4	Dissemination des Tumors in Fernlymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder andere Organe ausgenommen Stadium 4S
Stadium 4S	Lokalisierte Primärtumor bei Säuglingen im ersten Lebensjahr (definiert entsprechend der Stadien 1, 2a oder 2b) mit Dissemination in Haut, Leber und/oder das Knochenmark. Der Knochenmarksbefall muss minimal sein, d. h. in der Knochenmarksbiopsie oder Aspiration sind weniger als 10 % aller kernhaltigen Zellen maligne - bei größerem Anteil an Tumorzellen Einordnung als Stadium 4, MIBG-Szintigramm im Knochenmark negativ

Die *International Neuroblastoma Risk Group Force* (INRG) hat sich im Jahr 2006 die Erstellung einer neuen Tumorklassifikation zum Ziel gesetzt. Mit dem neu entwickelten Einteilungssystem soll der Tumor unabhängig von der gewählten Therapie und dem behandelnden Operateur in Stadien eingeteilt werden können. Dadurch soll die internationale Zusammenarbeit vereinfacht und die Vergleichbarkeit von Therapie- und Studienergebnissen ermöglicht werden (Ambros et al. 2009; Cohn et al. 2009; Monclair et al. 2009).

Um die Tumoren möglichst exakt ihren Stadien zuteilen zu können, wird initial ihre

Ausdehnung mit Hilfe bildgebender Diagnostik bestimmt. Die Kategorisierung richtet sich nach der Tumorausdehnung und in der Bildgebung erkennbaren *Image Defined Risk Factors* (IDRF). Die IDRF sind lokale Risikofaktoren, anhand derer eine Entscheidung über die Operabilität des Primärtumors und der Metastasen getroffen werden kann. Die IDRF sind Bestandteil der Bildgebung und leiten sich aus chirurgischen Risikofaktoren ab. Die Existenz chirurgischer Risikofaktoren bedeutet für den Patienten eine negativere Prognose, da aus ihnen intraoperative Komplikationen und eine geringere Rate an R0 Resektionen resultieren. Folglich ist es unbedingt erforderlich die IDRF bei der Therapieplanung zu berücksichtigen, da sie dem Chirurgen die präoperative Risikoabschätzung ermöglichen (Cecchetto et al. 2005; Monclair et al. 2015; Pohl et al. 2016).

Die IDRF wurden durch Monclair et al. eingeführt. Die Kriterien, nach denen die bildgebende Diagnostik ausgewertet werden soll, sind von Brisse et al. 2011 beschrieben worden.

Tabelle 2: INRGSS nach Monclair et al. 2009, übersetzt durch Schweinitz 2013

International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS)

Stadium L1	Lokoregionaler Tumor, der keine vitalen Strukturen (definiert nach IDRF) involviert
Stadium L2	Lokoregionaler Tumor mit einem oder mehr als einem IDRF
Stadium M	Fernmetastasen (ausgenommen Stadium MS)
Stadium MS	Metastasierende Erkrankung beschränkt sich Haut, Leber und/oder Knochenmark

1.1.4 Diagnostik

Die Basisdiagnostik soll klären, ob und in welcher Körperregion ein Primärtumor vorliegt und welche Größe die Raumforderung zum Diagnosezeitpunkt bereits einnimmt. Neben der körperlichen Untersuchung ist eine erste Bildgebung in Form einer Sonografie von Abdomen und Halsweichteilen sowie ein Röntgen-Thorax vorgesehen. Zusätzlich bietet sich die Kontrolle von spezifischen Tumormarkern an (Schweinitz 2013).

Mit Hilfe der Labordiagnostik lässt sich die Anwesenheit spezifischer Tumormarker feststellen. Neuroblastome bilden Katecholamine, deren Abbauprodukte Homovanillinsäure und Vanillinmandelsäure als Tumormarker im Urin nachgewiesen werden können (Krstulovic et al. 1979). Ein Neuroblastom gilt als diagnostiziert, wenn der Anstieg der Katecholamine und ihrer Abbauprodukte um den Faktor 3.0 SD größer ist als der mittlere Wert des Kreatinins in $\mu\text{mol}/\text{mmol}$, der für Patienten des entsprechenden Alters als Durchschnitt gilt. Diese erhöhten Werte können bei etwa 92 % der Patienten mit einem Neuroblastom nachgewiesen werden (Brodeur et al. 1993). Die Bestimmung der Katecholaminabbauprodukte hat die höchste Sensitivität aller diagnostischen Verfahren zur Identifikation eines Neuroblastoms (Verly et al. 2017).

Ein weiterer Marker ist die nachgewiesene Menge an Dopamin im Urin und Blutserum (Nakagawara et al. 1988). Mit ihm kann das adrenerge Verhalten des Tumors bestimmt werden. Um eine eindeutige Diagnose zu stellen, müssen zwei der drei Parameter erhöht sein (Schweinitz 2013). Erhöhte Werte, sowohl von Homovanillinsäure als auch von Vanillinmandelsäure und Dopamin, sprechen für eine schlechte Prognose des Patienten (Nakagawara et al. 1988).

Das Ferritin und die L-Laktatdehydrogenase (LDH) dienen als weniger spezifische Tumormarker des Blutserums. Hann et al. bringen einen erhöhten Ferritinwert in Zusammenhang mit Neuroblastomen der Stadien 4 und 4S. Sie beschreiben eine deutlich schlechtere Prognose für Patienten mit erhöhten Ferritinwerten (Hann et al. 1985). Das LDH-Niveau ist bei mehr als 80 % der Patienten mit einem Neuroblastom der Stadien 2, 4 und 4S erhöht (Quinn et al. 1980). Die im Blutserum vorhandene Menge der weniger spezifischen Marker kann ein Ausdruck für die Größe des Tumors sein. Allerdings haben das Ferritin und die LDH eine geringe diagnostische Sensitivität und Spezifität gegenüber der Bestimmung der Katecholaminabbauprodukte (Brodeur et al. 1993; Schweinitz 2013).

Ist eine Raumforderung lokalisierbar, kommt eine erweiterte bildgebende Diagnostik zum Einsatz. Mit Hilfe einer Computertomografie (CT) oder einer Magnetresonanztomografie (MRT) können der Primärtumor und große Metastasen dreidimensional dargestellt werden (Brodeur et al. 1993). Zur Identifikation von kleinen Metastasen eignet sich die Meta-Jod-Benzylguanidin-Szintigrafie (MIBG). Das Noradrenalinanalogon MIBG wird von mehr als 90 % der Neuroblastomen angereichert (Schweinitz 2013; Voute et al. 1985). Die MIBG-Szintigrafie hat eine hohe Sensitivität und Spezifität bei

der Erkennung von Neuroblastomen (Shulkin und Shapiro 1998). Das Verfahren eignet sich zudem gut dazu den Tumor einem Stadium zuzuordnen und eine prognostische Aussage treffen zu können (Matthay et al. 2003).

Nimmt ein Neuroblastom kein MIBG auf, ist die Alternative eine Ganzkörperdarstellung des Patienten durch eine Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomografie (FDG-PET), um das Ausmaß des gesamten Tumorbefalls feststellen zu können (Brodeur et al. 1993).

Vor Behandlungsbeginn ist eine Biopsie des Tumorweichgewebes obligat, da die Diagnose histologisch gesichert werden muss. Die Art und Weise, wie die Zellen entnommen werden, kann variieren: Die Feinnadelbiopsie ist ein sicherer und minimalinvasiver Weg, um Tumorgewebe zu entnehmen und eine verlässliche Diagnose stellen zu können (Ganick et al. 1988). Die offen-chirurgische Entnahme des Tumorgewebes ist ebenfalls zielführend und wird von vielen Operateuren bevorzugt (Brodeur et al. 2011).

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, eine Knochenmarkspunktion durchzuführen. Die Punktion kann auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen: Per Nadelpunktion oder per Stanzbiopsie (Franklin und Pritchard 1983). Obwohl eine klinische Relevanz der gewonnenen Informationen nicht endgültig geklärt ist, wird empfohlen dieses diagnostische Hilfsmittel bei jedem Patienten - mit Ausnahme von Säuglingen - anzuwenden (Burchill et al. 2016).

Die Differentialdiagnose im Fall eines Neuroblastoms ist nicht einfach. Die Tumoren präsentieren sich klinisch sehr unterschiedlich, und ca. 5 % bis 10 % bilden weder Katecholamine noch sind sie MIBG sensibel. Hinzu kommen die Patienten, bei denen kein primärer Tumor feststellbar ist (Brodeur et al. 2011).

1.1.5 Therapie

Die Therapiemöglichkeiten zur Behandlung eines Neuroblastoms sind umfangreich und müssen patientenindividuell abgestimmt werden. Die Entscheidung, welche Therapie Anwendung findet, richtet sich nach prognostischen Faktoren, wie dem Stadium der Erkrankung oder dem Alter des Patienten.

Kinder, die an einem Neuroblastom der Stadien 1 oder 2 leiden, können ausschließlich mit einer chirurgischen Tumorentfernung behandelt werden. Die Überlebensrate liegt

dabei bei 98 % (Perez et al. 2000). Ist eine radikalere Tumorresektion notwendig, sollten die Kinder älter als ein Jahr sein. Neuroblastome fortgeschrittener Stadien sind nicht allein chirurgisch zu therapieren, sondern zusätzlich mit weiteren begleitenden Therapien zu behandeln (Schweinitz et al. 2002). Die Effektivität der Kombinationstherapie, besonders bei Patienten mit Erkrankungen höherer Stadien, ist nach heutigem wissenschaftlichem Stand unumstritten. Hochrisiko-Neuroblastome können auf diese Weise kontrolliert und erfolgreich behandelt werden (Varan et al. 2015). Dabei ist es wichtig, dass das Tumorstadium operativ behandelt wird. Ob eine vollständige Tumorresektion durchgeführt wird, ist dabei von untergeordneter Wichtigkeit (Du et al. 2014).

Zu den begleitenden Therapien zählen Radio- und Chemotherapie und eine Kombinationstherapie. Mit der Bestrahlung des Primärtumors und der über die MIBG-Szintigrafie entdeckten Metastasen können zwischen 74 % und 84 % der Raumforderungen kontrolliert werden (Mazloom et al. 2014). Gegenüber Patienten, die nicht mit einer Ganzkörperbestrahlung therapiert worden sind, senkt diese Art der Bestrahlung das Risiko für die Entstehung eines Rezidivs um 25 % (Li et al. 2017). Die Strahlendosis wird je nach Größe und Lage des Primärtumors gewählt und sollte zwischen 15 Gray und 30 Gray liegen. Dabei ist die Strahlensensibilität der umliegenden Gewebe zu beachten (Paulino et al. 2002). Prinzipiell sind Neuroblastome strahlensensible Tumoren und der Einsatz einer Strahlentherapie kann die Überlebenschancen der Patienten verbessern. Patienten, bei denen der Tumor nicht auf eine Chemotherapie anspricht, können jedoch von der Bestrahlung des Tumorgewebes profitieren (Simon et al. 2006). Da es sich bei den Patienten um Kinder handelt, ist der Nutzen der Strahlentherapie immer in Relation zu möglichen Langzeitschäden der Therapie zu setzen und die Indikation dementsprechend äußerst streng zu stellen (Schweinitz 2013). Neben den gängigen Strahlentherapien ist es möglich, die MIBG-Diagnostik therapeutisch zu nutzen, indem man sie an einen Beta-Strahler (Jod 131) koppelt. MIBG speichernde Resttumoren können auf diese Art gezielt bestrahlt werden (Brodeur et al. 2011).

Die Gabe von Zytostatika ist ein weiteres wichtiges Standbein in der Tumorthherapie. In erster Linie profitieren Patienten von der Behandlung mit adjuvanter oder neoadjuvanter Chemotherapie, deren Tumoren in die mittleren und hohen Risikogruppen eingeordnet werden müssen. Die gebräuchlichen Präparate sind: Cisplatin, Carboplatin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Darcabacin, Etoposid, Ifosfamid, Vincristin und

Vindesin (Brodeur et al. 2011; Rubie et al. 2011). Ebenfalls möglich sind Kombinationen der verschiedenen Chemotherapeutika. Genutzt werden Kombinationen aus Melphalan mit Carboplatin und Etoposid. Diese Mega-Therapie oder myoablative Chemotherapie zerstört alle Stammzellen des Patienten, sodass ihr immer eine Stammzelltransplantation im Anschluss folgen muss. Patienten, die unter einem Hochrisiko-Neuroblastom leiden, profitieren sehr stark von der myoablative Chemotherapie. Ihre Überlebensrate steigt bei Anwendung der Therapiekombination deutlich an (Berthold et al. 2005; Matthay et al. 1999; Pritchard et al. 2005). Die intensive Therapie, die bei der Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen heute verwendet wird, ist nicht ohne Risiko. Fünf Jahre nach Therapieende entwickeln 0,72 % der Patienten eine zweite maligne Erkrankung. Nach zehn Jahren sind es 1,8 %. Im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe tragen diese Patienten ein 18 Mal höheres Risiko, an einem weiteren malignen Geschehen zu erkranken (Applebaum et al. 2017).

1.1.6 Prognose und Nachsorge

Im Durchschnitt liegt die Fünfjahresüberlebensrate der Patienten bei etwa 80 %, die Zehnjahresüberlebensrate bei ca. 78 % und die Fünfzehnjahresüberlebensrate bei etwa 76 % (Kaatsch und Spix 2015). Bei der Fünfjahresüberlebensrate ist die individuelle Prognose allerdings stark davon abhängig, in welche Risikogruppe die Patienten bei Diagnose eingeordnet werden müssen. Befindet sich die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in einem fortgeschrittenen Stadium und handelt es sich um ein Hochrisiko-Neuroblastom z. B. mit einer MYCN-Amplifikation, liegt die Letalität deutlich höher. Patienten mit Tumoren im Stadium 4S überleben im Mittel lediglich zwölf Monate. Etwa 30 % der Patienten sind 24 Monate nach Diagnosestellung noch am Leben (Canete et al. 2009). Die Prognose bei Neuroblastomen der niedrigen und mittleren Risikostufen sowie Neuroblastomen der höheren Stadien ohne MYCN-Amplifikation ist wesentlich günstiger. Die Fünfjahresüberlebensrate dieser Patienten liegt zwischen 87 % und 95 % bzw. zwischen 78 % und 87 % bei Stadium 4S ohne MYCN-Amplifikation (Di Cataldo et al. 2017).

Aufgrund von späteren Rezidiven und Langzeitnebenwirkungen der Therapien sollten die Patienten zehn Jahre in einem Tumornachsorgeprogramm regelmäßig untersucht werden (Schweinitz 2013). Die Beurteilung, ob ein Tumor therapiesensibel ist, wird anhand von Veränderungen der Tumorgöße und des Tumolvolumens bestimmt (Brodeur et al. 1993). Zusätzlich zu den regelmäßigen bildgebenden Untersuchungen soll-

ten die Tumormarker untersucht werden. Daneben sind mögliche Spätfolgen der Therapie, wie Nierenschäden, Schäden am Hörorgan, kardiologische Beeinträchtigungen oder Wachstumsstörungen zu untersuchen und auszuschließen (Leitlinie Neuroblastom 2011).

1.2 Die *Anaplastic Lymphoma Kinase* und das Neuroblastom

Im Jahr 1994 veröffentlichten Morris et al. und Shiota et al. ihre Studien über die Entdeckung eines bis dahin unbekanntes Fusionsproteins im Zusammenhang mit dem *Anaplastic Large Cell Lymphoma* (ALCL), einer Unterart des Non-Hodgkin-Lymphoms. Das neu entdeckte Protein hat ein Molekulargewicht von ca. 80 kDa und verdankt seinen Namen - *Anaplastic Lymphoma Kinase* - der Erkrankung in dessen Zusammenhang es entdeckt wurde. Vor der Transkription dieser Rezeptor-Tyrosinkinase findet eine Translokation an den Chromosomen 2 und 5 statt. Bei dieser Mutation fusioniert das Nucleophosmin-Gen (NPM) auf Chromosom 5q35 mit dem ALK-Gen auf Chromosom 2p23, wodurch der N-Terminus des NPM mit der katalytischen Domäne der *Anaplastic Lymphoma Kinase* verbunden wird. Daraufhin ist die Zelle in der Lage das NPM-ALK zu bilden und zu exprimieren. Weiter fanden die Autoren heraus, dass die unkontrollierte Expression des NPM-ALK zu einer malignen Transformation des ALCL führen kann.

Dass die Tyrosinkinase des NPM-ALK lediglich der intrazelluläre Teil des vollständigen ALK-Rezeptors ist, wurde 1997 deutlich. Durch Untersuchungen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) des ALK entdeckten Morris et al. und Iwahara et al. die *Anaplastic Lymphoma Kinase* in ihrer vollen Länge. Die Expression des ALK-Rezeptors beginnt am elften embryonalen Tag und ist infolgedessen bei Neugeborenen besonders hoch. Die mRNA, die während der Transkription entsteht, ist im Wesentlichen im Gehirn und im Rückenmark lokalisiert. Dort wird der Rezeptor nach umfangreicher Glykosylierung an der Zellmembran der Nervenzellen exprimiert und nimmt eine Rolle bei der physiologischen Entwicklung und Funktion des Gehirns und des zentralen Nervensystems ein. Während des Heranwachsens nimmt das Expressionsniveau des ALK-Rezeptors kontinuierlich ab. Im Erwachsenenalter ist der Rezeptor lediglich noch in neuronalen Geweben nachweisbar. Zudem ist das Expressionsniveau des ALK-Rezeptors in den neuronalen Geweben zu diesem Zeitpunkt äußerst gering (Pulford et al. 1997).

1.2.1 Aufbau und Struktur des *Anaplastic Lymphoma Kinase*-Rezeptors

Das Fusionsprotein NPM-ALK entsteht aus der t(2;5)(p23;q35) Translokation und hat ein Molekulargewicht von ca. 80 kDa. Bei der Mutation entsteht eine DNA, an deren 5'-Ende sich der Anteil des NPM-Gens und an deren 3'-Ende sich der Anteil des ALK-Gens befindet. Daraus wird gefolgert, dass im Anschluss an die Translokation das NPM-Gen die Rolle eines aktiven Promotors einnimmt (Morris et al. 1997). Bedeutsam ist im Hinblick darauf, dass der physiologische Promotor des ALK-Gens normalerweise inaktiv ist. Das NPM-ALK-Gen entwickelt durch diese Mutation eine onkogene Eigenschaft (Iwahara et al. 1997).

Die DNA des vollständigen ALK-Rezeptors besteht aus 6226 Basenpaaren auf Chromosom 2. Das Startcodon ist ein ATG und liegt an den Nukleotiden 912 bis 914. Darauf folgen 4857 Basenpaare, die das Protein kodieren. In Richtung des 3'-Terminus schließen sich 455 Basenpaare mit einem untranslatierten Bereich an. Die DNA im Bereich der 3'-Sequenz, die die Tyrosinkinase des Rezeptors kodiert, ist beim NPM-ALK-Fusionsprotein identisch mit der DNA des vollständigen ALK-Rezeptors (Morris et al. 1997).

Die vollständige humane ALK-Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) ist ein Polypeptid, welches aus 1620 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 177 kDa hat. Es besteht eine strukturelle Ähnlichkeit mit den Insulinrezeptoren. Die Anordnung der Aminosäuren zwischen der ALK und der Leukozyten-Tyrosinkinase (LTK) sind zu 57 % identisch und ähneln sich zu weiteren 71 % sehr stark. Die *Anaplastic Lymphoma Kinase* durchläuft eine post-translatorische Modifikation, bei der an 16 Ansatzpunkten innerhalb der extrazellulären Domäne des Rezeptors eine Glykosylierung stattfinden kann. Die Glykosylierung erfolgt auf dem Weg vom Ribosom über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zellmembran. Dabei werden Kohlenhydrate an Stickstoffatome gebunden, wodurch sich das Molekulargewicht des vollständigen Rezeptors auf insgesamt etwa 220 kDa erhöht (Morris et al. 1997). Wird die Glykosylierung inhibiert, entstehen zwei verschiedene Proteine, eines mit 180 kDa und ein anderes mit 140 kDa. Der Ursprung des 140 kDa schweren Proteins ist nicht bekannt. Eine mögliche Ursache ist ein anderes Startcodon während der Translation oder die Entstehung durch Proteolyse (Iwahara et al. 1997).

Der finale ALK-Rezeptor besteht aus einem Transmembransegment, dessen Primärstruktur sich aus drei Untereinheiten zusammensetzt (Abbildung 1):

Extrazellulär befindet sich der N-Terminus des Proteins beginnend mit Aminosäure 1 bis Aminosäure 1030. Darauf folgt eine transmembrane Domäne mit 26 Aminosäuren und der intrazelluläre Anteil des Proteins mit 563 Aminosäuren, welcher am C-Terminus endet. Die Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors befindet sich im Bereich des intrazellulären Anteils zwischen den Aminosäuren 1116 und 1383 (Lee et al. 2010).

Den Aufbau der extrazellulären Domäne beschreiben Loren et al. im Zusammenhang mit ihren Untersuchungen zur Drosophila-ALK (DALK). Sie entdecken, dass der Aufbau der DALK und der humanen ALK (hALK) sehr ähnlich ist und übertragen ihre Entdeckungen zum DALK auf das hALK. Die extrazelluläre Domäne enthält, ausgehend vom N-Terminus des Proteins, ein *Low-Density Lipoprotein Receptor Domain Class A*-Motiv (LDLa-Motiv), eine *Memprin, A5, Receptor Protein Tyrosin Phosphatase Mu*-Domäne (MAM-Domäne) und kurz vor der Zellmembran einen Bereich mit einem hohen Anteil an Glycin. Lee et al. ergänzen 2010 in ihrer Studie zum Aufbau der katalytischen Domäne den extrazellulären Bereich des ALK-Rezeptors um eine weitere MAM-Domäne, die noch vor dem LDLa-Motiv in Richtung des N-Terminus liegt. MAM-Domänen kommen häufig innerhalb von Transmembranproteinen vor und erfüllen dort ihre Aufgaben im Rahmen von Zell-Zell-Wechselwirkungen (Beckmann und Bork 1993). Sie bestehen aus ca. 150 bis 160 Aminosäuren und machen den ALK-Rezeptor einzigartig unter den Rezeptoren der Insulinfamilie, da MAM-Regionen nur im ALK-Rezeptor vorkommen (Loren et al. 2001).

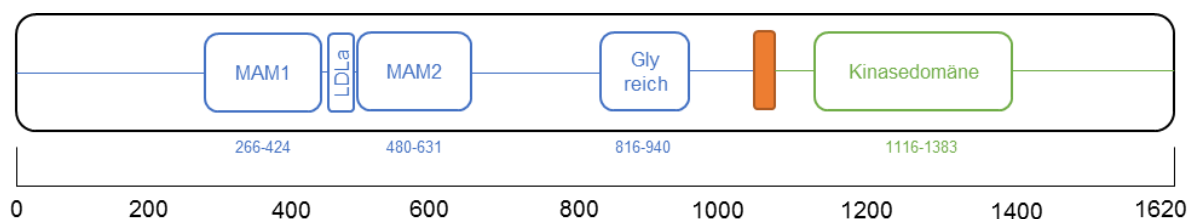


Abbildung 1: Aufbau des ALK-Rezeptors nach Lee et al. 2010

Die dreidimensionale Struktur der intrazellulären Kinase-Domäne des ALK-Rezeptors konnte erstmals 2010 durch Bossi et al. und Lee et al. vollständig beschrieben werden. Die Kinase-Domäne weist den immer wiederkehrenden, klassischen Aufbau der

Kinase-Domänen der Insulinrezeptoren auf. Proximal liegt eine kleinere N-terminale Schleife, bestehend aus den Aminosäuren 1093 bis 1199, distal davon folgt eine größere C-terminale Schleife, aufgebaut aus den Aminosäuren 1200 bis 1399. Die Verbindung zwischen beiden Schleifen bildet eine Scharnierregion, über die sich die Adenosintriphosphat-Bindungsstelle zwischen den Schleifen formt.

Die NT-Schleife setzt sich aus einer fünfsträngigen, antiparallelen β -Faltblattstruktur mit einer benachbarten α C-Helix zusammen. Die Aminosäuren 1096 bis 1103 weisen die Sekundärstruktur einer β -Schleife auf, wodurch sich dieser Bereich des β -Faltblatts an die α C-Helix anlehnt. Die β -Schleife beeinflusst die räumliche Ausrichtung der Aktivierungsschleife des ALK-Rezeptors entscheidend. Umso bemerkenswerter ist es, dass die anderen Rezeptoren der Familie der Insulinrezeptoren an diesem Punkt einen anderen strukturellen Aufbau zeigen und die β -Schleife dort nicht existiert und somit einzigartig für den ALK-Rezeptor ist.

Die CT-Schleife setzt sich aus acht α -Helices zusammen: α D, α EF und α F bis α I. Hinzu kommen zwei zweisträngige β -Faltblattstrukturen in der Umgebung der Scharnierregion, oberhalb von α D und α E.

Die Aminosäuren 1270 bis 1299, inmitten der CT-Schleife, bilden die Aktivierungsschleife (A-Schleife) des Rezeptors. Die A-Schleife setzt sich aus einer zweisträngigen antiparallelen β -Faltblattstruktur, β 1 und β 2, zusammen und liegt in ihrer Konformation relativ exponiert. Über Bindungen an α C-Helix und NT-Schleife stabilisiert sich die Konformation der A-Schleife (Bossi et al. 2010; Lee et al. 2010).

In der A-Schleife stehen aliphatische Seitenketten des Arg1275 und Arg1279 über chemische Bindungen mit der α C-Helix, der β -Schleife innerhalb der NT-Schleife an Tyr1096 und mit dem Phe1245 im katalytischen Zentrum in Kontakt. Als Teil des RAS-Motivs trennt die Aminosäure Arg1279 die erste Tyrosinkinase Tyr1278 der A-Schleife von der zweiten Tyrosinkinase Tyr1282 und der dritten Tyrosinkinase Tyr1283. Tyr1278 wird mit einer möglichen malignen Entartung des ALK-Rezeptors in Verbindung gebracht und ist eine Tyrosinkinase, an der bevorzugt eine Autophosphorylierung stattfindet (Bossi et al. 2010; Lee et al. 2010). Die Tyrosine Tyr1282 und Tyr1283 werden durch Morris et al. 1997 ebenfalls mit einer möglichen Autophosphorylierung in Zusammenhang gebracht. Die Autoren begründen das mit den Gemeinsamkeiten im Aufbau zwischen dem ALK-Rezeptor und der Insulinrezeptorfamilie.

Wang et al. haben bei Ihren Studien zum NPM-ALK das Tyr156, welches dem Tyr1096

im vollständigen ALK-Rezeptor entspricht, als eine Stelle identifiziert, an der bei Aktivierung des Rezeptors ebenfalls eine Autophosphorylierung stattfindet.

1.2.2 Aktivierungsmechanismen des ALK-Rezeptors

Tyrosinkinase sind wichtige Enzyme zur Regulierung der intrazellulären Signalwege sowie der interzellulären Signaltransduktion. Ihre Aktivierung und die Aktivität dieser Rezeptoren ist physiologisch streng reguliert. Veränderungen in der Struktur, z. B. durch Mutationen oder in Hinblick auf die exprimierte Menge der Tyrosinkinase an der Membran einer Zelle, können zu Veränderungen der Kinaseaktivität führen (Blume-Jensen und Hunter 2001).

Die *Anaplastic Lymphoma Kinase* galt lange Zeit als Waisen - (*orphan*) - Rezeptor. Aktuelle Studien belegen jedoch die Existenz von bislang drei Liganden, nach deren Bindung der ALK-Rezeptor aktiv wird.

Zwei der Liganden des ALK-Rezeptors sind die Zytokine FAM150B/Augmentor- α (AUG- α) und FAM150A/Augmentor- β (AUG- β). AUG- α ist hoch affin gegenüber dem ALK-Rezeptor, bindet stabil und aktiviert den Rezeptor im Anschluss an die Bindung. AUG- α kommt in Neuroblastomen vor, fördert die Transformation von Zellen und das Interleukin-3 (IL) unabhängige Zellwachstum. AUG- β bindet in erster Linie spezifisch an Leukozyten-Tyrosinkinase und hat nur eine geringe Affinität zum ALK-Rezeptor. AUG- β geht mit dem ALK-Rezeptor eine schwache Bindung ein (Reshetnyak et al. 2015). AUG- α und AUG- β sind in der Lage, sowohl an den Wild Type ALK-Rezeptor, als auch an dessen Mutationen zu binden und diese zu aktivieren. Die bereits erhöhte Aktivität, die einige der Mutationen aufweisen, wird auf diese Weise nochmals gesteigert (Guan et al. 2015).

Der dritte Ligand des ALK-Rezeptors ist das Heparin. Die Reaktion des ALK-Rezeptors, im Anschluss an die Bindung dieses Liganden, ist abhängig von der Kettenlänge bzw. dem Polymerisationsgrad des Heparins. Ab einem Polymerisationsgrad (dp) von 15 dp kommt es zu einer Autophosphorylierung, Dimerisierung und Aktivierung des ALK-Rezeptors. Liegt der Polymerisationsgrad des Heparins unterhalb von 15 dp, resultiert daraus keine Reaktion des Rezeptors (Murray et al. 2015).

Der ALK-Rezeptor zeigt eine hohe Substratspezifität. Liganden, die an andere RTK binden und diese aktivieren, haben auf die Aktivität des ALK-Rezeptors keinen Einfluss. Diesen Umstand führen die Autoren auf die strukturellen Unterschiede innerhalb

der A-Schleifen des ALK-Rezeptors und den mit ihm verwandten IRK zurück (Donella-Deana et al. 2005).

Der strukturelle Aufbau des ALK-Rezeptors ist in weiten Teilen identisch mit dem anderer Rezeptoren der Insulinrezeptorfamilie (Morris et al. 1997). Im Unterschied zu den übrigen Rezeptoren der Insulinrezeptorfamilie befindet sich in der A-Schleife des ALK-Rezeptors das *RAS*-Motiv, eine Aminosäuresequenz, die allein im ALK-Rezeptor zu finden ist und die in den anderen Rezeptoren der Insulinrezeptorfamilie nicht existiert (Donella-Deana et al. 2005). Donella-Deana et al. fanden heraus, dass es zwischen einem synthetisierten Protein, welches die A-Schleife des ALK-Rezeptors und dadurch das *RAS*-Motiv und die nebenliegenden Tyrosinkinasen Tyr1278, Tyr1282 und Tyr1283 enthält, und einem vollständigen ALK-Rezeptor zu einer Wechselwirkung kommt. Diese Wechselwirkung resultiert in der Phosphorylierung des Tyr1278. Werden die drei Tyrosine durch Phenylalanine ersetzt, zeigt sich ein anderes Phosphorylierungsmuster: Ersetzten die Autoren ausschließlich das Tyr1278 durch ein Phenylalanin, kam es an dieser Position zu keiner Phosphorylierung. Wurden dagegen das Tyr1282 und Tyr1283 durch Phenylalanine ausgetauscht, wurde auch das Protein an Tyr1278 stärker phosphoryliert (Donella-Deana et al. 2005).

Die synthetisch hergestellten Proteine der A-Schleife zeigen eine Autophosphorylierung, sobald sie energetisch die Möglichkeit zur Phosphorylierung bekommen. Das lässt den Rückschluss zu, dass sich der ALK-Rezeptor bei Aktivierung identisch verhält (Donella-Deana et al. 2005). Während jedes Aktivierungsvorganges einer RTK der Insulinrezeptorfamilie werden die Tyrosine der A-Schleife des Rezeptors in der identischen Reihenfolge phosphoryliert. Die Autophosphorylierung beginnt am zweiten Tyrosin (Tyr1162), danach erfolgt sie am dritten Tyrosin (Tyr1163) und endet mit der Phosphorylierung des ersten Tyrosins (Tyr1158) (Dickens und Tavaré 1992; Levine et al. 1991). Donella-Deana et al. fanden heraus, dass sich der ALK-Rezeptor von den RTK der Insulinrezeptorfamilie in diesem Punkt unterscheidet. Bei der Autophosphorylierung des ALK-Rezeptors wird das erste Tyrosin (Tyr1278) deutlich stärker phosphoryliert als die anderen beiden Tyrosine der A-Schleife. Anstelle des zweiten Tyrosins, wie bei den anderen RTK der Insulinrezeptorfamilie, ist das erste Tyrosin des ALK-Rezeptors das Hauptziel der Autophosphorylierung. Die Bedeutung des Tyr1278 bei der Autophosphorylierung des ALK-Rezeptors wurde von den Autoren durch weitere Experimente hervorgehoben. Bei den Experimenten wurde entweder das Tyr1278

allein oder das Tyr1282 zusammen mit dem Tyr1283 durch Phenylalanine ersetzt. Durch den Austausch des zweiten und dritten Tyrosins gegen je ein Phenylalanin steigt das Phosphorylierungsniveau des ALK-Rezeptors über das Phosphorylierungsniveau des unveränderten Rezeptors. Wird dagegen das Tyr1278 durch ein Phenylalanin ersetzt, sinkt das Phosphorylierungsniveau des ALK-Rezeptors unter das Niveau des unveränderten Rezeptors. Die Autoren vermuten den Grund in einer Konformationsveränderung des ALK-Rezeptors. Nach Austausch des Tyr1282 und Tyr1283 blockieren diese gering phosphorylierten Tyrosine das katalytische Zentrum des aktiven ALK-Rezeptors nicht mehr, sodass das gesamte Phosphorylierungsniveau ansteigt (Donella-Deana et al. 2005).

Um den Mechanismus der Autophosphorylierung des ALK-Rezeptors bei seiner Aktivierung noch weiter zu untersuchen, übertrugen Tartari et al. die Ergebnisse von Donella-Deana et al. auf das NPM-ALK. Neben dem Phosphorylierungsniveau untersuchen Tartari et al. zusätzlich das biologische Verhalten des Rezeptors. So stellen sie genau wie Donella-Deana et al. fest, dass der Austausch des zweiten und dritten Tyrosins keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des Rezeptors hat. Das Potential zur onkogenen Transformation bleibt ebenfalls erhalten. Der Austausch des ersten Tyrosins, sowie aller drei Tyrosine, gegen ein Phenylalanin führt dagegen zu einem Absinken des Phosphorylierungsniveaus, wie auch zum Verlust des onkogenen Potentials des Rezeptors (Tartari et al. 2008).

Für das NPM-ALK ist bekannt, dass es während der Aktivierung dimerisiert. Diese Dimerisierung führt zu einer Phosphorylierung innerhalb der A-Schleife aufgrund einer Autophosphorylierung des NPM-ALK (Bischof et al. 1997; Cordell et al. 1999). Das Dimerisierungsverhalten des vollständigen ALK-Rezeptors ist bis jetzt kaum untersucht.

1.2.3 Mutationen des ALK-Rezeptors und das Neuroblastom

Eine Vielzahl von Forschungsgruppen bringen den vollständigen ALK-Rezeptor sowohl mit der Pathogenese von sporadischen Neuroblastomen als auch von hereditären Neuroblastomen in Verbindung. Der ALK-Rezeptor kann in 99 % aller Neuroblastome nachgewiesen werden. In 48 % der Fälle liegt der Rezeptor phosphoryliert vor (Regairaz et al. 2016). Eine Ursache für die Entstehung von Neuroblastomen ist die Überexpression des ALK-Rezeptors. Sie steht in Zusammenhang mit Tumoren fortgeschrittener Stadien und resultiert in einer ungünstigen Prognose für die Patienten

(Lee et al. 2017; Schulte et al. 2011; Wang et al. 2013). DNA-Amplifikationen allein oder in Verbindung mit Translokationen am ALK-DNA-Locus sind weitere Gründe für die Entwicklung von Neuroblastomen. Mit ihnen werden ein aggressives Tumorverhalten und auftretende Rezidive assoziiert (Cazes et al. 2013). Die Folgen der DNA-Translokationen sind ein hohes Phosphorylierungsniveau des ALK-Rezeptors sowie verstärkte Aktivierung der nachfolgenden STAT3- und ERK-Signalwege (Fransson et al. 2015).

Als Hauptursache der Pathogenese von Neuroblastomen gelten Punktmutationen in der Aminosäuresequenz des ALK-Rezeptors, die zu einer vermehrten Aktivität des Rezeptors führen (Caren et al. 2008; Chen et al. 2008; George et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008; Mosse et al. 2008). Chand et al. teilen die Mutationen des ALK-Rezeptors, die im Zusammenhang mit Neuroblastomen vorkommen, in drei Kategorien ein: Mutationen, die ohne Bindung eines Liganden aktiv werden können, wie z. B. die F1174L- oder die R1275Q-Mutation. Mutationen, wie die I1250T-Mutation, die keine Kinaseaktivität aufweisen und Mutationen, die nur nach Bindung eines Liganden aktiv werden.

Neuroblastomzellen transkribieren Mutationen des ALK-Rezeptors etwa doppelt so häufig und in größerer Menge als die Wild Type ALK-Rezeptoren. Die Expressionsniveaus der Mutationen entsprechen sich im Vergleich untereinander. Klinisch und prognostisch übereinstimmend ungünstig verhalten sich Neuroblastome, die mutierte ALK-Rezeptoren enthalten und Tumoren, die eine Überexpression des Wild Type ALK-Rezeptors aufweisen. Die Autoren schließen daraus, dass die Existenz von Mutationen des ALK-Rezeptors oder die Überexpression des Wild Type ALK-Rezeptors für einen malignen Phenotyp des Neuroblastoms charakteristisch sind (Schulte et al. 2011).

Punktmutationen des ALK-Rezeptors sind die Ursache für 11 % bis 12,4 % der sporadischen Neuroblastome und spielen eine entscheidende Rolle bei ihrer Entstehung (Caren et al. 2008; Mosse et al. 2008). Punktmutationen, die in Verbindung mit einem sporadischen Neuroblastom stehen, sind zum Beispiel: D1091N, M1166R, I1171N, F1174I, F1174L, F1245C, F1245V und I1250T (Mosse et al. 2008). Demgegenüber sind Punktmutationen die Hauptursache für die Entstehung hereditärer Neuroblastome. Abhängig von der Mutation sind sie in mehr als 50 % der hereditären Neuroblastome zu finden. G1128A, R1192P und R1275Q sind Beispiele für Punktmutationen, die in hereditären Neuroblastomen entdeckt worden sind (Mosse et al. 2008).

Die meisten der mehr als 35 bekannten Mutationen des ALK-Rezeptors, die für die Entstehung von sporadischen oder hereditären Neuroblastomen verantwortlich sind, sind Punktmutationen (Hallberg und Palmer 2016). 85 % aller Punktmutationen konzentrieren sich auf drei Hotspots entlang der primären Aminosäuresequenz: F1174 (34,7 %), F1245 (10 %) und R1275 (49 %). F1174 wird gegen L, I, V, C oder S ausgetauscht, F1245 gegen L, I, V oder C und R1275 wird gegen Q oder L ausgewechselt (Bresler et al. 2014; Brouwer et al. 2010; Chen et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008).

Die Punktmutationen beeinflussen die Struktur des Rezeptors sowohl in seiner phosphorylierten als auch in seiner unphosphorylierten Form. Mutationen an den Aminosäuren F1174 und F1245 haben die größten strukturellen Auswirkungen im Hinblick auf die Aktivität des ALK-Rezeptors. Als Folge der Mutationen werden inhibitorisch wirkende, chemische Bindungen zwischen diesen Aminosäuren und den Seitenketten einiger Phenylalanine unmöglich, wodurch der mutierte Rezeptor in seiner inaktiven Form nicht mehr stabilisiert werden kann (Bossi et al. 2010; Bresler et al. 2014; Lee et al. 2010). Die katalytische Aktivität der beiden Mutationen entspricht dann in etwa der des Wild Type ALK-Rezeptors in seiner autophosphorylierten Form (Bresler et al. 2011). Alle ausschlaggebenden, struktureinflussenden Mutationen liegen entweder in der Aktivierungsschleife (Y1278 und R1275) oder in der α C-Helix (M1166, I1170 und I1171) des ALK-Rezeptors (Bossi et al. 2010; Lee et al. 2010). Sie begünstigen die Autophosphorylierung des ALK-Rezeptors und demzufolge dessen Aktivität ohne Bindung eines Liganden (Bresler et al. 2014).

Im Vergleich zum Wild Type ALK-Rezeptor zeigen die Mutationen ebenso eine gesteigerte Kinaseaktivität wie auch eine übermäßige Aktivierung der angeschlossenen Signalwege. Die Aktivierung der nachfolgenden intrazellulären Signalwege scheint mutationsspezifisch zu erfolgen (Caren et al. 2008; Chen et al. 2008; Mosse et al. 2008).

Die Expression des ALK-Rezeptors ist in jedem Tumorstadium nachweisbar. Sie ist auf kein Stadium begrenzt (Osajima-Hakomori et al. 2005). Die Majorität der Mutationen konzentriert sich auf Neuroblastome der fortgeschrittenen Stadien und steht in Zusammenhang mit einer ungünstigen Prognose für den Patienten (Chen et al. 2008). Bei Vorliegen einer Punktmutation sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten um 33 % (Caren et al. 2008). Die mutierten ALK-Rezeptoren weisen eine Autophosphorylierung auf und zeigen im Vergleich mit dem Wild Type ALK-Rezeptor einen

höheren Grad der Phosphorylierung, eine starke Kinaseaktivität und eine größere Aktivität der nachfolgenden Signalwege (Chen et al. 2008). Mosse et al. folgern daraus, dass eine Mutation des ALK-Rezeptors zu einer onkogenen Entartung des Rezeptors führt.

Mazot et al. beschreiben die Lokalisation des ALK-Rezeptors innerhalb der Zelle. Der Wild Type ALK-Rezeptor wird an der Zellmembran exprimiert. Die Mehrzahl der Mutationen des ALK-Rezeptors dagegen sind aufgrund einer fehlerhaften Glykosylierung im Zellinneren an Zellorganellen, wie das Endoplasmatische Retikulum oder den Golgi-Apparat, gebunden. Mazot et al. schließen daraus, dass die gesteigerte Aktivität der Mutationen des ALK-Rezeptors den intrazellulären Transport erschwert und in einer Akkumulation des Rezeptors im Zellinneren resultiert. ALK-Rezeptormutationen, die entgegen diesem Umstand dennoch an der Zellmembran exprimiert werden, zeigen ein gesteigertes Phosphorylierungsniveau gegenüber den Rezeptoren im Zellinneren (Mazot et al. 2011).

1.2.4 F1174L-Mutation

Die F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors macht etwa 34,7 % der Punktmutationen des ALK-Rezeptors aus (Brouwer et al. 2010). Während der Transkription kommt es in Exon 23 zu einem Austausch von Cytosin zu Adenin, wodurch an der Position 1174 in der primären Aminosäuresequenz des ALK-Rezeptors ein Phenylalanin durch ein Leucin ersetzt wird (Chen et al. 2008; George et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008; Mosse et al. 2008). Die Punktmutation ist in der Kinase-Domäne des ALK-Rezeptors lokalisiert und wird mit der Entstehung von sporadischen/somatischen Neuroblastomen in Verbindung gebracht (Lee et al. 2010; Mosse et al. 2008). Folge der Mutation ist eine verstärkte Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR- und MAPK-Signalwegs (Berry et al. 2012).

In 10,9 % aller Fälle tritt eine Punktmutation des ALK-Rezeptors zusammen mit einer MYCN-Amplifikation auf. Mit 41 % treten an Position F1174L die meisten Punktmutationen im Zusammenhang mit einer MYCN-Amplifikation auf (Bresler et al. 2014; Brouwer et al. 2010). Liegen eine MYCN-Amplifikation und die Punktmutation F1174L gemeinsam innerhalb eines Neuroblastoms vor, ergibt sich daraus eine schlechtere Prognose für die Patienten. Brouwer et al. vermuten, dass es einen kooperativen Effekt zwischen diesen beiden Anomalien gibt. Die F1174L-Mutation zeigt ein hohes Maß an Autophosphorylierung und eine starke Tendenz zur malignen Transformation (Berry et

al. 2012; Brouwer et al. 2010). Eine intrinsische und eine erworbene Immunität der F1174L gegenüber dem Inhibitor Crizotinib erschwert die Therapie zusätzlich (Sasaki et al. 2010).

1.2.5 I1250T-Mutation

Der Austausch der Aminosäure Isoleucin gegen Threonin findet in Exon 25 statt. Die dadurch entstehende Punktmutation liegt in der Kinase-Domäne des ALK-Rezeptors (Lee et al. 2010). Aus der Mutation resultiert eine kinasetote Variante des ALK-Rezeptors. Sie zeigt keinerlei Kinaseaktivität, an ihr ist keine Phosphorylierung nachzuweisen, und die in der Regel aktivierten Signalwege bleiben ebenfalls inaktiv. Die I1250T-Mutation ist nicht für die Entstehung oder das Voranschreiten von Neuroblastomen verantwortlich. Vielmehr scheint die gleichzeitige Expression von Wild Type ALK-Rezeptor und I1250T-Mutation an der Zellmembran zu verdeutlichen, dass die kinasetote Mutation als dominanter negativer Rezeptor gegenüber dem Wild Type ALK-Rezeptor wirken kann (Schonherr et al. 2011).

1.2.6 R1275Q-Mutation

Die R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors ist mit 49 % die am häufigsten auftretende Punktmutation des ALK-Rezeptor (Brouwer et al. 2010). Die Mutation entsteht während der Transkription des ALK-Rezeptors in Exon 25 und resultiert in einem Austausch der Aminosäuren Arginin gegen Glutamin an Position 1275. Damit liegt die Mutation innerhalb der A-Schleife des ALK-Rezeptors. Ähnlich wie die F1174L-Mutation führt die R1275Q-Mutation zu einer gesteigerten Kinaseaktivität und wird im Vergleich zum Wild Type ALK-Rezeptor vermehrt exprimiert. Das Vorkommen dieser Punktmutation wird sowohl mit der Entstehung von Neuroblastomen hereditären Ursprungs als auch mit der Entstehung von sporadisch auftretenden Neuroblastomen in Verbindung gebracht (Chen et al. 2008; George et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008; Mosse et al. 2008).

