

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

**Der ALK-Rezeptor in zellulären Modellen des humanen
Neuroblastomkrebses: Aktivierung und Signalisierung**

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

vorgelegt von

Laura Jacqueline Aksak

aus

Bamberg

Göttingen 2017

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

Referent: Prof. Dr. Freddy Wouters-Bunt

Ko-Referent: Prof. Dr. Dieter Kube

Drittreferentin: Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 31.01.18

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Der ALK-Rezeptor im Neuroblastom.....	1
1.1.1	Das Neuroblastom	1
1.1.1.1	Neuroblastomentstehung: Sporadisch vs. familiär	2
1.1.1.2	Hypothesen zur Pathogenese	2
1.1.1.2.1	Anaplastische Lymphomkinase	2
1.1.1.2.2	Chromosomenaberrationen.....	3
1.1.1.2.2.1	Numerisch	3
1.1.1.2.2.2	Strukturell	3
1.1.1.2.3	Genmutationen	3
1.1.1.2.3.1	Gene für Transkriptionsfaktoren	3
1.1.1.2.3.1.1	MYCN	3
1.1.1.2.3.1.2	PHOX2B.....	4
1.1.1.2.3.2	Weitere Gene	4
1.2	ALK: Überblick.....	4
1.2.1	Vorkommen der ALK.....	4
1.2.2	ALK – eine Rezeptortyrosinkinase.....	5
1.2.3	Theorien zur ALK-Aktivierung.....	6
1.2.3.1	ALK-Aktivierung durch Genmutation	6
1.2.3.1.1	Punktmutationen in der Kinasedomäne	6
1.2.3.1.1.1	Bekannte Punktmutationen.....	6
1.2.3.1.2	ALK-Amplifikation.....	7
1.2.3.1.3	Intragenes Rearrangement	7
1.2.3.2	Sonstige Theorien.....	7
1.2.3.2.1	ALK-Liganden	8
1.2.3.2.1.1	ALK-Liganden in Drosophila melanogaster.....	8
1.2.3.2.1.2	Liganden der Säugetier-ALK	8
1.2.3.2.2	Phosphatasen als ALK-Gegenspieler	8
1.2.3.2.3	NLRR1 als negativer ALK-Regulator	9
1.2.3.2.4	Flotillin-1 als negativer ALK-Regulator	9
1.2.4	ALK-Signalisierung: Mutmaßliche Signalwege.....	9
1.2.5	ALK als therapeutisches Target.....	9
1.2.5.1	Der ALK-Inhibitor Crizotinib	10
1.2.5.2	Weitere ALK-Inhibitoren in (prä)klinischen Studien	10
1.2.5.3	ALK-Inhibitoren in vitro	11
1.3	Erkenntnisgewinn dieser Arbeit.....	12
1.3.1	Aktivierung.....	12
1.3.1.1	Expressionslevel und ALK-Aktivierung	12
1.3.1.1.1	Wildtyp-ALK	13
1.3.1.1.2	F1174L	13
1.3.1.1.3	R1275Q	13
1.3.1.1.4	Y1604F.....	13
1.3.1.1.5	I1250T	14
1.3.1.2	ALK-Autophosphorylierung	14
1.3.2	Zytomorphologie	14
1.3.3	Signalisierung	14
1.3.3.1	ERK1/2-Inhibition.....	14
1.3.4	Die Umsetzung.....	15
1.3.4.1	Wahl von Materialien und Methoden.....	15
1.3.4.1.1	Zelllinien	15
1.3.4.1.2	Plasmide	15
1.3.4.1.3	Fluoreszenzfarbstoffe	15
1.3.4.1.4	Transfektion.....	15
1.3.4.1.4.1	Transiente Transfektion.....	15
1.3.4.1.4.2	Lipofektion als Transfektionsmethode	16