Die R1275Q-Mutation tritt, genau wie die F1174L-Mutation, im Zusammenhang mit einer MYCN-Amplifikation auf, jedoch nicht so häufig. Im Vergleich mit der F1174L-Mutation zeigt sie ebenfalls sowohl ein geringeres Maß an Autophosphorylierung als auch ein geringeres Potential zur malignen Entartung des Tumors (Brouwer et al. 2010). Dennoch hat die R1275Q-Mutation ein großes onkogenes Potential und ist eine Ursache für die Entstehung, das Wachstum und die Metastasierung des Neu-

roblastoms (Ueda et al. 2016). Der Inhibitor Crizotinib ist in der Lage, das Tumorwachstum von Neuroblastomen, die die R1275Q-Mutation allein oder zusammen mit der MYCN-Amplifikation aufweisen, nahezu vollständig zu inhibieren (Bresler et al. 2011; Ueda et al. 2016).

1.2.7 Y1604F-Mutation

Die Y1604F-Mutation, als Teil des vollständigen ALK-Rezeptors, ist noch wenig untersucht, jedoch entspricht sie der Y664F Mutation des NPM-ALK. Bei der Punktmutation wird an der Position 1604 bzw. 664 die Aminosäure Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt (Bai et al. 1998; Wang et al. 2010). Der Austausch der beiden Aminosäuren hat starke Auswirkungen auf die Eigenschaften des Rezeptors, dessen onkogenes Potential deutlich verringert wird. Das Expressionsniveau des Y664F-NPM-ALK sinkt stark, der Rezeptor wird nicht mehr phosphoryliert, und es kommt zu keiner Zellmigration oder Zellproliferation mehr. Infolge der mangelnden Phosphorylierung zeigen die nachfolgenden Signalwege STAT3, AKT und EKR ebenfalls eine stark verringerte Aktivität (Hu et al. 2016; Shi et al. 2013).

Beim vollständigen ALK-Rezeptor kann im Vergleich zur F1174L-Mutation an Position Y1604 keine Phosphorylierung festgestellt werden. Die Autoren folgern daraus, dass der ALK-Rezeptor durch die Mutation inaktiv wird (McDuff et al. 2013).

1.2.8 Wild Type ALK-Rezeptor

Expriemieren Neuroblastomzellen den Wild Type ALK-Rezeptor anstelle von Punktmutationen, wirkt sich dieser Umstand positiv auf die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten aus (Schulte et al. 2011). Wird der Wild Type ALK-Rezeptor jedoch stark überexprimiert, d. h. steigt das Expressionsniveau des Wild Type ALK-Rezeptors innerhalb der Zellen auf das Expressionsniveau der Punktmutationen, verschlechtert sich die Prognose für die Patienten deutlich. Die Größenordnung, in der sich die Überexpression des Wild Type ALK-Rezeptors negativ auf die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten auswirkt, steht in direktem Zusammenhang mit seinem Expressionsniveau. Daraus schließen die Autoren, dass sowohl die Punktmutationen als auch die Überexpression des Wild Type ALK-Rezeptors in gleichem Maße eine Tumorgenese auslösen können (Montavon et al. 2014; Passoni et al. 2009; Schulte et al. 2011). Die Existenz einer kritischen Schwellenmenge an expriemierten Wild Type ALK-Rezeptoren ist die Voraussetzung dafür, dass eine Tumorgenese durch Überexpression aus-

gelöst werden kann (Passoni et al. 2009). Eine große Menge exprimierter ALK-Rezeptoren kann ein Kriterium für die Beurteilung der Aggressivität eines Neuroblastoms sein, sollte jedoch nicht als alleiniger prognostischer Faktor Berücksichtigung finden (Lee et al. 2017). Befindet sich der Tumor in einem fortgeschrittenen Stadium, steigt die Menge an exprimierten ALK-Rezeptoren. Lee et al. und Wang et al. stellen einen Zusammenhang zwischen einem hohen Expressionsniveau des Wild Type ALK-Rezeptors und Hochrisiko-Neuroblastomen her.

Der Inhibitor Crizotinib hat einen Einfluss auf die Tumoren, die den Wild Type ALK-Rezeptor exprimieren. Er schränkt das Wachstums dieser Neuroblastome effektiv ein (Bresler et al. 2011). Demzufolge ist der Wild Type ALK-Rezeptor ein vielversprechendes therapeutisches Ziel (Passoni et al. 2009). Im Rahmen der Therapie ist zu beachten, dass Patienten mit ALK-Rezeptor-positiven Neuroblastomen ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Rezidiven aufweisen (Lee et al. 2017).

1.2.9 Die Signalwege des ALK-Rezeptors

Der ALK-Rezeptor an der Zellmembran aktiviert eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen: PLC- γ , PI3K/AKT, RAS/MAPK, JAK/STAT und RAS/JNK.

Die Bedeutung des Phospholipase C- γ (PLC- γ)-Signalwegs wurde von Bai et al. im Zusammenhang mit dem NPM-ALK bei ihren Forschungen zum ALCL entdeckt. Das NPM-ALK interagiert über das Tyr664 mit der PLC- γ , die daraufhin phosphoryliert und aktiv wird. Das Tyr664 des NPM-ALK entspricht dem Tyr1096 in der Primärstruktur des humanen ALK-Rezeptors. Die Interaktion des NPM-ALK kann dementsprechend auf das hALK übertragen werden (Bai et al. 1998).

Der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-Signalweg wird auch durch das NPM-ALK angesprochen. Über eine Verbindung zwischen dem NPM-ALK und der C-terminalen SH-Domäne des PI3K wird der PI3K/AKT-Signalweg aktiviert, der das apoptotische Verhalten der Zelle reguliert (Bai et al. 2000). Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FOXO3a, was wiederum eine Zellproliferation stimuliert und die Apoptose der Zelle inhibiert (Gu et al. 2004). Neben FOXO3a wird am Ende des PI3K/AKT-Signalwegs auch das Protein mTOR vermehrt phosphoryliert. Die Serin/Threonin-Kinase mTOR bindet an Ribosomen, wodurch eine Proteintranslation angeregt wird (Vega et al. 2006). mTOR kann zusätzlich über den ALK/RAS/MAPK-Signalweg aktiviert werden (Marzec et al. 2007). Der RAS/MAPK-Signalweg seinerseits wird über die Achse GRB2/SHC phosphoryliert (Fujimoto et al. 1996).

Ein weiterer Signalweg im Kontext der Aktivierung durch NPM-ALK ist der JAK/STAT-Signalweg. Der ALK-Rezeptor phosphoryliert und aktiviert JAK 3 und STAT 3, wodurch eine gesteigerte Expression des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Bcl-x(L) resultiert. Das Bcl-x(L) bietet der Zelle ausreichend Schutz gegenüber Inhibitoren des JAK/STAT-Signalweges oder der Bcr-Abl-Kinase und auf diese Weise die Möglichkeit einer unkontrollierten malignen Entartung (Amin et al. 2004; Zamo et al. 2002). Eine alleinige Aktivierung des STAT3-Signalweges durch den ALK-Rezeptor ist ebenfalls möglich (Moog-Lutz et al. 2005).

Der ALK-RAS-JNK-Signalweg hat ebenfalls das onkogene Potential zur Entwicklung eines Neuroblastoms. Die Stresskinase JNK phosphoryliert JUN, einen onkogenen Transkriptionsfaktor (Fuchs et al. 1996). Eine Inhibition des ALK-Rezeptors hat eine verringerte Phosphorylierung von JNK und JUN und der damit verbundenen Transkriptionsfaktoren zur Folge.

1.2.10 Die Inhibition des ALK-Rezeptors als Therapieoption

Wie zuvor beschrieben exprimieren die Neuroblastomzellen eine größere Menge von Mutationen des ALK-Rezeptors als von Rezeptoren des Wild Type ALK. Entsprechend den Expressionsniveaus können die Mutationen des ALK-Rezeptors auch in größerer Anzahl inhibiert werden. Duijkers et al. schließen daraus, dass die Mutationen unter Umständen anfälliger für eine Inhibition sind als das Wild Type ALK.

Ein Inhibitor des ALK-Rezeptors ist das Crizotinib. Das Crizotinib blockiert die Phosphorylierung der c-Met-Kinase und des ALK-Rezeptors im ALCL. Die Inhibition des ALK-Rezeptors wirkt sich auf die nachgeschalteten Signalwege aus. Die Aktivität des PLC- γ -, STAT3-, ERK-Kinasen- und AKT-Signalweges nimmt im gleichen Maß ab, in dem der Rezeptor inhibiert wird. Die Tumorzellen, in denen der ALK-Rezeptor inhibiert wird, leiten die Apoptose ein (Christensen et al. 2007; Hamedani et al. 2014).

Bresler et al. untersuchen die Auswirkungen des Crizotinib auf die Aktivität des in Neuroblastomzellen exprimierten ALK-Rezeptors. Sie stellen fest, dass der ALK-Rezeptor in Neuroblastomzellen, im Vergleich zum ALCL, anders auf die Inhibition mit Crizotinib anspricht. Die Effektivität des Medikaments wird durch eventuelle Punktmutationen des Rezeptors mitbeeinflusst. Mutationen und Amplifikationen des ALK-Rezeptors reagieren wesentlich sensibler auf Crizotinib als der Wild Type ALK-Rezeptor. Bei alleiniger Betrachtung der Mutationen stellen die Autoren fest, dass die F1174L-Mutation

signifikant weniger sensibel auf das Crizotinib reagiert als z. B. die R1275Q-Mutation (Bresler et al. 2011).

Aktuell wird an einer neuen Generation von Inhibitoren geforscht, um Mutationen therapieren zu können, die gegen bisher bekannte und genutzte Medikamente resistent sind. 2016 entdeckten Infarinato et al. den neuen, hoch potenten ALK-Inhibitor Lorlatinib. Es ist in der Lage, die Crizotinib-resistente ALK-Mutation F1174L sowohl im Mausmodell als auch auf humanen Xenografttransplantaten im Mausmodell zu inhibieren. Mit diesem Inhibitor kann im Mausmodell eine vollständige Regression sowohl von Crizotinib-sensiblen Neuroblastomen als auch von bis dato nicht Crizotinib-sensiblen Neuroblastomen erreicht werden (Infarinato et al. 2016). X-396 ist ebenfalls ein Inhibitor der zweiten Generation von ALK-Inhibitoren. Die Autoren fanden heraus, dass der Inhibitor X-396 ein besseres therapeutisches Ergebnis liefert als das Crizotinib. Im Mausmodell verhindert das X-396 eine Zellproliferation der Neuroblastomzellen und führt zu einer Regression des Neuroblastoms (Di Paolo et al. 2015).

Ein weiterer Inhibitor des ALK-Rezeptors ist das Alectinib. Dieses Medikament ist in der Lage, die Autophosphorylierung des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-Mutation und der R1275Q-Mutation in vergleichbarem Maße zu inhibieren (Sakamoto et al. 2011). Alectinib unterdrückt die Proliferation der Neuroblastomzellen, die den Wild Type ALK-Rezeptor oder die F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors exprimieren. Infolgedessen leiten die inhibierten Zellen die Apoptose ein (Lu et al. 2017).

Im Rahmen der Diagnose der Erkrankung müssen individuell vorhandene Resistenzen ermittelt und die medikamentöse Therapie entsprechend ausgewählt werden. Die Entwicklung neuerer, effektiverer Inhibitoren des ALK-Rezeptors zur Therapie von Neuroblastomen muss sich den immer neu entstehenden Mutationen anpassen (Holla et al. 2017).

1.2.11 Unterschiede in der Autophosphorylierung des ALK-Rezeptors

Die Arbeitsgruppe von Wouters-Bunt und Bunt hat den Wild Type ALK-Rezeptor, die F1174L-, die I1250T-, die R1275Q- und die Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors im Hinblick auf Unterschiede in den Gesamtphosphorylierungsniveaus der Phosphotyrosin-Epitope der Rezeptoren untersucht. Der Wild Type ALK-Rezeptor und die Mutationen wurden in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie exprimiert und die Neuroblastomzellen mittels quantitativer Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei konnten Abweichungen in den Phosphorylierungsniveaus festgestellt werden. Während der

Wild Type ALK-Rezeptor und die Y1604F-Mutation ein ähnliches Phosphorylierungsniveau zeigen, liegt das der I1250T-Mutation deutlich darunter. Das größte Maß an Autophosphorylierung weist die F1174L-Mutation auf. Es ist deutlich größer als das des Wild Type ALK-Rezeptors. Die R1275Q-Mutation zeigt ein Phosphorylierungsniveau, welches in seiner Größe zwischen dem Wild Type ALK-Rezeptor und der F1174L-Mutation liegt (Aksak 2017).

Die Studie der Arbeitsgruppe von Wouters-Bunt und Bunt dient als Ausgangspunkt für eine genauere Betrachtung der Autophosphorylierung des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der I1250T-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors.

1.2.12 Ziele der Studie

Der ALK-Rezeptor nimmt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des Neuroblastoms ein. In den letzten Jahren sind bezüglich der Darstellung des Aufbaus, der Identifikation von Mutationen innerhalb der primären Aminosäuresequenz und dem Wissen über die Aktivierungsmechanismen des ALK-Rezeptors Fortschritte in der Forschung erzielt worden. Im Hinblick auf die Aktivität auftretender Mutationen, ihren Einfluss auf das Aktivierungsverhalten des ALK-Rezeptors und auf das daraus entstehende maligne Potential bleiben jedoch Fragen offen.

Die vorliegende Arbeit verfolgt zwei Ziele: Zum einen erfolgt die vergleichende Darstellung der Phosphorylierungsniveaus zwischen dem Wild Type, der F1174L-, der I1250T-, der R1275Q- und der Y1604F-Punktmutation des ALK-Rezeptors mittels quantitativer Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie. Durch gezielte Untersuchung von sieben spezifischen Phosphotyrosin-Epitopen wird die Aktivität des ALK-Rezeptors und seiner Mutationen miteinander verglichen und charakteristische Unterschiede zwischen ihnen werden herausgearbeitet. Die quantitative Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie bietet die Möglichkeit umfassendes Datenmaterial zu gewinnen.

Zum anderen wird das Dimerisierungsverhalten des ALK-Rezeptors mit Hilfe des *Acceptor Photobleaching* untersucht. Über die Analyse der Effizienz des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) wird eine Dimerisierung des Wild Type ALK-Rezeptors registriert und mit dem Verhalten anderer Punktmutationen in ein Verhältnis gesetzt. Das *Acceptor Photobleaching* über ein *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) erlaubt eine gezielte, schnelle und systematische Analyse der FRET-Effizienz, bei

gleichzeitig möglicher Kontrolle anhand ungebleichter *Regions of Interest* (ROI) innerhalb der gleichen Zelle.

Die mikroskopische Identifikation von mutationsspezifisch bedeutsamen Phosphotyrosin-Epitopen und die Veranschaulichung des Dimerisierungs- und Aktivierungsverhaltens vertiefen das Verständnis über den ALK-Rezeptor. Mögliche therapeutisch relevante Struktur- und Aktivierungsmerkmale des ALK-Rezeptors sollen identifiziert und für weitere Studien als lohnende Forschungsschwerpunkte charakterisiert werden.

2. Material

2.1 Geräte und Mikroskopie

AccuJet	Brand
Autoklaven	Tuttnauer Systec
CO ₂ Inkubator	Sanyo
Hera Safe Hood	Thermo Scientific
NanoDrop	peqlab
Pipetten 0,1-2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson und Eppendorf Gerätebau
Vortexer	Heidolph
Waage	Kern
Wasserbad DC10	Thermo Scientific
Wasserbad GFI	medaphot
Zentrifuge 5810R	Eppendorf Gerätebau
Zentrifuge MiniSpin Plus	Eppendorf Gerätebau
CLSM Olymps X81	Olympus GmbH
Fluoview 1000	
Argon Ionen Laser 488 nm	
Diodengepumpter Festkörperlaser 559 nm/635 nm	
zwei spektrale und eine filterbasierte Detektionseinheit	
Software: Olympus Fluoview Version 4.2	
Zeiss Cell Observer Z1	Carl Zeiss
LED-Module der Colibri-Beleuchtungseinheit	
EGFP HC Filterset F36-525	
Cy3 HC Filterset F36-542	
AxioCam MRm	
Software: AxioVision Version 4.8.1	

2.2 Computersoftware und Internetadressen

Advanced Renamer 3.73	Versuchsauswertung www.advancedrenamer.com
Fiji	Bildbearbeitung https://fiji.sc/
ImageJ 1.5b	Bildbearbeitung https://imagej.nih.gov/ij/
Knime Analytics Platform 2.12.1	Versuchsauswertung https://www.knime.org/
Photoshop	Adobe Illustrator CS6 V.16.0
SciDavis 1.D005	Erstellung von Diagrammen http://scidavis.sourceforge.net/
Ubuntu mit VirtualBox 4.2.18	Versuchsauswertung www.virtualbox.org
Filtersets für EGFP und Cy3	www.ahf.de/
LED-Module Colibri-Beleuchtungseinheit	http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu

2.3 Materialien

Akkupipettierhilfe Pipetboy	IBS
Becher 100 ml, 250 ml (Glas)	Dunn Labortechnik GmbH
Deckgläser Nr. 01	Thermo Fisher Scientific
Einmal-Wägeschiffchen	Roth
Filterspitzen 0,1-2 µl, 2-20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
Magnetrührstäbe	Dunn Labortechnik GmbH
Messkolben 250 ml, 500 ml (Glas)	Dunn Labortechnik GmbH
Messzylinder 25 ml, 100 ml, 250 ml (Glas)	Dunn Labortechnik GmbH
Objektträger (76 mm x 26 mm x 1 mm)	Paul Marienfeld GmbH&CoKG

Parafilm	Pechiney
Sterile Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml (Polystyrol)	costar
Polypropylen Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Zellkultur Flasche 25 cm ³	Thermo Fisher Scientific
<i>12-Well Plate</i>	Thermo Fisher Scientific

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Agar	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Bovine Gelatine Type A	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Thermo Fisher Scientific
Ethanol rein	Roth
Ethanol vergällt (70 %)	Roth
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories
<i>FuGENE 6 Transfection Reagent</i>	Promega
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Thermo Fisher Scientific
Kaliumdihydrogenphosphat	Thermo Fisher Scientific
Mowiol 4-88	Roth
Natriumchlorid	Roth
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	gibco by life technologies
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin	gibco by life technologies
Trypton	Roth

2.5 Puffer und Medien

Soweit nicht anders beschrieben werden alle Puffer in zweifach demineralisiertem Wasser hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. Das fetale Kälberserum (FCS) und das Paraformaldehyd (PFA) werden bei -20 °C aufbewahrt. Die Puffer des *Nucleobond® Xtra Midi* kommen entsprechend den Vorgaben der Firma Macherey-Nagel zum Einsatz.

DMEM-Medium	DMEM; FCS 10 %; <i>MEM Non Essential Amino Acids Solution</i> (einfach verwendet); Penicillin/Streptomycin 100 U/ml; 4 °C
LB-Amp-Medium	LB-Medium; Ampicillin 100 µg/ml; 4 °C
LB-Medium	Trypton 10 g/l; Hefeextrakt 5 g/l; NaCl 10 g/l; 4 °C
LB-Agar-Platte	Agar 15 g/l; Trypton 10 g/l; NaCl 10 g/l; Hefeextrakt 5 g/l Ampicillin 100 µg/ml; 4 °C
Paraformaldehyd	PBS; PFA 0,88 g/ml
PBS-Gelatine	PBS; bovine Gelatine 1,58 M
PBS	NaCl 155,7 mM; KH ₂ PO ₄ 1,5 mM; Na ₂ HPO ₄ –7H ₂ O 2,7 mM; KCl 2,7 mM
Permeabilisationspuffer	PBS; 1 ml/l Triton X-100
Quenchpuffer	PBS; Glycin 100 mM
Transfektionsmedium	DMEM; 4 °C

2.6 Kits

DNA-Präparation	<i>Nucleobond® Xtra Midi</i> , Macherey-Nagel
Antikörper	<i>ALK Sampler Kit #12645S</i> , Cell Signaling

2.7 Vektoren, cDNAs und verwendete Konstrukte

Die komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) des Wild Type ALK-Rezeptors wird in Kombination mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen verwendet. Am C-terminalen Ende ist die cDNA einmal mit EGFP und einmal mit mCherry fusioniert.

Die Mutationen des ALK-Rezeptors F1174L, I1250T, R1275Q und Y1604F werden allein in Verbindung mit EGFP in Experimenten gebraucht. Die DNA-Plasmide wurden von der Firma GeneCopoeia synthetisiert und sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Plasmide der Firma GeneCopoeia

ALK – EGFP Plasmid: EX-T1863-M03		
Vektor:	pReceiver-M03	Antibiotika-Selektion mittels Ampicillin
Insert:	Humane Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase (ALK, 4863 bp)	Am C-Terminus mit EGFP fusioniert
Linker:	TACCTCGAGTGCGGCCGC	Xho I und Not I Schnittstelle
ALK – mCherry Plasmid: EX-T1863-M56		
Vektor:	pEZ-M56	Antibiotika-Selektion mittels Ampicillin
Insert:	Humane Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase (ALK, 4863 bp)	Am C-Terminus mit mCherry fusioniert
Linker:	CTCGAGTGCGGCCGC	Xho I und Not I Schnittstelle

2.8 Zelllinien

SK-N-AS (ATCC CRL2137)

Die Neuroblastomzellen sind menschlichen Ursprungs. Sie entstammen einer jungen, sechs Jahre alten Patientin, die an einem gering differenzierten Neuroblastom erkrankt ist. Die Neuroblasten sind aus der Hirnregion und aus Knochenmarksmetastasen entnommen worden. Sie synthetisieren den *Insulin-Like Growth Factor II* (IGF-II) und exprimieren den *Insulin-Like Growth Factor I*-Rezeptor (IGF-I) an ihrer Zellmembran. Das Zusammenspiel von IGF-II als Ligand mit dem IGF-I-Rezeptor ermöglicht den SK-N-AS-Zellen ein autonomes Zellwachstum (El-Badry et al. 1989).

Bei der SK-N-AS-Zelllinie liegt keine MYCN-Amplifikation vor und die Zellen enthalten endogene Wild Type ALK-Rezeptoren. Die Inhibition des MYCN-Gens in den SK-N-AS-Zellen führt zu einer geringeren Expressierung des ALK-Rezeptors. Die Aktivierung des ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Zelllinie resultiert in einer vermehrten Aktivierung des AKT-Signalwegs (Hasan et al. 2013; Holla et al. 2017).

Bakterienzelllinien

E. coli-Stamm „Top 10“ 5DHα

Thermo Fisher Scientific

2.9 Antikörper

Die primären und sekundären Antikörper der indirekten Immunfluoreszenz werden mit einem phosphatgepufferten Salzlösung-Gelatine-Gemisch (PBS) auf das gewünschte Verhältnis verdünnt. Die Antikörper des *ALK Sampler Kit #12645S* binden an spezifische Epitope der Primärstruktur des ALK-Rezeptors. Der Py20-Anti-Phosphotyrosin Antikörper detektiert Phosphorylierungen des Rezeptors im Allgemeinen. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Isotyp	Hersteller	Klonalität	Anwendung und Verdünnung
Phospho-ALK (D28B4) (Tyr1078)#12127	Hase IgG	Cell Signaling	monoklonaler Ab	Phosphorylierungsniveau des Tyr1078 1:100
Phospho-ALK (D96H9) (Tyr1096)#6962	Hase IgG	Cell Signaling	monoklonaler Ab	Phosphorylierungsniveau des Tyr1096 1:100
Phospho-ALK (D59G10) (Tyr1278)#6941	Hase IgG	Cell Signaling	monoklonaler Ab	Phosphorylierungsniveau des Tyr1278 1:100
Phospho-ALK (Tyr1278/1282/1283)#3983	Hase IgG	Cell Signaling	polyklonaler Ab	Phosphorylierungsniveau des Tyr1278/1282/1283 1:100
Phospho-ALK (D39B2) (Tyr1282/1283)#9687	Hase IgG	Cell Signaling	monoklonaler Ab	Phosphorylierungsniveau des Tyr1282/1283 1:100
Phospho-ALK (3B4) (Tyr1586)#3348	Hase IgG	Cell Signaling	monoklonaler Ab	Phosphorylierungsniveau des Tyr1586 1:100
Phospho-ALK (Tyr1604)#3341	Hase IgG	Cell Signaling	polyklonaler Ab	Phosphorylierungsniveau des Tyr1604 1:100
Cy3-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	Ziege IgG	Jackson ImmunoResearch	polyklonaler Ab	Sekundärer Antikörper 1:1000
Anti-Phosphotyrosin, clone Py20	Maus IgG2b	Millipore	monoklonaler Ab	Allgemeines Phosphorylierungsniveau 1:100
Cy TM 5-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	Ziege IgG	Jackson ImmunoResearch	polyklonaler Ab	Sekundärer Antikörper 1:1000

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die in Tabelle 3 genannten DNA-Plasmide lagen in der Arbeitsgruppe bereits vor. Zu Anfang der Experimente werden die Plasmide des ALK-Rezeptors mittels DNA-Transformation aus dem vorhandenen Grundstock vervielfältigt. Die Plasmide werden in chemisch kompetenten „Top 10“ 5HD α *E. coli*-Bakterien vervielfältigt. Dazu werden die bei -80 °C gelagerten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. 10 ng der zu vervielfältigen cDNAs werden zu 50 μ l der *E. coli*-Bakterien gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Mit einem Hitzeschock von 42 °C für 30 Sekunden und einem sofortigen Abkühlen der Suspension im Anschluss auf Eis wird die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien ermöglicht. Nach Zugabe von 250 μ l LB-Medium werden die Bakterien für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wird gleichmäßig auf einer LB-Agar-Platte mit einer Ampicillinkonzentration von 100 μ g/ml ausgestrichen und erneut für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Zwei der herangewachsenen Kolonien werden am nächsten Tag ausgewählt und in 4 ml LB-Amp-Medium mit einer Ampicillinkonzentration von 100 μ g/ml überführt und angezüchtet. Die Bakterien verbleiben bei 37 °C und 160 rpm für 24 Stunden auf einem Laborschüttler. Am folgenden Tag werden 100 μ l der *E. coli*-Kolonie abgenommen, in 100 ml LB-Medium überführt und ein drittes Mal für 24 Stunden bei 37 °C mit 120 rpm geschüttelt.

Die DNA-Präparation erfolgt mit dem *NucleoBond Xtra Midi Kit* der Firma Macherey-Nagel und wird nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Zusammengefasst bestehen die durchgeführten Arbeitsschritte aus Resuspension der abzentrifugierten Bakterien mit anschließender Lyse, sowie Trennung der chromosomalen DNA von der vervielfältigten cDNA durch Filtration. Während des Filtrationsvorgangs wird die cDNA entsalzt und aufgereinigt. Nach Aufnahme in Elutionspuffer wird die Ausfällung der cDNA durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol während des Vortexens herbeigeführt. Daraufhin wird die Lösung für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend bei 4 °C und 8000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die verbliebene cDNA wird in Elutionspuffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Alle Puffer des *Midi Kits* kommen in ihrer originalen Zusammensetzung zum Einsatz.

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wird mit dem NanoDrop und der zugehörigen Software NanoDrop 1000 bestimmt. Die Wellenlänge der Konzentrationsbestimmung ist $\lambda = 260$ nm. Als Referenz dient der Elutionspuffer.

Für die Verwendung der DNA in den Experimenten wird die Konzentration mit autoklaviertem H₂O auf 1 µg/µl verdünnt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kulturbedingungen

Die Kulturbedingungen entsprechen den Vorgaben von ATCC für die SK-N-AS-Zelllinie. Die Neuroblasten werden zusammen mit ihrem Nährmedium im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Das Basismedium ist das *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) + GlutaMax der Firma gibco by life technologies. Das Medium wird mit 10 % fetalem Kälberserum ergänzt. Hinzu kommen 0,5 mM essentielle Aminosäuren und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin.

Die Zellen teilen sich alle 39 Stunden. Erreicht die Zelldichte eine Konfluenz von etwa 80 %, werden die Zellen in den Verhältnissen 1:3, 1:5 oder 1:10 gesplittet, wobei ein Teil der Zellen in neuem Nährmedium inkubiert und der andere Teil verworfen wird. Das Umsetzen erfolgt, je nach vorliegender Zelldichte, zwei bis dreimal in der Woche.

3.2.2 Kultivierung der adhärennten Zellen

Zur Umsetzung der Zellen in eine neue Zellkulturschale wird das Nährmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um das enthaltene FCS zu entfernen. Die Zelladhäsion der SK-N-AS-Zellen zum Boden der Zellkulturschale wird durch Zugabe von 2 ml Trypsin gelöst. Im Anschluss werden die Zellen entsprechend dem Umsetzungsverhältnis in eine neue Zellkulturschale mit frischem Nährmedium überführt.

3.2.3 Transfektion der SK-N-AS-Zellen

Zur Durchführung der Experimente werden die Zellen in einer *12-Well Plate* mit 4 cm² Oberfläche auf unbeschichteten 15-mm-Glas-Cover Slips ausgesät. Die initiale Konfluenz der Neuroblasten auf dem *Cover Slip* liegt zwischen 10 % bis 15 %. Die Zellen werden dazu - wie vorangehend beschrieben - mit PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin

in Lösung gebracht und in der *12-Well Plate* in frischem Medium aufgenommen. Über 24 Stunden werden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag sollte die Konfluenz der Zellen auf den *Cover Slips* bei 30 % bis 40 % liegen. Um die DNA in die Zellen zu transfizieren, wird das *FuGENE 6 Transfection Reagent* der Firma Promega verwendet. Für einen Brunnen einer *12-Well Plate* werden 1 µg der gewünschten DNA, 3 µl *FuGENE 6* und 46 µl des Transfektionsmediums nach Angaben des Herstellers zu 50 µl Suspension vermischt. Das Verhältnis von DNA zu *FuGENE 6* ist 1:3 innerhalb des Transfektionsmediums. Die Suspension wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Nährmedium des Vortages wird aus der *12-Well Plate* abgesaugt und durch 1 ml frisches Medium in jedem Brunnen ersetzt. Danach werden jedem Brunnen 50 µl der vorbereiteten Suspension hinzugefügt. Abschließend wird die *12-Well Plate* für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator gelagert, um den Zellen die Zeit zu geben, die DNA aufzunehmen und den ALK-Rezeptor zu exprimieren.

Um der Fragestellung nachzugehen, ob der ALK-Rezeptor bei Aktivierung dimerisiert, wird mit EGFP und mit mCherry markierte DNA gleichzeitig in die Zellen transfiziert. Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen zwischen Donor und Akzeptor werden die Verhältnisse EGFP:mCherry 1:1 (0,5 µg:0,5 µg), 1:3 (0,25 µg:0,75 µg), 1:5 (0,17 µg:0,83 µg) und 3:1 (0,75 µg:0,25 µg) in die Zellen transfiziert. Die Menge der verwendeten DNA ist konstant 1 µg.

3.3 Immunfluoreszenz

3.3.1 Zellfixierung

Nach Transfektion, bei einer Konfluenz von 60 % bis 70 %, erfolgt die Zellfixierung. Dazu wird das Medium aus den Brunnen abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach dem Waschvorgang werden die Zellen mit 4 % PFA in PBS für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss daran werden die Zellen für jeweils 10 Minuten zuerst mit dem Quencherpuffer und danach mit dem Permeabilisierungspuffer inkubiert. Soll eine Antikörperfärbung folgen, werden die Zellen abschließend in PBS-Gelatine aufgenommen. Es wird reines PBS verwendet, wenn keine Antikörperfärbung vorgenommen werden soll.

3.3.2 Antikörperfärbung

Die Antikörperfärbung wird in einer lichtundurchlässigen, mit Parafilm ausgelegten Metallbox vorgenommen. Zum Einsatz kommt die Methode der indirekten Immunfluoreszenz, bei der die Zielstrukturen mit einem primären und sekundären Antikörper markiert werden. Die Anwendungen und Verdünnungen der Antikörper sind in Kapitel 2.9 beschrieben. Die primären Antikörper werden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit erfolgt die Rückführung der *Cover Slips* in die *12-Well Plate*. Dort werden sie vier Mal mit PBS-Gelatine gewaschen, wobei die Lösung pro Zyklus fünf Minuten einwirkt.

Die Vorgehensweise bei der Färbung mit den sekundären Antikörpern entspricht der der Vorgehensweise der ersten Färbung und die Einwirkzeit beträgt erneut eine Stunde. Abschließend erfolgen zwei Waschgänge mit PBS-Gelatine und zwei Waschgänge mit reinem PBS. Die Einwirkzeiten liegen jeweils bei fünf Minuten.

Die Einbettung der *Cover Slips* auf den Objektträgern erfolgt mit Mowiol 4-88 der Firma Carl Roth GmbH & Co.KG. Die Proben werden bei 4 °C aufbewahrt.

In den Experimenten zur Bestimmung des Phosphorylierungsniveaus werden für die primäre Antikörperfärbung die Antikörper des *ALK Sampler Kits #12645S* der Firma Cell Signaling (Tabelle 4) im Verhältnis 1:100 mit dem PBS-Gelatine-Gemisch verwendet.

Als sekundärer Antikörper wird der Cy3-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG-Antikörper der Firma Jackson ImmunoResearch benutzt. Die Konzentration des Antikörpers beträgt 5 µg/µl, bei einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-Gelatine.

Bei der Untersuchung des Dimerisierungsverhaltens des ALK-Rezeptors wird als primärer Antikörper der Anti-Phosphotyrosine PY20-Antikörper der Firma Millipore benutzt. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen IgG2b-Antikörper, der in der Konzentration 1 mg/ml geliefert wird und im Verhältnis 1:100 mit dem PBS-Gelatine-Gemisch angewendet wird.

Der sekundäre Antikörper ist der CyTM5-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG-Antikörper der Firma Jackson ImmunoResearch. Er wird in einer Konzentration von 1,4 mg/ml geliefert und für die Antikörperfärbung in einem Verhältnis von 1:1000 mit PBS-Gelatine verdünnt.

Im Rahmen der Experimente zur Bestimmung des Phosphorylierungsniveaus und zur Untersuchung des Dimerisierungsverhaltens des ALK-Rezeptors werden die in Kapitel 2.7 aufgeführten Plasmide des ALK-Rezeptors mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz untersucht.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Quantitative Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung des Phosphorylierungsniveaus des ALK-Rezeptors wird mit der quantitativen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie vorgenommen. Es wurden insgesamt 3181 Aufnahmen der Zellen angefertigt. Auf den Aufnahmen sind mehrere Zellen abgebildet, sodass die Aufnahmen insgesamt 6754 Zellen zeigen, die in der Datenanalyse ausgewertet worden sind.

3.4.2 Zeiss Cell Observer Z1

Die Bilder der Neuroblasten werden mit dem Zeiss Cell Observer Z1 der Firma Carl Zeiss aufgenommen. Dieses Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop ist mit LED-Modulen einer Colibri-Beleuchtungseinheit ausgestattet. Zur Anregung der Proben emittieren die LED-Module Licht spezieller Wellenlängen, welche auf die Fluoreszenzfarbstoffe der Proben abgestimmt sind.

Das Licht trifft, ausgehend von der Beleuchtungseinheit, auf ein Filtermodul, welches einen Anregungs- und Emissionsfilter sowie einen dichroitischen Strahlteiler enthält. Die Anregungsfilter werden so gewählt, dass sie ausschließlich Wellenlängen passieren lassen, die dem Anregungsspektrum der benutzten Fluoreszenzfarbstoffe entsprechen. Nach der Passage des Anregungsfilters trifft das Licht auf den dichroitischen Strahlteiler, über den das Anregungslicht von unten via Objektiv auf die Proben gelenkt wird. Die Proben absorbieren das einfallende Licht und emittieren es entsprechend der Stokes-Verschiebung in einer längeren Wellenlänge. Auf dem Rückweg trifft das Licht zum zweiten Mal auf den dichroitischen Strahlteiler, der für Wellenlängen oberhalb seiner Grenzwellenlänge durchlässig ist. Dieses Mal wird das Licht nicht reflektiert, sondern durchstrahlt den dichroitischen Strahlteiler, wodurch es auf den Emissionsfilter trifft. Der Emissionsfilter filtert das spezifische Emissionssignal der fluoreszierenden Proben heraus. Über ein System aus Spiegeln wird das verbliebene Signal entweder

zum Okular oder zur AxioCam, die über die AxioVision Software angesteuert wird, gelenkt (Abbildung 2).

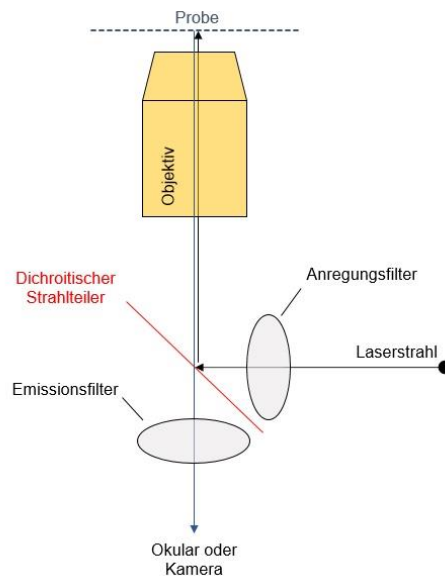


Abbildung 2: Strahlengang des Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops

3.4.3 Aufnahmen der quantitativen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie

Das EGFP wird mit LED-Licht der Wellenlänge 465 nm angeregt. Das Cy3 wird mit einer Wellenlänge von 535 nm angeregt. Die Spezifikationen der LED-Module sind in Tabelle 5 angegeben. Die Beleuchtungsintensität beider LED-Module liegt während der Aufnahmen bei 25 % der maximal erreichbaren Intensität.

Die Fluoreszenzsignale werden durch Filtersets der Firma AHF analysetechnik AG gefiltert. Das EGFP HC Filterset F36-525 und das Cy3 HC Filterset F36-542 detektieren die Anregungs- und Emissionswellenlängen beider Farbstoffe. Die Spezifikationen der Filtersets sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 5: LED-Module der Colibri-Beleuchtungseinheit

angeregte Fluoreszenz	LED Bezeichnung	LED FWHM Bandbreite (nm)	Bandbreite der Anregungsfilter (nm)	Leistungsdichte an der Objektebene (mW/cm ²)
Blue (EGFP)	465	449 - 473	450 - 490	17,5
Green (Cy3)	535	503 - 573	530 - 560	2,6

Tabelle 6: Wellenlängen der Filtersets EGFP HC und Cy3 HC

	Anregungsfilter	Dichroitischer Strahlteiler	Emissionsfilter
Wellenlänge EGFP Filterset F36-525	457 – 487	495	502 - 538
Wellenlängen Cy3 Filterset F36-542	511 - 561	562	573 - 613

Das verwendete Objektiv ist das Zeiss Objektiv EC Plan-Neofluar 40x/NA 1,3 Oil. Es vergrößert die Proben um den 40-fachen Maßstab und hat eine numerische Apertur von 1,3. Zusätzlich vergrößert das Okular W-PI 10x/23 der Firma Carl Zeiss die Proben um den Faktor Zehn, sodass insgesamt eine 400-fache Vergrößerung im Okular erreicht wird.

Die verwendete Kamera ist die AxioCam MRm (Carl Zeiss). Die Belichtungszeiten werden der Menge des exprimierten ALK-Rezeptors angepasst. Die Proben enthalten transient transfizierte Zellen, wodurch der ALK-Rezeptor inhomogen exprimiert wird. Um ein möglichst umfangreiches Spektrum der exprimierten Mengen des ALK-Rezeptors zu zeigen, werden die Belichtungszeiten in vier Kategorien unterteilt. Dadurch entsteht eine Varianz, die eine wichtige Säule für die Bildgewinnung der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie darstellt. Die Belichtungszeit des Cy3-Signals liegt immer oberhalb der Belichtungszeit des GFP-Signals. Tabelle 7 gibt eine Übersicht der Belichtungszeiten.

Tabelle 7: Belichtungszeiten der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz der Probe	sehr groß	groß	mittel	klein
Belichtungszeit des GFP-Kanals (ms)	100	300	500	750
Belichtungszeit des Cy3-Kanals (ms)	250	500	750	1000

Um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis der Bilder zu erreichen, werden die Belichtungszeiten so gewählt, dass die Signalintensität der Bildkanäle um ein Zehnfaches, mindestens aber um ein Fünffaches größer ist als der Bildhintergrund. Der Bildhintergrund dient als Referenz, während gleichzeitig eine Über- oder Unterbelichtung der Aufnahmen vermieden wird.

3.4.4 Datenanalyse

Die Quantifizierung der Phosphorylierung der ALK-Rezeptormutationen erfolgt in fünf Auswertungsschritten. Die Phosphorylierung wird grafisch durch die Relation zwischen dem Cy3-Signal gegenüber der Expressierung des ALK-Rezeptors dargestellt. Die exprimierte Menge des ALK-Rezeptors wird anhand der GFP-Signalstärke bestimmt. Analysiert werden die insgesamt 3181 gemachten Aufnahmen mit einem automatisierten *Python Custom Written Script*, welches speziell für diesen Zweck von Prof. Dr. Wouters-Bunt programmiert worden ist. Eine Übersicht der Analyseschritte ist in Abbildung 3 dargestellt.

Der erste der fünf Analyseschritte beinhaltet die Berücksichtigung der unterschiedlichen Belichtungszeiten. Bevor die Bilder ausgewertet werden können, wird jedes Bild mit einer Angabe über die angewendeten Belichtungszeiten versehen. Diese Informationen werden dazu verwendet die Intensitäten der Fluoreszenzsignale durch die Belichtungszeiten zu dividieren und auf diese Weise die Bandbreite der 12Bit-Kamera zu erhöhen. Durch die Berücksichtigung der Belichtungszeiten in Bezug auf die Signalintensitäten werden die Bilder, die aufgrund von unterschiedlichen GFP-ALK-Expressionsniveaus mit unterschiedlichen Belichtungszeiten aufgenommen worden sind, untereinander angeglichen.

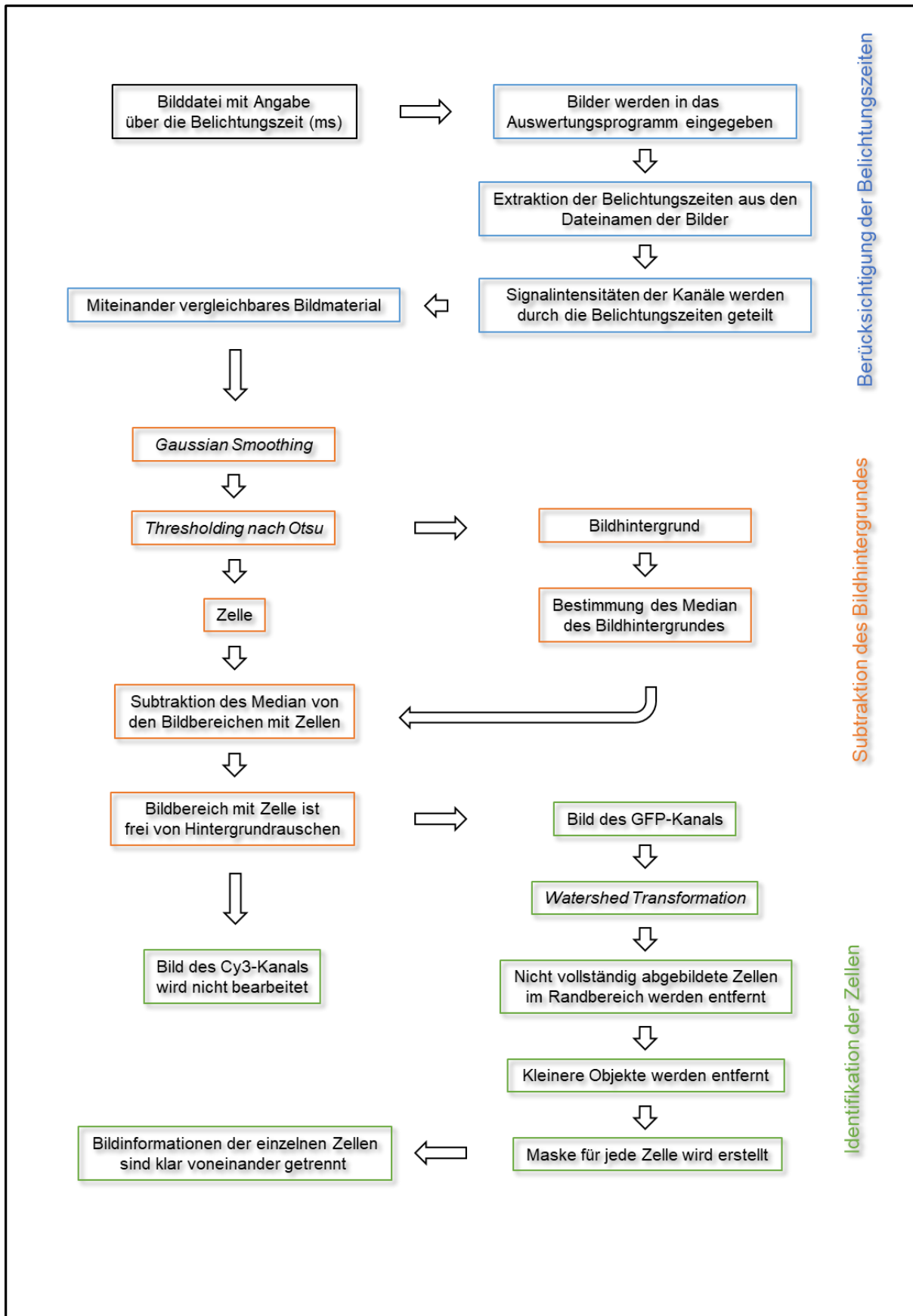
Nach Berücksichtigung der Belichtungszeiten wird das Bild einem *Gaussian Smoothing* unterworfen, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren. Dem *Gaussian Smoothing* folgt ein *Thresholding nach Otsu* und die Subtraktion des Bildhintergrundes.

Um festzustellen, wie viele Zellen auf dem GFP-Intensitätsbild abgebildet sind, wird eine *Watershed Transformation* durchgeführt. Damit werden alle Zellen klar voneinander getrennt und als einzelne Objekte dargestellt. Nicht vollständig abgebildete Zellen in den Randbereichen des Bildes, oder Objekte, die zu klein sind um Zellen zu sein, werden dabei nicht berücksichtigt. Nach Abschluss dieses Schrittes sind jeder Zelle ihre genauen Intensitäten zugeordnet.