1.3.4.1.5	Mikroskopie.....	16
1.3.4.1.5.1	Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie.....	16
1.3.4.1.5.2	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	17
1.3.4.1.5.2.1	Aufnahmen zur Beurteilung von Zytomorphologie und Fluoreszenzverteilung.....	17
1.3.4.1.5.2.2	Acceptorphotobleaching-Aufnahmen zur FRET-Messung.....	17
1.3.4.1.5.2.2.1	FRET-Theorie.....	18
1.3.4.1.5.2.2.2	Acceptorphotobleaching.....	18
1.3.4.1.6	Pathscan: Sandwich-Immunoassay.....	19
1.3.4.1.6.1	FACS: Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie).....	19
1.3.4.1.7	ERK-Inhibitor: FR180204.....	20
2	MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1	Material	21
2.1.1	Puffer und Lösungen	21
2.1.1.1	Lösungen für die Zellkultur.....	21
2.1.1.2	Fixierlösung.....	21
2.1.1.3	Chemikalien für die Transfektion.....	21
2.1.1.4	Puffer und Lösungen für die Immunofluoreszenzfärbung.....	21
2.1.2	Zellen.....	22
2.1.2.1	Humane Neuroblastomzellen: SK-N-AS.....	22
2.1.2.2	Murine embryonale Fibroblastenzellen: NIH/3T3.....	22
2.1.3	Kulturmedien.....	22
2.1.4	Zellinhibitoren	22
2.1.5	Antikörper und Farbstoffe	23
2.1.6	Spezielle Reagenzien und Kits	23
2.1.7	Zubehör	23
2.1.8	Spezielle Geräte und zugehörige Computersoftware.....	24
2.1.9	Weitere Computersoftware und Internetadressen.....	24
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Zellkultur	25
2.2.1.1	Auftauen der Zellen.....	25
2.2.1.2	Kultivieren der Zellen.....	25
2.2.1.2.1	NIH/3T3-Zelllinie.....	25
2.2.1.2.2	SK-N-AS-Zelllinie	25
2.2.2	Herstellung von Mikroskopie-Präparaten.....	25
2.2.2.1	Aussäen in 12-Well-Platten.....	26
2.2.2.1.1	PLL-Coating.....	26
2.2.2.2	Transfektion.....	26
2.2.2.3	Fixierung	26
2.2.2.4	Immunofluoreszenzfärbung.....	26
2.2.3	Mikroskopie.....	27
2.2.3.1	Weitfeldmikroskopie	27
2.2.3.2	Konfokale Mikroskopie.....	27
2.2.3.2.1	Z-Stacks.....	28
2.2.3.2.2	Acceptorphotobleaching.....	28
2.2.4	Auswertung der Aufnahmen.....	28
2.2.4.1	Auswertung der Weitfeldmikroskop-Aufnahmen.....	28
2.2.4.1.1	Auswertung der Zytomorphologie.....	28
2.2.4.1.2	Auswertung der Fluoreszenzintensitäten.....	29
2.2.4.1.2.1	Darstellung in Igor pro	29
2.2.4.2	Auswertung der konfokalen Aufnahmen.....	30
2.2.4.2.1	Darstellung der konfokalen Aufnahmen.....	30
2.2.4.2.2	Bestimmung der FRET-Effizienzen	30
2.2.5	Pathscan.....	32
2.2.5.1	Pathscan mit unsortierten Lysaten(ohne FACS).....	32
2.2.5.1.1	Herstellung der Lysate.....	32
2.2.5.1.2	Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	32
2.2.5.1.2.1	DAPI-Färbung	32
2.2.5.1.2.2	Bildgebung und Errechnung der Transfektionseffizienz	32

2.2.5.1.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	34
2.2.5.1.4	Präparation des Pathscan-Arrays	35
2.2.5.1.5	Fluorescent Readout	35
2.2.5.2	Pathscan mit sortierten Lysaten	37
2.2.5.2.1	Sortierung mittels FACS (Fluorescent activated cell sorting)	37
2.2.5.2.2	Durchführung des Pathscan	39
2.2.6	Behandlung der Zellen mit ERK1/2-Inhibitor	40
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Fluoreszenzverteilung bei Wildtyp-ALK und den ALK-Mutanten F1174L, R1275Q, Y1604F und I1250T	42
3.1.1	Phosphotyrosin-Level versus GFP-Level	42
3.1.1.1	Wildtyp-ALK	43
3.1.1.2	ALK-Mutante F1174L	47
3.1.1.3	ALK-Mutante R1275Q	49
3.1.1.4	ALK-Mutante Y1604F	51
3.1.1.5	ALK-Mutante I1250T	54
3.1.1.6	Vergleichender Überblick über die ALK-Mutanten	58
3.1.2	FRET-Messungen	59
3.1.2.1	FRET als Messinstrument für ALK-Autophosphorylierung	59
3.1.3	Zytomorphologie der ALK-Subtypen	63
3.1.3.1	Morphologie der Wildtyp-ALK	64
3.1.3.2	Morphologie der F1174L-Mutante	68
3.1.3.3	Morphologie der R1275Q-Mutante	71
3.1.3.4	Morphologie der Y1604F-Mutante	75
3.1.3.5	Morphologie der I1250T-Mutante	78
3.2	Pathscan	81
3.2.1	Durchführung mit unsortierten Lysaten (ohne FACS)	81
3.2.1.1	Signalmoleküle in Wildtyp-ALK-, ALK ^{F1174L} -, ALK ^{I1250T} -Zellen im Verhältnis zu untransfizierten Zellen	82
3.2.2	Durchführung mit sortierten Lysaten (FACS)	84
3.2.2.1	FACS: GFP-negative Zellen	84
3.2.2.2	FACS: GFP-positive Zellen	85
3.2.3	Pathscan-Ergebnisse: Resümee	87
3.3	ERK1/2-Inhibitor	89
3.4	Übersicht	94
4	DISKUSSION	95
4.1	ALK-Aktivierung: Schwellenwerte und Autophosphorylierung	95
4.1.1	Wildtyp-ALK: Expressionslevel bestimmt Tumorigenität	95
4.1.1.1	Mögliche Erklärungen für gesteigerte ALK-Expression	96
4.1.1.1.1	NeuroD1	96
4.1.1.1.2	MYCN	96
4.1.2	F1174L-ALK: aktivierteste Mutante	97
4.1.3	R1275Q-ALK: häufige Mutation, geringe Aktivität	98
4.1.4	Y1604F-ALK: mutierte endogene Phosphorylierungsdomäne	98
4.1.5	I1250T-ALK: „kinasetote“ Mutante	99
4.2	Zytomorphologie und Rezeptorverteilung der untersuchten ALK-Subformen	99
4.2.1	Wildtyp, F1174L, R1275Q in SK-N-AS-Zellen: Rezeptorlokalisation membranös vs. intrazellulär	99
4.2.2	Morphologie der ALK ^{Y1604F} - und ALK ^{I1250T} -Zellen	101
4.2.2.1	ALK ^{Y1604F} : Zytomorphologie und Rezeptorverteilung	101
4.2.2.2	ALK ^{I1250T} : Zytomorphologie und Rezeptorverteilung	101
4.2.3	„Übereinander wachsen“ und Verzweigung – ALK-Einfluss?	102

4.2.3.1	Adhäsives Wachstum	102
4.2.3.2	Neuritenauswuchs.....	102
4.3	ALK-Signalisierung.....	103
4.3.1	Aktivierte Signalmoleküle im Pathscan.....	103
4.3.1.1	AMPK α – Regulator des neuronalen Energiestoffwechsels.....	103
4.3.1.2	Akt – der PI3K/Akt-Signalweg	104
4.3.1.2.1	AMPK α als mTORC1-Inhibitor	106
4.3.1.2.2	mTOR.....	106
4.3.1.2.2.1	PRAS40	107
4.3.1.2.3	p70S6 Kinase, S6 Ribosomal Protein.....	108
4.3.1.2.4	Bad	109
4.3.1.2.5	Caspase-3.....	109
4.3.1.2.5.1	Exkurs: Durch proteolytische Spaltung aktivierte Caspase-3 in F1174L-, Wildtyp- und I1250T-ALK Zellen.....	110
4.3.1.2.5.1.1	PARP – ein Substrat der Caspase-3	110
4.3.1.2.6	GSK3 β	111
4.3.1.2.7	p53.....	111
4.3.1.3	Stat1, Stat3 – der JAK/STAT-Signalweg	112
4.3.1.4	ERK1/2 – der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg	113
4.3.1.5	Weitere erwogene Signalwege	114
4.3.1.5.1	PLC γ , intrazelluläres Calcium	114
4.3.1.5.2	ShcC	115
4.3.1.5.3	JNK-Signalweg.....	115
4.3.1.5.4	SRC-Kinasen, Shf, LGR5, SHH.....	116
4.3.2	Verschiedene ALK-Rezeptoren - verschiedene Signalwege?	117
5	ZUSAMMENFASSUNG	118
6	LITERATURVERZEICHNIS	121
7	ANHANG	144
7.1	Tabellenverzeichnis	144
7.2	Formelverzeichnis.....	144
7.3	Abbildungsverzeichnis	144

1. Einleitung

1.1 Der ALK-Rezeptor im Neuroblastom

1.1.1 Das Neuroblastom

Neuroblastome sind pädiatrische Tumoren, die von Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems ausgehen (Hoehner et al. 1996). Das Ursprungsgewebe bilden somit die Neuralleistenzellen (Brodeur 2003). Das Neuroblastom stellt den häufigsten extrakraniellen soliden Tumor der Kindheit dar (Berlanga et al 2017) und darüber hinaus die häufigste Neoplasie im ersten Lebensjahr (Ries et al. 1999, Maris et al. 2007), von der etwa 1 Kind von 10 000 betroffen ist (Maris 2010).