Im vierten Analyseschritt werden alle Pixel einer Zelle einbezogen. Sowohl für das GFP-Signal als auch für das Cy3-Signal wird ein Mittelwert der Bildintensität für jede abgebildete Zelle ermittelt.

Abschließend erfolgt die grafische Darstellung. Der Mittelwert einer Zelle des Cy3-Kanals wird durch seinen korrespondierenden Mittelwert aus dem GFP-Kanal dividiert. Die Bildintensität im Bild des GFP-Kanals ist in jedem Fall größer Null, da die aufgenommene Zelle den transfizierten ALK-Rezeptor enthält. Die Bildintensität innerhalb der Aufnahme des Cy3-Kanals kann Null sein, falls die Tyrosinkinasen unphosphoryliert vorliegen. Durch diese Analyseschritte wird jede identifizierte Zelle durch einen Punkt in der grafischen Darstellung repräsentiert.

Die Daten der ALK-Phospho-Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 wurden ausgewertet, jedoch nicht in die Gesamtauswertung (Abbildung 24) mit aufgenommen. Gründe dafür sind ihr Vorkommen in anderen ALK-Phospho-Epitopen oder die Ähnlichkeit ihrer Phosphorylierungsniveaus mit denen anderer Epitope. Die Darstellungen repräsentativer Zellen und der Phosphorylierungsniveaus der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 finden sich im Anhang.



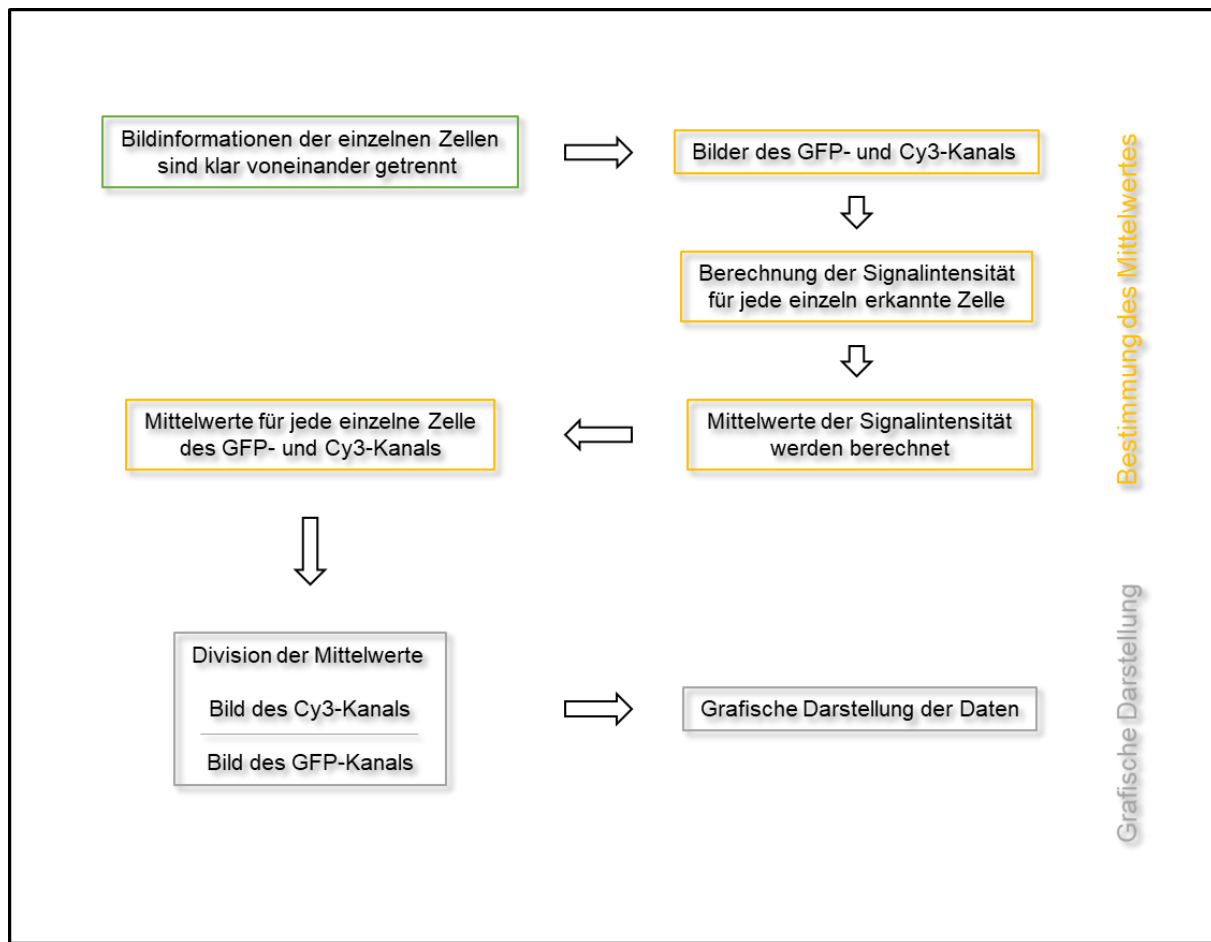


Abbildung 3: Datenanalyse quantitative Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie

3.4.5 Acceptor Photobleaching mittels konfokaler FRET-Mikroskopie

Das Dimerisierungsverhalten des ALK-Rezeptors wird mit einem *Confocal Laser Scanning Microscope* untersucht. Ein Laserstrahl trifft auf einen dichroitischen Strahlteiler. Dieser projiziert den Laserstrahl über eine Linse im Objektiv auf einen einzelnen Punkt innerhalb der Zelle auf dem Objektträger. Der, über den Laser angeregte, Fluoreszenzfarbstoff emittiert - folgend der Stokes-Verschiebung - Licht einer größeren Wellenlänge. Dieses Licht tritt erneut durch den dichroitischen Strahlteiler und erreicht eine weitere Lochblende vor der Detektionseinheit. Nur das Emissionslicht der gewählten Fokusebene kann die zweite Lochblende passieren und wird registriert. Das Emissionslicht, welches außerhalb der Fokusebene entstanden ist, wird durch die Lochblende gefiltert (Abbildung 4).

Das konfokale Prinzip ermöglicht es, die Zellen nicht nur in einer Ebene darzustellen,

sondern zudem auch noch hochauflösend in der Z-Dimension, der vertikalen Raumrichtung. Im Gegensatz zur Weitfeld-Mikroskopie entsteht das anregende Licht bei der konfokalen Mikroskopie durch Laserbeleuchtung anstelle eines LED-Moduls oder einer konventionellen Lampe. Die Fokussierung des Laserstrahls auf einen Punkt ermöglicht die Rasterung der gewählten Fokusebene und ferner die Detektion des Emissionslichts mittels eines von drei Punktdetektoren. Detektiert wird eine ROI in einer Schnittebene innerhalb der Zelle, indem der punktförmige Laser die ROI systematisch rastert. Wichtig für das *Acceptor Photobleaching* ist die Anregung der Proben wellenlängenspezifisch mit einem Laser, die Punktdetektion des Emissionslichts und das Rasterprinzip des Mikroskops bei Detektion der ROI. Die konfokale Apertur ist vollständig geöffnet, aus welchem Grund die Darstellungsmöglichkeit der Z-Ebene keine Rolle spielt.

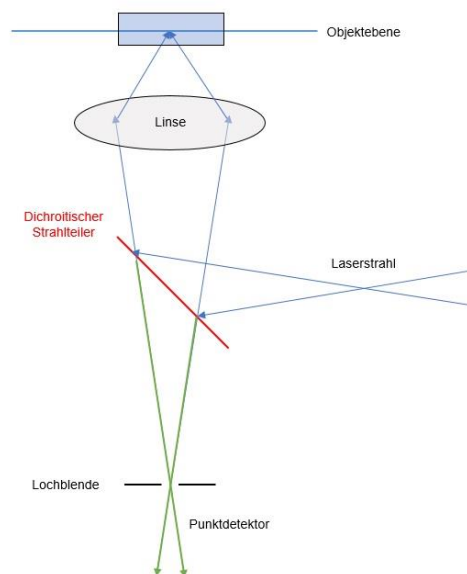


Abbildung 4: Strahlengang des CLSM

Die Durchführung des *Acceptor Photobleaching* mit einem CLSM bietet Vorteile gegenüber einem Weitfeldmikroskop. Die ROIs innerhalb der Zelle werden gezielt gewählt und systematisch gerastert. Des Weiteren ermöglicht die Einstellung der Laserintensität eine vollständige Ausbleichung des Akzeptors in der ROI. Ebenfalls von Vor-

teil ist die Geschwindigkeit des Bleichvorgangs. Aufgrund des geringen zeitlichen Intervalls, der für das *Acceptor Photobleaching* mit einem CLSM notwendig ist, wird ein Fokusdrift der Proben in X- und Y-Dimension vermieden, wie er im Zusammenhang mit einer langen Belichtungszeit bei Verwendung eines Weitfeldmikroskops möglich wäre.

Nach Abschluss des Bleichvorgangs enthält jede Zelle gebleichte Areale, anhand derer die FRET-Effizienz bestimmt wird, und ungebleichte Areale, die als Kontrollregionen dienen. Infolgedessen ist eine genaue und alleinige Messung des Donor-Signals in den ROIs möglich.

3.4.6 CLSM Fluoview 1000

Die konfokale FRET-Mikroskopie wird mit dem CLSM Fluoview 1000 (Olympus) durchgeführt. Es werden zwei dichroitische Strahlteiler verwendet. Der dichroitische Strahlteiler für das Anregungslicht ist der DM 405/488/561/633. Er lenkt das Anregungslicht auf die Proben. Der SDM 560 in der Detektionseinheit des Fluoview 1000 trennt das Emissionslicht des GFP von dem des mCherry. Unterhalb von 560 nm registriert ein Punktdetektor das Signal des GFP, oberhalb der Grenzwellenlänge detektiert ein nachgeschalteter Punktdetektor das Signal des mCherry. Die Wellenlängen, bei denen eine Strahltrennung an diesen dichroitischen Strahlteilern erfolgt, entsprechen den im Namen angegebenen Werten. Die konfokale Apertur ist vollständig geöffnet. Sie beträgt 800 µm. Aufgenommen werden die Bilder mit dem Objektiv UPlanSApo 60x/NA 1,35 Öl (Olympus GmbH) und der Software FV10-ASW.

3.4.7 Aufnahmen der konfokalen FRET-Mikroskopie

Bei der Bildgewinnung wird über die Intensität des Cy5-Signals eine Zelle ausgesucht, in der der ALK-Rezeptor in seiner phosphorylierten Form vorliegt. Innerhalb dieser Zelle wird eine ROI ausgewählt, die im Folgenden gebleicht wird.

Als Fluoreszenzfarbstoffe des *Acceptor Photobleaching* kommen EGFP und mCherry, gekoppelt an den ALK-Rezeptor, zum Einsatz. Das EGFP wird als Donor verwendet, das mCherry als Akzeptor. Ein Argon Ionen Laser regt das EGFP mit 488 nm an. Ein diodengepumpter Festkörperlaser wird mit 559 nm zur Anregung von mCherry und mit 635 nm zur Anregung von Cy5 verwendet. Das Emissionsspektrum des EGFP und das Absorptionsspektrum des mCherry überschneiden sich im Gebiet der Wellenlängen zwischen etwa 475 nm und 650 nm, womit ein FRET zwischen beiden Fluoreszenzfarbstoffen möglich wird (Tabelle 8).

Die Intensität der Laser zur Anregung von EGFP und mCherry beträgt 2,5 % der maximal möglichen Intensität während der Bildaufnahme bei einer Verweildauer von 20 $\mu\text{s}/\text{Pixel}$. Während des Bleichvorgangs wird die Intensität des diodengepumpton Festkörperlasers mit der Wellenlänge 559 nm auf 100 % eingestellt, um den Akzeptor in der ROI vollständig zu bleichen. Dabei wird die Geschwindigkeit, mit der der Laser die ROI rastert, auf 10 $\mu\text{s}/\text{Pixel}$ verringert und die ROI wird insgesamt 20 Mal gescannt.

Während einer Aufnahme entstehen vier Bilder, aufgeteilt auf zwei Kanäle, die zeitlich versetzt aufgenommen werden. Ein Kanal enthält das Signal des Donors, der andere Kanal das Signal des Akzeptors. Von jedem Signal wird je eine Aufnahme vor und nach dem Bleichvorgang angefertigt: Donor_{pre}/Donor_{post} und Akzeptor_{pre}/Akzeptor_{post}. Die Bilder haben eine Größe von 256 x 256 Pixel (Abbildung 5).

Tabelle 8: Fluoreszenzfarbstoffe der konfokalen FRET-Mikroskopie

Fluoreszenzfarbstoffe	Maxima der Absorptionswellenlänge (nm)	Maxima der Emissionswellenlänge (nm)
GFP	395 und 475	509
mCherry	587	610
Cyanin 5	650	670

3.4.8 Datenanalyse

Von jeder Kombination aus Donor und Akzeptor werden 20 Zellen aufgenommen und gebleicht, sodass summarisch 960 Bilder ausgewertet werden. Die Bildauswertung erfolgt mit Hilfe des Programms KNIME Analytics Platform und einem von Prof. Dr. Wouters-Bunt erstellten Ablauf von Auswertungsschritten.

Im ersten Auswertungsschritt werden die Bilder mit einem Medianfilter bearbeitet. Über diesen Filter werden besonders große Ausreißer der Signalintensitäten abgemildert und das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert. Daraufhin folgt ein *Thresholding nach Otsu* und die Subtraktion des Bildhintergrundes.

Zur Bestimmung der FRET-Effizienz E werden im Anschluss die Grauwerte des Donor_{pre} Bildes von denen im Donor_{post} Bild subtrahiert und durch die Informationen aus dem Donor_{post} Bild dividiert.

$$E = \frac{D_{post} - D_{pre}}{D_{post}}$$

Dabei entsteht ein Bild, welches Informationen über die FRET-Effizienz in Werten zwischen Null und Eins enthält. Das Bild wird abgespeichert.

Während des *Acceptor Photobleaching* wird nicht die gesamte Zelle, sondern nur eine ROI gebleicht. Die umliegenden Bereiche des Bildes werden als nonROI angeführt und dienen als Kontrollregion. Um bei der Auswertung festzulegen welche Bereiche der Bilder ROI bzw. nonROI sind, wird eine binäre Maske erstellt.

Die binäre Maske wird durch die Verrechnung der Bilder des Akzeptor-Kanals angefertigt. Die Informationen des Akzeptor_{post} Bildes werden von den Informationen des Akzeptor_{pre} Bildes subtrahiert. Da die Bilder bis auf die ROI identisch sind, bleiben allein die Bildinformationen der ROI zurück.

Die verbliebene Bildregion wird jetzt binarisiert. Der ROI wird die Zahl 1, der nonROI die Zahl 0 zugeordnet, wodurch eine „positiv Maske“ entsteht, die die ROI in Größe und Umfang beschreibt. Zusätzlich zur „positiv Maske“ wird eine „negativ Maske“ gebildet. Dazu wird die „positiv Maske“ dupliziert und umgekehrt, sodass in der „negativ Maske“ der nonROI die Zahl 1 und der ROI die Zahl 0 entspricht. Die „negativ Maske“ enthält die Signalintensitäten der aufgenommenen Zelle ohne die ROI (Abbildung 6).

Das Bild der FRET-Effizienz wird mit beiden binären Masken multipliziert. Durch Multiplikation mit der „positiv Maske“ entsteht ein Bild, das Informationen über die FRET-Effizienz der ROI, d. h. im gebleichten Areal, enthält. Multipliziert man das Bild mit der „negativ Maske“ werden Informationen über die FRET-Effizienz in der nonROI gewonnen.

Als letztes werden die Histogramme der ausgewerteten Bilder kumuliert und in Graphen zusammengefasst. Dabei erfolgt eine Normalisierung der Tabellenwerte, um jeder Zelle, unabhängig von der Zellgröße, die gleiche Gewichtung zu geben.

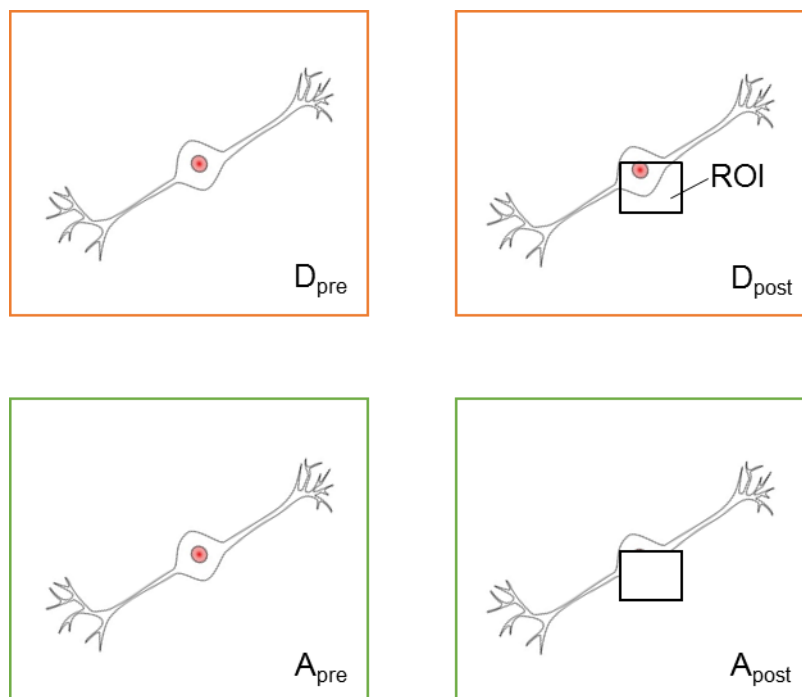
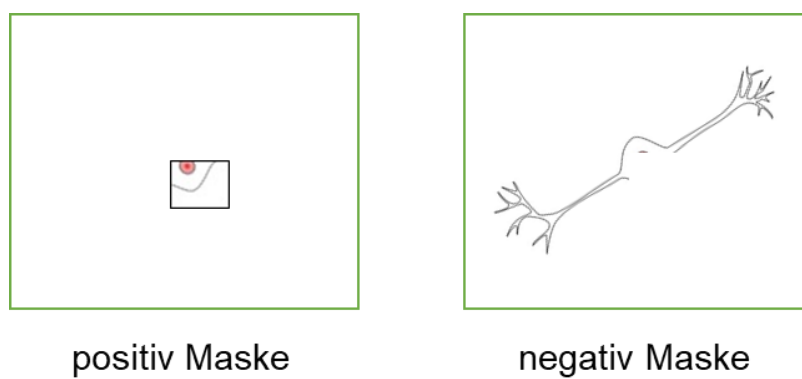
Abbildung 5: Bilder einer Aufnahmeserie¹

Abbildung 6: Binäre Masken

¹ https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudounipolar_bipolar_neurons.svg Zugriff am 16.01.2017 16.12 Uhr

4. Ergebnisse

4.1 Das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope

Zur Untersuchung des Phosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der I1250T-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors wurden sie mit dem Fluoreszenzprotein EGFP fusioniert und in der Neuroblastomzelllinie SK-N-AS exprimiert. Die exprimierten ALK-Rezeptoren wurden darauffolgend mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz markiert, um das antikörperspezifische Cy3-Signal der ALK-Phospho-Epitope anzuzeigen. Die primären Antikörper sind gegen die ALK-Phospho-Epitope Tyr1096, Tyr1278, eine Kombination aus Tyr1278/1282/1283, Tyr1586 und Tyr1604 gerichtet. Alle Epitope liegen im intrazellulären Anteil des ALK-Rezeptors. Unterschieden wird zwischen Tyr1096, Tyr1586 und Tyr1604, die außerhalb der Tyrosinkinase-Domäne des ALK-Rezeptors liegen und Tyr1278 bzw. der Kombination aus Tyr1278/1282/1283, die innerhalb dieser Domäne liegen (Lee et al. 2010). Die Bindung des Antikörpers erfolgt nur bei phosphoryliertem, aktivem ALK-Rezeptor. Das Tyr1096 steht über chemische Bindungen mit dem katalytischen Zentrum des ALK-Rezeptors in Kontakt und wird bei Aktivierung des Rezeptors autophosphoryliert (Lee et al. 2010; Wang et al. 2010). Ebenso werden die Tyrosine der Positionen 1278, 1282 und 1283 - als Bestandteil der Aktivierungsschleife des ALK-Rezeptors - mit einer Autophosphorylierung in Zusammenhang gebracht (Bossi et al. 2010; Lee et al. 2010).

Die Bildgewinnung erfolgte mittels quantitativer Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie und entsprechend dem Expressionsniveau des ALK-Rezeptors angepassten Belichtungszeiten. Die Bilder einer Abbildung sind gleich skaliert. Die Signalintensitäten des GFP-Signals und des Cy3-Signals wurden mit den Belichtungszeiten der Bilder verrechnet (Kapitel 3.4.4). Dadurch können Vergleiche im Hinblick auf die Signalintensität und die Lokalisation der ALK-Rezeptormutationen in den Neuroblastomzellen gezogen werden. Die Signalintensität wird durch die Helligkeit in der Abbildung dargestellt, die Lokalisation der ALK-Rezeptormutationen wird durch die räumliche Überlagerung der Signale abgebildet.

Abschließend wurden die Phosphorylierungsniveaus als Verhältnis zwischen der GFP-Signalstärke, d. h. der exprimierten Menge des ALK-Rezeptors, und der Cy3-Signalstärke, d. h. der Phosphorylierung der ALK-Phospho-Epitope, dargestellt. Die fünf

DNA-Mutationen wurden im Hinblick auf Unterschiede in ihren Gesamtposphorylierungsniveaus und auf Unterschiede an den antikörperspezifisch markierten ALK-Phospho-Epitopen hin untersucht.

4.1.1 Wild Type ALK-Rezeptor

Die SK-N-AS-Zellen, die den Wild Type ALK-Rezeptor exprimieren, behalten die spindelförmige, fibroblastenähnliche Zellmorphologie untransfizierter Neuroblastomzellen in Grundzügen bei, sind jedoch sichtbar stärker polarisiert. Sie bilden flache, breite Lamellipodien, entsprechend den Richtungen ihrer Polarisation. Im Gegensatz dazu bilden nicht transfizierte SK-N-AS-Zellen wenige bis gar keine Zellausläufer aus.

In Abbildung 7 wird das Expressionsniveau des Wild Type ALK-Rezeptors ebenso wie das Phosphorylierungsniveau der mit Antikörpern markierten ALK-Phospho-Epitope dargestellt. Die Darstellung der absoluten Helligkeit beider Signale erfolgt in Graustufen, die Kolo-kalisation der Signale ist farblich abgebildet. Das grüne GFP-Signal und das rote Cy3-Signal werden zusammen gezeigt, um einen Bezug zwischen der Lokalisation der ALK-Rezeptoren in der Zelle und dem Phosphorylierungsniveau der antikörpermarkierten Epitope herzustellen. In den gelben Zellarealen überlagern sich die Signale. Dort exprimiert die Neuroblastomzelle eine große Menge an phosphorylierten ALK-Rezeptoren.

Keine der Zellen zeigt im Bereich der Zellkerne eine Färbung mit GFP, d. h. im Zellkern der Neuroblastomzellen kommt der Wild Type ALK-Rezeptor nicht vor. Demgegenüber findet sich in allen Zellen eine homogene, großflächige und perinukleäre Färbung des Zytoplasmas mit GFP. Diese intrazelluläre Expression des Wild Type ALK-Rezeptors deutet auf eine lokalisierte Anhäufung der Rezeptoren im Bereich des kernnahen Endoplasmatischen Retikulums der Zellen hin. Auch an den Zellmembranen aller Neuroblastomzellen kann ein GFP-Signal nachgewiesen werden. Entgegen der ähnlich lokalisierten Expression des Wild Type ALK-Rezeptors innerhalb der Zellen weisen die Zellen im optischen Vergleich ein heterogenes Expressionsniveau des Rezeptors auf.

Die ALK-Phospho-epitopspezifische Cy3-Signalstärke und dessen Überlagerung mit dem GFP-Signal ist ebenfalls heterogen zwischen den Epitopen verteilt, dementsprechend liegen die Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors unterschiedlich stark phosphoryliert vor. Ein besonders hohes Maß an Phosphorylierung zeigen die Epitope Tyr1096 und Tyr1604, deren Phosphorylierungsniveaus über dem der anderen ALK-

Phospho-Epitope liegen. Die Phosphorylierungsniveaus des Tyr1278 und des Tyr1586 sind geringer und liegen näher beieinander, wobei das Tyr1278 stärker phosphoryliert wird als das Tyr1586. Das geringste Phosphorylierungsniveau findet sich an der Kombination der Epitope Tyr1278/1282/1283.

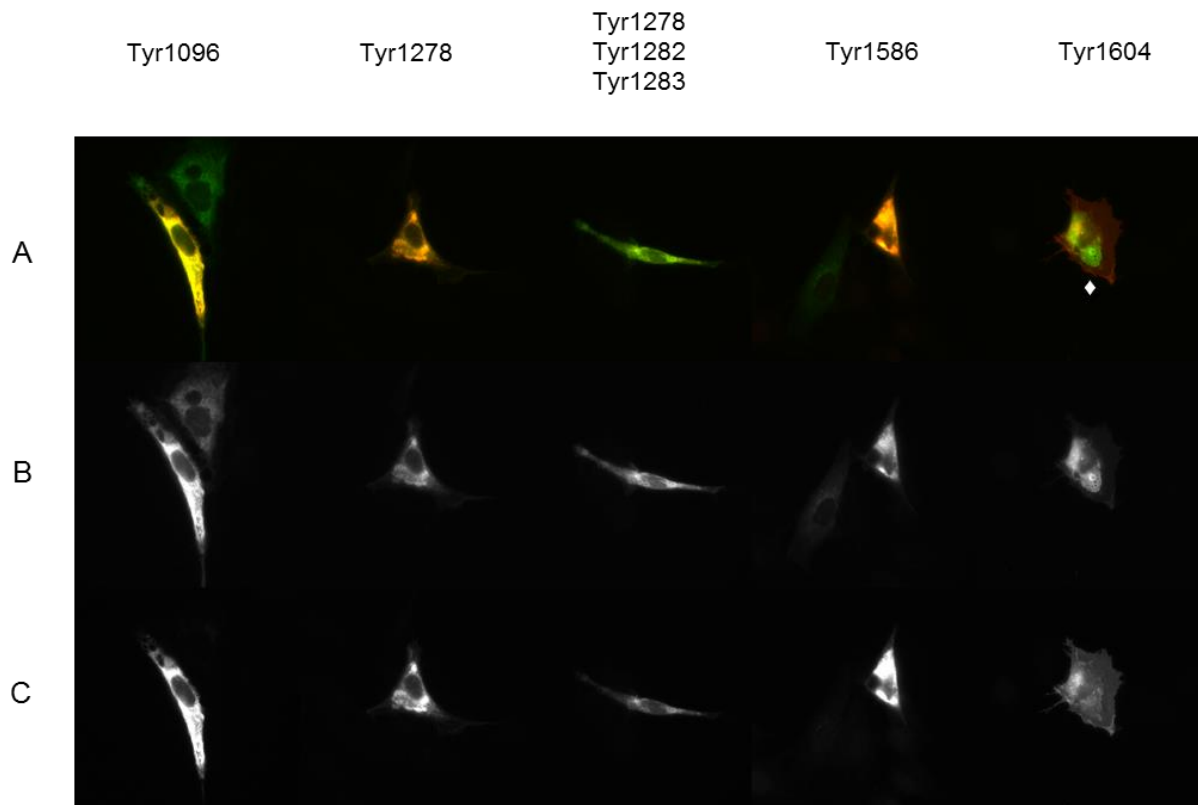


Abbildung 7: Expression des Wild Type ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie. Darstellung von repräsentativen Zellen. **A**, Darstellung der Kolo-kalisation des grünen GFP-Signals und des roten Cy3-Signals in den Neuroblastomzellen. **B**, Übersicht über die Signalstärken des GFP-Signals und die Lokalisation des Wild Type ALK-Rezeptors in den SK-N-AS-Zellen in Graustufen. **C**, Übersicht über die Signalstärken des Cy3-Signals und über das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope des Wild Type des ALK-Rezeptors in Graustufen.

Bis auf das Tyr1604 weisen die ALK-Phospho-Epitope eine gleichmäßige, homogene Phosphorylierung im Zytoplasma wie auch an der Zellmembran auf. Es gibt nahezu keine Unterschiede im Hinblick auf die intrazelluläre Lokalisation der Phosphorylierungen an den vier ALK-Phospho-Epitopen Tyr1096, Tyr1278, der Kombination aus Tyr1278/1282/1283 und Tyr1586. Auffällig sind Bereiche starker Phosphorylierung nahe der Kernpole, vermutlich am zellkernnahen Endoplasmatischen Retikulum der

Zellen, die sich bei der kombinierten Darstellung beider Signale als gelbliche Bereiche präsentieren. An Tyr1604 ist dagegen eine klare Trennung zwischen den stark phosphorylierten Rezeptoren an der Zellmembran und den weniger stark phosphorylierten Rezeptoren im Zellinneren zu erkennen. Das GFP- und das Cy3-Signal sind klar voneinander getrennt (♦, s. Abbildung 7).

4.1.2 F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors

Die Neuroblastomzellen, die die F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors exprimieren, bilden ausgeprägte Lamellipodien und Filopodien entlang ihrer Zellmembran. Die Zellausläufer sind dünner und länger als bei den SK-N-AS-Zellen, die die anderen untersuchten Mutationen exprimieren. In Grundzügen bleibt ihre Zellmorphologie dennoch ähnlich der von Fibroblasten. Sie besitzen einen Zellkern und einen polaren Aufbau, der eine Zellausrichtung erkennen lässt.

Die F1174L-Mutation exprimiert in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie eine große homogene Menge des ALK-Rezeptors. Das GFP-Signal findet sich gleichmäßig stark im Zytoplasma aller Zellen. Im Hinblick auf die absolute Helligkeit des GFP-Signals liegen Gebiete mit höherer Fluoreszenzintensität im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums in der Umgebung der Zellkerne. In den Zellkernen selbst ist kein GFP-Signal detektierbar, folglich wird dort kein ALK-Rezeptor der F1174L-Mutation exprimiert. Im Gegensatz dazu ist an den Zellmembranen aller Neuroblastomzellen ein gleichmäßig starkes GFP-Signal erkennbar. Bis in die kleinen Filopodien exprimieren die Zellen die F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors an ihrer Zellmembran (○, s. Abbildung 8).

Bei dieser Mutation des ALK-Rezeptors liegt an jedem der ALK-Phospho-Epitope ein Cy3-Signal vor, folglich wird jedes der Epitope phosphoryliert. Im Hinblick auf die Cy3-Signalstärke unterscheiden sich die Epitope voneinander. Die geringste Cy3-Signalstärke weist die Kombination Tyr1278/1282/1283 auf. Im Vergleich mit den anderen vier ALK-Phospho-Epitopen zeigt das Tyr1278/1282/1283 die geringste Helligkeit. Ein leicht stärkeres Cy3-Signal zeigen das Tyr1278 und das Tyr1604. Die Helligkeit des Tyr1278 ist etwas größer als die des Tyr1604, demnach wird das Tyr1278 etwas stärker phosphoryliert als das Tyr1604. Das Tyr1586 weist das zweitstärkste, das Tyr1096 das stärkste Cy3-Signal der ALK-Phospho-Epitope der F1174L-Mutation auf. Die Lokalisation der Cy3-Signale in den Neuroblastomzellen ist vergleichsweise identisch. Da keine ALK-Rezeptoren in den Kernen vorkommen, ist dort kein Cy3-Signal feststellbar. Im Zytoplasma liegen die hohen Fluoreszenzintensitäten des Cy3-Signals in

den Bereichen des Endoplasmatischen Retikulums. Die Zellmembranen aller Zellen zeigen ein deutliches Cy3-Signal, selbst die in den kleinen Filopodien vorhandenen ALK-Rezeptoren sind stark phosphoryliert (♦, s. Abbildung 8).

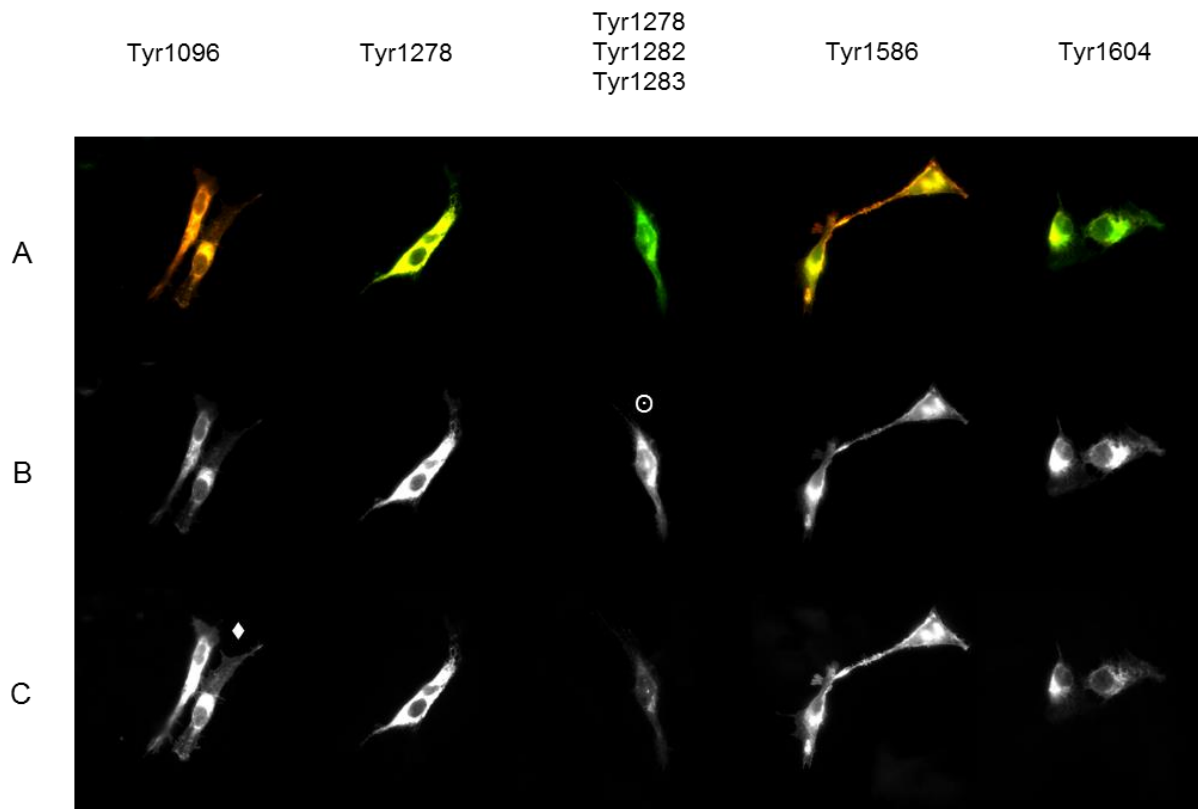


Abbildung 8: Expression der F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie. Darstellung von repräsentativen Zellen. **A**, Darstellung der Kollokalisierung des grünen GFP-Signals und des roten Cy3-Signals in den Neuroblastomzellen. **B**, Übersicht über die Signalstärken des GFP-Signals und die Lokalisation der F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors in den SK-N-AS-Zellen in Graustufen. **C**, Übersicht über die Signalstärken des Cy3-Signals und über das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors in Graustufen.

Das hohe, jedoch uneinheitliche Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors wird durch die Darstellung der Kollokalisierung beider Signale verdeutlicht. Das Tyr1096 und das Tyr1586 zeigen stark phosphorylierte ALK-Rezeptoren der F1174L-Mutation an der Zellmembran der Neuroblastomzellen. Durch die Überlagerung der Signale sind sie rot dargestellt. Das hohe Phos-

phorylierungsniveau dieser beiden Epitope im Zellinneren, vornehmlich am Endoplasmatischen Retikulum der Zellen, ist in der Überlagerung der Signale gelb dargestellt. Das Tyr1278 und das Tyr1604 zeigen die gleiche intrazelluläre Überlagerung beider Signale, ihnen fehlt dagegen das hohe Phosphorylierungsniveau an den Zellmembranen. Das Tyr1278/1282/1283 weist ebenfalls keine Signalüberlagerung an der Zellmembran auf. Die gelbliche Überlagerung der Signale im Zytoplasma ist die schwächste aller ALK-Phospho-Epitope der F1174L-Mutation (Abbildung 8).

4.1.3 I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors

Die Zellmorphologie der SK-N-AS-Zellen, in die die I1250T-Mutation im Verbund mit dem ALK-GFP eingebracht worden ist, ist der Morphologie untransfizierter SK-N-AS-Zellen sehr ähnlich. Sie besitzen kaum Lamellipodien oder andere Zellausläufer und ihre äußere Form entspricht der von Fibroblasten mit polarer Zellmorphologie.

Alle Neuroblastomzellen, in die die I1250T-Mutation transfiziert worden ist, zeigen ein homogenes intrazelluläres GFP-Signal. Die ALK-Rezeptoren sind gleichmäßig im Zytoplasma der Zellen verteilt. Regionen hoher ALK-Expression finden sich an den Kernpolen, vermutlich im Endoplasmatischen Retikulum der Zellen. Die Zellkerne weisen kein GFP-Signal auf. Folglich kommt die I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors in den Zellkernen der Neuroblastomzellen nicht vor. Entlang der Zellmembranen zeigt sich ein schwaches GFP-Signal, da der ALK-Rezeptor dort nur in geringen Mengen exprimiert wird. Das Expressionsniveau des ALK-Rezeptors ist bei allen Zellen, die die I1250T-Mutation exprimieren, annähernd identisch und im Vergleich mit den anderen vier untersuchten Mutationen gering.

Keines der ALK-Phospho-Epitope der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors zeigt ein Cy3-Signal, weder im Zytoplasma noch an der Zellmembran. Da im Inneren der Zellkerne keine ALK-Rezeptoren vorkommen, kann dort auch keine Phosphorylierung detektiert werden. Entgegen den Zellkernen werden im Zytoplasma und an der Zellmembran jedoch ALK-Rezeptoren exprimiert. Daher verhält sich die I1250T-Mutation anders als die anderen vier untersuchten Mutationen: Die ALK-Rezeptoren der I1250T-Mutation werden in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie nicht phosphoryliert (Abbildung 9).

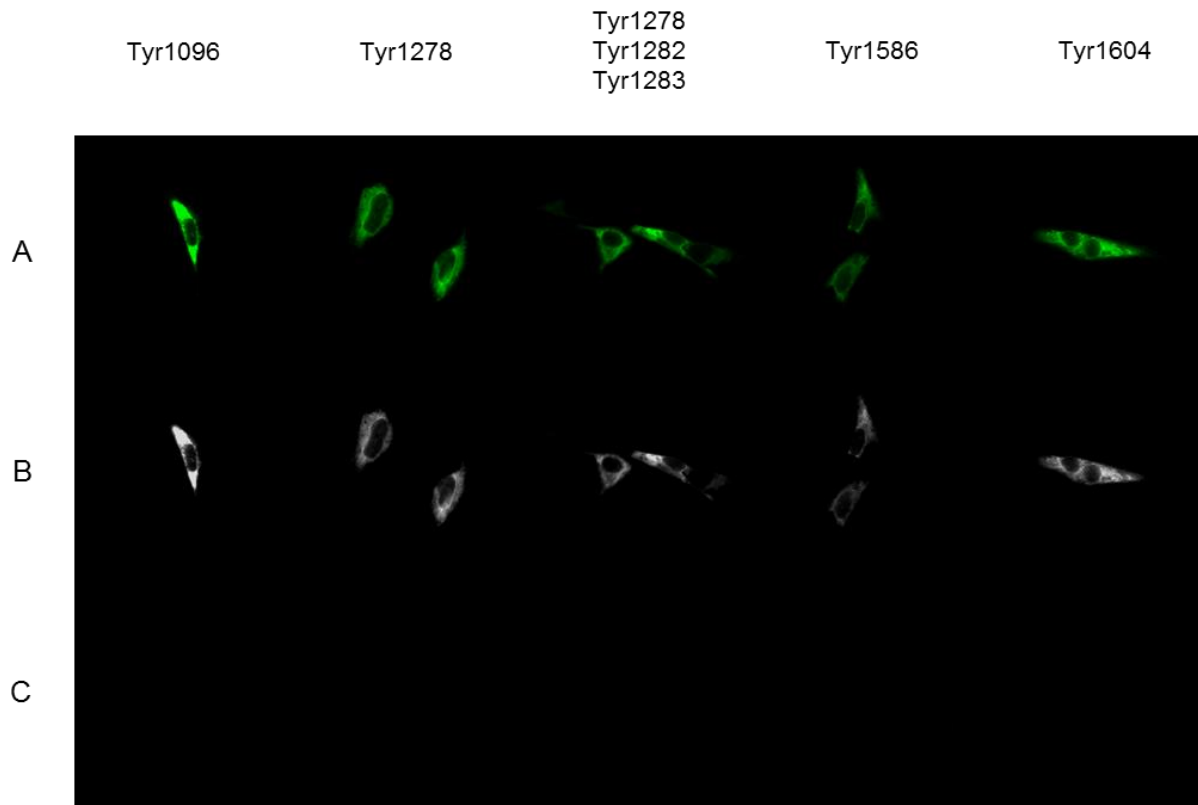


Abbildung 9: Expression der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie. Darstellung von repräsentativen Zellen. **A**, Darstellung der Kollokalisierung des grünen GFP-Signals und des roten Cy3-Signals in den Neuroblastomzellen. **B**, Übersicht über die Signalstärken des GFP-Signals und die Lokalisation der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors in den SK-N-AS-Zellen in Graustufen. **C**, Übersicht über die Signalstärken des Cy3-Signals und über das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors in Graustufen.

4.1.4 R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors

Die Morphologie der Zellen, welche die R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors exprimieren, zeigt deutliche Ausprägungen von Lamellipodien und Filopodien. Grundlegend bleibt eine den Fibroblasten ähnliche Zellmorphologie erhalten. Die Zellen sind polarisiert, jedoch sind die Zellausläufer häufiger und stärker ausgeprägt als bei allen anderen Mutationen mit Ausnahme der F1174L-Mutation. Die Zellaktivität der Neuroblastomzellen, die die R1275Q-Mutation exprimieren, ist hoch.

Das Expressionsniveau der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors wird zusammen mit dem Phosphorylierungsniveau ausgesuchter ALK-Phospho-Epitope in Abbildung 10 dargestellt. Die Neuroblastomzellen zeigen in ihren Zellkernen weder ein GFP-Signal

noch ein Cy3-Signal. Dagegen liegt im Zytoplasma der Neuroblastomzellen eine ausgeprägte Expression des ALK-Rezeptors der R1275Q-Mutation vor. Das homogene GFP-Signal in der Region um die Zellkerne deutet auf eine Ansammlung der ALK-Rezeptoren im kernnahen Endoplasmatischen Retikulum der Zellen hin. Ebenso zeigen alle transient transfizierten SK-N-AS-Zellen das GFP-Signal an ihren Zellmembranen, da dort die R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors ebenfalls exprimiert wird. Die Verteilung des GFP-Signals entlang der Zellmembranen ist jedoch ungleichmäßiger als im Zytoplasma und die Signalintensität dort weniger stark.

Die ALK-Phospho-Epitope an Tyr1096, der Kombination aus Tyr1278/1282/1283, Tyr1586 und Tyr1604 zeigen ein einheitlich starkes Cy3-Signal und demzufolge ein etwa gleich großes Phosphorylierungsniveau. Lediglich das Phosphorylierungsniveau an Tyr1096 liegt etwas über dem der anderen vier ALK-Phospho-Epitope. Das Cy3-Signal beschränkt sich hauptsächlich auf das Zytoplasma der Neuroblastomzellen. Innerhalb des Zytoplasmas ist die Phosphorylierung der ALK-Phospho-Epitope inhomogen verteilt. In den kernnahen Zellarealen liegen punktuelle Bereiche mit höherer Fluoreszenzintensität. Phosphorylierte ALK-Rezeptoren an der Zellmembran sind bei diesen vier Epitopen die Ausnahme. Das Tyr1278 nimmt eine Sonderrolle zwischen den ALK-Phospho-Epitopen der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors ein. Dieses Epitop weist eine deutlich größere Heterogenität des Phosphorylierungsniveaus als die anderen vier Epitope der R1275Q-Mutation auf. Das Phosphorylierungsmuster der Neuroblastomzellen, die mit Antikörpern an Tyr1278 markiert wurden, ist dichotom. Obwohl jede der Zellen in etwa die gleiche GFP-Signalstärke zeigt, dementsprechend auch in etwa die gleiche Menge an ALK-Rezeptoren der R1275Q-Mutation exprimiert, unterscheidet sich die Cy3-Signalstärken und damit die Phosphorylierungsniveaus dieser zwei Zellpopulationen deutlich voneinander. Während die eine Zelle ein geringes Cy3-Signal und damit ein geringes Phosphorylierungsniveau aufweist, liegt die zweite Zelle, obwohl ebenfalls am Tyr1278 mit Antikörpern markiert, wesentlich stärker phosphoryliert vor. Das Tyr1278 ist das einzige Epitop, an dem dieses Muster vorliegt. Die stark phosphorylierten Zellen an Tyr1278 übertreffen im Vergleich der Helligkeit des Cy3-Signals alle anderen ALK-Phospho-Epitope der R1275Q-Mutation. Zusätzlich zu der starken intrazellulären Phosphorylierung - Gelb in der Überlagerung des GFP - und Cy3-Signals - zeigt die an Tyr1278 stärker phosphorylierte Zellpopulation ebenfalls eine Phosphorylierung der ALK-Rezeptoren entlang der Zellmembran - Rot in der Überlagerung dargestellt (♦, s. Abbildung 10).