Beschrieben wurde das Neuroblastom erstmals vor mehr als einem Jahrhundert durch die Ärzte Hutchinson, Pepper und Wright (zitiert nach Rothenberg et al. 2009). Es manifestiert sich typischerweise im Nebennierenmark oder in paraspinalen Ganglien und kann sich klinisch als Raumforderung in Hals, Brust, Abdomen oder Becken präsentieren (Maris 2010). Dort kann es zu Kompression beziehungsweise Beeinträchtigung benachbarter Organe führen (Von Schweinitz und Ure 2013). Die meisten Neuroblastome werden dabei im abdominellen Bereich diagnostiziert (Brodeur 2003).

Im Hinblick auf die Malignität sind Neuroblastome bemerkenswert heterogen. In einigen Fällen kommt es zur spontanen Remission, die meisten Patienten leiden jedoch unter einer aggressiven metastatischen Erkrankung (Maris et al. 2007). Dabei ist das Neuroblastom für 15% der krebisbedingten Kindersterblichkeit verantwortlich (Maris und Matthay 1999, Brodeur 2003) und weist somit eine der höchsten Mortalitätsraten aller pädiatrischen Malignome auf (Maris 2010). Es handelt sich um stark vaskularisierte Tumoren mit rasantem Wachstum (Meitar et al. 1996, Rössler et al. 2008, Zins et al. 2016).

Die Diagnostik eines Neuroblastoms ist außerordentlich komplex. Da die meisten Neuroblastome Katecholamine und deren Metabolite produzieren (Sawada et al. 1982, Sawada et al. 1984), erfolgt zunächst die Detektion verschiedener Katecholaminmetabolite in Serum und Urin. Daneben kommt der Sonografie eine wichtige Rolle in der Neuroblastom-Diagnostik zu. Die Sonografie-Befunde werden durch verschiedene weitere Bildgebungstechniken bestätigt. Weiterhin wird ein Knochenmarkausstrich angefertigt, und am Ende der Diagnostik sollte eine Tumorbiopsie stehen, welche jedoch nicht immer möglich ist (Von Schweinitz und Ure 2013). Letztendlich erfordert die verlässliche Diagnosestellung einen pathognomonischen Histologiebefund der Tumorbiopsie oder aber charakteristische Tumorzellen im Knochenmarkausstrich und zudem erhöhte Katecholaminmetabolite in Serum oder Urin (Siewert et al. 2010).

Nach Diagnosestellung und Staging erfolgt die klinische Einteilung der Neuroblastome nach Befallsmuster in die Stadien I-IV und IVS (Evans et al. 1971). Auf dieser Grundlage in Zusammenschau mit weiteren klinischen Kriterien wird durch die *International Neuroblastoma Risk Group* etwa die Hälfte aller diagnostizierten Neuroblastome der Risikogruppe *high risk* zugeteilt (Park et al. 2008). Entsprechend sind ungefähr die Hälfte aller Erkrankten bei Diagnosestellung bereits von Metastasen befallen (DuBois et al. 1999). Die 5-Jahres-Überlebensrate von *non-high-risk*-Patienten beträgt mehr als 90% und die von *high-risk*-

Patienten weniger als 50% (Irwin und Park 2015). Patienten mit lokalisiertem, resektablem Neuroblastom haben generell eine gute Prognose und können rein chirurgisch therapiert werden, jedoch entwickeln etwa 10% dieser Patienten im Verlauf Lokalrezidive oder Metastasen (Navarro et al. 2006).

Als therapeutische Optionen kommen Chemotherapie, Operation, Stammzelltransplantation und anti-GD2-Immuntherapie mit zusätzlich verabreichten Zytokinen sowie Isotretinoin zum Einsatz (Yu et al. 2010, Kiyonari und Kadomatsu 2015). In einigen Fällen wird auch Radiotherapie eingesetzt (Von Schweinitz und Ure 2013).

Typischerweise kommt es beim Neuroblastom nach transientem Therapieansprechen zu Rezidiven und Chemoresistenz (Matthay et al. 2009, Goldsmith et al. 2012). Entwickeln sich derartige Resistenzen im Rahmen eines Rezidivs, werden die Patienten einer hochintensiven multimodalen Therapie zugeführt (Barone et al. 2013). In den meisten Fällen folgt ein letaler Ausgang (Matthay et al. 2009).

1.1.1.1 Neuroblastomentstehung: Sporadisch vs. familiär

Die meisten Neuroblastome treten sporadisch auf, 1% aller Fälle haben jedoch eine positive Familienanamnese (Maris 2010). Bei Vorliegen eines solchen familiär vererbten Neuroblastoms entwickeln die Betroffenen bereits in einem Alter von etwa 9 Monaten einen entsprechenden Tumor. Patienten ohne familiäre Prädisposition erkranken in der Regel erst im Alter von 2 oder 3 Jahren (Park et al. 2008).

1.1.1.2 Hypothesen zur Pathogenese

Wie bereits erwähnt, entstammen Neuroblastome aus Zellen der Neuralleiste. Diese bedürfen in ihrer Entwicklung vieler verschiedener Signalisierungsmechanismen, um Zellmigration und –differenzierung zu kontrollieren. Bekannt ist, dass Defekte im Rahmen dieser Mechanismen Neuroblastome bedingen können (Westermarck et al. 2011, Mohlin et al. 2011, Kulesa et al. 2009, Reiff et al. 2010, Kobayashi et al. 2013, Palacios-Moreno et al. 2015). Der genaue Pathomechanismus ist jedoch weiterhin unergründet (Palacios-Moreno et al. 2015).

Dennoch gibt es verschiedene Hypothesen zur Pathogenese des Neuroblastoms, die im Folgenden knapp umrissen werden, beginnend mit der in dieser Arbeit thematisierten anaplastischen Lymphomkinase. Von dieser abgesehen, wurden verschiedene weitere Aberrationen in Neuroblastomen entdeckt. Bezüglich all dieser vorgeschlagenen ätiologischen Faktoren gilt jedoch zu berücksichtigen, dass in 70% der Neuroblastome gar keine Mutation vorliegt (Molenaar et al. 2012, Pugh et al. 2013).

1.1.1.2.1 Anaplastische Lymphomkinase

Die anaplastische Lymphomkinase (ALK) ist eine Rezeptortyrosinkinase (RTK). Sie spielt eine Rolle in der physiologischen neuronalen Entwicklung (Morris et al. 1997, Iwahara et al. 1997, Vernersson et al. 2006, Palmer et al. 2009). Während der Embryogenese wird reichlich ALK im neuronalen Gewebe exprimiert. Im Verlauf sinkt das Expressionslevel ab, sodass bei Erwachsenen ALK nur noch in vereinzelt Neuronen zu finden ist (Morris et al. 1997, Iwahara et al. 1997, Webb et al. 2009, Ardini et al. 2010).

Auch in den meisten Neuroblastomen kann ALK detektiert werden (Chen et al. 2014). Eine klare Korrelation zwischen ALK-Deregulation und dem Auftreten von Neuroblastomen gilt dabei bereits als erwiesen (Chen et al. 2008, George et al. 2008, Janoueix-Lerosey et al. 2008, Mosse et al. 2008). Auf die diesbezüglich angenommenen Pathomechanismen soll im Folgenden noch ausführlich eingegangen werden.

1.1.1.2.2 Chromosomenaberrationen

Als weiteren ätiologischen Ansatz wurden in Neuroblastomen verschiedenste Aberrationen des chromosomalen Materials entdeckt, beispielsweise Deletionen oder Triploidität (Brodeur et al. 2003, Vandesompele et al. 2005, Michels et al. 2007, Janoueix-Lerosey et al. 2009).

1.1.1.2.2.1 Numerisch

Numerische Chromosomenaberrationen konnten in Neuroblastomen jüngerer Patienten mit lokalisiertem Stadium und guter Prognose beobachtet werden (Janoueix-Lerosey et al. 2009, Schleiermacher et al. 2010).

Hinsichtlich der Ploidie zeigten Neuroblastome mit triploiden oder hyperploiden Chromosomensätzen vorrangig eine bessere Prognose (Chen et al. 2008). Die Ploidie wird auch häufig als genetischer Marker zur Risikobewertung und als Entscheidungshilfe für die Wahl der richtigen Therapie herangezogen (Cohn et al. 2009, boeMonclair et al. 2009, van Roy et al. 2009).

1.1.1.2.2.2 Strukturell

Strukturelle Chromosomenaberrationen sind emblematisch für aggressive Neuroblastome (Janoueix-Lerosey et al. 2009, Boeva et al. 2013). Zu finden sind sie vorwiegend in Tumoren älterer Kinder in fortgeschrittenen Stadien mit schlechtem Outcome (Normand et al. 2011). Insbesondere der Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 11q deutet auf einen ungünstigen Verlauf hin (Attiyeh et al. 2005).