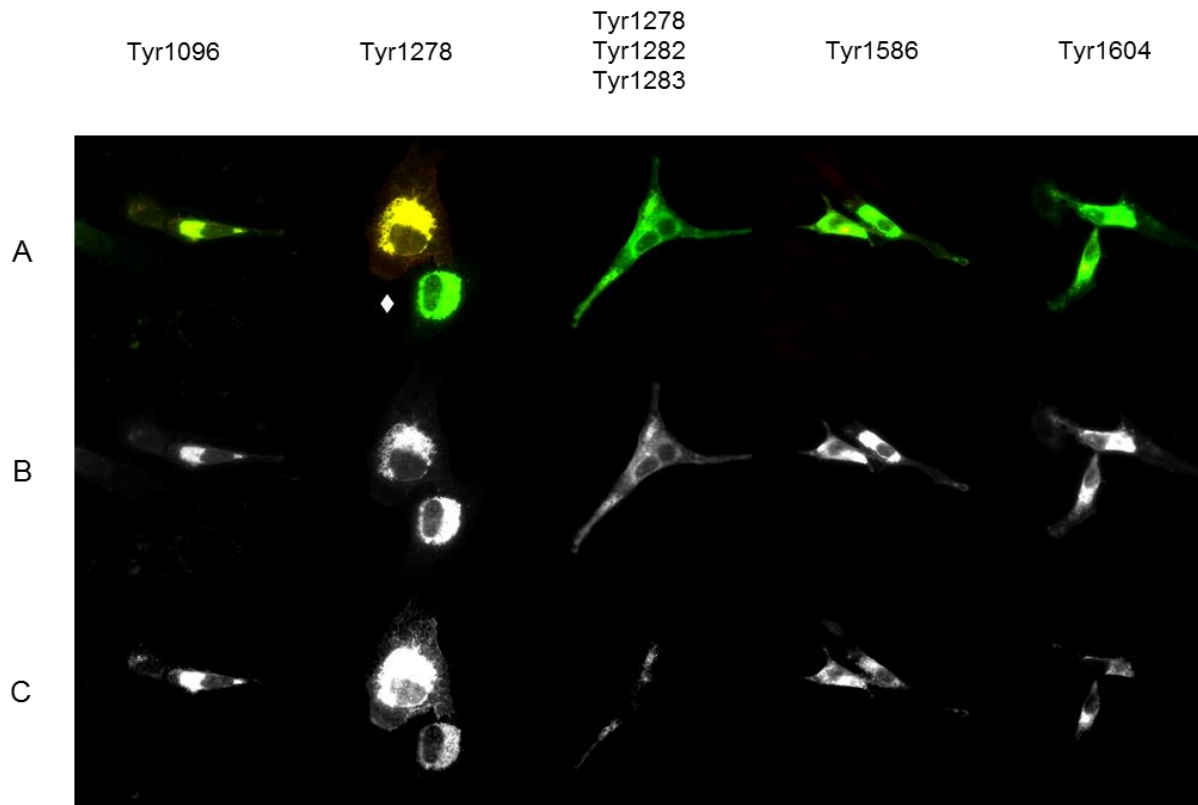


Abbildung 10: Expression der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie. Darstellung von repräsentativen Zellen. **A**, Darstellung der Kolokalisation des grünen GFP-Signals und des roten Cy3-Signals in den Neuroblastomzellen. **B**, Übersicht über die Signalstärken des GFP-Signals und die Lokalisation der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors in den SK-N-AS-Zellen in Graustufen. **C**, Übersicht über die Signalstärken des Cy3-Signals und über das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors in Graustufen.

4.1.5 Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors

Die SK-N-AS-Zellen, die die Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors exprimieren, weisen eine Zellmorphologie auf, welche der Morphologie der Zellen sehr ähnlich ist, die den Wild Type ALK-Rezeptor exprimieren. Die Neuroblastomzellen bilden Lamellipodien und Filopodien. Daneben ist eine Steigerung der Zellaktivität zu beobachten. Die transient transfizierten Zellen zeigen eine polare Ausrichtung, welche der von Fibroblasten ähnlich ist.

Das GFP-Signal in Abbildung 11 weist auf eine ausgeprägte heterogene Verteilung der exprimierten Mengen des ALK-Rezeptors der Y1604F-Mutation in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie hin. Die Bandbreite des Expressionsniveaus reicht von einer sehr geringen Signalstärke des GFP an Tyr1604 bis hin zu einer großen Menge an

exprimierten ALK-Rezeptoren der Y1604F-Mutation an Tyr1278. Wie die anderen Mutationen zeigt auch die Y1604F-Mutation kein GFP-Signal und damit keine ALK-Rezeptoren in den Zellkernen der Neuroblastomzellen. Im Zytoplasma der Zellen sind die vorhandenen ALK-Rezeptoren homogen verteilt, größere Konzentrationen der GFP-Signalstärken liegen an den Zellarealen nahe der Kernpole. Unabhängig von der absoluten Menge der exprimierten ALK-Rezeptoren ist die Homogenität des GFP-Signals bei allen Zellen identisch. Die Neuroblastomzellen exprimieren die Y1604F-Mutation an ihrer Zellmembran, das GFP-Signal ist bis in die gebildeten Filopodien zu sehen.

Insgesamt zeigen die ALK-Phospho-Epitope der Y1604F-Mutation ein sehr hohes Phosphorylierungsniveau, wobei mehrere Besonderheiten auffällig sind. Dabei zeigt das Epitop Tyr1096 das höchste Phosphorylierungsniveau innerhalb der Y1604F-Mutation auf. Die dünn auslaufenden Filopodien exprimieren eine geringe Menge der ALK-Rezeptoren, die ihrerseits sehr stark phosphoryliert vorliegen. In der Ansicht der Kolo-kalisation beider Fluoreszenzsignale ist die sehr starke Phosphorylierung Tyr1096 rot dargestellt (◆, s. Abbildung 11). Das Tyr1604 verhält sich gegensätzlich zum Tyr1096. Obwohl die an diesem ALK-Phospho-Epitop mit Antikörpern markierten Neuroblastomzellen eine vergleichbare Menge an ALK-Rezeptoren exprimieren, weisen die Zellen kein Cy3-Signal auf. Bei der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors wird das ursprünglich an Position 1604 gelegene Tyrosin gegen ein Phenylalanin ausgetauscht (Lee et al. 2010). Eine Phosphorylierung dieser Tyrosinkinase-Domäne ist ab dem Zeitpunkt der Mutation folglich nicht mehr möglich. Die fehlende Phosphorylierung an diesem Epitop ist als Negativkontrolle zu werten und bestätigt die Ergebnisse der durchgeführten Experimente. Die verbleibenden drei ALK-Phospho-Epitope Tyr1278, die Kombination aus Tyr1278/1282/1283 und Tyr1586 zeigen eine Abstufung in ihren Phosphorylierungsniveaus. Dabei entsprechen sich die Phosphorylierungsniveaus des Tyr1586 und der Kombination aus Tyr1278/1282/1283 in etwa, wohingegen das leicht geringere Phosphorylierungsniveau des Tyr1278 hinter den anderen beiden zurückbleibt.

Das Cy3-Signal ist innerhalb der Zellen, in denen der ALK-Rezeptor der Y1604F-Mutation phosphoryliert vorliegt, heterogen verteilt. Die ALK-Rezeptoren im Zytoplasma der Zellen liegen generell phosphoryliert vor, allerdings schwankt das Phosphorylierungsniveau zwischen den verschiedenen Zellarealen. Deutlich heraus stechen punk-

tuelle Gebiete mit hoher Fluoreszenzintensität im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums und in der Nähe der Kernpole. Die anderen Areale des Zytoplasmas sind weniger stark aber gleichmäßig phosphoryliert. Des Weiteren zeigen alle Neuroblastomzellen ein Cy3-Signal ungleicher Signalstärke entlang ihrer Zellmembran. Das Epitop an Tyr1278 zeigt eine deutliche Trennung zwischen den stark phosphorylierten ALK-Rezeptoren entlang der Zellmembran und den großen Expressionsmengen weniger stark phosphorylierter ALK-Rezeptoren im Zytoplasma (▲, s. Abbildung 11).

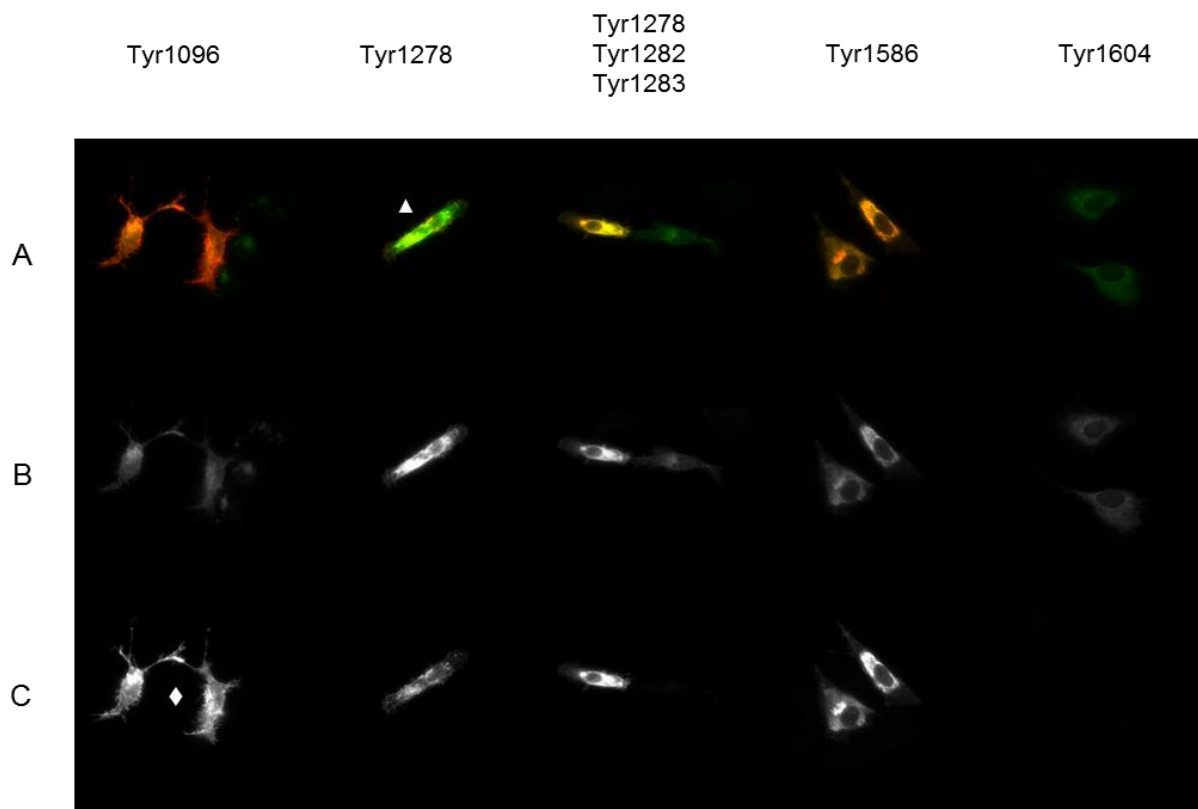


Abbildung 11: Expression der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie. Darstellung von repräsentativen Zellen. **A**, Darstellung der Kollokalisierung des grünen GFP-Signals und des roten Cy3-Signals in den Neuroblastomzellen. **B**, Übersicht über die Signalstärken des GFP-Signals und die Lokalisation der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors in den SK-N-AS-Zellen in Graustufen. **C**, Übersicht über die Signalstärken des Cy3-Signals und über das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors in Graustufen.

4.1.6 Das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors, der I1250T-Mutation und der Kontrollgruppe

Für jede Zelle wurde während der Datenanalyse ein Mittelwert der Signalstärke des GFP- und des Cy3-Kanals errechnet (siehe Kapitel 3.4.4). In der Darstellung des Verhältnisses von GFP-Signalstärke auf der x-Achse und Cy3-Signalstärke auf der y-Achse wird jede Zelle durch einen Punkt repräsentiert. Die Werte, die die Expressionsmengen des GFP anzeigen, sind keinen absoluten Mengen des ALK-Rezeptors zugeordnet, aber für alle Mutationen identisch und daher zur Quantifizierung der Daten nutzbar. Der Wert der GFP-Signalstärke ist proportional zur Menge der exprimierten ALK-Rezeptoren.

In Abbildung 12 ist das Phosphorylierungsniveau der antikörpermarkierten ALK-Phospho-Epitope Tyr1096, Tyr1278, der Kombination aus Tyr1278/1282/1283, Tyr1586 und Tyr1064 des Wild Type ALK-Rezeptors dargestellt. Zur Überprüfung der Ergebnisse zeigt die Abbildung die Phosphorylierungsniveaus der I1250T-Mutation sowie die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen.

Die Betrachtung des Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors zeigt, dass, unabhängig davon welches Epitop mit der indirekten Immunfluoreszenz markiert worden ist, zunächst eine erforderliche Schwellenmenge an ALK-Rezeptoren exprimiert sein muss, um eine Phosphorylierung des ALK-Rezeptors auszulösen. Mit der GFP-Signalstärke von 1 ist die notwendige Schwellenmenge für eine Phosphorylierung der ALK-Phospho-Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors für alle Epitope nahezu identisch. Wird die erforderliche Schwellenmenge oder eine größere Menge an ALK-Rezeptoren exprimiert, kommt es zu einer Phosphorylierung aller Epitope, wobei sich die Epitope im Hinblick auf den Grad ihrer Phosphorylierung unterscheiden. Exprimiert die Zelle keine ausreichende Menge an ALK-Rezeptoren, wird in der Folge kein ALK-Phospho-Epitop phosphoryliert.

Das Tyr1096 ist das am stärksten phosphorylierte ALK-Phospho-Epitop des Wild Type ALK-Rezeptors. Das Phosphorylierungsniveau erreicht an diesem Epitop die größten Werte. Gleichzeitig ist das Tyr1096 jedoch auch das Epitop mit der größten Streuung innerhalb der Messwerte. Bei der GFP-Signalstärke von 10 gibt es Zellen, die sehr stark phosphoryliert vorliegen und gleichzeitig Zellen, die nahezu überhaupt kein Cy3-Signal aufweisen. Das Tyr1278 zeigt ein etwa halb so großes, maximales Phosphorylierungsniveau wie das Tyr1096 bei annähernd gleicher Steigung beider Kurven. In

Bezug auf die Verteilung der Messpunkte zeigen beide Epitope ein übereinstimmendes Muster. Das Phosphorylierungsniveau des Tyr1586 beträgt wiederum etwa 50 % des Niveaus des Tyr1278. Im Bereich der GFP-Signalstärke zwischen 1 und 3 entspricht das Phosphorylierungsniveau des Tyr1586 dem des Tyr1278. Oberhalb von 3 flacht die Kurve bei zunehmender Menge an exprimierten ALK-Rezeptoren ab. Das Tyr1604 weist nach dem Tyr1096 das zweithöchste Phosphorylierungsniveau auf, wobei sich die Messpunkte in zwei Kohorten aufteilen. Ein Kollektiv der Neuroblastomzellen zeigt, trotz einer großen Menge an exprimierten ALK-Rezeptoren, ein sehr geringes Phosphorylierungsniveau. Das zweite Kollektiv zeigt, bei einem identisch hohen Expressionsniveau an ALK-Rezeptoren, eine starke Phosphorylierung. Im Vergleich mit den anderen vier ALK-Phospho-Epitopen zeigt die Kombination Tyr1278/1282/1283 das geringste Phosphorylierungsniveau. Die notwendige Schwellenmenge an exprimierten ALK-Rezeptoren muss in etwa doppelt so groß sein, bevor es zu einer Phosphorylierung des ALK-Phospho-Epitops kommt.

Zusammenfassend ergibt sich für den Wild Type ALK-Rezeptor folgende Übersicht über die Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope:

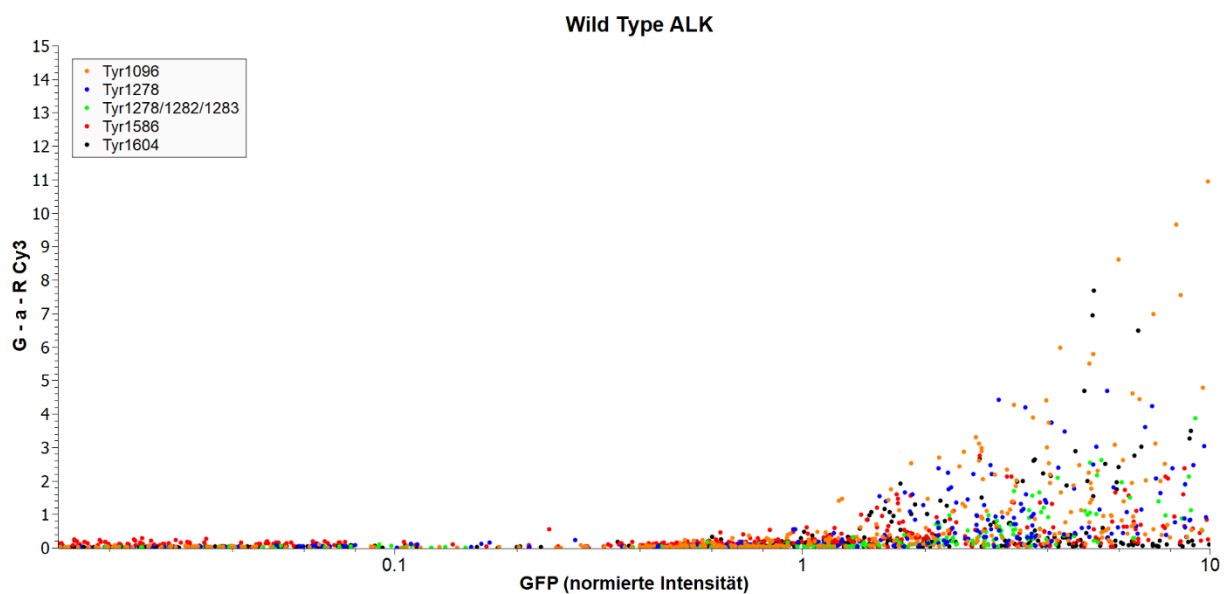
Tyr1096 > Tyr1604 > Tyr1278 > Tyr1586 > Tyr1278/1282/1283

Das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der I1250T-Mutation zeigt, dass unabhängig von der Menge der exprimierten ALK-Rezeptoren in den Neuroblastomzellen kein Epitop phosphoryliert vorliegt. In Relation zur Kontrollgruppe verdeutlichen die Ergebnisse die Spezifität der verwendeten Antikörper gegenüber den markierten ALK-Phospho-Epitopen.

Zusammenfassend ergibt sich für die I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors folgende Übersicht über die Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope:

$$\text{Tyr1096} = \text{Tyr1278} = \text{Tyr1278/1282/1283} = \text{Tyr1586} = \text{Tyr1604}$$

Mit den Neuroblastomzellen der Kontrollgruppe wurde während der Experimente genauso verfahren wie mit den anderen Zellen. Auf die Anwendung der primären Antikörper wurde während der Versuchsdurchführung verzichtet. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe verdeutlichen, dass kein ALK-Phospho-Epitop der Kontrollgruppe eine Phosphorylierung aufweist. Diese Beobachtung trifft für alle Mutationen zu. Folglich sind die sekundären Antikörper nur gegen die Epitope der primären Antikörper gerichtet. Sie verursachen kein Hintergrundrauschen. Das Phosphorylierungsniveau ist dabei unabhängig von der Menge der exprimierten ALK-Rezeptoren in den Zellen.



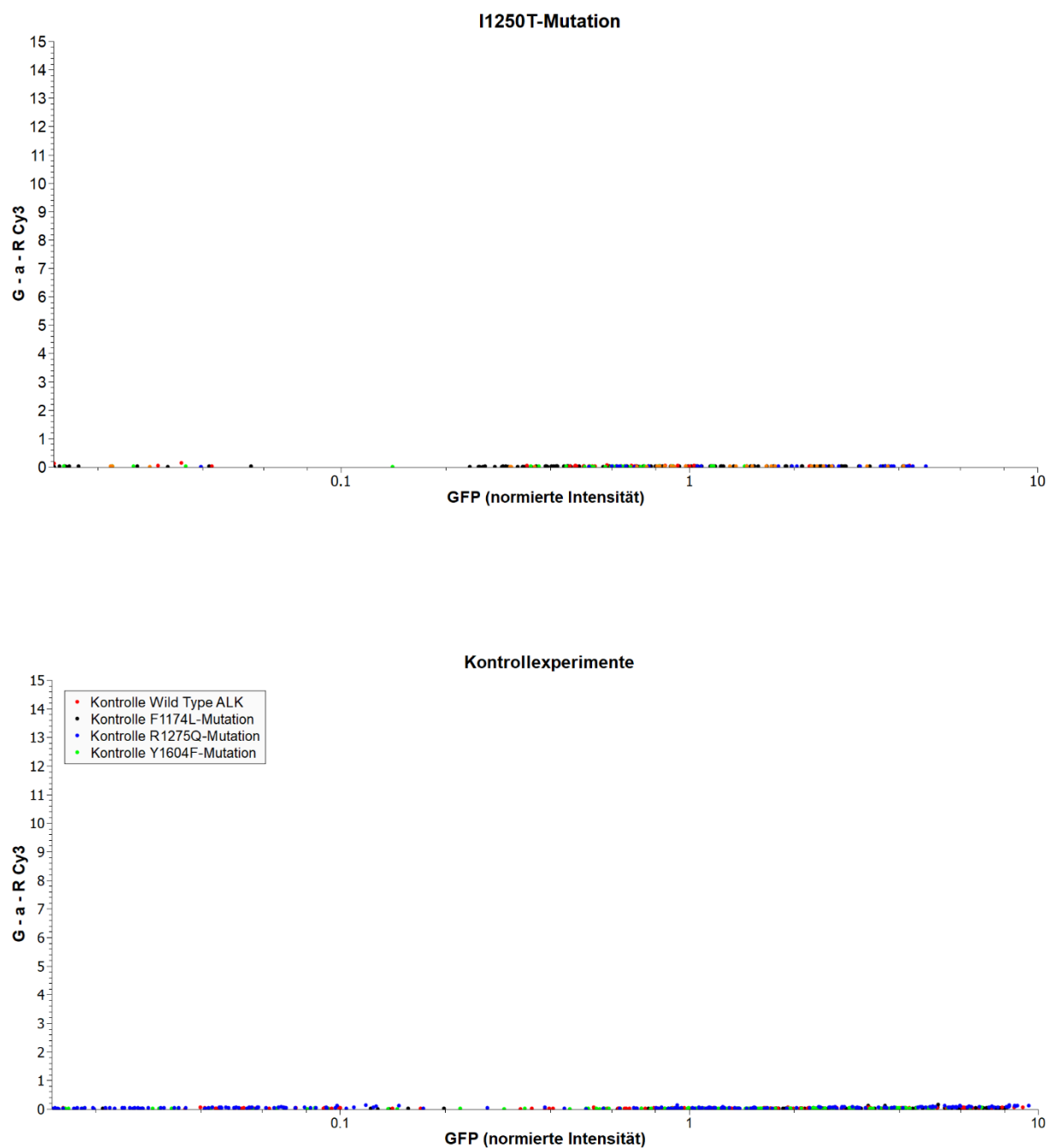


Abbildung 12: Analyse des Phosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors, der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors und der Kontrollgruppe. Das Phosphorylierungsniveau ist als Verhältnis zwischen dem Mittelwert des GFP-Signals (x-Achse) und dem Mittelwert des Cy3-Signals (y-Achse) dargestellt. Die Intensitäten beider Achsen sind in allen Graphen normiert. Jede Zelle ist durch einen Messpunkt symbolisiert.

4.1.7 Das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der F1174L-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors

Abbildung 13 zeigt das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope Tyr1096, Tyr1278, der Kombination Tyr1278/1282/1283, Tyr1586 und Tyr1604. Die Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-Mutation, der R1275Q-Mutation und der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors sind in der Abbildung untereinander dargestellt.

Alle ALK-Phospho-Epitope der F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors werden phosphoryliert, nachdem eine Schwellenmenge an ALK-Rezeptoren von den Neuroblastomzellen exprimiert worden ist. Die Epitope unterscheiden sich in der Menge der ALK-Rezeptoren, die notwendig ist, bevor sie phosphoryliert vorliegen können. Das Tyr1096, das Tyr1586 und die Kombination aus Tyr1278/1282/1283 benötigen im Gegensatz zu den anderen beiden ALK-Phospho-Epitopen eine geringere Schwellenmenge an exprimierten ALK-Rezeptoren. Ab einer GFP-Signalstärke von 0,6 liegen diese drei Epitope phosphoryliert vor. Die Phosphorylierung des Tyr1604 beginnt ab einer GFP-Signalstärke von 0,8. Zur Phosphorylierung des Tyr1278 wird eine doppelt so große Schwellenmenge benötigt. Ab einer GFP-Signalstärke von etwa 1,5 kommt es zu einem Anstieg des Phosphorylierungsniveaus.

Die Gesamtbetrachtung aller Zellen der F1174L-Mutation zeigt, dass die Mehrzahl der Neuroblastomzellen phosphorylierte ALK-Phospho-Epitope enthält. Die Phosphorylierungsniveaus der verschiedenen ALK-Phospho-Epitope laufen fächerförmig auseinander und sind klar voneinander abgrenzbar. Oberhalb der für die Phosphorylierung erforderlichen Schwellenmenge an ALK-Rezeptoren liegt keins der Epitope unphosphoryliert vor.

Das größte Phosphorylierungsniveau zeigt das Tyr1096. Im Vergleich mit den anderen Epitopen der F1174L-Mutation liegen dort die höchsten Werte der Cy3-Signalstärke sowie die größte Steigung der Messwerte vor. Die maximale Cy3-Signalstärke am Tyr1586 ist in etwa um ein Drittel geringer als am Tyr1096. Die Steigung an diesem Epitop ist ebenfalls geringer, dafür liegen die Messpunkte konzentrierter beieinander und umfassen das gesamte Spektrum der GFP-Signalstärke. Die Messpunkte des Tyr1278, der Kombination aus Tyr1278/1282/1283 und des Tyr1604 zeigen ebenfalls eine geringe Streuung. Trotz der geringen erforderlichen Schwellenmenge an ALK-Rezeptoren zeigt die Kombination an Tyr1278/1282/1283 das niedrigste Phosphorylierungsniveau der F1174L-Mutation. Etwas darüber liegt das Tyr1604. Beide Kurven

haben eine annähernd gleiche Steigung, nahezu identische Maxima der Cy3-Signalstärke auf der y-Achse und zeigen Messpunkte bis zum maximalen x-Achsenwert. Das Phosphorylierungsniveau des Tyr1278 liegt über dem des Tyr1604, aber unter dem des Tyr1586. Die maximale Cy3-Signalstärke beträgt in etwa 50 % der Signalstärke des Tyr1586, wobei in dieser Zellpopulation Expressionsniveaus erreicht werden, die einer GFP-Signalstärke von 10 entsprechen.

Zusammenfassend ergibt sich für die F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors folgende Übersicht über die Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope:

Tyr1096 > Tyr1586 > Tyr1278 > Tyr1604 ≈ Tyr1278/1282/1283

Die Phosphorylierungsniveaus der verschiedenen ALK-Phospho-Epitope der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors liegen eng beieinander und zeigen eine geringe Phosphorylierung an allen Epitopen. Die Phosphorylierungsniveaus der Kombination aus Tyr1278/1282/1283, des Tyr1586 und des Tyr1604 sind nahezu identisch, ihre Messpunkte sind nicht eindeutig voneinander abzugrenzen. Bei jeder GFP-Signalstärke gibt es Beispiele für Neuroblastomzellen, in denen diese drei Epitope gering phosphoryliert vorliegen, genauso wie für Zellen, in denen sie unphosphoryliert vorliegen. Es ist nicht möglich, eine Schwellenmenge an ALK-Rezeptoren zu definieren, ab der die Phosphorylierungsniveaus der drei Epitope verstärkt ansteigen.

Die Phosphorylierungsniveaus des Tyr1096 und des Tyr1278 decken sich zum Großteil mit denen der anderen drei Epitope, unterscheiden sich jedoch in zwei Punkten. In einigen Neuroblastomzellen liegen die Epitope Tyr1096 und Tyr1278 stärker phosphoryliert vor als die anderen drei ALK-Phospho-Epitope der R1275Q-Mutation. Das Phosphorylierungsniveau des Tyr1096 steigt ab einer GFP-Signalstärke von 0,6 verstärkt an. In einer geringen Anzahl von Neuroblastomzellen liegt das Tyr1096 oberhalb dieser Schwellenmenge stärker phosphoryliert vor. Die Mehrzahl der Neuroblastomzellen, in denen das Tyr1096 mit Antikörpern markiert wurde, zeigt jedoch eine geringe oder gar keine Phosphorylierung, auch oberhalb der GFP-Signalstärke von 0,6.

Das Phosphorylierungsniveau der Neuroblastomzellen, in denen das Tyr1278 mit Antikörpern markiert wurde, zeigt eine dichotome Verteilung der Messpunkte. Der Großteil der Epitope des Tyr1278 liegt gering bis gar nicht phosphoryliert vor. Ab der GFP-Signalstärke von 2 ist eine ausreichende Schwellenmenge von ALK-Rezeptoren der R1275Q-Mutation vorhanden, sodass es zu einem geringen Anstieg des Phosphorylierungsniveaus kommt. Das Phosphorylierungsniveau des Großteils der Epitope des Tyr1278 erreicht sein Maximum bei der GFP-Signalstärke von 3 und fällt danach, bis die Expressionsmenge des ALK-Rezeptors den Wert 5 erreicht, kontinuierlich wieder ab. Oberhalb des Expressionsniveaus von 5 bleibt das Phosphorylierungsniveau eines Großteils der Epitope des Tyr1278 konstant. Eine geringe Anzahl von Epitopen des Tyr1278 liegt wesentlich stärker phosphoryliert vor. Im Bereich der GFP-Signalstärke zwischen 0,4 und 4 kommt es zu einem starken Anstieg des Phosphorylierungsniveaus. Die Maximalwerte der Cy3-Signalstärke der stärker phosphorylierten Population übertreffen die Maximalwerte der geringer phosphorylierten Epitope des Tyr1278 in diesem Intervall um das Doppelte.

Zusammenfassend ergibt sich für die R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors folgende Übersicht über die Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope:

$$\text{Tyr1278} > \text{Tyr1096} = \text{Tyr1278/1282/1283} = \text{Tyr1586} = \text{Tyr1604}$$

Die ALK-Phospho-Epitope Tyr1096, Tyr1278, Tyr1278/1282/1283 und Tyr1586 der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors liegen phosphoryliert vor, sobald die dafür notwendige Schwellenmenge an ALK-Rezeptoren innerhalb der Zellen exprimiert worden ist. Die benötigten Schwellenmengen des Tyr1096 und des Tyr1586 sind nahezu identisch. Ab einer GFP-Signalstärke von 1 liegen beide Epitope phosphoryliert vor. Das Tyr1096 wird stärker phosphoryliert als das Tyr1586, und die Steigung der Cy3-Signalstärke des Tyr1096 ist minimal größer als die des Tyr1586. Beide Epitope liegen bei der maximalen GFP-Signalstärke sowohl im phosphorylierten, als auch im unphosphorylierten Zustand vor. Im Vergleich mit den anderen drei Epitopen zeigen das

Tyr1096 und das Tyr1586 eine breitere Streuung der Messpunkte, sowohl in x-Achsenrichtung, als auch in y-Achsenrichtung. Zur Phosphorylierung der Kombination aus Tyr1278/1282/1283 ist eine etwas größere Schwellenmenge erforderlich. Ab einer GFP-Signalstärke leicht über 1 liegt dieses ALK-Phospho-Epitop phosphoryliert vor. Der Anstieg des Phosphorylierungsniveaus ist geringer als beim Tyr1096 oder Tyr1586, jedoch liegen die Punkte enger zusammen. Die maximale Cy3-Signalstärke des Tyr1278/1282/1283 beträgt in etwa 25 % der Cy3-Signalstärke des Tyr1096. Das ALK-Phospho-Epitop Tyr1278 benötigt eine doppelt so große Schwellenmenge an exprimierten ALK-Rezeptoren als das Tyr1096 und das Tyr1586. Ab einer GFP-Signalstärke von 2 liegt das Epitop Tyr1278 phosphoryliert vor. Die Steigung des Phosphorylierungsniveaus ist ähnlich der Steigung an Tyr1096 und Tyr1586, jedoch bleibt das Phosphorylierungsniveau hinter denen des Tyr1096, Tyr1586 und Tyr1278/1282/1283 zurück.

Das ALK-Phospho-Epitop Tyr1604 nimmt eine Sonderstellung in der Y1604F-Mutation ein. Durch den Austausch der Aminosäure Tyrosin gegen Phenylalanin kann an diesem Epitop keine Phosphorylierung mehr stattfinden, wodurch die Ergebnisse eine Negativkontrolle darstellen. Unabhängig von der exprimierten Schwellenmenge an ALK-Rezeptoren liegt dieses Epitop als einziges ALK-Phospho-Epitop der Y1604F-Mutation nicht phosphoryliert vor.

Zusammenfassend ergibt sich für die Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors folgende Übersicht über die Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope:

Tyr1096 > Tyr1586 ≈ Tyr1278/1282/1283 > Tyr1278 > Tyr1604

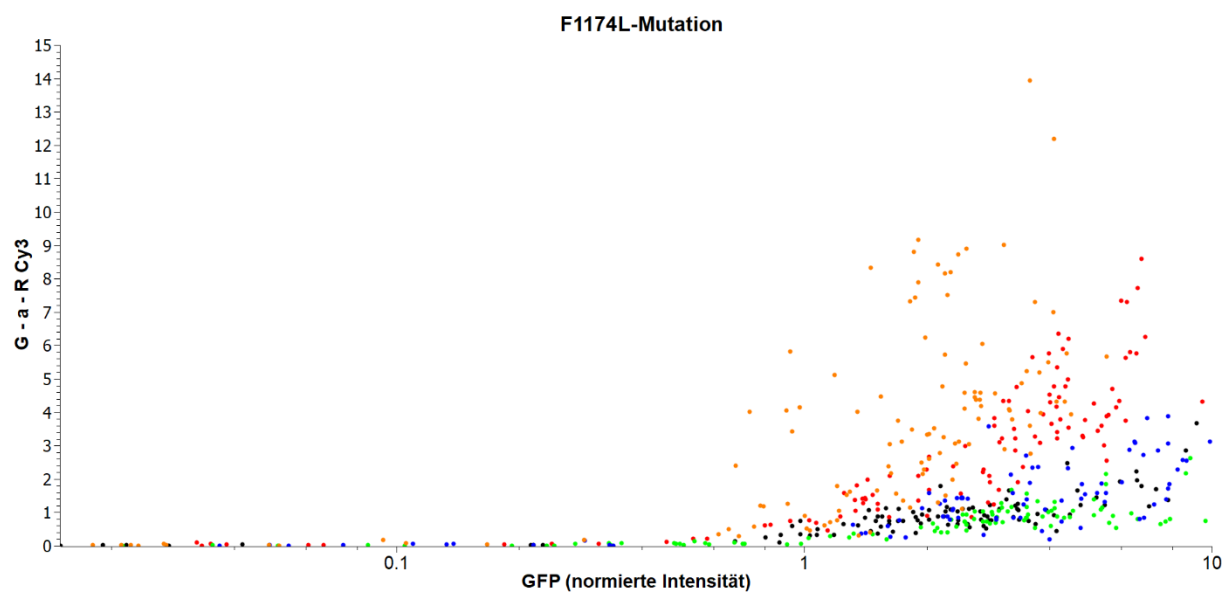
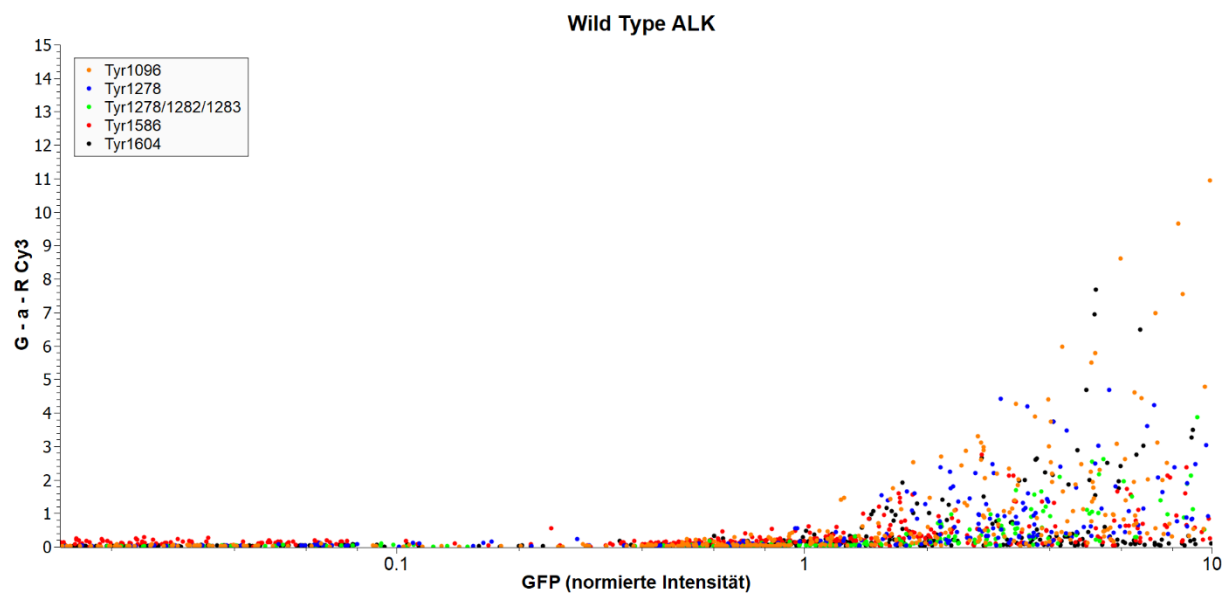




Abbildung 13: Analyse des Phosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors. Das Phosphorylierungsniveau ist als Verhältnis zwischen dem Mittelwert des GFP-Signals (x-Achse) und dem Mittelwert des Cy3-Signals (y-Achse) dargestellt. Die Intensitäten beider Achsen sind in allen Graphen normiert. Jede Zelle ist durch einen Messpunkt symbolisiert.

4.1.8 Das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope im Vergleich zwischen dem Wild Type ALK-Rezeptor und seinen Mutationen

Abbildung 14 zeigt eine Darstellung der Daten, in der die unterschiedlichen ALK-Mutationen im direkten Vergleich der Phosphorylierungsniveaus des gleichen ALK-Phospho-Epitops gezeigt werden. Die vorausgegangene Datenanalyse und die Einteilung der Koordinatenachsen sind identisch mit der aus Kapitel 4.1.6 und 4.1.7.

Ab etwa der gleichen Schwellenmenge an exprimierten ALK-Rezeptoren zeigen die F1174L- und die R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors eine Phosphorylierung an Tyr1096. Oberhalb einer GFP-Signalstärke von etwa 0,6 liegt das Tyr1096 in beiden Mutationen phosphoryliert vor. Die F1174L-Mutation zeigt das größte Phosphorylierungsniveau an Tyr1096. Die R1275Q-Mutation liegt mit ihrem Phosphorylierungsniveau unter dem des Tyr1096 innerhalb des Wild Type ALK-Rezeptors und der Y1604F-Mutation. Damit der Wild Type ALK-Rezeptor und die Y1604F-Mutation phosphoryliert werden, ist eine größere Schwellenmenge an exprimierten ALK-Rezeptoren notwendig. Ab einer GFP-Signalstärke von etwa 1 liegt das Tyr1096 sowohl im Wild Type ALK-Rezeptor als auch in der Y1604F-Mutation phosphoryliert vor. Im Wild Type ALK-Rezeptor und in der Y1604F-Mutation ist die Steigung des Phosphorylierungsniveaus nahezu identisch. Das Tyr1096 des Wild Type ALK-Rezeptors erreicht jedoch ein größeres Phosphorylierungsniveau als das der Y1604F-Mutation. In beiden Mutationen liegt das Tyr1096 bis zur maximalen GFP-Signalstärke phosphoryliert vor. Das Tyr1096 der I1250T-Mutation zeigt keine Phosphorylierung.

Zusammenfassend ergibt sich für das ALK-Phospho-Epitop Tyr1096 folgende Übersicht über dessen Phosphorylierungsniveau im Vergleich der Mutationen:

F1174L > Wild Type ALK > Y1604F > R1275Q > I1250T

Ein etwa identisch großes Phosphorylierungsniveau an Tyr1278 zeigt die stark phosphorylierte Zellpopulation der R1275Q-Mutation und des Wild Type ALK-Rezeptors. Ihre Phosphorylierungsniveaus unterscheiden sich darin, dass die R1275Q-Mutation

an diesem ALK-Phospho-Epitop eine geringere Schwellenmenge an exprimierten ALK-Rezeptoren braucht, bevor sie phosphoryliert wird. Ab einer GFP-Signalstärke von 0,6 wird das Tyr1278 innerhalb der R1275Q-Mutation phosphoryliert; das Tyr1278 des Wild Type ALK-Rezeptors dagegen erst ab einer GFP-Signalstärke von 1. Oberhalb der GFP-Signalstärke von 4 liegt die R1275Q-Mutation nicht mehr phosphoryliert vor. Das Tyr1278 des Wild Type ALK-Rezeptors wird dagegen bis zur maximalen GFP-Signalstärke phosphoryliert. Die F1174L-Mutation liegt in ihrem Phosphorylierungsniveau leicht unterhalb des Niveaus des Wild Type ALK-Rezeptors und der R1275Q-Mutation. Ab der GFP-Signalstärke von 1 wird die F1174L-Mutation phosphoryliert und liegt bis zur maximalen GFP-Signalstärke von 10 phosphoryliert vor. Damit die Y1604F-Mutation an Tyr1278 phosphoryliert wird, ist eine GFP-Signalstärke von etwa 1,2 auf der x-Achse notwendig. Die Y1604F-Mutation bleibt in ihrem Phosphorylierungsniveau hinter den drei zuvor genannten zurück. Die I1250T-Mutation zeigt keine Phosphorylierung an Tyr1278.

Zusammenfassend ergibt sich für das ALK-Phospho-Epitop Tyr1278 folgende Übersicht über dessen Phosphorylierungsniveau im Vergleich der Mutationen:

**R1275Q Population 1 \approx Wild Type ALK > F1174L > Y1604F > I1250T \approx R1275Q
Population 2**

An der Kombination Tyr1278/1282/1283 zeigt die I1250T-Mutation keine Phosphorylierung. Die R1275Q-Mutation ist gering phosphoryliert. Ab einer GFP-Signalstärke von 1 steigt die Cy3-Signalstärke an, bleibt jedoch, unabhängig von der exprimierten Menge an ALK-Rezeptoren, unter 1. Die Phosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-Mutation und der Y1604F-Mutation zeigen etwa die gleiche Steigung. Alle drei Epitope sind stärker phosphoryliert als die R1275Q-Mutation. In der Schwellenmenge an ALK-Rezeptoren, die vorhanden sein muss, bevor die Epitope phosphoryliert vorliegen, unterscheiden sich die Epitope. Ab einer GFP-Signalstärke von 1 liegt das Tyr1278/1282/1283 in der Y1604F-Mutation phosphoryliert vor. Der Wild Type ALK-Rezeptor und die F1174L-Mutation werden ab einer GFP-

Signalstärke von 2 phosphoryliert. Das Phosphorylierungsniveau beider Mutationen ist gleich groß und liegt leicht oberhalb des Niveaus der Y1604F-Mutation.

Zusammenfassend ergibt sich für das ALK-Phospho-Epitop Tyr1278/1282/1283 folgende Übersicht über dessen Phosphorylierungsniveau im Vergleich der Mutationen:

F1174L ≈ Wild Type ALK > Y1604F > R1275Q > I1250T

Am ALK-Phospho-Epitop Tyr1586 zeigt die F1174L-Mutation das größte Phosphorylierungsniveau. Ab einer GFP-Signalstärke von 0,6 wird das Epitop in dieser Mutation phosphoryliert. Das zweitgrößte Phosphorylierungsniveau zeigt die Y1604F-Mutation, die ab einer GFP-Signalstärke von 1 phosphoryliert vorliegt. Die Steigung der Cy3-Signalstärke dieser Mutation ist geringer als die der F1174L-Mutation und erreicht nur etwa zwei Drittel der maximalen Cy3-Signalstärke der F1174L-Mutation. Ab einer GFP-Signalstärke etwas oberhalb von 1 liegt der Wild Type ALK-Rezeptor an Tyr1586 in seiner phosphorylierten Form vor. Das Phosphorylierungsniveau des Wild Type ALK ist geringer als das der Y1604F-Mutation an Tyr1586, zeigt jedoch keinen einheitlichen Anstieg mit zunehmender Menge an exprimierten ALK-Rezeptoren, sondern im Bereich zwischen 1 und 4 und oberhalb der GFP-Signalstärke von 6 zwei voneinander getrennte Maxima. Während die R1275Q-Mutation ab einer GFP-Signalstärke von 1 auf der x-Achse ein geringes Phosphorylierungsniveau zeigt, liegt die I1250T-Mutation unphosphoryliert vor.