1.1.1.2.3 Genmutationen

1.1.1.2.3.1 Gene für Transkriptionsfaktoren

1.1.1.2.3.1.1 MYCN

Das MYCN-Gen codiert für einen Transkriptionsfaktor (Matthay et al. 2016). Amplifikationen des MYCN-Gens sind in ca. 38% aller Neuroblastome und 50% aller *high-risk*-Neuroblastome zu finden (Brodeur et al. 1984).

MYCN-Amplifikation werden häufig als genetische Marker zur Risikobewertung und als Entscheidungshilfen für die Wahl der richtigen Therapie herangezogen (Cohn et al. 2009, boeMonclair et al. 2009, van Roy et al. 2009), wobei die aggressivsten Neuroblastome durch die Amplifikation gekennzeichnet sind (Seeger et al. 1985). Damit ist MYCN ein prognostisch schlechter Faktor (Brodeur et al. 1984, Sridhar et al. 2013) und laut Kiyonari und Kadomatsu (2015) auch der aussagekräftigste prognostische Faktor.

MYCN-Proteine tragen sowohl zur Proliferation als auch zur apoptotischen Signalisierung bei (Vita und Henriksson 2006, Meyer und Penn 2008, Müller et al. 2014) und haben eine wichtige Rolle in der Progression des Neuroblastoms (Lutz et al. 1996, Goodman et al. 1997).

1.1.1.2.3.1.2 PHOX2B

Zudem gibt es Spekulationen über eine Neuroblastom-Pathogenese durch die Beeinflussung von ALK durch den Transkriptionsfaktor Paired-like Homeobox 2B (PHOX2B) (Bachetti et al. 2010). PHOX2B Mutationen beeinflussen Proliferation und Differenzierung embryonischer sympathischer Neuronen und die Proliferation von Neuroblastomzelllinien (Raabe et al. 2008, Reiff et al. 2010).

1.1.1.2.3.2 Weitere Gene

Durch den Einsatz neuer Techniken des genomweiten Screenings konnten weitere, wiederholt auftretende Genmutationen im Neuroblastom detektiert werden. So wurden beispielsweise Loss-of-function Mutationen und Deletionen des Gens ATRX, welches für eine RNA-Helicase codiert, beschrieben (Molenaar et al. 2012, Cheung et al. 2012).

Auch PTPN11, NRAS und zahlreiche weitere Gene wiesen in untersuchten Neuroblastomen gehäuft Mutationen auf (Pugh et al. 2013, Schleiermacher et al. 2014), auf welche jedoch an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll.

1.2 ALK: Überblick

1.2.1 Vorkommen der ALK

1994 identifizierten Morris et al. (1995) die anaplastische Lymphomkinase erstmals als Fusionspartner von Nucleophosmin (NPM). Das Fusionsprotein NPM-ALK ist in der Mehrheit der anaplastisch-großzelligen Lymphome (ALCL) zu finden (McDermott et al. 2008). Dabei ist durch eine Translokation das NPM-Gen mit dem Teil des ALK-Gens fusioniert, der für den intrazellulären Anteil des Rezeptors codiert (Morris et al. 1994). Der ALK-Rezeptor liegt hierbei also nicht in seiner voller Länge vor.

Über die ALK in Gesamtlänge wurde erst 1997 von Iwahara et al. (1997) und Morris et al. (1997) genauer berichtet. Die Expression dieser vollständigen ALK konnte in Glioblastomen (Powers et al. 2002) und Neuroblastomen (Lamant et al. 2000) festgestellt werden. Ein Neuroblastom-Screening dazu ergab, dass bei einem signifikanten Anteil der Tumore hohe ALK-Expressionslevel vorliegen (Lamant et al. 2000). Dabei kann der ALK-Rezeptor sowohl mutiert als auch nicht-mutiert auftreten (Carpenter und Mosse 2012).

Überdies wurde ALK auch im Rahmen anderer maligner Prozesse entdeckt, unter anderem im inflammatorischen myofibroblastischen Tumor (Griffin et al. 1999, Chan et al. 2001) und im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) (Soda et al. 2007). Dabei bieten die entsprechenden ALK-positiven Tumoren häufig ein anderes Verhalten als deren ALK-negative Pendanten (Murga-Zamalloa und Lim 2014). Auch im anaplastischen Schilddrüsen-Karzinom wurde ALK detektiert (Murugan und Xing 2011), sowie im Rhabdomyosarkom (Mosse et al. 2008, Janoueix-Lerosey et al. 2008, George et al. 2008, Chen et al. 2008, Barreca et al. 2011, Mano 2012). Auch in die Pathogenese kolorektaler Karzinome sind aberrante ALK-Formen involviert (Mologni 2015). Kürzlich wurde ALK außerdem im Medulloblastom, einem intrakraniellen pädiatrischen neuronalen Tumor, entdeckt (Trubicka et al. 2016).

ALK ist dabei durch unterschiedlichste Mechanismen in die verschiedenen humanen Krebsformen involviert: Translokationen, Amplifikationen und aktivierende Punktmutationen

(Mano 2012, Hallberg und Palmer 2013). In Neuroblastomen sind dabei Amplifikationen und Punktmutationen pathognomonisch (Mosse et al. 2008, Janoueix-Lerosey et al. 2008, Chen et al. 2008, George et al. 2008, Epstein et al. 2012). Allen Mechanismen gemein ist, dass dysregulierte ALK-Signalisierung zu unkontrollierter Zellteilung und gesteigertem Zellüberleben führt (Mologni 2015).

ALK wird beim Menschen außerdem in Dünndarm, Hoden und Gehirn exprimiert (Morris et al. 1995). So wurde die RTK auch in essentiellen motorischen Kernen des Hirnstamms entdeckt (Lopez-Delisle et al. 2014). Über die ALK-Expression im Rahmen der neuronalen Entwicklung wurde bereits berichtet.

1.2.2 ALK – eine Rezeptortyrosinkinase

Insgesamt sind 90 Tyrosinkinasen im menschlichen Genom codiert, darunter 58 Rezeptortyrosinkinasen (Robinson et al. 2000, Manning et al. 2002). Das Gen für die Rezeptortyrosinkinase ALK ist dabei auf dem Chromosom 2p23 lokalisiert, umfasst 29 Exons und kodiert für ein Protein aus 1620 Aminosäuren mit einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne, einer Transmembrandomäne sowie intrazellulär einer Juxtamembrandomäne und einer Kinasedomäne (Palmer et al. 2009). Bezüglich ihrer Sequenzabfolge weist ALK die größte Ähnlichkeit zur LTK, der Leukozyten-Tyrosinkinase auf. Zusammen bilden diese beiden Rezeptoren ihre eigene Subgruppe in der Familie der Insulin-Rezeptoren (Morris et al. 1995, Iwahara et al. 1997).

Rezeptortyrosinkinasen spielen eine wichtige Rolle in der zellulären Proliferation und Differenzierung (Sopko und Perrimon 2013). Die physiologische Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen geschieht durch Liganden-induzierte Dimerisierung und konsekutiver Phosphorylierung der intrazellulären Kinasedomäne (Ullrich und Schlessinger 1990). Dadurch werden wiederum „Andockstellen“ für diverse Adapter-Proteine generiert, welche in Folge verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden anstoßen (Morris et al. 1995).

Die Kinase-Aktivität kann jedoch durch Punktmutationen, Amplifikationen oder Rearrangement der korrespondierenden Gene ein onkogenes Potential entfalten (Palmer et al. 2009). Als weitere Abweichung zur physiologischen RTK-Aktivierung konnten Mazot et al. (2011) belegen, dass die beiden häufigsten ALK-Mutanten konstitutiv aktiviert sind, ohne eine Rezeptordimerisierung aufzuweisen. Sowohl Keimbahn- als auch erworbene ALK-Aberrationen führen dabei häufig zu konstitutiv gesteigerter ALK-Autophosphorylierung und somit auch zu verstärkter Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege (Carpenter et al. 2012).

Anzumerken sei an dieser Stelle, dass in Neuroblastom-Rezidiven ein gesteigertes Vorkommen mutierter ALK beobachtet werden konnte, was am ehesten als klonale Evolution mutierter Zellen im Rahmen der Erstbehandlung zu deuten ist (Padovan-Merhar et al. 2016).

1.2.3 Theorien zur ALK-Aktivierung

1.2.3.1 ALK-Aktivierung durch Genmutation

1.2.3.1.1 Punktmutationen in der Kinasedomäne

In Neuroblastomen wird die Mehrheit der ALK-Mutationen in der Kinasedomäne gefunden (George et al. 2008). Diese aktivierenden Mutationen, ob vererbt oder somatisch akquiriert, führen zu konstitutiver Autophosphorylierung der ALK und dadurch zu gesteigerter Kinase-Aktivität (Chen et al. 2008, George et al. 2008, Janoueix-Lerosey et al. 2008, Mosse et al. 2008). Diese führt wiederum zu exzessiver Phosphorylierung von Signalmolekülen (Yao et al. 2013). Die aktivierenden Mutationen werden als Hauptmechanismus der onkogenen Aktivierung des ALK-Rezeptors erachtet (Cazes et al. 2013).