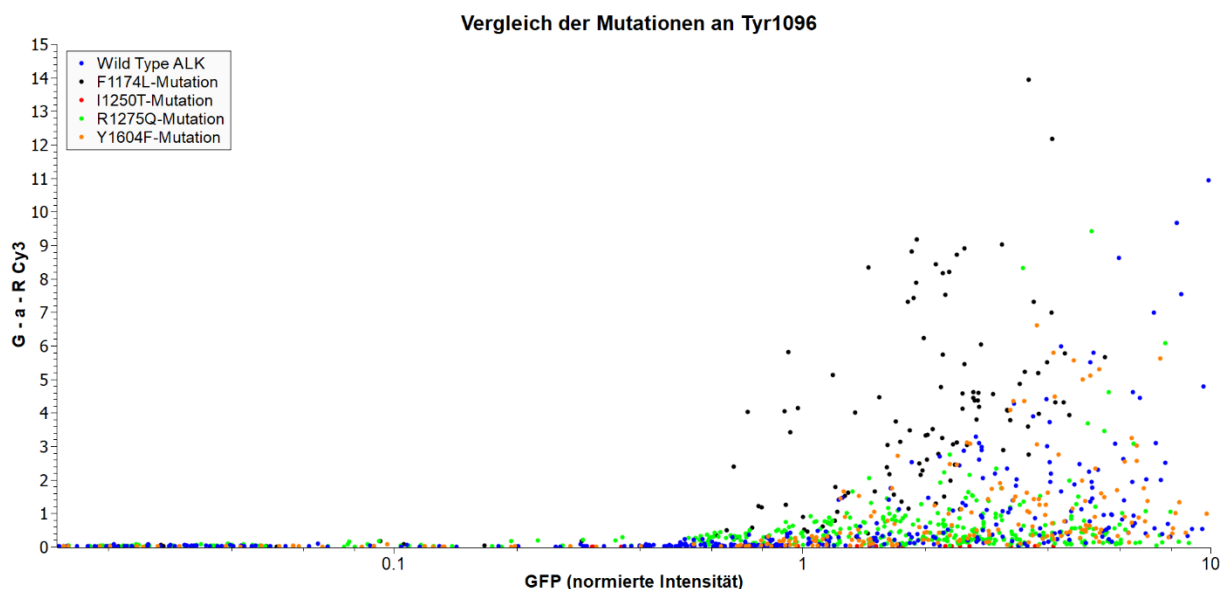
Zusammenfassend ergibt sich für das ALK-Phospho-Epitop Tyr1586 folgende Übersicht über dessen Phosphorylierungsniveau im Vergleich der Mutationen:

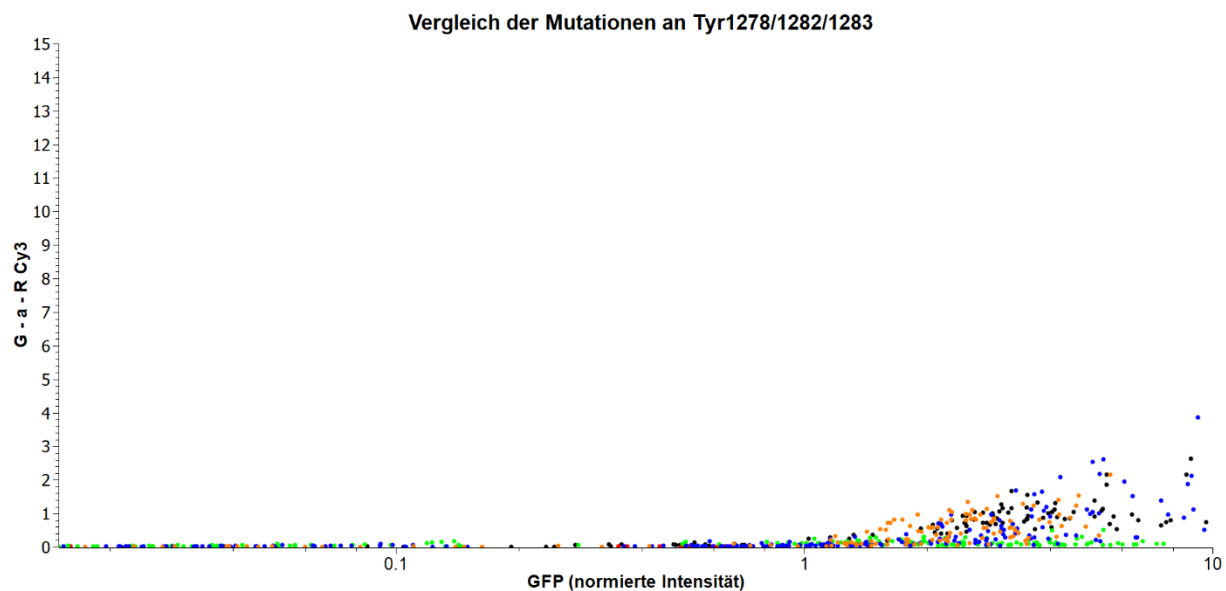
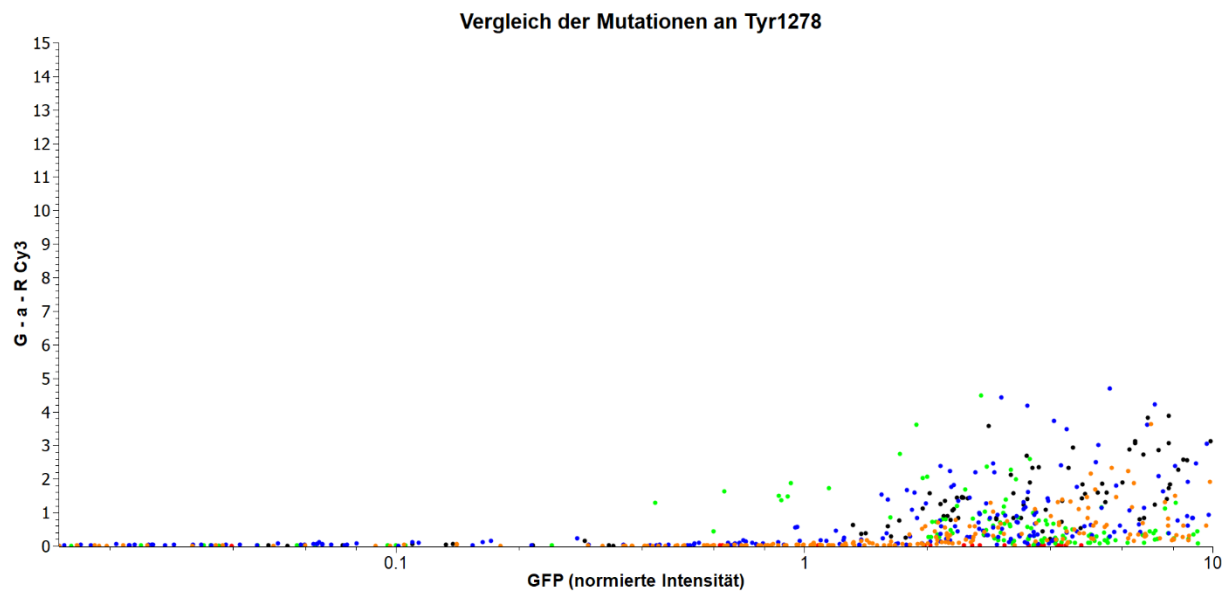
F1174L > Y1604F > Wild Type ALK > R1275Q > I1250T

Am ALK-Phospho-Epitop Tyr1604 zeigen der Wild Type ALK-Rezeptor und die F1174L-Mutation ein gesteigertes Phosphorylierungsniveau. Ab einer GFP-Signalstärke von 1 wird das Tyr1604 in beiden Mutationen phosphoryliert. Dabei übertrifft die Cy3-Signalstärke des Tyr1604 innerhalb des Wild Type ALK-Rezeptors die Cy3-Signalstärke der F1174L-Mutation mit zunehmender Menge vorhandener ALK-Rezeptoren um das Doppelte. Die I1250T-Mutation sowie die Y1604F-Mutation liegen dagegen unphosphoryliert vor. Unabhängig von der exprimierten Menge der ALK-Rezeptoren wird die R1275Q-Mutation nur gering phosphoryliert.

Zusammenfassend ergibt sich für das ALK-Phospho-Epitop Tyr1604 folgende Übersicht über dessen Phosphorylierungsniveau im Vergleich der Mutationen:

Wild Type ALK > F1174L > R1275Q > Y1604F = I1250T





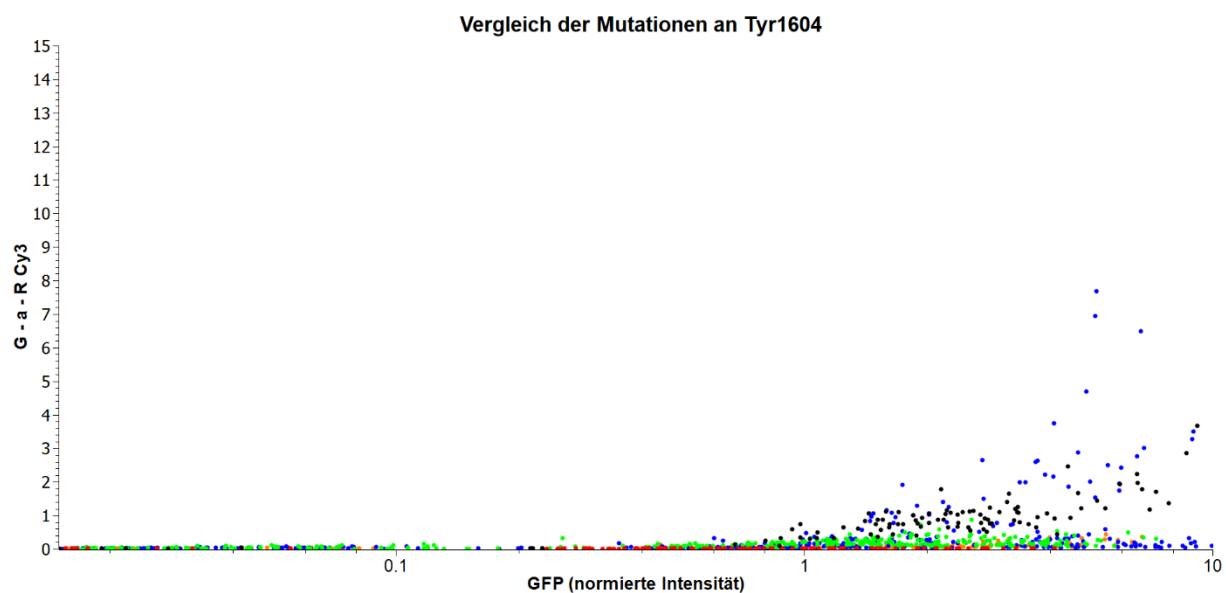
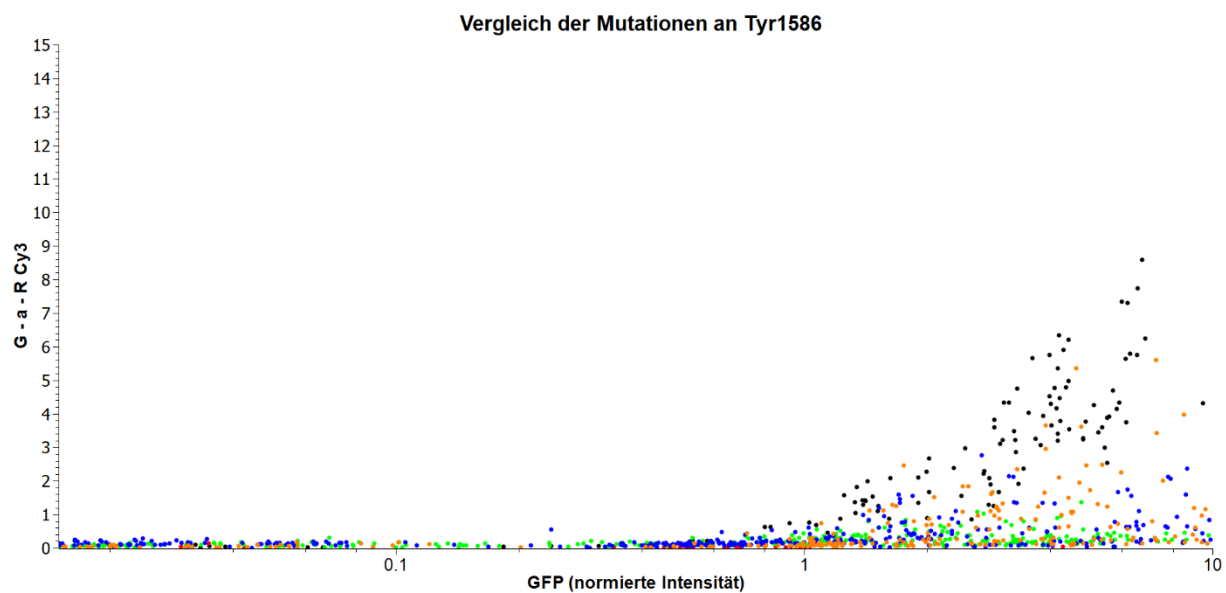


Abbildung 14: Analyse des Phosphorylierungsniveaus der einzelnen ALK-Phospho-Epitope im Vergleich des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der I1250T-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation. Das Phosphorylierungsniveau ist als Verhältnis zwischen dem Mittelwert des GFP-Signals (x-Achse) und dem Mittelwert des Cy3-Signals (y-Achse) dargestellt. Die Intensitäten beider Achsen sind in allen Graphen normiert. Jede Zelle ist durch einen Messpunkt symbolisiert.

4.2 Das Dimerisierungsverhalten des ALK-Rezeptors

Zur Untersuchung des Dimerisierungsverhaltens des ALK-Rezeptors wurde der Wild Type ALK-Rezeptor jeweils am C-terminalen Ende mit EGFP oder mCherry fusioniert. Die F1174L-, die I1250T-, die R1275Q- und die Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors wurden am C-terminalen Ende einzig mit dem EGFP fusioniert. Der Wild Type ALK-Rezeptor und die Mutationen wurden in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie exprimiert. Zur Detektion der Phosphorylierung der exprimierten ALK-Rezeptoren mittels eines antikörperspezifischen Cy5-Signals wurden die ALK-Rezeptoren mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz markiert. Die primären Antikörper sind gegen die ALK-Phospho-Epitope Tyr1096, Tyr1278, eine Kombination aus Tyr1278/1282/1283, Tyr1586 und Tyr1604 gerichtet.

Die Bildgewinnung erfolgte mit dem CLSM Fluoview 1000. Die Zellen wurden nach der Intensität der Cy5-Signalstärke ausgewählt und das *Acceptor Photobleaching* einer ROI innerhalb einer Neuroblastomzelle durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.7). In der Datenanalyse wurde die FRET-Effizienz aus den Grauwertinformationen der EGFP-Aufnahmen vor und im Anschluss an den Bleichvorgang errechnet. Die Histogramme der ausgewerteten Bilder wurden im Anschluss an eine Normalisierung der Tabellenwerte kumuliert und in Graphen dargestellt (siehe Kapitel 3.4.8).

Ziel ist die Darstellung des Dimerisierungsverhaltens von zwei Wild Type ALK-Rezeptoren sowie zwischen den Mutationen und einem Wild Type ALK-Rezeptor als Dimerisierungspartner im Sinne eines bildgebenden *pull-down*-Experimentes zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion bei Aktivierung der ALK-Rezeptoren.

4.2.1 Das Verhältnis zwischen Donor und Akzeptor

Während des *Acceptor Photobleaching* dient das EGFP als Donor. Es ist genetisch an den C-Terminus des Wild Type ALK-Rezeptors und dessen Mutationen F1174L, I1250T, R1275Q und Y1604F fusioniert. Der mit EGFP markierte Wild Type ALK-Rezeptor sowie jede Mutation wird zusammen mit dem am C-Terminus markierten mCherry Wild Type ALK-Rezeptor in die SK-N-AS-Zelllinie transfiziert. Das Fluoreszenzprotein mCherry dient hierbei als Akzeptor.

Um eine große FRET-Effizienz zu erreichen, wird das optimale Donor-Akzeptor-Verhältnis ermittelt. Dadurch wird sichergestellt, dass bei Aktivierung des ALK-Rezeptors die statistische Chance für die Dimerisierung eines mit EGFP und eines mit mCherry

markierten ALK-Rezeptors möglichst groß ist. In Abhängigkeit von der Expressierung des ALK-Rezeptors in der Neuroblastomzelle sind drei unterschiedliche Rezeptorkombinationen denkbar: Zwei mit EGFP markierte Rezeptoren dimerisieren, zwei mit mCherry markierte Rezeptoren dimerisieren oder ein mit EGFP und ein mit mCherry markierter Rezeptor dimerisieren. Nur bei der dritten Kombinationsmöglichkeit ist eine Bestimmung der FRET-Effizienz möglich, da allein in dieser Variante das EGFP als Donor und das mCherry als Akzeptor fungiert.

Das optimale Verhältnis zwischen Donor und Akzeptor wird durch verschiedene Kombinationen der mit EGFP und mCherry markierten Wild Type ALK-Rezeptoren bestimmt. Die verwendete Menge an DNA ist konstant bei 1 μg . Die Verhältnisse zwischen der mit EGFP und der mit mCherry fusionierten Mengen an DNA sind in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

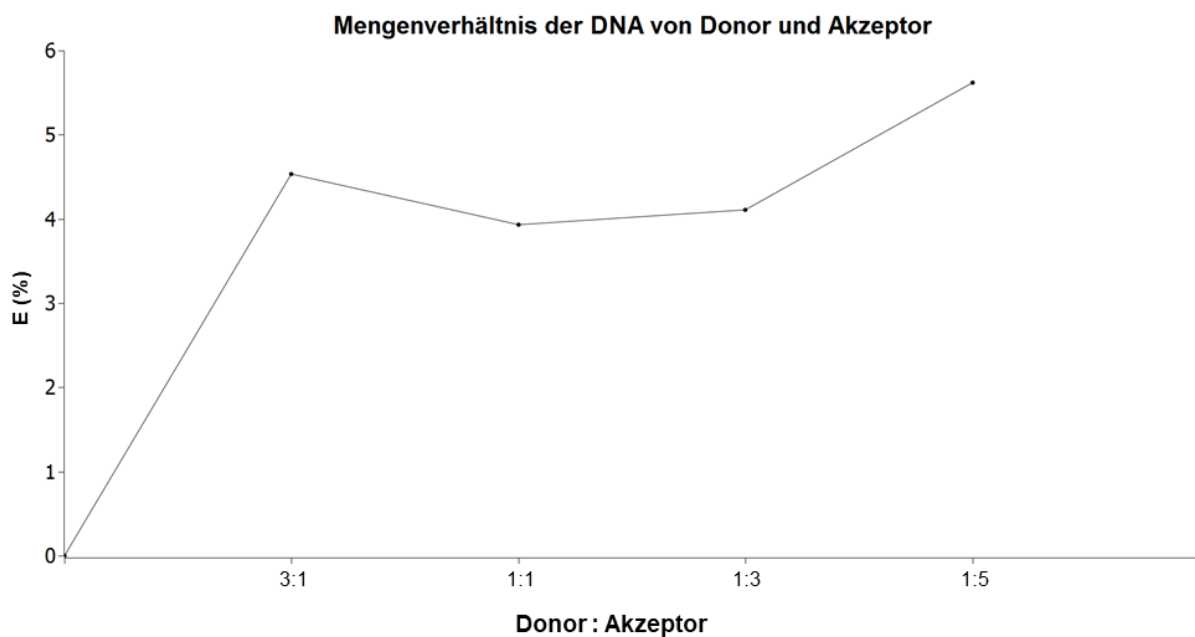


Abbildung 15: Darstellung der Beziehung zwischen dem Mengenverhältnis von Donor (EGFP) und Akzeptor (mCherry) und der daraus resultierenden FRET-Effizienz (E %) bei der Aktivierung des Wild Type ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie.

Abbildung 15 beschreibt das Verhältnis der verwendeten Mengenverhältnisse zwischen Donor und Akzeptor auf der x-Achse und der resultierenden FRET-Effizienz (E %) auf der y-Achse. Wird der Anteil des Akzeptors erhöht, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein mit EGFP markierter ALK-Rezeptor und ein mit mCherry markierter ALK-Rezeptor bei der Aktivierung der Rezeptoren dimerisieren. Gleichzeitig führt ein geringeres Verhältnis des Donors dazu, dass die GFP-Signalstärke abnimmt, da eine geringere Menge an DNA vorliegt, die mit EGFP fusioniert ist. Das optimale Verhältnis zwischen Donor und Akzeptor wird bei dem Mengenverhältnis Donor 1 zu Akzeptor 5 erreicht, da dort die größte FRET-Effizienz messbar ist. Werden Donor und Akzeptor in das Verhältnis 1:3 gesetzt, zeigen die Messergebnisse eine geringere, aber dennoch klar messbare FRET-Effizienz.

Aufgrund dieser Ergebnisse für den Wild Type ALK-Rezeptor werden die F1174L-, die I1250T-, die R1275Q- und die Y1604F-Mutation im Hinblick auf ihre FRET-Effizienzen in den Donor-Akzeptor-Verhältnissen 1:3 und 1:5 untersucht.

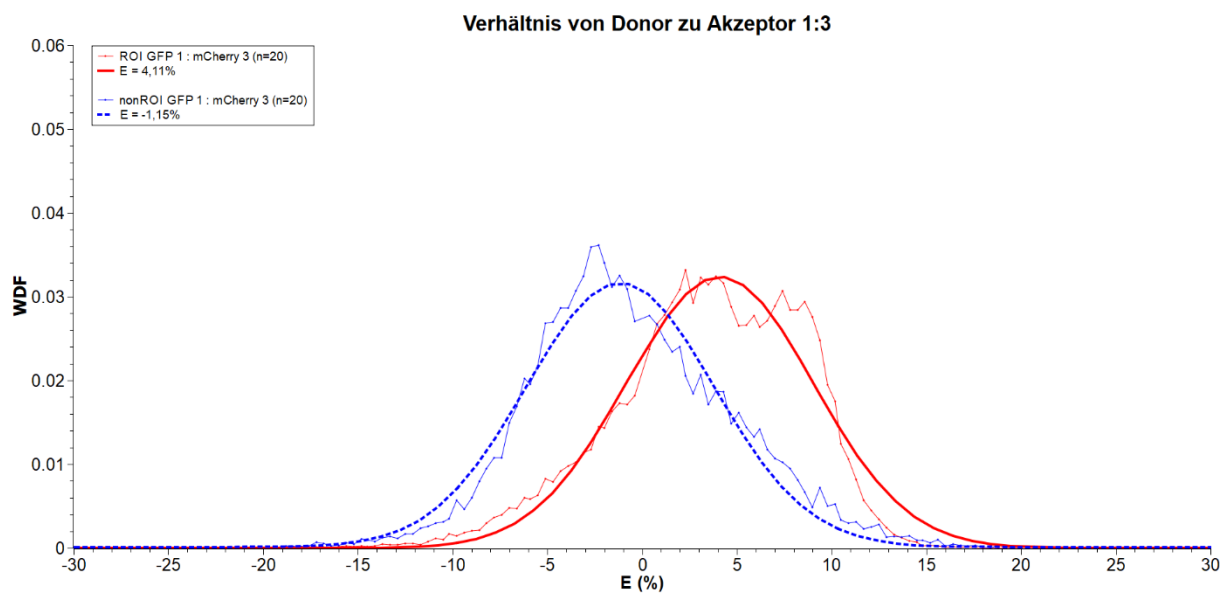
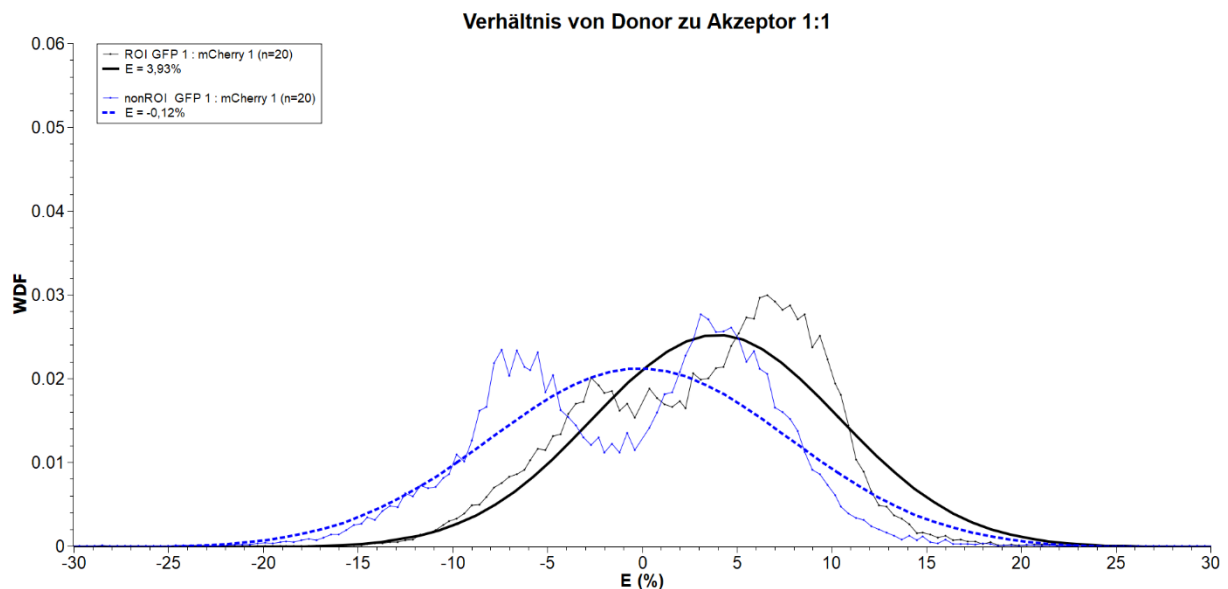
4.2.2 Die FRET-Effizienz des Wild Type ALK-Rezeptors

Abbildung 16 zeigt die FRET-Effizienzen des Wild Type ALK-Rezeptors als Gaußsche Verteilungskurve. Die Messpunkte werden als Verhältnis der FRET-Effizienz in Prozent auf der x-Achse und der Wahrscheinlichkeitsdichte auf der y-Achse dargestellt. Durch die Normalisierung der Messwerte wird jede Zelle gleich gewichtet, unabhängig von ihrer Zellgröße. Die FRET-Effizienzen sind in drei verschiedenen Verhältnissen von Donor und Akzeptor dargestellt. Während des *Acceptor Photobleaching* wird in jeder Zelle eine ROI geblichen und deren FRET-Effizienz errechnet. Die nonROI werden nicht geblichen, denn sie dienen als Kontrollregionen innerhalb der gleichen Zelle. Die FRET-Effizienzen der ROI und nonROI sind als Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (WDF) dargestellt. Die als durchgängig dargestellten Gaußschen Verteilungskurven in den folgenden Abbildungen zeigen die FRET-Effizienzen der ROI. Die FRET-Effizienzen der nonROI sind als unterbrochen dargestellte Gaußsche Verteilungskurven gezeigt.

Das 1:1-Verhältnis von EGFP zu mCherry ist in Schwarz dargestellt. Die FRET-Effizienz der ROI ist mit $E = 3,93 \%$ die geringste des Wild Type ALK-Rezeptors. Die nonROI ist in Blau dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = -0,12 \%$.

Das 1:3-Verhältnis von EGFP zu mCherry ist in Rot dargestellt. Die FRET-Effizienz der ROI beträgt $E = 4,11\%$ und ist größer als beim Verhältnis 1:1. Die nonROI ist erneut in Blau dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = -1,15\%$.

Das 1:5-Verhältnis von EGFP zu mCherry ist in Grün dargestellt. Die FRET-Effizienz der ROI beträgt $E = 5,62\%$ und ist damit die größte des Wild Type ALK-Rezeptors. Die nonROI ist erneut in Blau dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = -1,63\%$.



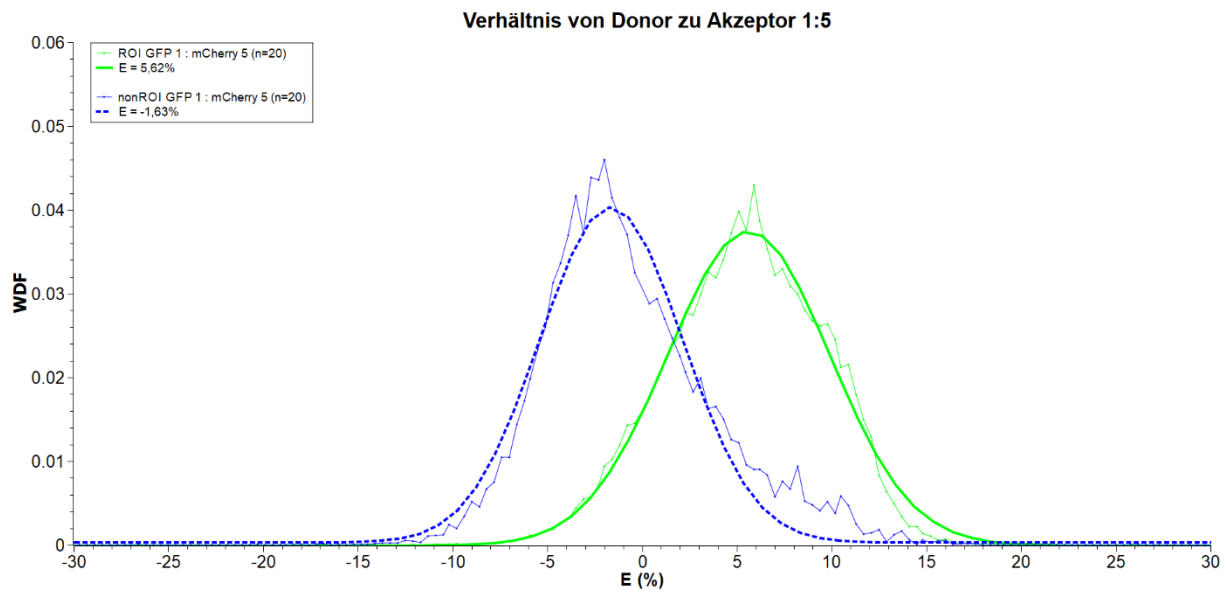


Abbildung 16: Die FRET-Effizienzen des Wild Type ALK-Rezeptors in den Verhältnissen von Donor (EGFP) und Akzeptor (mCherry) in 1:1 (Schwarz), 1:3 (Rot) und 1:5 (Grün). Die FRET-Effizienzen der Kontrollregionen sind in Blau dargestellt. Die ALK-Rezeptoren sind in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie exprimiert. Die Anzahl (n) der untersuchten Neuroblastomzellen ist: n=20.

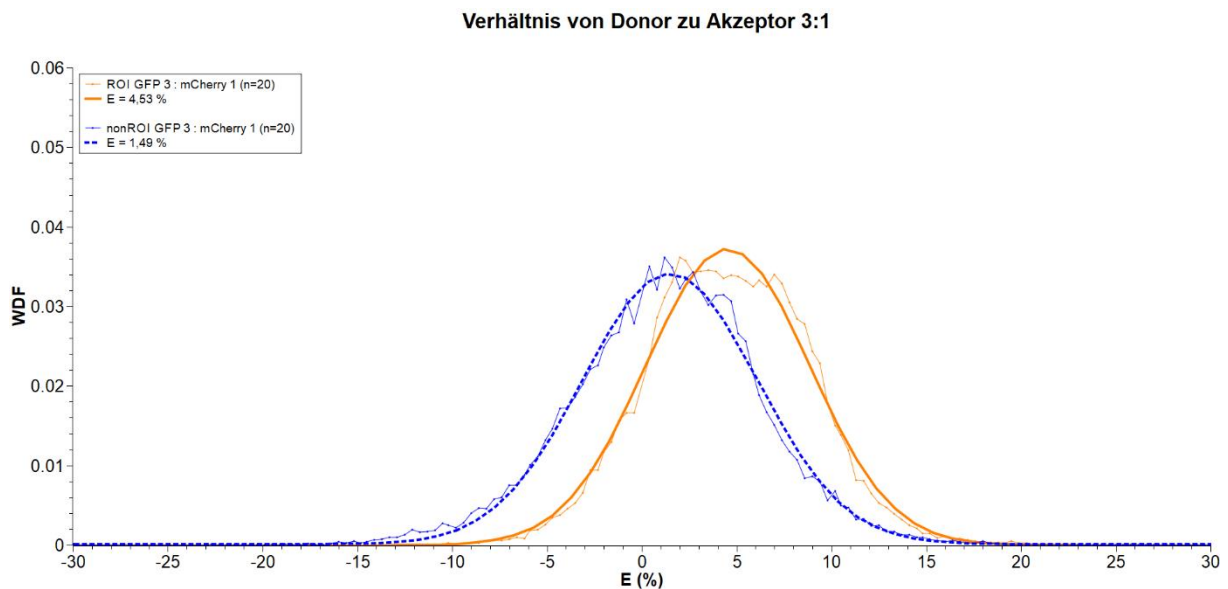


Abbildung 17: Die FRET-Effizienz des Wild Type ALK-Rezeptors im Verhältnis von Donor (EGFP) und Akzeptor (mCherry) in 3:1 (Orange). Die FRET-Effizienz der Kontrollregion ist in Blau dargestellt. Die ALK-Rezeptoren sind in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie exprimiert. Die Anzahl (n) der untersuchten Neuroblastomzellen ist: n=20.

Für den Wild Type ALK-Rezeptor wurde zusätzlich ein viertes Mengenverhältnis von Donor zu Akzeptor untersucht. Abbildung 17 stellt das Verhältnis 3:1 zwischen EGFP als Donor und mCherry als Akzeptor in Orange dar. Die FRET-Effizienz der ROI beträgt $E = 4,55 \%$. Die nonROI ist in Blau dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = 1,49 \%$.

4.2.3 Die FRET-Effizienz der F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors

Das Dimerisierungsverhalten der F1174L-Mutation zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor wird in Abbildung 18 dargestellt. Die cDNA der F1174L-Mutation ist an ihrem C-terminalen Ende mit EGFP fusioniert. Die cDNA des Wild Type ALK-Rezeptors ist mit mCherry fusioniert, sodass EGFP als Donor fungiert und mCherry als Akzeptor. Das Dimerisierungsverhalten wurde für die Donor-Akzeptor-Verhältnisse 1:3 und 1:5 untersucht und die FRET-Effizienzen berechnet.

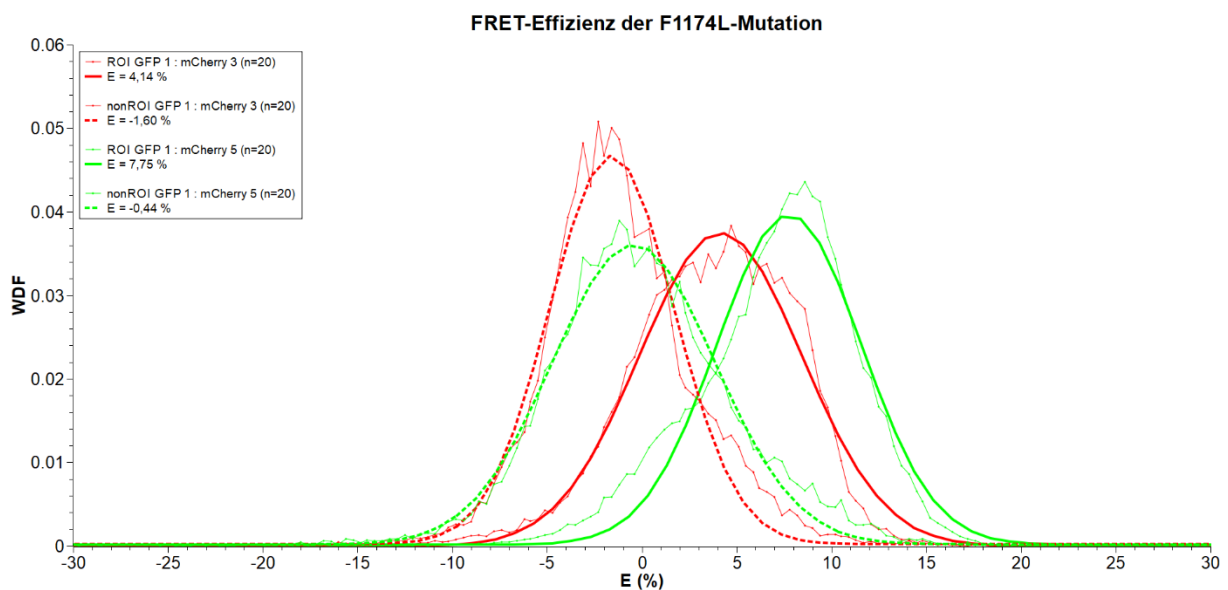


Abbildung 18: Die Die FRET-Effizienz der F1174L-Mutation zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor im Verhältnis von Donor (EGFP) und Akzeptor (mCherry) in 1:3 (Rot) und 1:5 (Grün). Die FRET-Effizienzen der ROI sind in den durchgängigen Gaußschen Verteilungskurven gezeigt. Die FRET-Effizienzen der nonROI in den gestrichelten Gaußschen Verteilungskurven dargestellt. Die ALK-Rezeptoren sind in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie exprimiert. Die Anzahl (n) der untersuchten Neuroblastomzellen ist: $n=20$.

Das 1:3-Verhältnis von EGFP zu mCherry ist in der roten, durchgängig gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der ROI beträgt $E = 4,14 \%$. Die nonROI ist in der roten, gestrichelt gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = -1,60 \%$.

Das 1:5-Verhältnis von EGFP zu mCherry ist in der grünen, durchgängig gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der ROI beträgt $E = 7,75 \%$. Die nonROI ist in der grünen, gestrichelt gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = -0,44 \%$.

4.2.4 Die FRET-Effizienz der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors

Das Dimerisierungsverhalten der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor wird in Abbildung 19 dargestellt. Die cDNA der I1250T-Mutation ist an ihrem C-terminalen Ende mit EGFP fusioniert. Die cDNA des Wild Type ALK-Rezeptors ist mit mCherry fusioniert, sodass EGFP als Donor fungiert und mCherry als Akzeptor. Das Dimerisierungsverhalten wurde für die Donor-Akzeptor-Verhältnisse 1:3 und 1:5 untersucht und die FRET-Effizienzen berechnet.

Das 1:3-Verhältnis von EGFP zu mCherry ist in der roten, durchgängig gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der ROI beträgt $E = -0,20 \%$. Die nonROI ist in der roten, gestrichelt gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = -2,48 \%$.

Das 1:5-Verhältnis von EGFP zu mCherry ist in der grünen, durchgängig gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der ROI beträgt $E = 3,74 \%$. Die nonROI ist in der grünen, gestrichelt gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = -2,15 \%$.

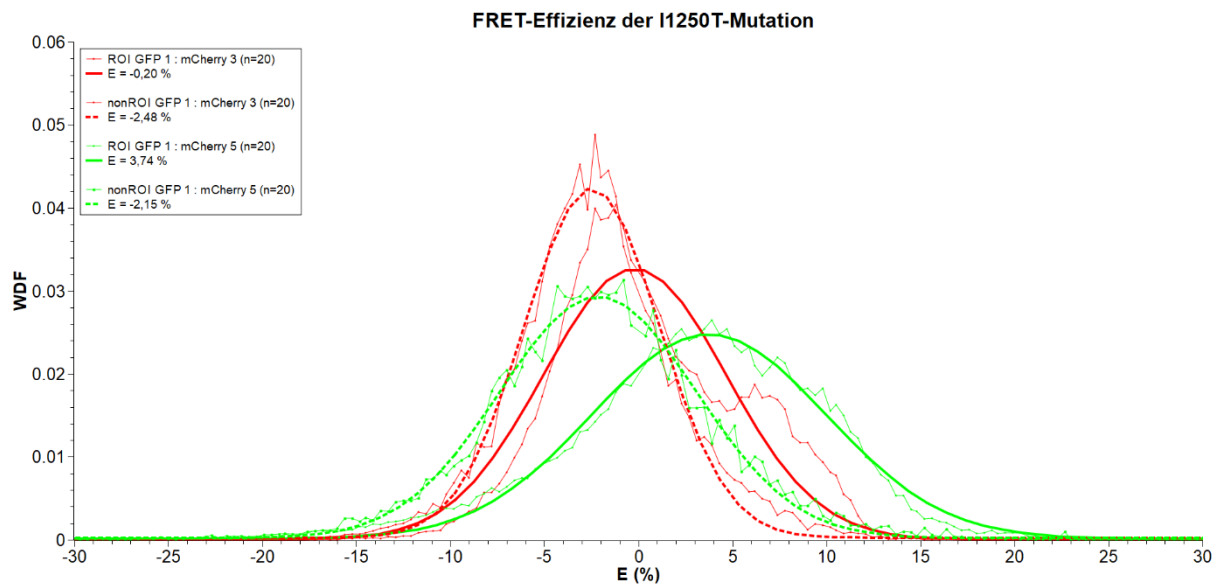


Abbildung 19: Die FRET-Effizienz der I1250T-Mutation zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor im Verhältnis von Donor (EGFP) und Akzeptor (mCherry) in 1:3 (Rot) und 1:5 (Grün). Die FRET-Effizienzen der ROI sind in den durchgängigen Gaußschen Verteilungskurven gezeigt. Die FRET-Effizienzen der nonROI in den gestrichelten Gaußschen Verteilungskurven dargestellt. Die ALK-Rezeptoren sind in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie exprimiert. Die Anzahl (n) der untersuchten Neuroblastomzellen ist: n=20.

4.2.5 Die FRET-Effizienz der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors

Das Dimerisierungsverhalten der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor wird in Abbildung 20 dargestellt. Die cDNA der R1275Q-Mutation ist an ihrem C-terminalen Ende mit EGFP fusioniert. Die cDNA des Wild Type ALK-Rezeptors ist mit mCherry fusioniert, sodass EGFP als Donor fungiert und mCherry als Akzeptor. Das Dimerisierungsverhalten wurde für die Donor-Akzeptor-Verhältnisse 1:3 und 1:5 untersucht und die FRET-Effizienzen berechnet.

Das 1:3-Verhältnis von EGFP zu mCherry ist in der roten, durchgängig gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der ROI beträgt $E = 4,88\%$. Die nonROI ist in der roten, gestrichelt gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = -1,10\%$.

Das 1:5-Verhältnis von EGFP zu mCherry ist in der grünen, durchgängig gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der ROI beträgt $E = 5,13\%$. Die nonROI ist in der grünen, gestrichelt gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = -1,31\%$.

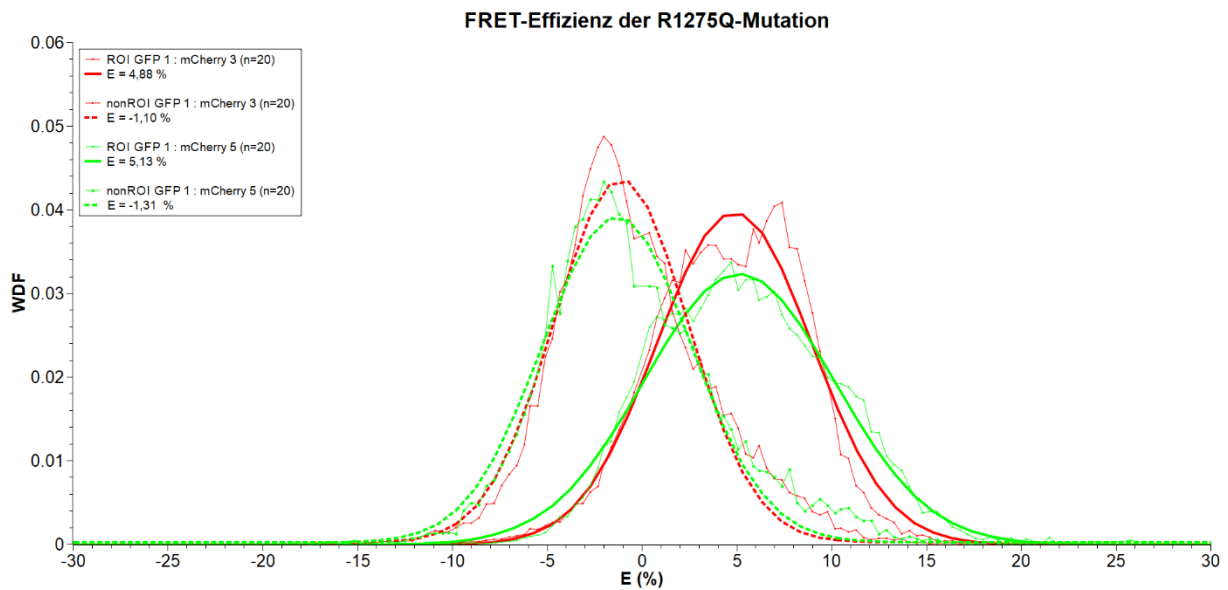


Abbildung 20: Die FRET-Effizienz der R1275Q-Mutation zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor im Verhältnis von Donor (EGFP) und Akzeptor (mCherry) in 1:3 (Rot) und 1:5 (Grün). Die FRET-Effizienzen der ROI sind in den durchgängigen Gaußschen Verteilungskurven gezeigt. Die FRET-Effizienzen der nonROI in den gestrichelten Gaußschen Verteilungskurven dargestellt. Die ALK-Rezeptoren sind in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie exprimiert. Die Anzahl (n) der untersuchten Neuroblastomzellen ist: n=20.

4.2.6 Die FRET-Effizienz der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors

Das Dimerisierungsverhalten der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor wird in Abbildung 21 dargestellt. Die cDNA der Y1604F-Mutation ist an ihrem C-terminalen Ende mit EGFP fusioniert. Die cDNA des Wild Type ALK-Rezeptors ist mit mCherry fusioniert, sodass EGFP als Donor fungiert und mCherry als Akzeptor. Das Dimerisierungsverhalten wurde für die Donor-Akzeptor-Verhältnisse 1:3 und 1:5 untersucht und die FRET-Effizienzen berechnet.

Das 1:3-Verhältnis von EGFP zu mCherry ist in der roten, durchgängig gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der ROI beträgt $E = 4,07 \%$. Die nonROI ist in der roten, gestrichelt gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = -1,10 \%$.

Das 1:5-Verhältnis von EGFP zu mCherry ist in der grünen, durchgängig gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der ROI beträgt $E = 6,27 \%$. Die nonROI ist in der grünen, gestrichelt gezeichneten Gaußschen Verteilungskurve dargestellt. Die FRET-Effizienz der Kontrollregion beträgt $E = -1,33 \%$.

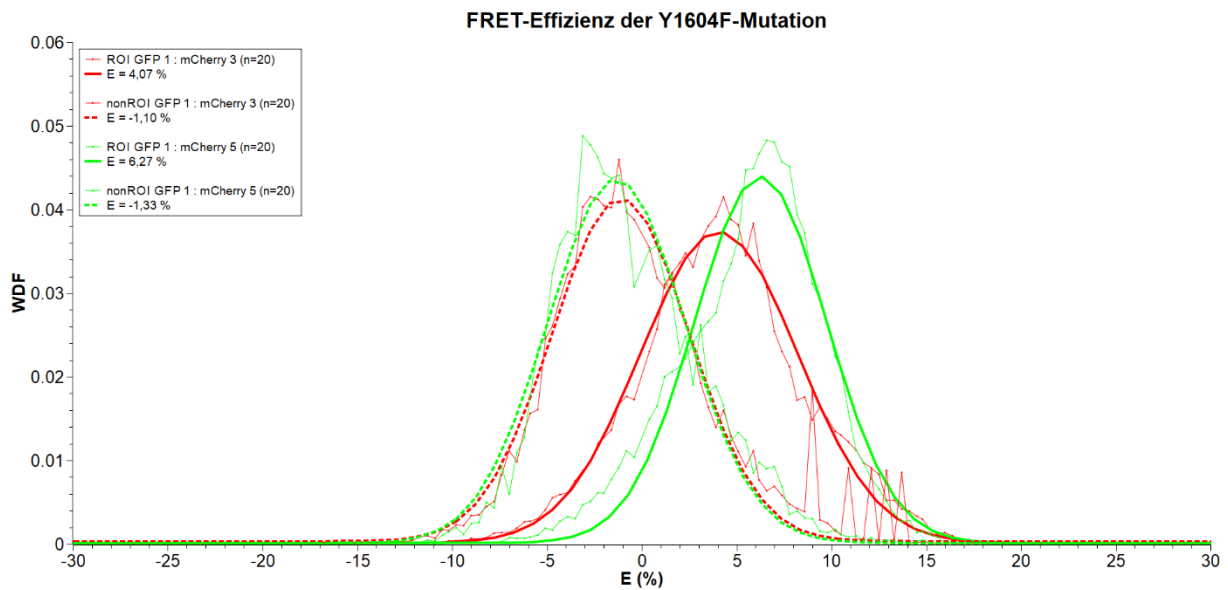


Abbildung 21: Die FRET-Effizienz der Y1604F-Mutation zusammen mit dem Wild Type ALK-Rezeptor im Verhältnis von Donor (EGFP) und Akzeptor (mCherry) in 1:3 (Rot) und 1:5 (Grün). Die FRET-Effizienzen der ROI sind in den durchgängigen Gaußschen Verteilungskurven gezeigt. Die FRET-Effizienzen der nonROI in den gestrichelten Gaußschen Verteilungskurven dargestellt. Die ALK-Rezeptoren sind in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie exprimiert. Die Anzahl (n) der untersuchten Neuroblastomzellen ist: n=20.

4.2.7 FRET-Effizienzen repräsentativer Neuroblastomzellen

Abschließend zeigt Abbildung 22 eine repräsentative Übersicht der FRET-Effizienzen des Wild Type ALK-Rezeptors und seiner Mutationen in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie. Das Zellareal, in dem der Bleichvorgang durchgeführt wurde, und die FRET-Effizienz der entsprechenden Zellregion sind in Falschfarben dargestellt. Auf diese Weise können die FRET-Effizienzen einer Position innerhalb der Zelle zugeordnet und die unterschiedlichen Intensitäten der FRET-Effizienzen farblich dargestellt werden. Daneben sind die FRET-Effizienzen sowohl der ROI wie auch der nonROI der Zelle als WDF dargestellt. Die Achseinteilungen sind entsprechend den Einteilungen der zuvor gezeigten Graphen der Gesamtpopulation gewählt.

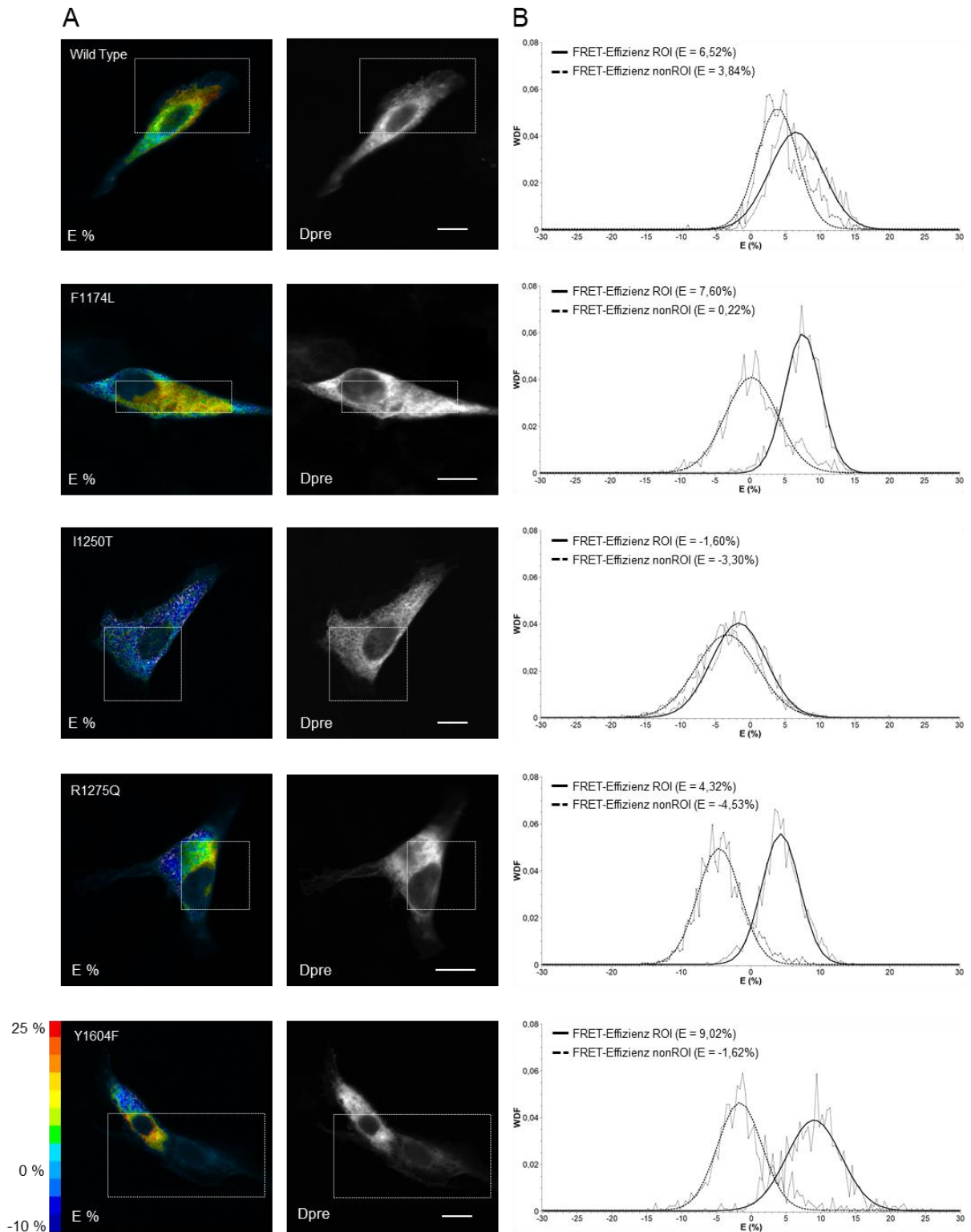


Abbildung 22: Repräsentative Aufnahmen von Zellen der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie zur Darstellung der FRET-Effizienzen (E %) im Anschluss an das *Acceptor Photobleaching*. **A**, Die FRET-Effizienzen sind in Falschfarben dargestellt. Das *Acceptor Photobleaching* wurde in den eingerahmten Arealen durchgeführt. Maßstabsleiste: 10 μ m. **B**, Darstellung der FRET-Effizienzen der ROI und nonROI der repräsentativen Zellen als WDF.

5. Diskussion

Im Laufe des menschlichen Wachstumsprozesses übernimmt die *Anaplastic Lymphoma Kinase* regulierende Aufgaben bei der physiologischen Entwicklung des zentralen Nervensystems und des Gehirns. In den ersten Jahren der menschlichen Entwicklung ist das Expressionsniveau des ALK-Rezeptors stark gesteigert (Pulford et al. 1997). In diesem Entwicklungsstadium kann es zu einer Genese eines Neuroblastoms kommen. Das durchschnittliche Alter der Patienten liegt bei 19 Monaten. Die Ätiologie der Entstehung eines Neuroblastoms ist nicht endgültig geklärt (Brodeur et al. 2011; Schweinitz 2013). Sicher ist jedoch, dass die *Anaplastic Lymphoma Kinase* eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese dieser malignen Neoplasie einnimmt (George et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008; Mosse et al. 2008). Strukturelle Veränderungen des Rezeptors, wie eine Mutation in der Aminosäuresequenz oder Schwankungen hinsichtlich der exprimierten Menge von Rezeptoren entlang der Zellmembran, haben Einfluss auf die Kinaseaktivität des Rezeptors und beeinflussen die physiologisch strenge Regulation dieser Enzyme (Blume-Jensen und Hunter 2001).

5.1 Die Rezeptoraktivität und das Phosphorylierungsniveau

Um ein besseres Verständnis für die Rolle des ALK-Rezeptors in der Pathogenese des Neuroblastoms zu erlangen, ist es wichtig zu verstehen, welche Mechanismen bei der Aktivierung des ALK-Rezeptors eine ausschlaggebende Rolle spielen und wie sich diese Mechanismen auf die Rezeptoraktivität auswirken. Besondere Betrachtung verdient die Fragestellung nach den Auswirkungen der Autophosphorylierung des ALK-Rezeptors auf die Intensität der Tyrosinkinase. Die Arbeitsgruppe Wouters-Bunt und Bunt konnte feststellen, dass es infolge der Autophosphorylierung relevante Unterschiede in den Gesamtphosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, I1250T-, R1275Q- und Y1604F-Mutation gibt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bauen auf vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe auf. Die Resultate zeigten hinsichtlich der Größe des Gesamtphosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors und dessen Mutationen und den Divergenzen zwischen ihnen, dass die I1250T-Mutation das geringste Ausmaß an Autophosphorylierung aufweist. Die R1275Q-Mutation liegt etwas darüber. Das Gesamtphosphorylierungsniveau der Y1604F-Mutation entspricht dem des Wild Type ALK-Rezeptors. Die Phosphorylierungsniveaus beider Varianten liegen oberhalb des Phosphorylierungsniveaus der R1275Q-Mutation und werden nur noch vom Niveau der F1174L-Mutation übertroffen (Aksak 2017).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist eine genauere Untersuchung der Gesamtphosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der I1250T-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation erforderlich, um die spezifische Bedeutung der ALK-Phospho-Epitope in jeder Mutation des ALK-Rezeptors während der Autophosphorylierung hervorzuheben. Ziel der Untersuchung ist eine Differenzierung zwischen den ALK-Phospho-Epitopen im Hinblick auf ihre Rolle in der Regulation der Kinaseaktivität des ALK-Rezeptors während der Autophosphorylierung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen eine Abstufung der Auswirkungen der Autophosphorylierung der ALK-Phospho-Epitope in Bezug auf die Kinaseaktivität des ALK-Rezeptors. Konkludierend ist festzuhalten, dass eine gesteigerte Intensität der Phosphorylierung der ALK-Phospho-Epitope eine Auswirkung auf die Rezeptoraktivität haben kann. Daraus resultieren zwei Möglichkeiten: Im Anschluss an die Phosphorylierung des Rezeptors wird dieser aktiv und in der Folge auch die nachgeschalteten intrazellulären Signalkaskaden, oder die intrazellulären Signalwege verbleiben, trotz zuvor stattgefundener Phosphorylierung, inaktiv (Abbildung 23, A).

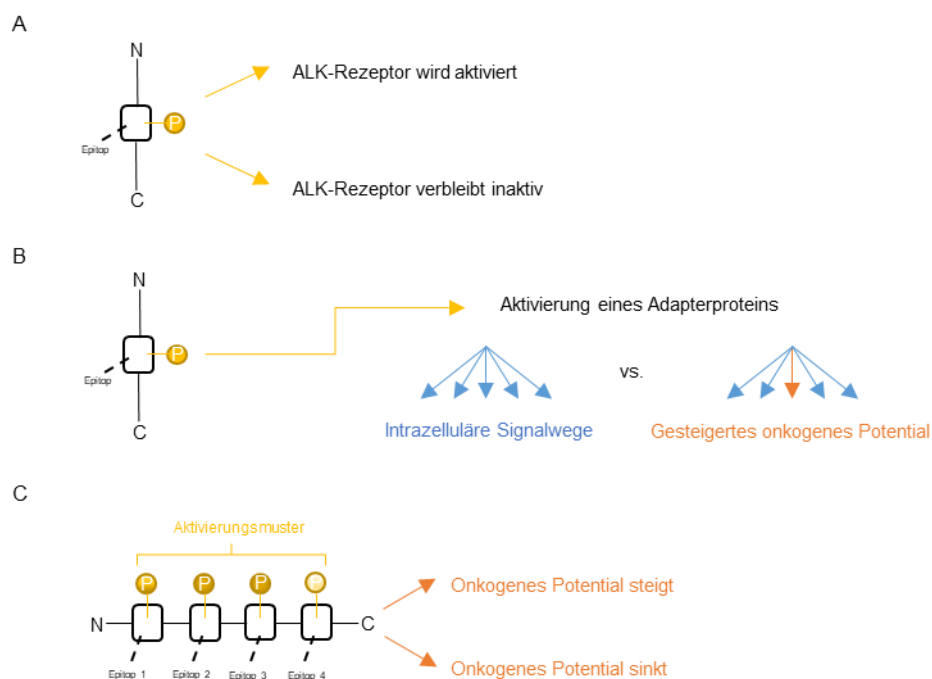


Abbildung 23: Schematische Darstellung möglicher Effekte der Autophosphorylierung der ALK-Phospho-Epitope.

Bei weiterführender Betrachtung der Effekte der gesteigerten Intensitäten der Autophosphorylierungen werden Unterschiede in der Qualität der Rezeptoraktivität ersichtlich. Einzelne Epitope scheinen einen direkten Einfluss auf die ihnen nachgeschalteten Signalwege zu nehmen, indem sie diese gezielt aktivieren oder deaktivieren. Im Umkehrschluss führt der Ausfall dieser ALK-Phospho-Epitope zur Inaktivität des ansonsten aktiven Signalweges. Die Auswirkungen einer Manipulation des ALK-Rezeptors auf die Phosphorylierung der Epitope kann in einem gesteigerten onkogenen Potential resultieren. Die Phosphorylierung der Epitope moderiert die Aktivierung der nachgeschalteten intrazellulären Signalwege ähnlich einem Stellglied. Dabei kann die Phosphorylierung einiger einzelner Epitope einen bedeutenderen Einfluss auf das biologische Verhalten der Zelle ausüben, als die Phosphorylierung anderer Epitope es vermag (Abbildung 23, B). Im Gesamtzusammenhang nehmen die Aktivierungsmuster, welche sich aus den Intensitäten der Phosphorylierungen der einzelnen ALK-Phospho-Epitope summieren, essentiellen Einfluss auf das onkogene Potential der ALK-Rezeptormutation (Abbildung 23, C).

5.2 Die Überexpression des Wild Type ALK-Rezeptors

Der Wild Type ALK-Rezeptor verfügt, genau wie die F1174L-, die R1275Q- und die Y1604F-Mutation über ein onkogenes Potential in Bezug auf die Pathogenese eines Neuroblastoms (Passoni et al. 2009). Der Mechanismus, welcher zur Entstehung der Tumoren führt, wird beim Wild Type ALK-Rezeptor mit einer Überexpression des Rezeptors in Zusammenhang gebracht. Das erhöhte Expressionsniveau führt zu einer gesteigerten Aktivität, welche in der Folge ursächlich für die Entstehung von Neuroblastomen ist. Eine Voraussetzung für eine Tumorgenese durch Überexpression ist eine zuvor exprimierte Schwellenmenge an Wild Type ALK-Rezeptoren in den Neuroblastomzellen (Passoni et al. 2009).

Die Analyse des Gesamtposphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors unterstützt die Aussage von Passoni et al., dass die Expression einer Schwellenmenge notwendig ist. Vor Überschreiten der Schwellenmenge kommt es zu keiner Phosphorylierung der ALK-Phospho-Epitope. Die gesonderte Untersuchung der Phosphorylierungsniveaus der einzelnen ALK-Phospho-Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors ermöglicht eine genauere Differenzierung zwischen den notwendigen Schwellenmengen. Die Schwellenmenge wird anhand der GFP-Signalstärke bestimmt. Die GFP-Signalstärke ist in Kapitel 3.4.4 definiert. Ihr liegt die Menge der exprimierten, mit GFP

fusionierten, ALK-Rezeptoren zu Grunde. Auf sie wird von nun an nur noch als Signalstärke Bezug genommen. Während vier der ALK-Phospho-Epitope ab einer normierten GFP-Signalstärke von 1 eine Phosphorylierung zeigen, sticht das Tyr1278/1282/1283 mit einer doppelt so großen Schwellenmenge gegenüber den anderen vier Epitopen heraus.

Obwohl die Schwellenmengen für vier der fünf ALK-Phospho-Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors nahezu identisch sind, unterscheiden sich die Phosphorylierungsniveaus dieser vier Epitope deutlich voneinander. Dadurch entstehen epitopspezifische Muster, da die einzelnen ALK-Phospho-Epitope erst ab einer für sie spezifischen Schwellenmenge phosphoryliert vorliegen. Die Schwellenmengen mehrerer Epitope können identisch sein. Eine Abhängigkeit der Phosphorylierung der Epitope untereinander ist dabei jedoch nicht feststellbar. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Phosphorylierungsniveaus der verschiedenen ALK-Phospho-Epitope nur initial, und damit indirekt, von der Menge der exprimierten ALK-Rezeptoren abhängig sind. Dementsprechend müssen weitere Faktoren existieren, die einen Einfluss auf die Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope ausüben.

Die Lage der Tyrosinkinasen innerhalb der Aminosäuresequenz des ALK-Rezeptors könnte ausschlaggebend sein. Strukturell ist der ALK-Rezeptor in weiten Teilen identisch mit anderen Rezeptoren der Insulinrezeptorfamilie. Dennoch nimmt er eine einzigartige Stellung ein, da er sich im Aufbau der A-Schleife relevant von den anderen Rezeptoren der Insulinrezeptorfamilie unterscheidet (Donella-Deana et al. 2005; Morris et al. 1997). Die Epitope Tyr1278, Tyr1282 und Tyr1283 liegen in der A-Schleife, die übrigen untersuchten ALK-Phospho-Epitope befinden sich außerhalb der Kinase-Domäne des ALK-Rezeptors (Lee et al. 2010). Donella-Deana et al. berichten über ein Phosphorylierungsmuster, nach dessen Vorgabe die Reihenfolge der Autophosphorylierung abläuft. Infolge des Phosphorylierungsmusters liegt das Tyr1278, als erstes Tyrosin der A-Schleife, stärker phosphoryliert vor als das Tyr1282 und das Tyr1283.

Die Betrachtung der Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors bestätigt die Aussagen von Donella-Deana et al. Das Phosphorylierungsniveau des Tyr1278 liegt oberhalb des Phosphorylierungsniveaus des Tyr1282 und des Tyr1283. Vertiefend kann gezeigt werden, dass die drei Epitope der A-Schleife, obwohl sie im aktiven Zentrum der Kinaseaktivität des ALK-Rezeptors lie-

gen, nicht das größte Phosphorylierungsniveau der Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors aufweisen. Das Phosphorylierungsniveau des Tyr1278 liegt im Mittelfeld, das Phosphorylierungsniveau der Kombination aus Tyr1278/1282/1283 ist das geringste der untersuchten Gruppe von Epitopen. Die Epitope, welche außerhalb der Kinase-Domäne des Rezeptors liegen, zeigen im Vergleich größere Phosphorylierungsniveaus. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Tyrosine der Kinase-Domäne eine relevante Rolle während des Prozesses der Autophosphorylierung des Wild Type ALK-Rezeptors spielen und die Autophosphorylierung in einer gesteigerten Intensität der Phosphorylierung des Tyr1096 und des Tyr1604 resultiert.

5.3 Die Punktmutationen des ALK-Rezeptors

Punktmutationen in der primären Aminosäuresequenz des ALK-Rezeptors gelten als eine der Hauptursachen in der Pathogenese von Neuroblastomen. Das Auftreten einer Punktmutation hat eine verstärkte Aktivität des ALK-Rezeptors zur Folge (Caren et al. 2008; Chen et al. 2008; George et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008; Mosse et al. 2008). Da sich stabilisierende, chemische Bindungen nicht mehr ausbilden können, führen Punktmutationen zu strukturellen Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur des ALK-Rezeptors. Die strukturbeeinflussenden Veränderungen haben sowohl Auswirkungen auf die phosphorylierte, als auch auf die unphosphorylierte Form des mutierten Rezeptors: Die Autophosphorylierung des ALK-Rezeptors wird begünstigt, die Rezeptoraktivität ohne Bindung eines Liganden wird gesteigert (Bossi et al. 2010; Bresler et al. 2014; Lee et al. 2010). Daraus resultiert ein gesteigertes malignes Potential der Rezeptormutation, in dessen Folge die Wahrscheinlichkeit für die Pathogenese eines Neuroblastoms ansteigt (Schulte et al. 2011).

Die Punktmutationen des ALK-Rezeptors können unterschieden werden in Mutationen, die keinerlei Kinaseaktivität aufweisen, in Mutationen, die erst nach Ligandenbindung aktiv werden und in Mutationen, die in der Folge einer Autophosphorylierung ohne Ligandenbindung Aktivität erlangen (Chand et al. 2013).

Die I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors wird als eine Mutation ohne Kinaseaktivität beschrieben. Durch die Mutation an Aminosäure 1250 wird die Mutation inaktiv, wodurch eine Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege ebenfalls ausbleibt (Schonherr et al. 2011). Die Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope der I1250T-Mutation bestätigen die Beobachtungen von Schonherr et al. Jedes der unter-

suchten ALK-Phospho-Epitope zeigt lediglich eine geringe Intensität der Phosphorylierung. Das geringe Phosphorylierungsniveau ist unabhängig von der Menge der exprimierten ALK-Rezeptoren und ist identisch mit den Phosphorylierungsniveaus der Kontrollgruppe. Eine Schwellenmenge an exprimierten ALK-Rezeptoren, als Voraussetzung für eine Phosphorylierung, ist nicht detektierbar. Alle Phosphorylierungsniveaus der Epitope der I1250T-Mutation sind nahezu identisch gering. Es kann daher angenommen werden, dass die Mutation kein malignes Potential aufweist und ihr dadurch, im Hinblick auf die Pathogenese und die Progression von Neuroblastomen, keinerlei Bedeutung zukommt.

Schonherr et al. stellen die These auf, dass eine gleichzeitige Expression der I1250T-Mutation und des Wild Type ALK-Rezeptors in einer Neuroblastomzelle zu einer Wechselwirkung zwischen den Rezeptoren führen könnte. Die kinasetote Mutation könnte einen dominant-negativen Effekt auf die Aktivität des Wild Type ALK-Rezeptors ausüben (Schonherr et al. 2011). Die Fusion der Rezeptoren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen und eine mikroskopische Untersuchung der Phosphorylierungsniveaus ermöglicht die Validierung dieser These. Bei konstanter Menge des Wild Type ALK-Rezeptors und ansteigender Expression der I1250T-Mutation wäre demnach eine Abnahme des Phosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors zu erwarten.

Die F1174L-Mutation macht 34,7 % aller bekannten Punktmutationen des ALK-Rezeptors aus. Sie ist in der Kinase-Domäne des ALK-Rezeptors lokalisiert und zeigt ein hohes Maß an Autophosphorylierung bei gleichzeitig deutlicher Tendenz zur malignen Transformation der exprimierenden Neuroblastomzellen (Berry et al. 2012; Brouwer et al. 2010). Zur Phosphorylierung der ALK-Phospho-Epitope der F1174L-Mutation muss, ähnlich wie beim Wild Type ALK-Rezeptor, zuvor eine Schwellenmenge an Rezeptoren exprimiert werden. Im Gegensatz zum Wild Type ALK-Rezeptor variieren die Schwellenmengen der Epitope stärker voneinander. Bei den am stärksten phosphorylierten Epitopen Tyr1096 und Tyr1586 ist die Schwellenmenge am geringsten. Obwohl die Kombination Tyr1278/1282/1283 das geringste Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der F1174L-Mutation aufweist, entspricht die Schwellenmenge dieses Epitops der des Tyr1096 und des Tyr1586. Damit es zu einer Phosphorylierung des Tyr1278 kommt, ist eine dreimal so große Menge an exprimierten ALK-Rezeptoren notwendig. Die Varianz der Schwellenmengen ist bei der F1174L-Mutation größer als

beim Wild Type ALK-Rezeptor. Das Phosphorylierungsniveau scheint von der Menge der exprimierten ALK-Rezeptoren unabhängig zu sein, sobald die Schwellenmenge exprimierter Rezeptoren erreicht wird. Sowohl bei der F1174L-Mutation als auch beim Wild Type ALK-Rezeptor zeigt das Tyr1096 das größte Phosphorylierungsniveau, jedoch ist die Schwellenmenge des Epitops der F1174L-Mutation geringer als die des Tyr1096 des Wild Type ALK-Rezeptors. Bei den Epitopen Tyr1278 und der Kombination aus Tyr1278/1282/1283 sind diese Relationen identisch. Bei beiden Varianten des ALK-Rezeptors liegt das Phosphorylierungsniveau des Tyr1278 im Mittelfeld, und die Kombination aus Tyr1278/1282/1283 weist das geringste Phosphorylierungsniveau auf. Die beiden anderen ALK-Phospho-Epitope zeigen ein disparates Phosphorylierungsniveau. Bei der F1174L-Mutation ist das Tyr1586 das Epitop mit dem zweitgrößten Phosphorylierungsniveau, beim Wild Type ALK-Rezeptor zeigt das Epitop das zweitgeringste Phosphorylierungsniveau. Das Tyr1604 verhält sich konträr gegenüber dem Tyr1586.

Die R1275Q-Mutation ist die am häufigsten auftretende Punktmutation des ALK-Rezeptors. Sie steht im Zusammenhang mit einer gesteigerten Kinaseaktivität und der Pathogenese von Neuroblastomen (Chen et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008; Mosse et al. 2008). Bisherige Studien konnten zeigen, dass die R1275Q-Mutation trotz des starken onkogenen Potentials ein geringeres Maß an Autophosphorylierung aufweist als die F1174L-Mutation (Brouwer et al. 2010; Ueda et al. 2016).

Die Ergebnisse der Untersuchung des Phosphorylierungsniveaus der R1275Q-Mutation bestätigen die Aussagen von Brouwer et al. Das Gesamtphosphorylierungsniveau der Autophosphorylierung, das durch die R1275Q-Mutation verursacht wird, ist wesentlich geringer als das der F1174L-Mutation und es liegt noch unter dem des Wild Type ALK-Rezeptors. Die R1275Q-Mutation benötigt eine geringe Schwellenmenge an exprimierten ALK-Rezeptoren, bevor die Phosphorylierung stattfinden kann. Aufgrund des geringen Phosphorylierungsniveaus der Epitope Tyr1278/1282/1283, Tyr1586 und Tyr1604 ist die Schwellenmenge dieser Epitope nicht eindeutig bestimmbar. Sie verhalten sich annähernd identisch. Die Schwellenmenge der Epitope Tyr1096 und Tyr1278 unterscheiden sich dagegen deutlich voneinander. Vor Beginn der Phosphorylierung des Tyr1278 muss im Vergleich mit dem Tyr1096 nahezu die dreifache Menge an ALK-Rezeptoren exprimiert werden.

In der Gegenüberstellung der Phosphorylierungsniveaus der Epitope der R1275Q-Mutation ist auffällig, dass sich vier der Epitope kaum in ihren Phosphorylierungsniveaus unterscheiden. Das Tyr1278 kann in zwei Populationen unterteilt werden. Die erste Population weist ein ähnliches Phosphorylierungsniveau wie die anderen vier Epitope auf. Das Phosphorylierungsniveau der zweiten Population sticht im Bereich der GFP-Signalstärke zwischen 0,4 und 4 heraus. Das Tyr1278 nimmt in diesem Bereich eine Sonderstellung ein, da das Phosphorylierungsniveau deutlich über dem der anderen Epitope dieser Mutation liegt. Weder die I1250T-Mutation noch die F1174L-Mutation oder der Wild Type ALK-Rezeptor enthalten eine Zellpopulation oder ein Epitop, welches sich in dieser Art und Weise von den übrigen Epitopen abgrenzen lässt.

Die Y1604F-Mutation ist entgegen den anderen Punktmutationen des ALK-Rezeptors wenig erforscht. In der Literatur finden sich lediglich Ausführungen über ihre korrespondierende Mutation Y664F innerhalb des NPM-ALK (Bai et al. 1998; Wang et al. 2010). Dort führt die Mutation dazu, dass das NPM-ALK nicht mehr phosphoryliert werden kann. Infolgedessen sinkt das Expressionsniveau des Rezeptors, und die nachgeschalteten Signalwege verbleiben inaktiv (Hu et al. 2016; Shi et al. 2013). Bei der Untersuchung der Y1604F-Mutation an Position 1604 innerhalb des vollständigen ALK-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass die Y1604F-Mutation an diesem Epitop nicht phosphoryliert wird (McDuff et al. 2013).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Beobachtungen von McDuff et al. hinsichtlich des Phosphorylierungsniveaus an Position 1604. Das Tyr1604 ist das einzige ALK-Phospho-Epitop der Y1604F-Mutation, welches unphosphoryliert vorliegt. Es nimmt daher eine ähnliche Sonderstellung wie das Tyr1278 der R1275Q-Mutation ein. Die übrigen Epitope werden im Rahmen der Autophosphorylierung phosphoryliert. Das Gesamtposphorylierungsniveau der Y1604F-Mutation entspricht in etwa dem des Wild Type ALK-Rezeptors. Bis auf das Tyr1604 werden in beiden Varianten die gleichen Epitope phosphoryliert. Die Zusammensetzung des Gesamtposphorylierungsniveaus der Y1604F-Mutation ist eine andere als beim Wild Type ALK-Rezeptor. In beiden Varianten weist das Tyr1096 das größte Phosphorylierungsniveau auf. Das zweitgrößte Phosphorylierungsniveau der Y1604F-Mutation zeigen die Kombination aus Tyr1278/1282/1283 und das Tyr1586. Die Intensitäten der Cy3-Signalstärke dieser beiden Epitope entsprechen einander. Beim Wild Type ALK-Rezeptor lassen diese Epitope das geringste Phosphorylierungsniveau erkennen. Genau entgegengesetzt

verhalten sich das Tyr1278 und das Tyr1604, die bei der Y1604F-Mutation eine geringe, bzw. keine Phosphorylierung aufweisen. Beim Wild Type ALK-Rezeptor zeigen sie dagegen das dritt- bzw. zweitstärkste Phosphorylierungsniveau.

5.4 Die Qualitäten der Rezeptoraktivität

Die Gesamtphosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors und seiner Punktmutationen sind die Summe der Phosphorylierungsniveaus aller phosphorylierten ALK-Phospho-Epitope. Im Vergleich der Gesamtphosphorylierungsniveaus untereinander liegt das Niveau der F1174L-Mutation über dem Niveau des Wild Type ALK-Rezeptors. Bei detaillierterer Analyse der Gesamtphosphorylierungsniveaus wird deutlich, dass die Gewichtung der Epitope zwischen der F1174L-Mutation und dem Wild Type ALK-Rezeptor unterschiedlich ist. Nicht die gleichen ALK-Phospho-Epitope werden lediglich stärker phosphoryliert, sondern die Autophosphorylierung resultiert in einem anderen Phosphorylierungsprofil. In allen untersuchten Varianten des Wild Type ALK-Rezeptors hat die Autophosphorylierung die gleichen ALK-Phospho-Epitope als Ziel. Die Phosphorylierungsprofile unterscheiden sich nicht nur zwischen dem Wild Type ALK-Rezeptor und der F1174L-Mutation, sondern jede Punktmutation zeichnet sich durch ihr individuelles Phosphorylierungsprofil aus.

Die Streudiagramme (Kapitel 4.1.6 bis Kapitel 4.1.8) verbildlichen die Mutations- und Epitopspezifität der Phosphorylierungsniveaus. Die Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors liegen enger und sich überlagernder zusammen als die der F1174L-Mutation, die in ihrer fächerförmigen Anordnung klar voneinander zu unterscheiden sind. In ihrer Varianz entspricht die Y1604F-Mutation in etwa dem Wild Type ALK-Rezeptor. Die Streuung der Epitope der R1275Q-Mutation ist geringer als die der Y1604F-Mutation oder die des Wild Type ALK-Rezeptors. Ungeachtet dessen weist die R1275Q-Mutation ein größeres Phosphorylierungsniveau als der Wild Type ALK-Rezeptor oder die Y1604F-Mutation auf.

Aus den verschiedenen epitopspezifischen Phosphorylierungsniveaus summiert sich ein mutationsspezifisches Gesamtphosphorylierungsniveau. Die Aufschlüsselung der Ergebnisse dieser Arbeit ermöglicht ein besseres Verständnis der Abstufungen zwischen den Phosphorylierungsniveaus und den Schwellenmengen der ALK-Phospho-Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors und dessen Punktmutationen. Die Relationen der Phosphorylierungsniveaus aller untersuchten Mutationen und deren Epitopen werden in einer zusammenfassenden Übersicht dargestellt. Die Zeilen innerhalb des

Schemas repräsentieren die Größe des Phosphorylierungsniveaus. In jeder Spalte wird ein anderes ALK-Phospho-Epitop dargestellt.

Die unterste Zeile zeigt die Epitope der I1250T-Mutation. Alle Epitope dieser Mutation liegen auf einem gleichmäßig geringen Phosphorylierungsniveau, sodass die I1250T-Mutation als kinasetot eingestuft werden kann. In der Zeile darüber befinden sich die gering stärker phosphorylierten Epitope der R1275Q-Mutation. Nur die gering phosphorylierte Population des Tyr1278 der R1275Q-Mutation ist in dieser Zeile repräsentiert. Neben den Epitopen der R1275Q-Mutation ist auch das Tyr1604 der Y1604F-Mutation auf diesem Phosphorylierungsniveau repräsentiert. Auf dem nächst größeren Phosphorylierungsniveau liegen die Kombination Tyr1278/1282/1283 der F1174L-Mutation und des Wild Type ALK-Rezeptors. Diese beiden Epitope sind annähernd gleich stark phosphoryliert und die einzigen zwei Epitope auf diesem Niveau.

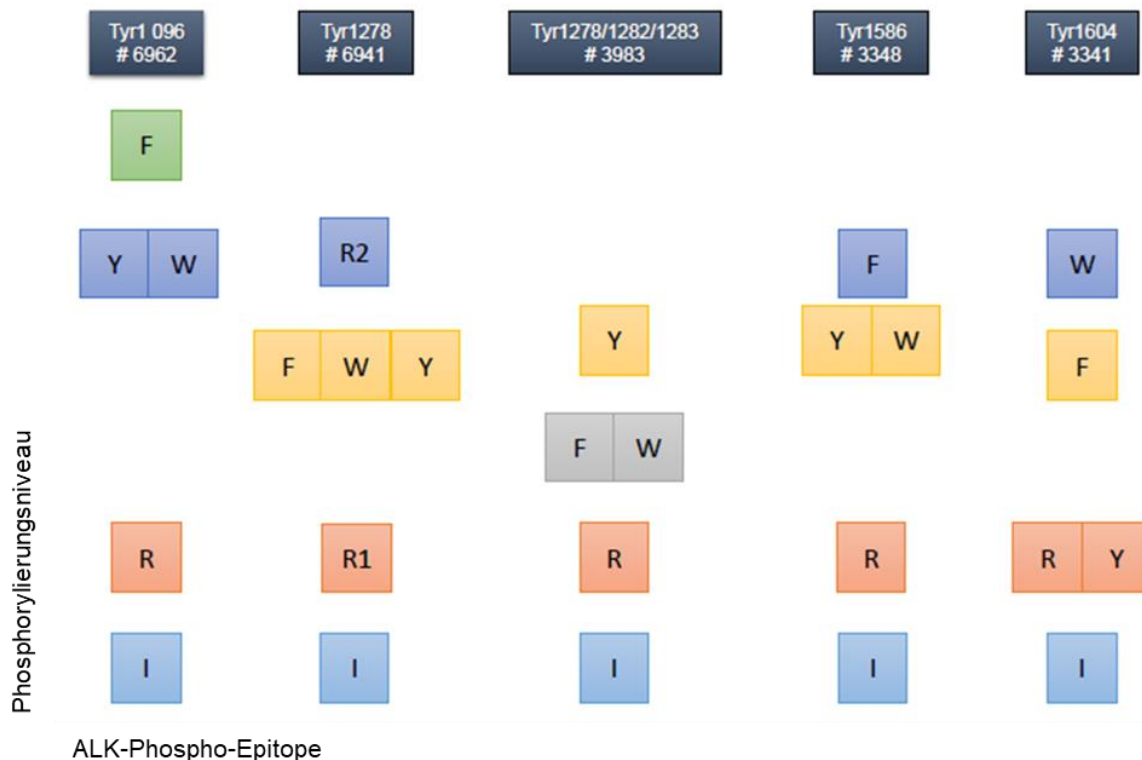


Abbildung 24: Die Relationen zwischen den ALK-Phospho-Epitopen

Auf dem nächst höhergelegenen Phosphorylierungsniveau liegen insgesamt sieben Epitope der F1174L-, der Y1604F-Mutation und des Wild Type ALK-Rezeptors. Das Tyr1278 ist beim Wild Type ALK-Rezeptor und seinen beiden Mutationen nahezu gleichstark phosphoryliert. Sie liegen auf einem Niveau mit dem Tyr1604 der F1174L-Mutation. Die Kombination Tyr1278/1282/1283 und das Tyr1586 der Y1604F-Mutation, sowie das Tyr1586 des Wild Type ALK-Rezeptors sind leicht stärker phosphoryliert als die anderen vier Epitope dieses Phosphorylierungsniveaus. Wiederum eine Zeile darüber befinden sich das Tyr1096 des Wild Type ALK-Rezeptors und der Y1604F-Mutation, die stark phosphorylierte Population des Tyr1278 der R1275Q-Mutation, das Tyr1586 der F1174L-Mutation und das Tyr1604 des Wild Type ALK-Rezeptors. Das größte Phosphorylierungsniveau aller untersuchten Epitope zeigt das Tyr1096 der F1174L-Mutation (Abbildung 24).

5.5 Die biologische Aktivität des ALK-Rezeptors

Die Autophosphorylierung des ALK-Rezeptors kann zu einer gesteigerten Aktivität des Rezeptors führen. Dabei hat die Intensität der Phosphorylierung einen Einfluss darauf ob es dazu kommt, dass der Rezeptor in großen Mengen phosphoryliert vorliegt. Nur phosphorylierte ALK-Rezeptoren sind in der Lage die biologische Zellaktivität maßgeblich hin zur Malignität zu beeinflussen. In wie weit die exprimierenden Zellen durch den Wild Type ALK-Rezeptor oder seine Punktmutationen in ihrem biologischen Verhalten beeinflusst werden ist abhängig vom Phosphorylierungsmuster. Die Mechanismen, welche dabei ihre Wirkung entfalten, sind unterschiedlich. Der Wild Type ALK-Rezeptor erreicht das für seine Aktivität notwendige Phosphorylierungsniveau durch eine Überexpression des Rezeptors. Das gesteigerte Phosphorylierungsniveau der Punktmutationen resultiert aus den Mutationen in ihren primären Aminosäuresequenzen.

Zwischen den mutationsspezifischen Folgen, die die Überexpression oder eine Punktmutation für das biologische Verhalten der betroffenen Zelle hat, kann differenziert werden. Mit Ausnahme der I1250T-Mutation steigert die Autophosphorylierung durch Überexpression oder punktuelle Mutation das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope. Besonders das Tyr1096 sticht heraus, da es durch die Autophosphorylierung das größte Phosphorylierungsniveau aller Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors und der F1174L-Mutation erreicht. Die weiteren Epitope der beiden

Varianten unterscheiden sich in der Größe ihrer Phosphorylierungsniveaus und nehmen keine derartige Sonderstellung ein.

Die R1275Q-Mutation und die Y1604F-Mutation zeigen jeweils ein Epitop, welches eine Sonderstellung einnimmt. Das Tyr1278 der R1275Q-Mutation weist ein weit höheres Phosphorylierungsniveau auf, als die anderen Epitope der R1275Q-Mutation. Die R1275Q-Mutation ist die am häufigsten auftretende Punktmutation des ALK-Rezeptors (Brouwer et al. 2010). Die Existenz dieser Punktmutation begünstigt sowohl die Pathogenese hereditärer Neuroblastome als auch das Auftreten sporadisch entstandener Tumoren (Chen et al. 2008; George et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008; Mosse et al. 2008). Da Neuroblastomzellen, die die R1275Q-Mutation exprimieren, ein stark malignes biologisches Potential aufweisen, ist zu vermuten, dass dieses maligne Potential eng in Zusammenhang mit der Phosphorylierung des Tyr1278 dieser Mutation steht.

Das Tyr1604 der Y1604F-Mutation beeinflusst das biologische Verhalten der Y1604F-Mutation auf eine andere Art und Weise. Durch die Punktmutation an Aminosäure 1604 kann das ALK-Phospho-Epitop an dieser Position nicht mehr phosphoryliert werden. Diese Mutation führt jedoch nicht dazu, dass die Y1604F-Mutation insgesamt nicht mehr phosphoryliert wird. Lediglich das Epitop Tyr1604 liegt nicht phosphoryliert vor. Die Phosphorylierung der anderen ALK-Phospho-Epitope wird nicht beeinträchtigt. Das Gesamtphosphorylierungsniveau der Y1604F-Mutation ist trotz des unphosphorylierten Epitops in etwa so groß wie das des Wild Type ALK-Rezeptors.

5.6 Das Phosphorylierungsniveau und die Zellmorphologie

Neuroblastomzellen, welche den Wild Type ALK-Rezeptor exprimieren, sind bei Betrachtung ihrer äußeren Zellmorphologie mit polarisierten Fibroblasten vergleichbar. Sie sind jedoch stärker polarisiert als Fibroblasten, bilden breitere, flachere Lamellipodien und können daher voneinander unterschieden werden. Dagegen ist die Zellmorphologie der Zellen, die die I1250T-Mutation exprimieren, kaum von der Zellmorphologie normaler Fibroblasten zu unterscheiden. Die Zellen der I1250T-Mutation bilden keine oder nur eine geringe Anzahl von Zellausläufern, zudem ist ihre Zellpolarisation geringer ausgeprägt. Die Neuroblastomzellen, welche die F1174L-Mutation exprimieren, verhalten sich im Hinblick auf die Zellmorphologie konträr zu den Zellen der I1250T-Mutation. Entlang der Zellmembranen der Zellen der F1174L-Mutation sind deutlich ausgeprägte Lamellipodien und Filopodien sichtbar. Die Zellausläufer sind

dünnere und längere als bei den anderen Mutationen, sodass diese Zellen optisch klar identifiziert werden können. Die Zellmorphologie der Zellen, welche die Y1604F-Mutation exprimieren, entspricht der Morphologie der Zellen des Wild Type ALK-Rezeptors. Die polare Ausrichtung, die Existenz und die Art und Orientierung der Zellausläufer sind vergleichbar. Eine demgegenüber gesteigerte Ausprägung von Lamellipodien und Filopodien zeigen die Zellen, die die R1275Q-Mutation exprimieren. Sie sind stärker polarisiert als untransfizierte Fibroblasten.

Bei gleichzeitiger Betrachtung des Phosphorylierungsniveaus des ALK-Rezeptors und der Zellmorphologie der Neuroblastomzellen in denen der ALK-Rezeptor exprimiert wird, ist eine Korrelation zwischen der Intensität des Phosphorylierungsniveaus und der morphologischen Zellaktivität zu erkennen. Ein gesteigertes Phosphorylierungsniveau resultiert in morphologisch klar erkennbaren Veränderungen der Neuroblastomzellen. Die Zellen sind intensiver polarisiert und die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien ist gesteigert. Infolgedessen ist ein Anstieg des malignen Potentials der Neuroblastomzellen zu vermuten, da eine Steigerung der Zellmigration und der Zellproliferation erwartet werden kann. Aus der mikroskopischen Betrachtung der äußeren Zellmorphologie können Rückschlüsse auf das biologische Verhalten der Neuroblastomzellen, die den Wild Type ALK-Rezeptor oder eine Punktmutation exprimieren, gezogen werden.

Die genauere Betrachtung der morphologischen Aktivität der Neuroblastomzellen liegt außerhalb des Umfangs dieser Arbeit. Eine qualitative morphologische Analyse dieser Veränderungen ist Gegenstand einer Dissertation eines anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe Wouters-Bunt.

Im Anschluss an die Glykosylierung wird der ALK-Rezeptor im Inneren der neuronalen Zellen an der Zellmembran exprimiert (Iwahara et al. 1997; Morris et al. 1997). Während die Masse der Wild Type ALK-Rezeptoren membranständig ist, liegt die Mehrzahl der ALK-Rezeptoren mit Punktmutationen vorwiegend im Zellinneren, gebunden an Zellorganellen, vor. Die mutierten Rezeptoren, welche dennoch an der Zellmembran exprimiert werden, zeigen ein gesteigertes Phosphorylierungsniveau (Mazot et al. 2011).

Durch die Betrachtung der Lokalisation der ALK-Phospho-Epitope in dieser Arbeit können die Aussagen von Mazot et al. weiter konkretisiert werden. Alle Variationen des ALK-Rezeptors haben die Gemeinsamkeit, dass sie nicht im Inneren des Zellkerns

einer SK-N-AS-Neuroblastomzelle exprimiert werden. Innerhalb des Zytoplasmas sind die Epitope jedoch unterschiedlich lokalisiert.

Die Verteilung der Wild Type ALK-Rezeptoren im Zellinneren bekräftigt die Beobachtungen von Mazot et al. partiell. Der Rezeptor kann entlang der Zellmembran und im Zellinneren nachgewiesen werden. Dort wird er vermutlich am kernnahen Endoplasmatischen Retikulum exprimiert. Wie in Abbildung 7 dargestellt sind die ALK-Rezeptoren homogen im Zytoplasma verteilt, die Verteilung entlang der Zellmembran fällt dagegen heterogen aus. Das Tyr1604 sticht aus den Epitopen hervor, welche in den flachen Zellausläufern exprimiert werden. Bei Betrachtung der Kolo-kalisation des GFP-Signals und der Phosphorylierung der Epitope wird ersichtlich, dass das Tyr1604 in dieser Zellregion besonders stark phosphoryliert vorliegt, während die übrigen Epitope homogener phosphoryliert werden.

Genau wie die Wild Type ALK-Rezeptoren wird die F1174L-Mutation homogen im Zytoplasma exprimiert, vermutlich ebenfalls an Zellorganellen gebunden. Im Gegensatz zum Wild Type ALK-Rezeptor wird die F1174L-Mutation vermehrt an den Zellmembranen exprimiert. Dabei liegen vor allem das Tyr1096 und das Tyr1586 in den dünnen Filopodien besonders stark phosphoryliert vor. Diese beiden Epitope nehmen eine besondere Stellung innerhalb der F1174L-Mutation und in Relation zu den Epitopen der anderen Mutationen und des Wild Type ALK-Rezeptors ein. Beide Epitope liegen sowohl an den Rezeptoren der Zellmembran als auch an den Rezeptoren im Zytoplasma phosphoryliert vor. Das Tyr1278 der F1174L-Mutation liegt dagegen nur innerhalb des Zytoplasmas phosphoryliert vor, in den Zellausläufern wird es nur gering phosphoryliert. Die Epitope mit den geringsten Phosphorylierungsniveaus der F1174L-Mutation liegen nur in den kernnahen Zellarealen phosphoryliert vor. Aufgrund dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass die im Hinblick auf das onkologische Potential bedeutsamen ALK-Phospho-Epitope vermehrt stark phosphoryliert entlang der Zellmembran exprimiert werden.

Bis auf das Tyr1604 zeigen alle ALK-Phospho-Epitope der Y1604F-Mutation ein homogen verteiltes GFP-Signal innerhalb des Zytoplasmas. Die Epitope Tyr1096, Tyr1586 und die Kombination aus Tyr1278/1282/1283 weisen neben der starken Phosphorylierung der im Zellinneren gelegenen Rezeptoren auch ein gesteigertes Phosphorylierungsniveau an den Rezeptoren entlang der Zellmembran und den

Zellausläufern auf. Das Tyr1278 ist, neben dem Tyr1604, das am geringsten phosphorylierte Epitop der Y1604F-Mutation. Dabei ist das Tyr1278 nur an den Rezeptoren, die an der Zellmembran und den Zellausläufern liegen, stark phosphoryliert. Die Rezeptoren im Inneren der Neuroblastomzellen zeigen ein vergleichsweise geringes Phosphorylierungsniveau an Tyr1278.

Bei der mikroskopischen Betrachtung zeigt die R1275Q-Mutation, ähnlich wie die I1250T-Mutation, ein einheitlicheres Bild der GFP- und Cy3-Signalstärken als der Wild Type ALK-Rezeptor oder die anderen Punktmutationen. Die Rezeptoren sind homogen im Zytoplasma verteilt. Die ALK-Phospho-Epitope Tyr1096, die Kombination Tyr1278/1282/1283, das Tyr1586 und das Tyr1604 liegen allein in den Zellarealen nahe den Zellkernen phosphoryliert vor, an den Zellmembranen sind sie nur gering phosphoryliert. Die Ausnahme ist eine Population von Zellen des Tyr1278, die sowohl im Zellinneren als auch an der Zellmembran stark phosphoryliert vorliegt.

Sowohl die Intensität als auch die Qualität der Phosphorylierung der ALK-Phospho-Epitope im Rahmen der Autophosphorylierung sind optisch detektierbar. Die aktiven Mutationen und ihre stark phosphorylierten Epitope sind durch die unterschiedlichen Intensitäten des GFP-Signals von den geringer phosphorylierten Epitopen abgrenzbar. Sie exprimieren die am stärksten phosphorylierten Epitope an „Signalisierungs-Hot-Spots“ in den dünnen Lamellipodien und Filopodien entlang der Zellmembran.

5.7 Die Profile der Autophosphorylierung

Bei der Untersuchung der Auswirkungen der Autophosphorylierung auf das Phosphorylierungsniveau des ALK-Rezeptors wird deutlich, dass infolge der Autophosphorylierung der Wild Type ALK-Rezeptor und seine Punktmutationen unterschiedliche Gesamtphosphorylierungsniveaus aufweisen. Davon ausgehend erfolgt eine differenziertere Betrachtung der Phosphorylierungsniveaus der einzelnen ALK-Phospho-Epitope des ALK-Rezeptors.

Die ursächlichen Mechanismen, welche zu einer Autophosphorylierung des ALK-Rezeptors führen, sind unterschiedlich. Beim Wild Type ALK-Rezeptor wird in erster Linie eine Überexpression in Betracht gezogen (Passoni et al. 2009). Übereinstimmend dazu konnte gezeigt werden, dass eine Schwellenmenge exprimierter ALK-Rezeptoren vorhanden sein muss, bevor der Rezeptor phosphoryliert wird. Die Schwellenwerte sind epitop- und mutationsspezifisch. Ist der Schwellenwert erreicht, scheint die Menge

der exprimierten Rezeptoren keine weiteren Auswirkungen auf die Größe der Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope zu haben.

Da sich die Phosphorylierungsniveaus der Mutationen oberhalb der Schwellenwerte jedoch unterscheiden, liegt der Schluss nahe, dass andere Faktoren neben der Menge der exprimierten ALK-Rezeptoren die Intensität der Phosphorylierung beeinflussen. Der Anstieg der Intensität oberhalb des Schwellenwertes erfolgt nicht linear. Ein möglicher Faktor könnte die Position der Epitope in der Aminosäurestruktur des Rezeptors sein. Dabei scheinen einige ALK-Phospho-Epitope von größerer Bedeutung zu sein als andere. Die Betrachtung der Intensität der Phosphorylierung durch die Überexpression des Wild Type ALK-Rezeptors zeigt, dass der Schwerpunkt der Phosphorylierung nicht in der A-Schleife, sondern auf den Epitopen Tyr1096 und Tyr1604 liegt. Die gesteigerte Phosphorylierung dieser beiden Epitope kann das biologische Verhalten des Wild Type ALK-Rezeptors entscheidend mitbeeinflussen. Infolgedessen sind diese stark phosphorylierten ALK-Phospho-Epitope vielversprechende Therapieziele für Neuroblastome, welche den Wild Type ALK-Rezeptor exprimieren.

Die Punktmutationen benötigen in gleicher Weise eine zuvor exprimierte Menge an ALK-Rezeptoren, bevor sie phosphoryliert werden können. Die Größe des Schwellenwertes unterscheidet sich zwischen dem Wild Type ALK-Rezeptor und dessen Punktmutationen und ist aus diesem Grund sowohl epitop- als auch mutationsspezifisch individuell. Im Rückschluss bedeutet das, dass die Malignität des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-Mutation, der R1275Q-Mutation und der Y1604F-Mutation epitop- und mutationsspezifische Ursachen hat. Die unterschiedlichen Phosphorylierungsniveaus sind nicht die Grundlage, sondern die Folge einer epitop- und mutationsspezifischen Gewichtung der Epitope als Ziele der Autophosphorylierung.

Bis auf die Punktmutationen ist der generelle Aufbau der Aminosäuresequenzen der ALK-Rezeptoren identisch. Eine Unterscheidung der Varianten des ALK-Rezeptors anhand der epitop- und mutationsspezifischen Phosphorylierungsprofile ist jedoch möglich. Der Wild Type ALK-Rezeptor und seine Punktmutationen sprechen während der Autophosphorylierung für die jeweilige Mutation spezifische Ziele an, um sie in einem für die Mutation individuellen Maß zu phosphorylieren.

Aus einer punktuellen Mutation des ALK-Rezeptors resultiert dementsprechend nicht allein eine gesteigerte Intensität des Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-

Epitope, sondern ebenfalls eine qualitative Abstufung zwischen den Epitopen innerhalb einer Mutation. Aus dieser mutationseigenen Gewichtung der ALK-Phospho-Epitope entwickelt sich das epitop- und mutationsspezifische Potential zur malignen Transformation.

Der Mechanismus der Autophosphorylierung, unabhängig davon, ob Überexpression oder punktuelle Mutation in der primären Aminosäuresequenz, spielt lediglich eine untergeordnete Rolle. Entscheidend ist das Phosphorylierungsniveau der Epitope. Bei Betrachtung der qualitativen Abstufung zwischen den ALK-Phospho-Epitopen nehmen einige Epitope eine Sonderstellung ein. Die Epitope, welche eine Sonderstellung einnehmen, sind als Ziele zukünftiger Forschungsprojekte bzw. zur Erforschung möglicher Therapien bedeutsam. Als vielversprechende Ziele sind das Tyr1096 des Wild Type ALK-Rezeptors und der F1174L-Mutation, das Tyr1278 der R1275Q-Mutation und das Tyr1604 der Y1604F-Mutation aufzuführen.

Das Epitop Tyr1278 der R1275Q-Mutation scheint eine ausschlaggebende Rolle hinsichtlich des onkogenen Potentials der R1275Q-Mutation zu spielen. Im Gegensatz dazu beeinflusst das Tyr1604 der Y1604F-Mutation nicht das biologische Verhalten der gesamten Punktmutation, da die Y1604F-Mutation, trotz des unphosphoryliert vorliegenden Tyr1604, nahezu ein identisches Gesamtphosphorylierungsniveau aufweist wie der Wild Type ALK-Rezeptor. Diese Beispiele zeigen, dass Punktmutationen das Phosphorylierungsniveau einzelner Epitope sowohl in Richtung gesteigerter Phosphorylierung als auch in die entgegengesetzte Richtung beeinflussen können. Das wiederum kann, muss jedoch nicht zwingend Folgen für das Phosphorylierungsniveau der gesamten Mutation haben (Abbildung 25).

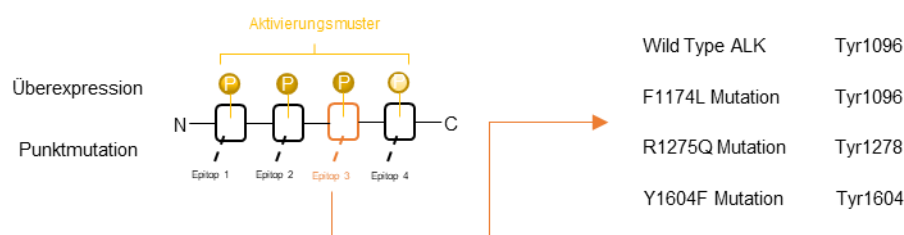


Abbildung 25: Epitope, die eine Sonderstellung einnehmen

Der Wild Type ALK-Rezeptor und jede seiner Punktmutationen haben ein spezifisches Phosphorylierungsprofil, welches sich ebenfalls in der Lokalisation der stark phosphorylierten Epitope widerspiegelt. Am deutlichsten sticht dieser Umstand bei der F1174L-Mutation heraus. Diese Punktmutation zeigt klar abgrenzbare Unterschiede zwischen den ALK-Phospho-Epitopen, sowohl beim Phosphorylierungsniveau als auch bei der Lokalisation der phosphorylierten Epitope innerhalb der Neuroblastomzellen. Ausnahmen sind das Tyr1604 und das Tyr1586, die unabhängig von ihrer Lokalisation in der Zelle stark phosphoryliert vorliegen.

Die äußere Zellmorphologie der Neuroblastomzellen ähnelt der Morphologie von polarisierten Fibroblasten. Eine gesteigerte Expression der ALK-Rezeptoren resultiert in mikroskopisch erkennbaren Unterschieden in der Zellmorphologie. Dabei hat die Größe des Phosphorylierungsniveaus Einfluss auf die Zellaktivität und dadurch auch auf die Zellmorphologie. Anhand der Zellmorphologie können Rückschlüsse auf die Zellaktivität und das biologische Verhalten der Zellen getroffen werden. Aktivere Zellen sind stärker polarisiert und bilden dünnere und vermehrt auftretende Zellausläufer aus. Dies könnte mit einer gesteigerten Zellproliferation und einem erhöhten onkogenen Potential zusammenhängen.

Weiterführend sollte untersucht werden, ob aus den epitop- und mutationsspezifischen Phosphorylierungsprofilen des Wild Type ALK-Rezeptors und seiner Punktmutationen ein ebenso spezifisches Aktivierungsprofil der nachgeschalteten intrazellulären Signalwege resultiert. Die fortführende Untersuchung kann sich auf die am stärksten phosphorylierten ALK-Phospho-Epitope konzentrieren. Dadurch ergeben sich spezifische therapeutische Ziele in Neuroblastomen, die den Wild Type ALK-Rezeptor oder eine der Punktmutationen enthalten. Als mögliche Ansatzpunkte kommen eine Inhibition der Autophosphorylierung des gesamten ALK-Rezeptors oder einzelner ALK-Phospho-Epitope durch Therapeutika oder weitere Mutationen genauso in Betracht wie eine gezielte Inhibition der nachfolgenden Signalwege.

5.8 Die Dimerisierung des ALK-Rezeptors

Das Dimerisierungsverhalten des NPM-ALK ist bereits durch Morris et al. und Shiota et al. 1994 in Studien untersucht worden. Nach der Fusion des NPM mit dem intrazellulären Anteil des ALK-Rezeptors kommt es bei der Aktivierung des NPM-ALK zur Dimerisierung des NPM. Infolgedessen liegen die Tyrosinkinasen des ALK-Rezeptors lokal nahe beieinander, wodurch eine Autophosphorylierung der Epitope innerhalb der

A-Schleife des ALK-Rezeptors ausgelöst wird.

Das Dimerisierungsverhalten des vollständigen ALK-Rezeptors ist bis dato wenig untersucht. Der ALK-Rezeptor galt lange Zeit als *orphan receptor* ohne bekannten Liganden. Aktuelle Studien belegen die Bindung der Zytokine FAM150A/Augmentor- β und FAM150B/Augmentor- α sowie des Heparins als Liganden des ALK-Rezeptors in Zusammenhang mit einer möglichen Autophosphorylierung des Rezeptors (Guan et al. 2015; Murray et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe des *Acceptor Photobleaching* an einem *Confocal Laser Scanning Microscope* die FRET-Effizienz bestimmt, um Rückschlüsse auf eine mögliche Dimerisierung des Wild Type ALK-Rezeptors oder dessen Punktmutationen während der Autophosphorylierung ziehen zu können. Sind die interagierenden Rezeptoren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen fusioniert, überträgt sich während des FRET Energie vom angeregten Donor auf den Akzeptor (Förster 1948). Dieser Energietransfer ist besonders effizient, wenn sich Donor und Akzeptor in unmittelbarer Nähe zueinander befinden, d. h. nicht weiter als 10 nm auseinander liegen (Stryer 1978). Im Umkehrschluss leitet sich daraus folgende These ab: Ist eine FRET-Effizienz während der Autophosphorylierung des Wild Type ALK-Rezeptors oder seiner Punktmutationen messbar, nähern sich die Rezeptoren während der Aktivierung auf weniger als 10 nm aneinander an. Aufgrund dieses geringen Abstandes während der Autophosphorylierung kann von einer Dimerisierung der ALK-Rezeptoren ausgegangen werden.

Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses zwischen Donor und Akzeptor werden vier DNA-Verhältnisse von Donor zu Akzeptor untersucht. Bei jedem der Verhältnisse ist eine Protein-Protein-Interaktion zwischen zwei, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen fusionierten, ALK-Rezeptoren messbar. Das optimale Mengenverhältnis zwischen mit Donor Fluoreszenzprotein und Akzeptor Fluoreszenzprotein fusionierter ALK-Rezeptor-DNA ist 1:5. Durch die Erhöhung der Menge der DNA, welche mit dem Akzeptor Fluoreszenzprotein fusioniert ist, kann bis zu diesem Mengenverhältnis eine Steigerung der FRET-Effizienz erzielt werden. Diese Steigerung ist darin begründet, dass den ALK-Rezeptoren, die mit dem Donor Fluoreszenzprotein fusioniert sind, eine ausreichende Anzahl von ALK-Rezeptoren, die mit dem Akzeptor Fluoreszenzprotein fusioniert sind, zur Dimerisierung zur Verfügung gestellt werden. Aufgrund dieser Er-

gebnisse wird das Dimerisierungsverhalten der Punktmutationen nur in den DNA-Verhältnissen 1:3 und 1:5 untersucht. Oberhalb dieser DNA-Mengenverhältnisse ist mit einer einsetzenden Sättigung zu rechnen.

Bei allen DNA-Mengenverhältnissen im DNA-Verhältnis von Donor und Akzeptor 1:5, die bei der Untersuchung des Dimerisierungsverhaltens des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der I1250T-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation untersucht worden sind, ist eine FRET-Effizienz messbar, welche klar größer 0 % ist. In je 20 Zellen jedes DNA-Mengenverhältnisses wurde die FRET-Effizienz einer ROI und einer nonROI bestimmt. Die FRET-Effizienz der ROI gibt Informationen über den Grad der Dimerisierung der exprimierten ALK-Rezeptoren. Die nonROI dient als Kontrollregion jeder Zelle. In der nonROI wird kein *Acceptor Photobleaching* durchgeführt. Die FRET-Effizienzen in diesen Regionen liegen immer um 0 %. Die Signifikanzberechnung zwischen den FRET-Effizienzen der ROI und nonROI des Wild Type ALK-Rezeptors und seiner Punktmutationen zeigt bei jedem Wertepaar signifikante Unterschiede. Die p-Werte wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Bei der Betrachtung des DNA-Verhältnisses von Donor und Akzeptor 1:3 zeigt sich lediglich bei der I1250T-Mutation kein signifikanter Unterschied zwischen den FRET-Effizienzen der ROI und nonROI, die anderen vier FRET-Effizienzen unterscheiden sich signifikant voneinander.

Die FRET-Effizienzen des Wild Type ALK-Rezeptors und seiner Punktmutationen unterscheiden sich voneinander. Mit Steigerung der DNA-Mengenverhältnisse auf das Verhältnis 1:5 sind die größten FRET-Effizienzen messbar. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit einem Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test durchgeführt (Abbildung 26). In der ersten Spalte der Abbildung finden sich die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen der verschiedenen Mutationen im Vergleich mit dem Wild Type ALK-Rezeptor, sowie der Vergleich zwischen der F1174L- und der I1250T-Mutation. In der zweiten Spalte sind die Daten in der dazugehörigen kumulativen Verteilungsfunktion (CDF) aufgeführt. Die dritte Spalte zeigt die Differenz zwischen beiden Funktionen als absoluten Betrag. Da der Test in Erwartung einer Abweichung zu einer bekannten Seite durchgeführt wird, wird die *one-tailed test* Variante gewählt. Die Risikogrenzwerte der statistischen Signifikanz sind der standardisierten Lilliefors-Tabelle entnommen: 10 % (grün), 5 % (rot) und 2,5 % (blau) (Lilliefors 1967).

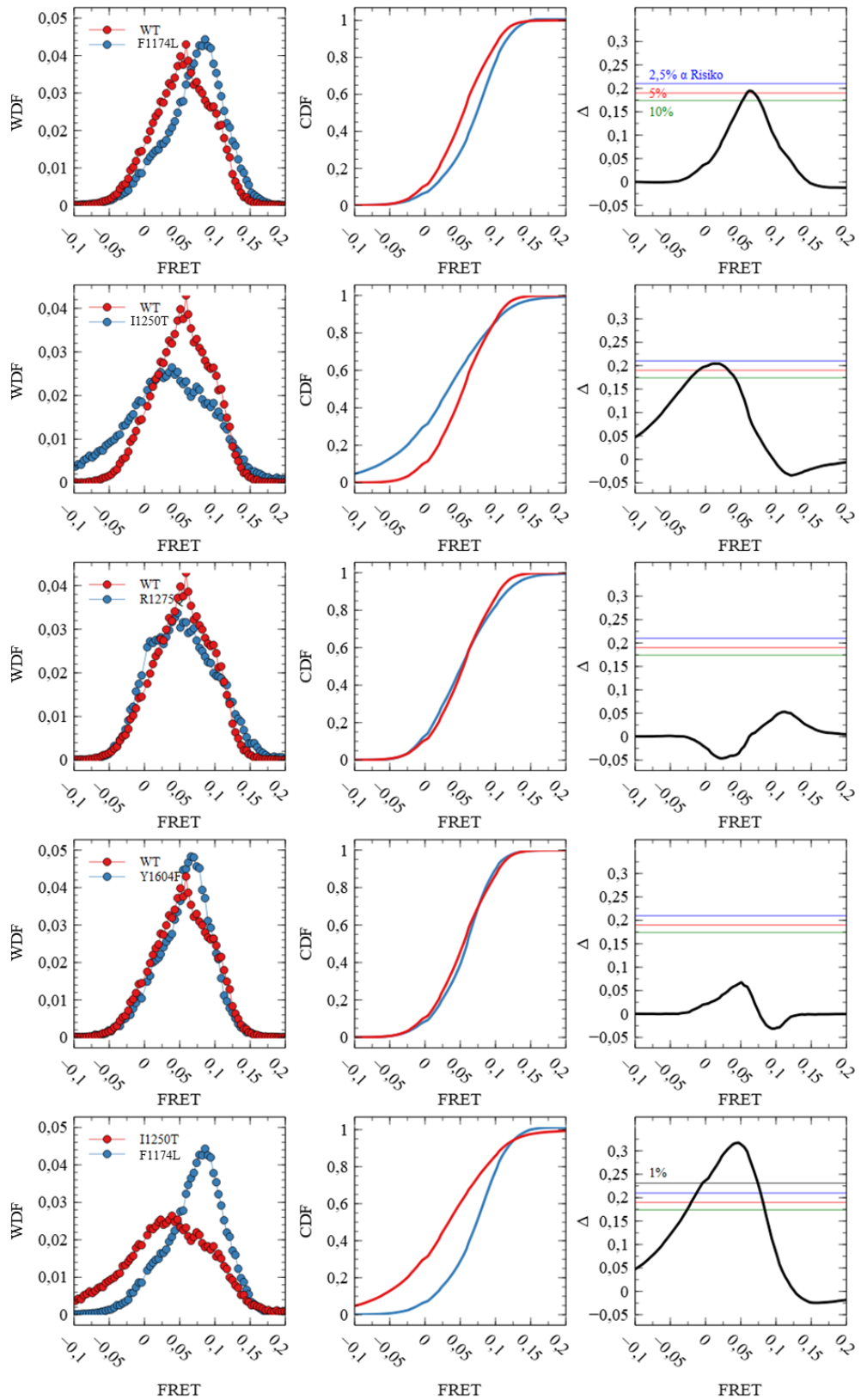


Abbildung 26: Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test (*one-tailed*) des Verhältnisses von Donor zu Akzeptor 1:5.

Als Ausgangsvermutung gilt, dass Mutationen, die ein nachgewiesenermaßen höheres karzinogenes Potential als der Wild Type ALK-Rezeptor aufweisen, ebenfalls stärker dimerisieren als der Wild Type ALK-Rezeptor. Gleichzeitig sollte die kinasetote I1250T-Mutation weniger stark dimerisieren als der Wild Type ALK-Rezeptor.

Diese Ausgangsvermutungen erweisen sich als richtig. Die F1174L-Mutation weist ein stärkeres karzinogenes Potential auf als der Wild Type ALK-Rezeptor. Sie zeigt mit 7,8 % die größte FRET-Effizienz aller Varianten des ALK-Rezeptors. Danach folgt die Y1604F-Mutation mit 6,3 % und der Wild Type ALK-Rezeptor mit 5,6 %. Mit einer FRET-Effizienz von 5,1 % weist die R1275Q-Mutation den geringsten Wert der kina-seaktiven Mutationen auf. Die FRET-Effizienz der I1250T-Mutation liegt mit 3,7 % noch darunter.

Der Unterschied zwischen den FRET-Effizienzen des Wild Type ALK-Rezeptors und der F1174L-Mutation ist signifikant ($p < 0,05$). Ebenfalls signifikant ist der Unterschied zwischen dem Wild Type ALK-Rezeptor und der I1250T-Mutation ($p < 0,05$). Zwischen der F1174L- und der I1250T-Mutation besteht ein hoch signifikanter Unterschied der FRET-Effizienzen ($p < 0,01$). Zwischen der Y1604F-Mutation und dem Wild Type ALK-Rezeptor ist kein signifikanter Unterschied feststellbar. Die FRET-Effizienz der Y1604F-Mutation ist dennoch größer als die FRET-Effizienz des Wild Type ALK-Rezeptors, ebenso wie das onkogene Potential. Trotz des größeren onkogenen Potentials der R1275Q-Mutation gegenüber dem Wild Type ALK-Rezeptor dimerisiert diese Mutation weniger stark, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Diese Abweichung könnte auf die zuvor diskutierte Sonderstellung des Tyr1278 innerhalb der R1275Q-Mutation zurückzuführen sein. Lediglich dieses ALK-Phospho-Epitop liegt besonders stark phosphoryliert vor, während die anderen Epitope geringere Phosphorylierungsniveaus aufweisen.

Erwartungsgemäß sind die FRET-Effizienzen der DNA-Mengenverhältnisse von Donor und Akzeptor 1:3 aufgrund der geringeren Saturierung mit Rezeptoren, die mit dem Akzeptorfarbstoff fusioniert sind, insgesamt geringer als die FRET-Effizienzen des Verhältnisses 1:5. Mit geringen Variationen sind die relativen Zusammenhänge jedoch ähnlich. Die R1275Q-Mutation zeigt mit 4,9 % die größte FRET-Effizienz. Der Wild Type ALK-Rezeptor (4,1 %), die F1174L-Mutation (4,1 %) und die Y1604F-Mutation (4,0 %) weisen nahezu die gleichen FRET-Effizienzen auf. In diesem DNA-Mengenverhältnis liegt die FRET-Effizienz der I1250T-Mutation bei etwa 0 %.

Hoch signifikante Unterschiede finden sich zwischen dem Wild Type ALK-Rezeptor und der I1250T-Mutation sowie zwischen der F1174L- und der I1250T-Mutation ($p < 0,01$). Die Unterschiede zwischen den FRET-Effizienzen des Wild Type ALK-Rezeptors und der F1174L-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation sind statistisch nicht signifikant (Abbildung 27).

Bei gleichzeitiger Betrachtung des Dimerisierungsverhaltens und der Gesamtphosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors und seiner Punktmutationen ist ein Zusammenhang zu vermuten. Die F1174L-Mutation zeigt sowohl das größte Gesamtphosphorylierungsniveau als auch die größte FRET-Effizienz im DNA-Mengenverhältnis 1:5. Demgegenüber liegen die FRET-Effizienzen des Wild Type ALK-Rezeptors und der Y1604F-Mutation nicht so eng beieinander wie ihre Phosphorylierungsniveaus. Das Verhalten der R1275Q-Mutation entspricht, nach Einordnung in das Gesamtbild, den Erwartungen, da sich die FRET-Effizienz analog zum Gesamtphosphorylierungsniveau der Mutation einordnen lässt. Die FRET-Effizienz der R1275Q-Mutation ist, genau wie ihr Gesamtphosphorylierungsniveau größer als das der I1250T-Mutation und ordnet sich unterhalb der Y1604F-Mutation und des Wild Type ALK-Rezeptors ein.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl der Wild Type ALK-Rezeptor als auch seine Punktmutationen während der Autophosphorylierung dimerisieren. Dabei gibt es eine Korrelation zwischen der Größe der FRET-Effizienz als Maß für die Dimerisierung des ALK-Rezeptors und der Größe des Phosphorylierungsniveaus als Maß für die Aktivität des ALK-Rezeptors.

Zur weiteren Untersuchung dieses Aktivierungsmechanismus aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wäre eine Fusion der gleichen ALK-Punktmutationen mit dem Fluoreszenzfarbstoff mCherry eine sinnvolle Weiterführung der bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Experimente. Zwei Rezeptoren der gleichen Punktmutation, einer mit EGFP als Donorfarbstoff und der zweite mit mCherry als Akzeptorfarbstoff fusioniert, könnten stärker dimerisieren als die Rezeptoren einer Punktmutation mit dem Wild Type ALK-Rezeptor.

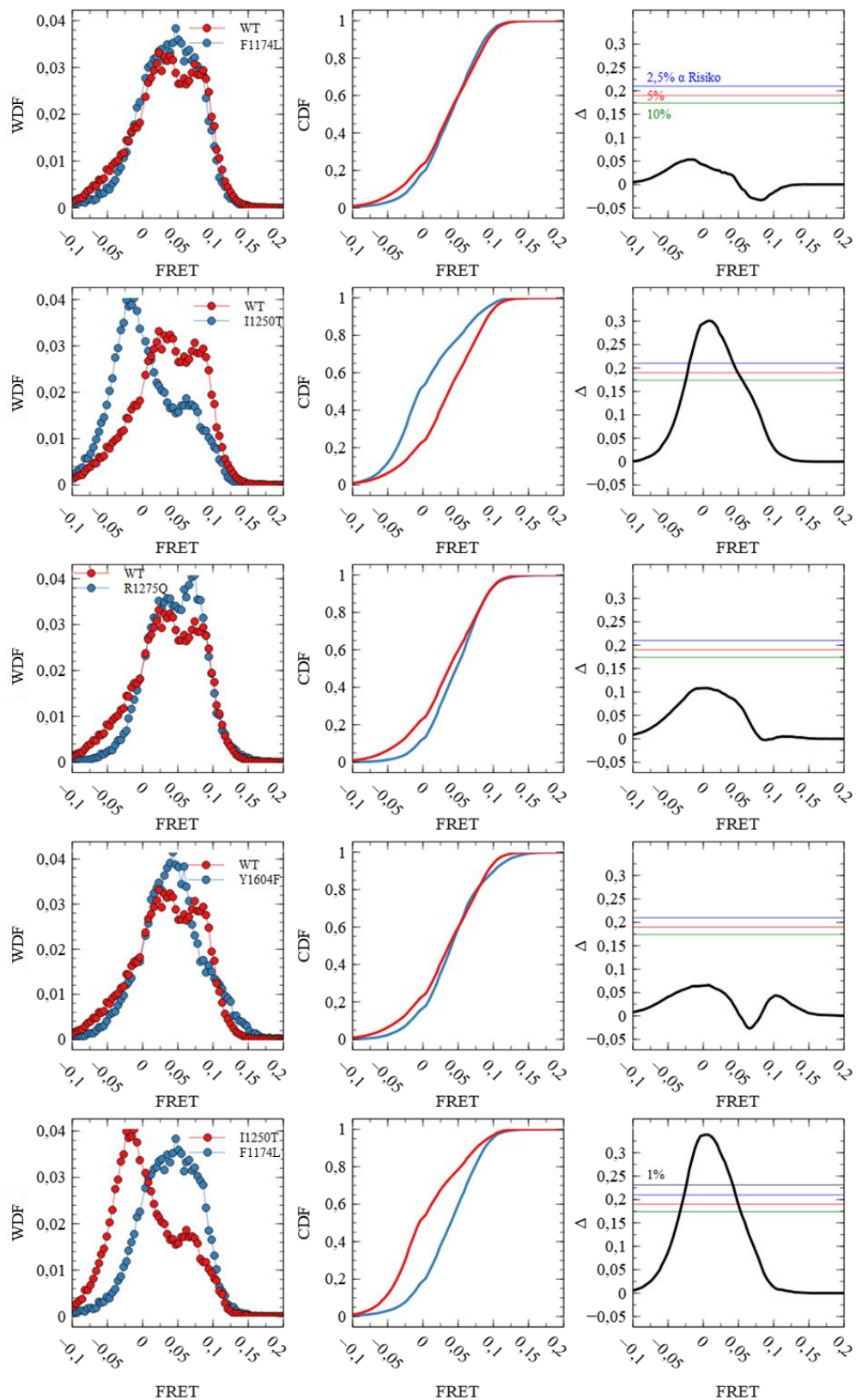


Abbildung 27: Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test (*one-tailed*) des Verhältnisses von Donor zu Akzeptor 1:3.

6. Zusammenfassung

Die Pathogenese des Neuroblastoms steht in direktem Kontext mit einer Überexpression der *Anaplastic Lymphoma Kinase* oder der Expression von Punktmutationen des ALK-Rezeptors. Die Aktivität und das Aktivierungsverhalten des ALK-Rezeptors beeinflussen sowohl das onkogene Potential als auch das biologische Verhalten der Neuroblastomzellen.

Die vorliegende Arbeit verfolgt zwei Ziele: Mit Hilfe der quantitativen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie und der Methode der indirekten Immunfluoreszenz werden mutations- und epitopspezifische Varianzen der Phosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der I1250T-, der R1275Q- und der Y1604F-Punktmutation des ALK-Rezeptors untersucht und verglichen. Des Weiteren wird mittels *Acceptor Photobleaching*, durchgeführt an einem *Confocal Laser Scanning Microscope*, die Dimerisierung des ALK-Rezeptors im Rahmen der Autophosphorylierung experimentell nachgewiesen.

Es ist gelungen die Gesamtphosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors und seiner Punktmutationen differenzierter als zuvor darzustellen. Sowohl beim Wild Type ALK-Rezeptor als auch bei seinen Punktmutationen führt die Autophosphorylierung der ALK-Rezeptoren zur Entstehung eines individuellen Phosphorylierungsprofils. Die Phosphorylierung der ALK-Phospho-Epitope erfolgt in einer mutationsspezifisch eigenen Gewichtung, wodurch die Entstehung der epitopspezifischen Phosphorylierungsniveaus erst ermöglicht wird. Es wird deutlich, dass sich das Gesamtphosphorylierungsniveau des Wild Type ALK-Rezeptors und seiner Punktmutationen aus der Summe der epitopspezifischen Phosphorylierungsniveaus zusammensetzt.

Die Identifikation mutationsspezifisch besonders stark phosphorylierter ALK-Phospho-Epitope erlaubt die Einordnung der mutations- und epitopspezifischen Phosphorylierungsniveaus in ein gemeinsames Schema. Innerhalb dieses Schemas sind die Größen der Phosphorylierungsniveaus in Relation zueinander gesetzt, wodurch eine gezielte Auswahl von Epitopen ermittelt worden ist, die während der Autophosphorylierung priorisiert phosphoryliert werden. Beispielhaft ist das Tyr1096 des Wild Type ALK-Rezeptors und der F1174L-Mutation genauso zu nennen wie das Tyr1278 der R1275Q-Mutation. Diese ALK-Phospho-Epitope bieten sich in besonderem Maße als Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten an.

Bei der Untersuchung des Aktivierungsmechanismus in Zusammenhang mit der Autophosphorylierung des ALK-Rezeptors konnte erfolgreich dargelegt werden, dass der Wild Type ALK-Rezeptor wie auch seine Punktmutationen bei der Aktivierung des Rezeptors dimerisieren. Die ermittelten FRET-Effizienzen belegen einen Energietransfer zwischen zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen fusionierten ALK-Rezeptoren. Damit ist nachgewiesen, dass sich die ALK-Rezeptoren während der Autophosphorylierung auf weniger als 10 nm einander annähern.

Die Bestimmung von mutationsspezifisch bedeutsamen ALK-Phospho-Epitopen und die Beschreibung des Dimerisierungs- und Aktivierungsverhaltens des ALK-Rezeptors während der Autophosphorylierung dienen der Charakterisierung struktur- und aktivierungsrelevanter Attribute des ALK-Rezeptors als Schwerpunkt weiterführender Grundlagenforschung.

7. Anhang

Der Wild Type ALK-Rezeptor

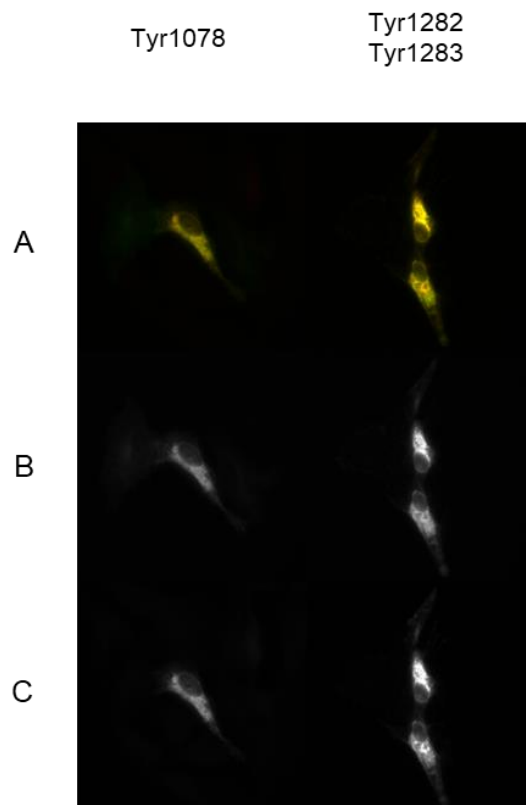


Abbildung 28: Expression der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 des Wild Type ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie. Darstellung von repräsentativen Zellen. **A**, Darstellung der Kolo­kalisierung des grünen GFP-Signals und des roten Cy3-Signals in den Neuroblastomzellen. **B**, Übersicht über die Signalstärken des GFP-Signals und die Lokalisation des Wild Type ALK-Rezeptors in den SK-N-AS-Zellen in Graustufen. **C**, Übersicht über die Signalstärken des Cy3-Signals und über das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope des Wild Type ALK-Rezeptors in Graustufen.

Die F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors

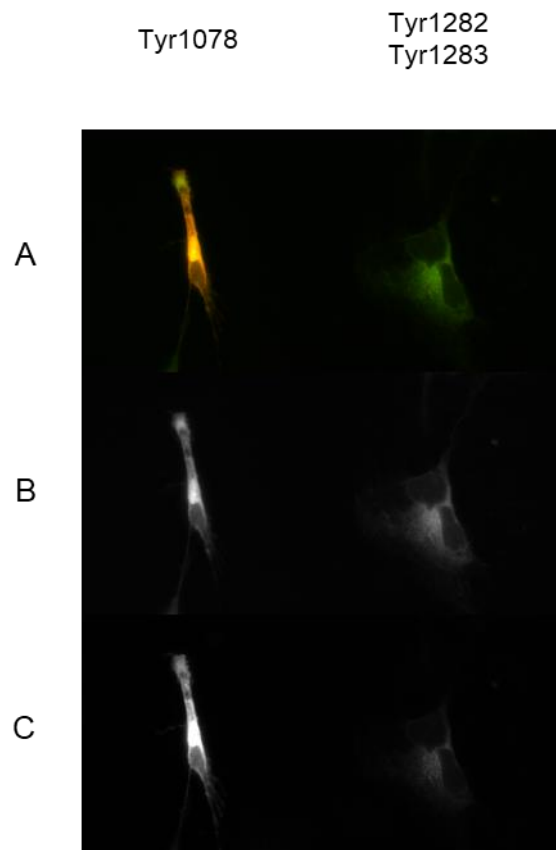


Abbildung 29: Expression der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 der F1174L-Mutation des ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie. Darstellung von repräsentativen Zellen. **A**, Darstellung der Kolokalisation des grünen GFP-Signals und des roten Cy3-Signals in den Neuroblastomzellen. **B**, Übersicht über die Signalstärken des GFP-Signals und die Lokalisation der F1174L-Mutation in den SK-N-AS-Zellen in Graustufen. **C**, Übersicht über die Signalstärken des Cy3-Signals und über das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der F1174L-Mutation in Graustufen.

Die I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors

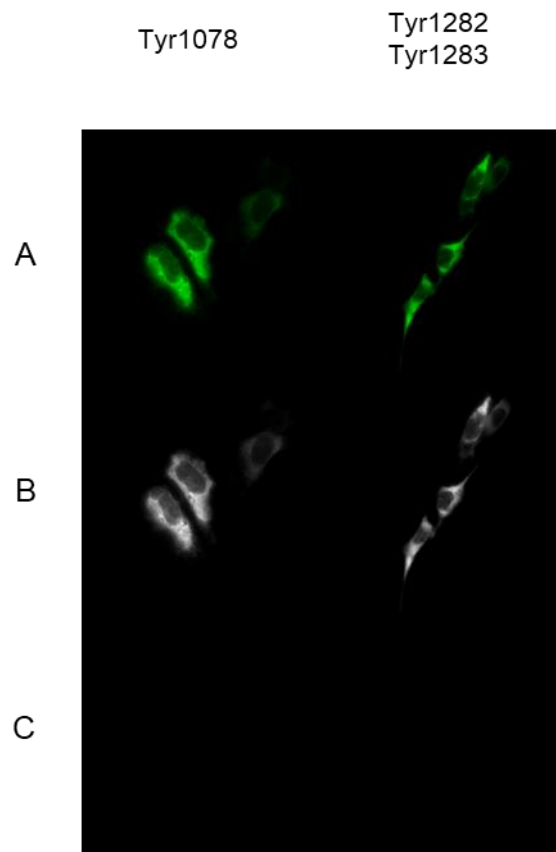


Abbildung 30: Expression der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie. Darstellung von repräsentativen Zellen. **A**, Darstellung der Kolokalisation des grünen GFP-Signals und des roten Cy3-Signals in den Neuroblastomzellen. **B**, Übersicht über die Signalstärken des GFP-Signals und die Lokalisation der I1250T-Mutation in den SK-N-AS-Zellen in Graustufen. **C**, Übersicht über die Signalstärken des Cy3-Signals und über das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der I1250T-Mutation des ALK-Rezeptors in Graustufen.

Die R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors

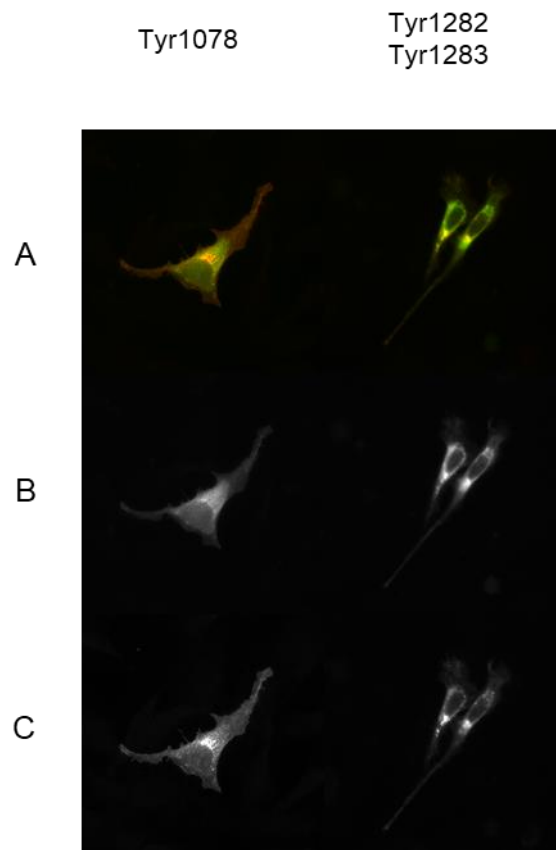


Abbildung 31: Expression der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie. Darstellung von repräsentativen Zellen. **A**, Darstellung der Kolokalisation des grünen GFP-Signals und des roten Cy3-Signals in den Neuroblastomzellen. **B**, Übersicht über die Signalstärken des GFP-Signals und die Lokalisation der R1275Q-Mutation in den SK-N-AS-Zellen in Graustufen. **C**, Übersicht über die Signalstärken des Cy3-Signals und über das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der R1275Q-Mutation des ALK-Rezeptors in Graustufen.

Die Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors

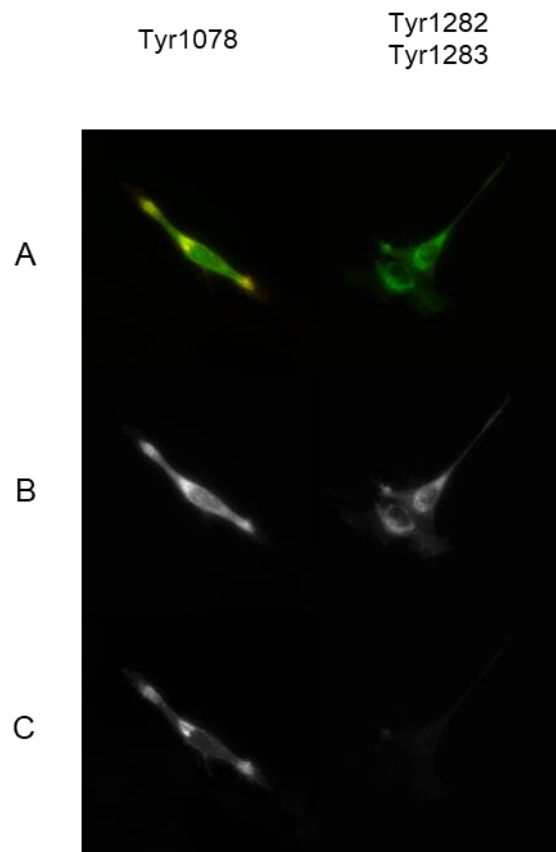
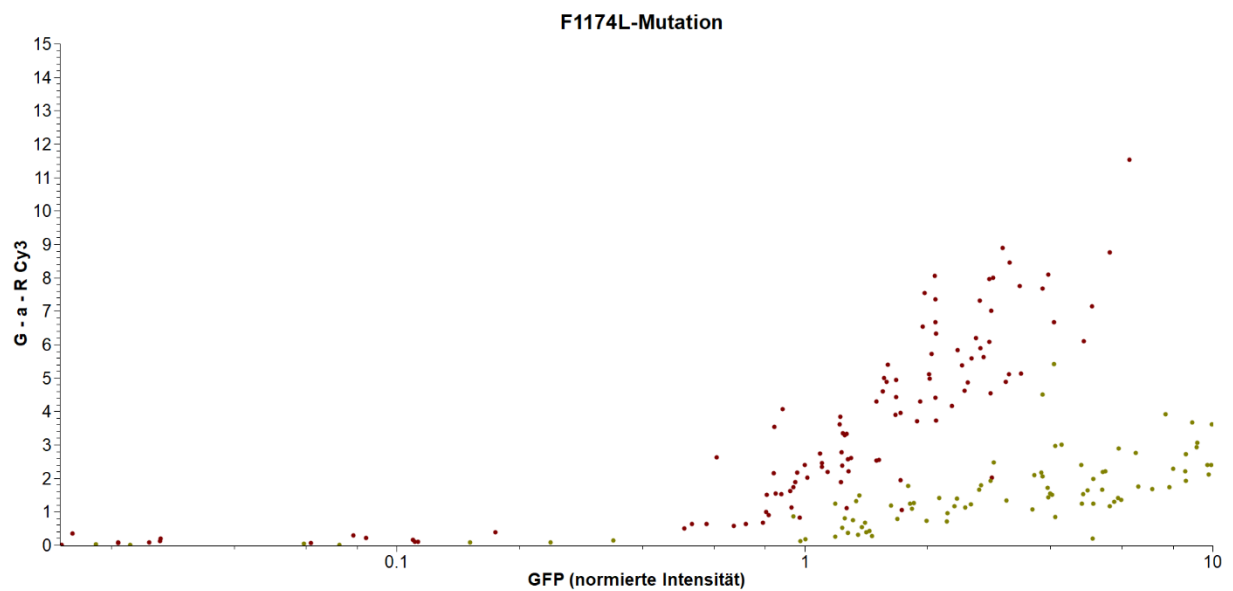
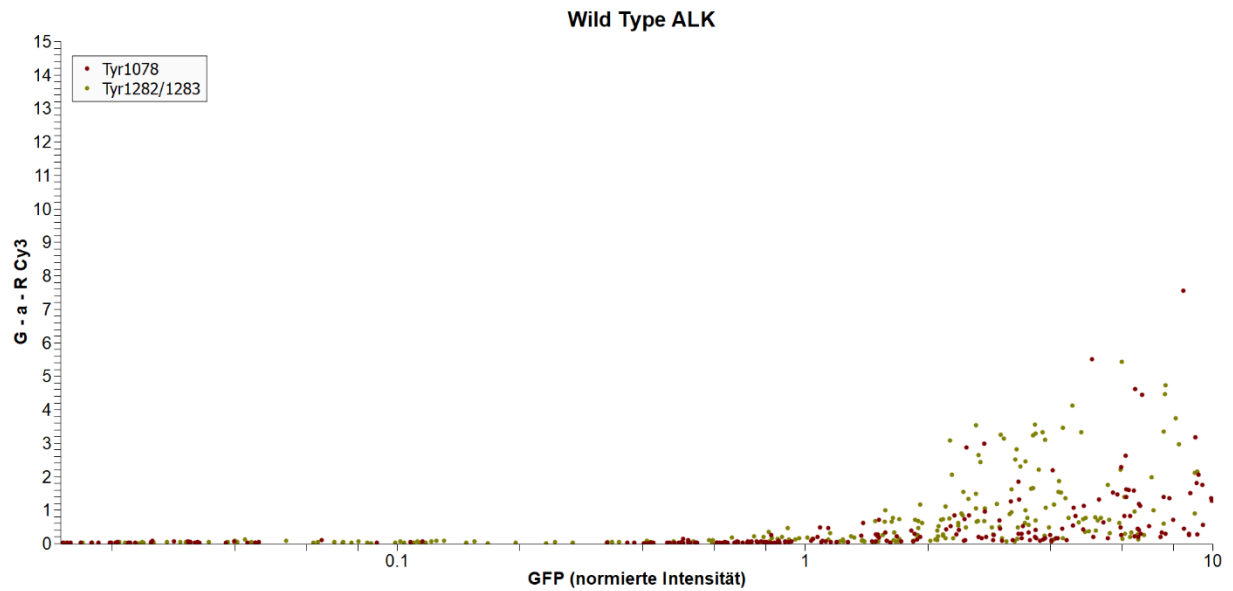
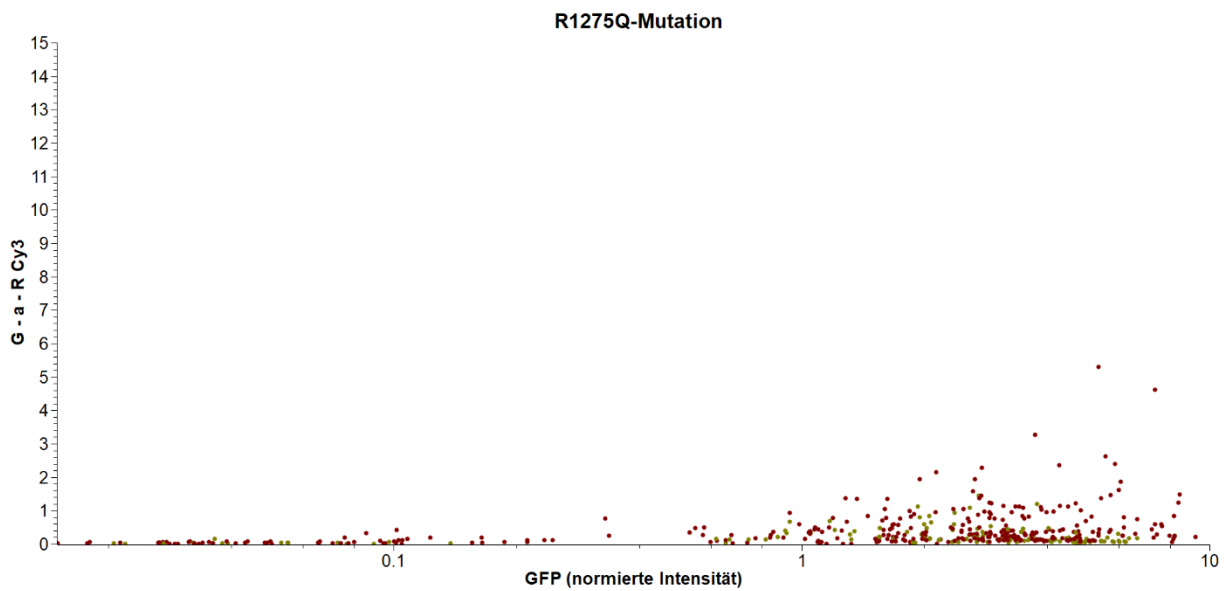
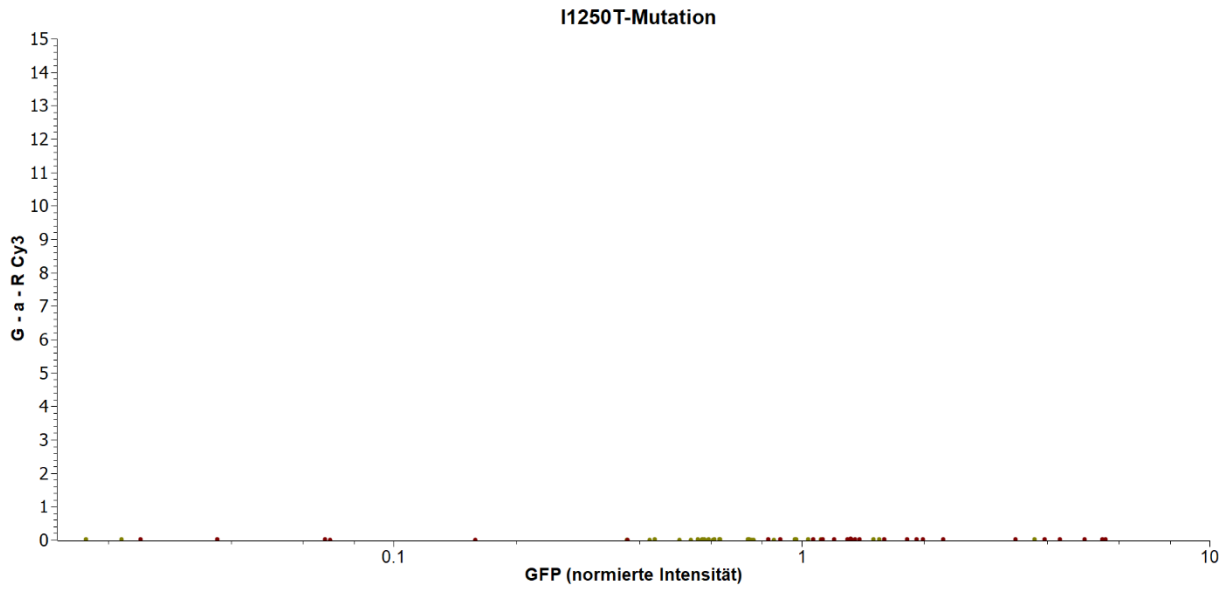


Abbildung 32: Expression der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors in der SK-N-AS-Neuroblastomzelllinie. Darstellung von repräsentativen Zellen. **A**, Darstellung der Kolo­kalisierung des grünen GFP-Signals und des roten Cy3-Signals in den Neuroblastomzellen. **B**, Übersicht über die Signalstärken des GFP-Signals und die Lokalisation der Y1604F-Mutation in den SK-N-AS-Zellen in Graustufen. **C**, Übersicht über die Signalstärken des Cy3-Signals und über das Phosphorylierungsniveau der ALK-Phospho-Epitope der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors in Graustufen.

Die Phosphorylierungsniveaus der Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283





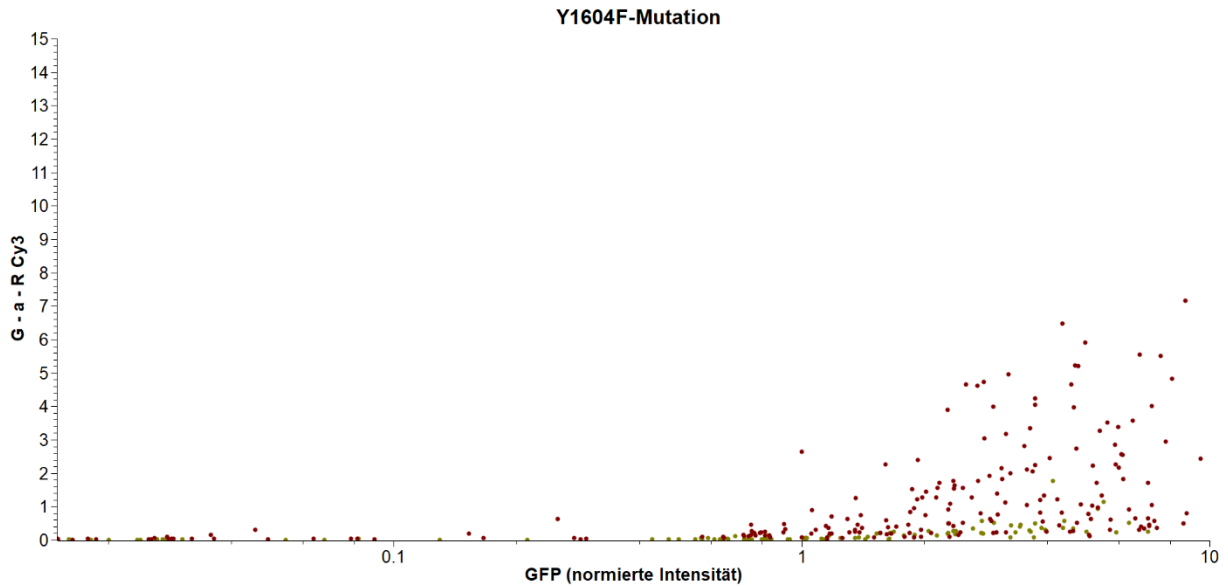


Abbildung 33: Analyse des Phosphorylierungsniveaus des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der I1250T-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation des ALK-Rezeptors. Das Phosphorylierungsniveau ist als Verhältnis zwischen dem Mittelwert des GFP-Signals (x-Achse) und dem Mittelwert des Cy3-Signals (y-Achse) dargestellt. Die Intensitäten beider Achsen sind in allen Graphen normiert. Jede Zelle ist durch einen Messpunkt symbolisiert.

Anordnung der Phosphorylierungsniveaus nach Mutationen

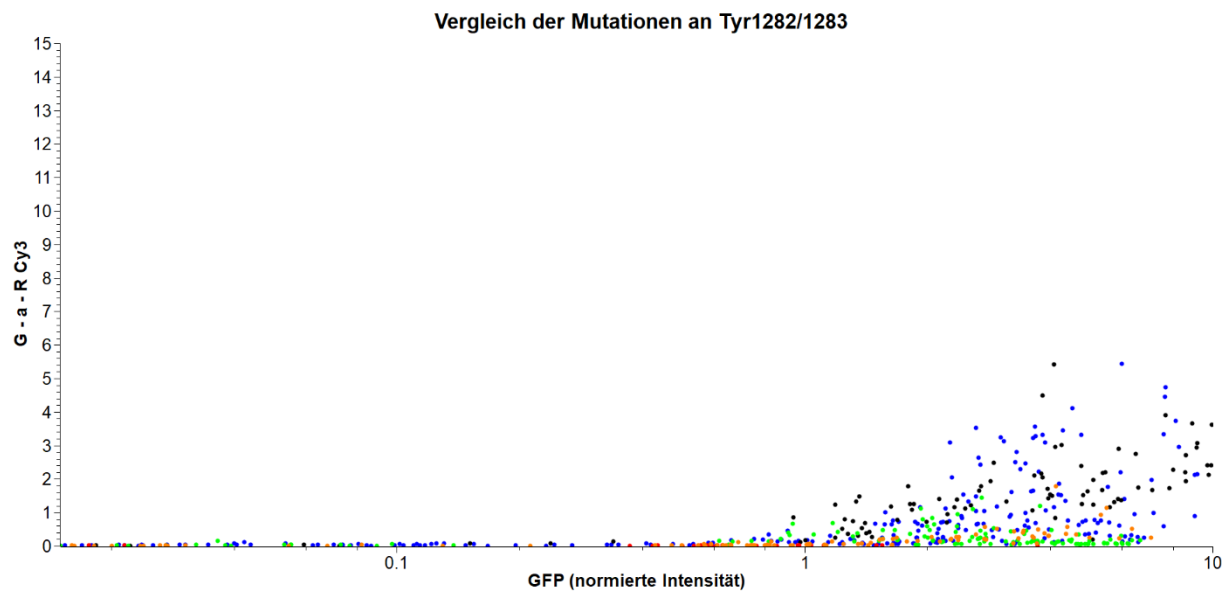
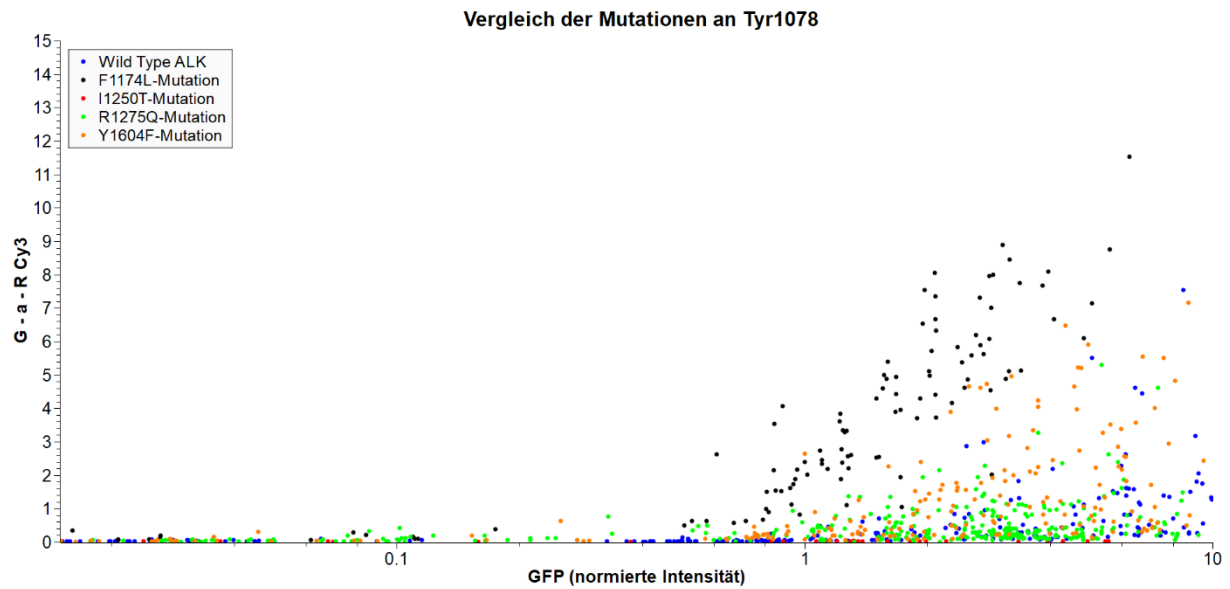


Abbildung 34: Analyse der Phosphorylierungsniveaus der ALK-Phospho-Epitope Tyr1078 und Tyr1282/1283 im Vergleich des Wild Type ALK-Rezeptors, der F1174L-, der I1250T-, der R1275Q- und der Y1604F-Mutation. Das Phosphorylierungsniveau ist als Verhältnis zwischen dem Mittelwert des GFP-Signals (x-Achse) und dem Mittelwert des Cy3-Signals (y-Achse) dargestellt. Die Intensitäten beider Achsen sind in allen Graphen normiert. Jede Zelle ist durch einen Messpunkt symbolisiert.

8. Literaturverzeichnis

- Aksak L: Der ALK-Rezeptor in zellulären Modellen des humanen Neuroblastomkreb-
ses: Aktivierung und Signalisierung. Med. Diss. Göttingen 2017
- Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleierma-
cher G, Speleman F, Spitz R, London WB et al. (2009): International consensus
for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neu-
roblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer* 100, 1471–1482
- Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, Lin Q, Fujio Y, Kunisada K, Leventaki V, Das P, Ras-
sidakis GZ, Cutler C et al. (2004): Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis
and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *On-
cogene* 23, 5426–5434
- Applebaum MA, Vaksman Z, Lee SM, Hungate EA, Henderson TO, London WB, Pinto
N, Volchenbom SL, Park JR, Naranjo A et al. (2017): Neuroblastoma survivors
are at increased risk for second malignancies: A report from the International
Neuroblastoma Risk Group Project. *Eur J Cancer* 72, 177–185
- Bai RY, Dieter P, Peschel C, Morris SW, Duyster J (1998): Nucleophosmin-anaplastic
lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active ty-
rosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity.
Mol Cell Biol 18, 6951–6961
- Bai RY, Ouyang T, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J (2000): Nucleophos-
min-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma
activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway.
Blood 96, 4319–4327
- Beckmann G, Bork P (1993): An adhesive domain detected in functionally diverse re-
ceptors. *Trends Biochem Sci* 18, 40–41
- Berry T, Luther W, Bhatnagar N, Jamin Y, Poon E, Sanda T, Pei D, Sharma B,
Vetharoy WR, Hallsworth A et al. (2012): The ALK(F1174L) mutation potentiates
the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell* 22, 117–130
- Berthold F, Boos J, Burdach S, Erttmann R, Henze G, Hermann J, Klingebiel T, Kre-
mens B, Schilling FH, Schrappe M et al. (2005): Myeloablative megatherapy with
autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consoli-
dation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised control-
led trial. *Lancet Oncol* 6, 649–658
- Bischof D, Pulford K, Mason DY, Morris SW (1997): Role of the nucleophosmin (NPM)
portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma
kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol Cell Biol* 17, 2312–2325
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001): Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355–365
- Bossi RT, Saccardo MB, Ardini E, Menichincheri M, Rusconi L, Magnaghi P, Orsini P,
Avanzi N, Borgia AL, Nesi M et al. (2010): Crystal structures of anaplastic lym-
phoma kinase in complex with ATP competitive inhibitors. *Biochemistry* 49,
6813–6825
- Bown N, Lastowska M, Cotterill S, O'Neill S, Ellershaw C, Roberts P, Lewis I, Pearson
AD (2001): 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. U.K.

- Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* 36, 14–19
- Bresler SC, Wood AC, Haglund EA, Courtright J, Belcastro LT, Plegaria JS, Cole K, Toporovskaya Y, Zhao H, Carpenter EL et al. (2011): Differential inhibitor sensitivity of anaplastic lymphoma kinase variants found in neuroblastoma. *Sci Transl Med* 3, 108ra114
- Bresler SC, Weiser DA, Huwe PJ, Park JH, Krytska K, Ryles H, Laudenslager M, Rappaport EF, Wood AC, McGrady PW et al. (2014): ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell* 26, 682–694
- Brisse HJ, McCarville MB, Granata C, Krug KB, Wootton-Gorges SL, Kanegawa K, Giammarile F, Schmidt M, Shulkin BL, Matthay KK et al. (2011): Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: consensus report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Radiology* 261, 243–257
- Brodeur GM, Fong CT (1989): Molecular biology and genetics of human neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 41, 153–174
- Brodeur GM, Nakagawara A (1992): Molecular basis of clinical heterogeneity in neuroblastoma. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 14, 111–116
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984): Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224, 1121–1124
- Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D'Angio G, Bernardi B de, Evans AE, Favrot M, Freeman AI (1988): International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 6, 1874–1881
- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, Bernardi B de, Evans AE, Favrot M, Hedborg F (1993): Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11, 1466–1477
- Brodeur GM, Hogarty MD, Mosse YP, Maris JM: Neuroblastoma; In: Principles and practice of pediatric oncology; hrsg. v. Pizzo PA, Poplack DG, 6. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia 2011, 886–922
- Brouwer S de, Preter K de, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebeeck J, van Maerken T et al. (2010): Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res* 16, 4353–4362
- Burchill SA, Beiske K, Shimada H, Ambros PF, Seeger R, Tytgat GAM, Brock PR, Haber M, Park JR, Berthold F (2016): Recommendations for the standardization of bone marrow disease assessment and reporting in children with neuroblastoma; on behalf of the International Neuroblastoma Response Criteria Bone Marrow Working Group. *Cancer* 123, 1095–1105
- Canete A, Gerrard M, Rubie H, Castel V, Di Cataldo A, Munzer C, Ladenstein R, Brichard B, Bermudez JD, Couturier J et al. (2009): Poor survival for infants with MYCN-amplified metastatic neuroblastoma despite intensified treatment: the International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Experience. *J Clin Oncol* 27, 1014–1019

- Caren H, Abel F, Kogner P, Martinsson T (2008): High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem J* 416, 153–159
- Cazes A, Louis-Brennetot C, Mazot P, Dingli F, Lombard B, Boeva V, Daveau R, Cappo J, Combaret V, Schleiermacher G et al. (2013): Characterization of rearrangements involving the ALK gene reveals a novel truncated form associated with tumor aggressiveness in neuroblastoma. *Cancer Res* 73, 195–204
- Cecchetto G, Mosseri V, Bernardi B de, Helardot P, Monclair T, Costa E, Horcher E, Neuenschwander S, Toma P, Rizzo A et al. (2005): Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma: the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group. *J Clin Oncol* 23, 8483–8489
- Chand D, Yamazaki Y, Ruuth K, Schonherr C, Martinsson T, Kogner P, Attiyeh EF, Maris J, Morozova O, Marra MA et al. (2013): Cell culture and Drosophila model systems define three classes of anaplastic lymphoma kinase mutations in neuroblastoma. *Dis Model Mech* 6, 373–382
- Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T et al. (2008): Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455, 971–974
- Chen K, Lv F, Xu G, Zhang M, Wu Y, Wu Z (2016): Phosphoproteomics reveals ALK promote cell progress via RAS/JNK pathway in neuroblastoma. *Oncotarget* 7, 75968–75980
- Chow EJ, Friedman DL, Mueller BA (2007): Maternal and perinatal characteristics in relation to neuroblastoma. *Cancer* 109, 983–992
- Christensen JG, Zou HY, Arango ME, Li Q, Lee JH, McDonnell SR, Yamazaki S, Alton GR, Mroczkowski B, Los G (2007): Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* 6, 3314–3322
- Cohn SL, London WB, Huang D, Katzenstein HM, Salwen HR, Reinhart T, Madafiglio J, Marshall GM, Norris MD, Haber M (2000): MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified MYCN. *J Clin Oncol* 18, 3604–3613
- Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D et al. (2009): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27, 289–297
- Cordell JL, Pulford KA, Bigerna B, Roncador G, Banham A, Colombo E, Pelicci PG, Mason DY, Falini B (1999): Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells. *Blood* 93, 632–642
- Corvi R, Amler LC, Savelyeva L, Gehring M, Schwab M (1994): MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5523–5527
- Di Cataldo A, Agodi A, Balaguer J, Garaventa A, Barchitta M, Segura V, Bianchi M, Castel V, Castellano A, Cesaro S et al. (2017): Metastatic neuroblastoma in infants: are survival rates excellent only within the stringent framework of clinical trials? *Clin Transl Oncol* 19, 76–83

- Di Paolo D, Yang D, Pastorino F, Emionite L, Cilli M, Daga A, Destafanis E, Di Fiore A, Piaggio F, Brignole C et al. (2015): New therapeutic strategies in neuroblastoma: combined targeting of a novel tyrosine kinase inhibitor and liposomal siRNAs against ALK. *Oncotarget* 6, 28774–28789
- Dickens M, Tavaré JM (1992): Analysis of the order of autophosphorylation of human insulin receptor tyrosines 1158, 1162 and 1163. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 244–250
- Donella-Deana A, Marin O, Cesaro L, Gunby RH, Ferrarese A, Coluccia AML, Tartari CJ, Mologni L, Scapozza L, Gambacorti-Passerini C et al. (2005): Unique substrate specificity of anaplastic lymphoma kinase (ALK): development of phospho-acceptor peptides for the assay of ALK activity. *Biochemistry* 44, 8533–8542
- Du L, Liu L, Zhang C, Cai W, Wu Y, Wang J, Lv F (2014): Role of surgery in the treatment of patients with high-risk neuroblastoma who have a poor response to induction chemotherapy. *J Pediatr Surg* 49, 528–533
- DuBois SG, Kalika Y, Lukens JN, Brodeur GM, Seeger RC, Atkinson JB, Haase GM, Black CT, Perez C, Shimada H et al. (1999): Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *J Pediatr Hematol Oncol* 21, 181–189
- Dubois SG, London WB, Zhang Y, Matthay KK, Monclair T, Ambros PF, Cohn SL, Pearson A, Diller L (2008): Lung metastases in neuroblastoma at initial diagnosis: A report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) project. *Pediatr Blood Cancer* 51, 589–592
- Duijkers FAM, Gaal J, Meijerink JPP, Admiraal P, Pieters R, Krijger RR de, van Noesel MM (2011): Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor response in neuroblastoma is highly correlated with ALK mutation status, ALK mRNA and protein levels. *Cell Oncol (Dordr)* 34, 409–417
- EI-Badry OM, Romanus JA, Helman LJ, Cooper MJ, Rechler MM, Israel MA (1989): Autonomous growth of a human neuroblastoma cell line is mediated by insulin-like growth factor II. *J Clin Invest* 84, 829–839
- Fong CT, Dracopoli NC, White PS, Merrill PT, Griffith RC, Housman DE, Brodeur GM (1989): Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3753–3757
- Förster T (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* 437, 55–75
- Franklin IM, Pritchard J (1983): Detection of bone marrow invasion by neuroblastoma is improved by sampling at two sites with both aspirates and trephine biopsies. *J Clin Pathol* 36, 1215–1218
- Fransson S, Hansson M, Ruuth K, Djos A, Berbegall A, Javanmardi N, Abrahamsson J, Palmer RH, Noguera R, Hallberg B et al. (2015): Intragenic anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangements: translocations as a novel mechanism of ALK activation in neuroblastoma tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 54, 99–109
- Friedman DL, Kadan-Lottick NS, Whitton J, Mertens AC, Yasui Y, Liu Y, Meadows AT, Robison LL, Strong LC (2005): Increased risk of cancer among siblings of long-

- term childhood cancer survivors: a report from the childhood cancer survivor study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1922–1927
- Fuchs SY, Dolan L, Davis RJ, Ronai Z (1996): Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* 13, 1531–1535
- Fujimoto J, Shiota M, Iwahara T, Seki N, Satoh H, Mori S, Yamamoto T (1996): Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4181–4186
- Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Kolla V, Kim J, Zhao H, Pawel BR, London WB et al. (2008): CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 100, 940–949
- Ganick DJ, Silverman JF, Holbrook CT, Dabbs DJ, Kodroff MB (1988): Clinical utility of fine needle aspiration in the diagnosis and management of neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 16, 101–106
- George RE, Sanda T, Hanna M, Frohling S, Luther W2, Zhang J, Ahn Y, Zhou W, London WB, McGrady P et al. (2008): Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 455, 975–978
- Godfried MB, Veenstra M, v Sluis P, Boon K, v Asperen R, Hermus MC, v Schaik BDC, Voute TPA, Schwab M, Versteeg R et al. (2002): The N-myc and c-myc downstream pathways include the chromosome 17q genes nm23-H1 and nm23-H2. *Oncogene* 21, 2097–2101
- Gu T-L, Tothova Z, Scheijen B, Griffin JD, Gilliland DG, Sternberg DW (2004): NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood* 103, 4622–4629
- Guan J, Umapathy G, Yamazaki Y, Wolfstetter G, Mendoza P, Pfeifer K, Mohammed A, Hugosson F, Zhang H, Hsu AW et al. (2015): FAM150A and FAM150B are activating ligands for anaplastic lymphoma kinase. *Elife* 4, e09811
- Hallberg B, Palmer RH (2016): The role of the ALK receptor in cancer biology. *Ann Oncol* 27, iii4-iii15
- Hamedani FS, Cinar M, Mo Z, Cervania MA, Amin HM, Alkan S (2014): Crizotinib (PF-2341066) induces apoptosis due to downregulation of pSTAT3 and BCL-2 family proteins in NPM-ALK(+) anaplastic large cell lymphoma. *Leuk Res* 38, 503–508
- Hann HW, Evans AE, Cohen IJ, Leitmeyer JE (1981): Biologic differences between neuroblastoma stages IV-S and IV. Measurement of serum ferritin and E-rosette inhibition in 30 children. *N Engl J Med* 305, 425–429
- Hann HW, Evans AE, Siegel SE, Wong KY, Sather H, Dalton A, Hammond D, Seeger RC (1985): Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. *Cancer Res* 45, 2843–2848
- Hasan MK, Nafady A, Takatori A, Kishida S, Ohira M, Suenaga Y, Hossain S, Akter J, Ogura A, Nakamura Y et al. (2013): ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Sci Rep* 3, Article number: 3450
- Holla VR, Elamin YY, Bailey AM, Johnson AM, Litzemberger BC, Khotaskaya YB, Sanchez NS, Zeng J, Shufean MA, Shaw KR et al. (2017): ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 3, a001115

- Hu L-L, Zhen H, Zhang X-N, Zhou L, Amin HM, Shi P (2016): Effect of Tyrosine Phosphorylation Sites of Oncogenic Protein NPM-ALK on Cell Cycle and Its Related Mechanisms. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 24, 1201–1205
- Infarinato NR, Park JH, Krytska K, Ryles HT, Sano R, Szigety KM, Li Y, Zou HY, Lee NV, Smeal T et al. (2016): The ALK/ROS1 Inhibitor PF-06463922 Overcomes Primary Resistance to Crizotinib in ALK-Driven Neuroblastoma. *Cancer Discov* 6, 96–107
- Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, Mori S, Ratzkin B, Yamamoto T (1997): Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 14, 439–449
- Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, Pontual L de, Combaret V, Raynal V, Puisieux A, Schleiermacher G, Pierron G et al. (2008): Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455, 967–970
- Kaatsch P, Spix C (2015): German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2015 (1980 - 2014). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz
- Knudson AG, JR, Strong LC (1972): Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am J Hum Genet* 24, 514–532
- Krstulovic AM, Zakaria M, Lohse K, Bertani-Dziedzic L (1979): Diagnosis of neural crest tumors by reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of urinary catecholamine metabolites. *J Chromatogr* 186, 733–748
- Lee CC, Jia Y, Li N, Sun X, Ng K, Ambing E, Gao M-Y, Hua S, Chen C, Kim S et al. (2010): Crystal structure of the ALK (anaplastic lymphoma kinase) catalytic domain. *Biochem J* 430, 425–437
- Lee JW, Park SH, Kang HJ, Park KD, Shin HY, Ahn HS (2017): ALK Protein Expression is Related to Neuroblastoma Aggressiveness, But is Not Independent Prognostic Factor. *Cancer Res Treat* 50, 495–505
- Leitlinie Neuroblastom (2011): AWMF Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie - Neuroblastom. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-008l_S1_Neuroblastom_2011-abgelaufen.pdf
- Levine BA, Clack B, Ellis L (1991): A soluble insulin receptor kinase catalyzes ordered phosphorylation at multiple tyrosines of dodecapeptide substrates. *J Biol Chem* 266, 3565–3570
- Li R, Polishchuk A, DuBois S, Hawkins R, Lee SW, Bagatell R, Shusterman S, Hill-Kayser C, Al-Sayegh H, Diller L et al. (2017): Patterns of Relapse in High-Risk Neuroblastoma Patients Treated With and Without Total Body Irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 97, 270–277
- Lilliefors HW (1967): On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown. *J Am Stat Assoc* 62, 399
- Loren CE, Scully A, Grabbe C, Edeen PT, Thomas J, McKeown M, Hunter T, Palmer RH (2001): Identification and characterization of DAlk: a novel *Drosophila melanogaster* RTK which drives ERK activation in vivo. *Genes Cells* 6, 531–544

- Lu J, Guan S, Zhao Y, Yu Y, Woodfield SE, Zhang H, Yang KL, Bieberkezhazi S, Qi L, Li X et al. (2017): The second-generation ALK inhibitor alectinib effectively induces apoptosis in human neuroblastoma cells and inhibits tumor growth in a TH-MYCN transgenic neuroblastoma mouse model. *Cancer Lett* 400, 61–68
- Maris JM, Weiss MJ, Mosse Y, Hii G, Guo C, White PS, Hogarty MD, Mirensky T, Brodeur GM, Rebbeck TR et al. (2002): Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Res* 62, 6651–6658
- Marzec M, Kasprzycka M, Liu X, El-Salem M, Halasa K, Raghunath PN, Bucki R, Wlodarski P, Wasik MA (2007): Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the rapamycin-sensitive mTOR signaling pathway. *Oncogene* 26, 5606–5614
- Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM et al. (1999): Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 341, 1165–1173
- Matthay KK, Edeline V, Lumbroso J, Tanguy ML, Asselain B, Zucker JM, Valteau-Couanet D, Hartmann O, Michon J (2003): Correlation of early metastatic response by 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy with overall response and event-free survival in stage IV neuroblastoma. *J Clin Oncol* 21, 2486–2491
- Mazloom A, Louis CU, Nuchtern J, Kim E, Russell H, Allen-Rhoades W, Krance R, Paulino AC (2014): Radiation therapy to the primary and postinduction chemotherapy MIBG-avid sites in high-risk neuroblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 90, 858–862
- Mazot P, Cazes A, Bouterin MC, Figueiredo A, Raynal V, Combaret V, Hallberg B, Palmer RH, Delattre O, Janoueix-Lerosey I et al. (2011): The constitutive activity of the ALK mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking. *Oncogene* 30, 2017–2025
- McDuff FKE, Lim S-V, Dalbay M, Turner SD (2013): Assessment of the transforming potential of novel anaplastic lymphoma kinase point mutants. *Mol Carcinog* 52, 79–83
- Menegaux F, Olshan AF, Neglia JP, Pollock BH, Bondy ML (2004): Day care, childhood infections, and risk of neuroblastoma. *Am J Epidemiol* 159, 843–851
- Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG et al. (2009): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27, 298–303
- Monclair T, Mosseri V, Cecchetto G, Bernardi B de, Michon J, Holmes K (2015): Influence of image-defined risk factors on the outcome of patients with localised neuroblastoma. A report from the LNESG1 study of the European International Society of Paediatric Oncology Neuroblastoma Group. *Pediatr Blood Cancer* 62, 1536–1542
- Montavon G, Jauquier N, Coulon A, Peuchmaur M, Flahaut M, Bourlout KB, Yan P, Delattre O, Sommer L, Joseph J-M et al. (2014): Wild-type ALK and activating ALK-R1275Q and ALK-F1174L mutations upregulate Myc and initiate tumor formation in murine neural crest progenitor cells. *Oncotarget* 5, 4452–4466

- Moog-Lutz C, Degoutin J, Gouzi JY, Frobert Y, Brunet-de Carvalho N, Bureau J, Creminon C, Vigny M (2005): Activation and inhibition of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase by monoclonal antibodies and absence of agonist activity of pleiotrophin. *J Biol Chem* 280, 26039–26048
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT (1994): Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263, 1281–1284
- Morris SW, Naeve C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, Cui X, Witte DP (1997): ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* 14, 2175–2188
- Mosse YP, Diskin SJ, Wasserman N, Rinaldi K, Attiyeh EF, Cole K, Jagannathan J, Bhambhani K, Winter C, Maris JM (2007): Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* 46, 936–949
- Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, Laquaglia MJ, Sennett R, Lynch JE, Perri P et al. (2008): Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455, 930–935
- Murray PB, Lax I, Reshetnyak A, Ligon GF, Lillquist JS, Natoli EJ, JR, Shi X, Folta-Stogniew E, Gunel M, Alvarado D et al. (2015): Heparin is an activating ligand of the orphan receptor tyrosine kinase ALK. *Sci Signal* 8, ra6
- Nakagawara A, Ikeda K, Tasaka H (1988): Dopaminergic neuroblastoma as a poor prognostic subgroup. *J Pediatr Surg* 23, 346–349
- Nakagawara A, Arima M, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM (1992): Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res* 52, 1364–1368
- 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 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas. *Oncogene* 27, 803–810
- Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R (2005): Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol* 167, 213–222
- Passoni L, Longo L, Collini P, Coluccia AML, Bozzi F, Podda M, Gregorio A, Gambini C, Garaventa A, Pistoia V et al. (2009): Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer Res* 69, 7338–7346
- Paulino AC, Mayr NA, Simon JH, Buatti JM (2002): Locoregional control in infants with neuroblastoma: role of radiation therapy and late toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52, 1025–1031
- Perez CA, Matthay KK, Atkinson JB, Seeger RC, Shimada H, Haase GM, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN (2000): Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study. *J Clin Oncol* 18, 18–26

- Pohl A, Erichsen M, Stehr M, Hubertus J, Bergmann F, Kammer B, Schweinitz D von (2016): Image-defined Risk Factors korrelieren mit chirurgischer Radikalität und Lokalrezidiven bei Neuroblastom-Patienten. *Klin Padiatr* 228, 118–123
- Pritchard J, Cotterill SJ, Germond SM, Imeson J, Kraker J de, Jones DR (2005): High dose melphalan in the treatment of advanced neuroblastoma: results of a randomised trial (ENSG-1) by the European Neuroblastoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 44, 348–357
- Pulford K, Lamant L, Morris SW, Butler LH, Wood KM, Stroud D, Delsol G, Mason DY (1997): Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* 89, 1394–1404
- Quinn JJ, Altman AJ, Frantz CN (1980): Serum lactic dehydrogenase, an indicator of tumor activity in neuroblastoma. *J Pediatr* 97, 89–91
- Regairaz M, Munier F, Sartelet H, Castaing M, Marty V, Renauleaud C, Doux C, Delbé J, Courty J, Fabre M et al. (2016): Mutation-Independent Activation of the Anaplastic Lymphoma Kinase in Neuroblastoma. *Am J Pathol* 186, 435–445
- Reiter JL, Brodeur GM (1996): High-resolution mapping of a 130-kb core region of the MYCN amplicon in neuroblastomas. *Genomics* 32, 97–103
- Reshetnyak AV, Murray PB, Shi X, Mo ES, Mohanty J, Tome F, Bai H, Gunel M, Lax I, Schlessinger J (2015): Augmentor alpha and beta (FAM150) are ligands of the receptor tyrosine kinases ALK and LTK: Hierarchy and specificity of ligand-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 15862–15867
- Roos AJ de, Olshan AF, Teschke K, Poole C, Savitz DA, Blatt J, Bondy ML, Pollock BH (2001a): Parental occupational exposures to chemicals and incidence of neuroblastoma in offspring. *Am J Epidemiol* 154, 106–114
- Roos AJ de, Teschke K, Savitz DA, Poole C, Grufferman S, Pollock BH, Olshan AF (2001b): Parental occupational exposures to electromagnetic fields and radiation and the incidence of neuroblastoma in offspring. *Epidemiology* 12, 508–517
- Rubie H, Bernardi B de, Gerrard M, Canete A, Ladenstein R, Couturier J, Ambros P, Munzer C, Pearson ADJ, Garaventa A et al. (2011): Excellent outcome with reduced treatment in infants with nonmetastatic and unresectable neuroblastoma without MYCN amplification: results of the prospective INES 99.1. *J Clin Oncol* 29, 449–455
- Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami TA, Oikawa N, Tsukuda T, Ishii N, Aoki Y (2011): CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell* 19, 679–690
- Sasaki T, Okuda K, Zheng W, Butrynski J, Capelletti M, Wang L, Gray NS, Wilner K, Christensen JG, Demetri G et al. (2010): The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer Res* 70, 10038–10043
- Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, Klein G, Sander J, Schwarz K, Treuner J et al. (2002): Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 346, 1047–1053
- Schönherr C, Ruuth K, Eriksson T, Yamazaki Y, Ottmann C, Combaret V, Vigny M, Kamaraj S, Palmer RH, Hallberg B (2011): The neuroblastoma ALK(I1250T) mutation is a kinase-dead RTK in vitro and in vivo. *Transl Oncol* 4, 258–265

- Schulte JH, Bachmann HS, Brockmeyer B, Depreter K, Oberthur A, Ackermann S, Kahlert Y, Pajtler K, Theissen J, Westermann F et al. (2011): High ALK receptor tyrosine kinase expression supersedes ALK mutation as a determining factor of an unfavorable phenotype in primary neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 17, 5082–5092
- Schweinitz D von: Neuroblastom und andere Nebennierentumoren; In: Kinderchirurgie: Viszerale und allgemeine Chirurgie des Kindesalters; hrsg. v. Schweinitz Dv, 2. Auflage, Ure B: Springer, Berlin, Heidelberg 2013, 625–649
- Schweinitz D von, Hero B, Berthold F (2002): The impact of surgical radicality on outcome in childhood neuroblastoma. *Eur J Pediatr Surg* 12, 402–409
- Shi B, Vishwamitra D, Granda JG, Whitton T, Shi P, Amin HM (2013): Molecular and functional characterizations of the association and interactions between nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase and type I insulin-like growth factor receptor. *Neoplasia* 15, 669–683
- Shiota M, Fujimoto J, Semba T, Satoh H, Yamamoto T, Mori S (1994): Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene* 9, 1567–1574
- Shulkin BL, Shapiro B (1998): Current concepts on the diagnostic use of MIBG in children. *J Nucl Med* 39, 679–688
- Simon T, Hero B, Bongartz R, Schmidt M, Muller RP, Berthold F (2006): Intensified external-beam radiation therapy improves the outcome of stage 4 neuroblastoma in children 1 year with residual local disease. *Strahlenther Onkol* 182, 389–394
- Stryer L (1978): Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* 47, 819–846
- Tartari CJ, Gunby RH, Coluccia AML, Sottocornola R, Cimbro B, Scapozza L, Donella-Deana A, Pinna LA, Gambacorti-Passerini C (2008): Characterization of some molecular mechanisms governing autoactivation of the catalytic domain of the anaplastic lymphoma kinase. *J Biol Chem* 283, 3743–3750
- Tsubono Y, Hisamichi S (2004): A halt to neuroblastoma screening in Japan. *N Engl J Med* 350, 2010–2011
- Ueda T, Nakata Y, Yamasaki N, Oda H, Sentani K, Kanai A, Onishi N, Ikeda K, Sera Y, Honda Z-I et al. (2016): ALK(R1275Q) perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. *Oncogene* 35, 4447–4458
- van Roy N, Laureys G, van Gele M, Opdenakker G, Miura R, van der Drift P, Chan A, Versteeg R, Speleman F (1997): Analysis of 1;17 translocation breakpoints in neuroblastoma: implications for mapping of neuroblastoma genes. *Eur J Cancer* 33, 1974–1978
- Varan A, Kesik V, Senocak ME, Kale G, Akyuz C, Buyukpamukcu M (2015): The efficacy of delayed surgery in children with high-risk neuroblastoma. *J Cancer Res Ther* 11, 268–271
- Vega F, Medeiros LJ, Leventaki V, Atwell C, Cho-Vega JH, Tian L, Claret F-X, Rasidakis GZ (2006): Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res* 66, 6589–6597

- Verly IRN, van Kuilenburg ABP, Abeling NGGM, Goorden SMI, Fiocco M, Vaz FM, van Noesel MM, Zwaan CM, Kaspers GL, Merks JHM et al. (2017): Catecholamines profiles at diagnosis: Increased diagnostic sensitivity and correlation with biological and clinical features in neuroblastoma patients. *Eur J Cancer* 72, 235–243
- Voute PA, Hoefnagel CA, Marcuse HR, Kraker J de (1985): Detection of neuroblastoma with ¹³¹I-meta-iodobenzylguanidine. *Prog Clin Biol Res* 175, 389–398
- Wang M, Zhou C, Sun Q, Cai R, Li Y, Wang D, Gong L (2013): ALK amplification and protein expression predict inferior prognosis in neuroblastomas. *Exp Mol Pathol* 95, 124–130
- Wang P, Wu F, Ma Y, Li L, Lai R, Young LC (2010): Functional characterization of the kinase activation loop in nucleophosmin (NPM)-anaplastic lymphoma kinase (ALK) using tandem affinity purification and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Biol Chem* 285, 95–103
- White PS, Thompson PM, Gotoh T, Okawa ER, Igarashi J, Kok M, Winter C, Gregory SG, Hogarty MD, Maris JM et al. (2005): Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* 24, 2684–2694
- Woods WG, Gao R-N, Shuster JJ, Robison LL, Bernstein M, Weitzman S, Bunin G, Levy I, Brossard J, Dougherty G et al. (2002): Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* 346, 1041–1046
- Zamo A, Chiarle R, Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosi M, Levy DE, Inghirami G (2002): Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* 21, 1038–1047

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Wouters-Bunt für die gute wissenschaftliche Betreuung und den Einblick in den Arbeitsalltag seiner Forschungsgruppe.

Ein weiterer großer Dank geht an Frau Dr. G. Bunt für die geduldige Beantwortung fachlicher und methodischer Fragen. Frau Mirja Fülle und Frau Ute Eilers danke ich für die praktische und organisatorische Unterstützung im Rahmen des Laboralltags.

Meinem Mitdoktoranden Basel Kharbot gebührt Dank für die gegenseitige Unterstützung und Motivation sowie seine Diskussionsbereitschaft während der vielen Stunden im Labor und am Telefon.