Bei einer Genanalyse aus 1596 Neuroblastomen ergaben sich bei 8% der Proben Mutationen in der Kinasedomäne der ALK. Die Neuroblastome dieser mutierten Proben zeigten als klinisches Korrelat einen vergleichsweise ungünstigen Verlauf (Bresler et al. 2014).

Beim Vergleich sporadischer und hereditärer Neuroblastome fällt auf, dass besagte Mutationen in nur 7-8% der sporadischen Neuroblastome (de Brouwer et al. 2010, Schulte et al. 2011, Weiser et al. 2011), aber in mehr als der Hälfte der hereditären Neuroblastome zu finden sind. Dominante ALK-Mutationen konnten dabei in 50% der familiären Neuroblastom-Fälle gefunden werden, die Penetranz der Mutationen ist somit variabel (Mosse et al. 2008, Janoueix-Lerosey et al. 2008). Nichtsdestotrotz stellen aktivierende Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne die Hauptursache familiärer Neuroblastome dar (Mosse et al. 2008).

Zudem gibt es Spekulationen darüber, ob eine ALK-Punktmutation lediglich ein „initiiierendes“ Ereignis darstellt, welches einen *second hit* im Sinne einer MYCN-Dysregulation benötigt, um ein Neuroblastom auszuprägen (Knudson und Strong 1972). Nach dieser Hypothese würde die aktivierende Mutation des Gens, das für ALK codiert, lediglich eine Prädisposition für ein Neuroblastom darstellen (Reiff et al. 2011).

Auch in der extrazellulären ALK-Domäne wurde bereits über Kinase-aktivierende Punktmutationen und Deletionen berichtet (Sattu et al. 2013), diese sollen jedoch an dieser Stelle nicht weiter thematisiert werden.

1.2.3.1.1.1 Bekannte Punktmutationen

Aktivierende ALK-Mutationen treten als einbasige Alterationen in der Tyrosinkinasedomäne auf (Mosse et al. 2008), es handelt sich also um aktivierende Punktmutationen (Bellini et al. 2015), beziehungsweise gain-of-function Mutationen, welchen eine Rolle in der Initiierung oder Progression des Neuroblastoms zukommen soll (Schönherr et al. 2011 b).

Mutationen der Codons R1275, F1174 und F1245 machen dabei zusammengenommen etwa 85% der ALK-Mutationen aller Neuroblastome aus (Chen et al. 2016). Die häufigste somatische Mutation ist R1275Q, welche jedoch auch in familiären Neuroblastomen beobachtet werden kann. Die zweithäufigste Mutation ist F1174L (Wood et al. 2009), diese tritt jedoch ausschließlich in sporadischen Tumoren auf (de Brouwer et al. 2010, Azarova et al. 2011).

I1250T ist ebenfalls eine bekannte somatische ALK-Mutation in sporadischen Neuroblastomen (Mosse et al. 2008). Weiterhin finden sich hierbei alterierende Aminosäuren in den Mu-

tationen K1062M, F1174C, F1174I, F1245C, F1245V und F1245L. In familiären Neuroblastomen wurden zudem die Mutationen T1087I und G1128A detektiert (Mosse et al. 2008, Janoueix-Lerosey et al. 2008, George et al. 2008, Chen et al. 2008, Barreca et al. 2011). F1174 und F1245 konnten jedoch bisher in keinem Falle einer hereditären Keimbahnmutation beobachtet werden (Janoueix-Lerosey et al. 2010, de Brouwer et al. 2010). Als konstitutiv aktivierte ALK-Varianten wird in der Literatur weiterhin über I1171N und R1192P berichtet (Schönherr et al. 2011 b).

Insgesamt sind 12 verschiedene Reste bekannt, welche in beschriebener Weise von ALK-Mutationen betroffen sein können (de Brouwer et al. 2010). Auf die in dieser Arbeit untersuchten Punktmutationen soll in nachfolgenden Ausführungen noch genauer eingegangen werden.

1.2.3.1.2 ALK-Amplifikation

In etwa 2% aller Neuroblastome liegt eine Amplifikation des ALK-Gens vor (de Brouwer et al. 2010, Weiser et al. 2011). Dabei zeigte sich die entsprechend exprimierte ALK konstitutiv aktiviert. Zudem konnte sowohl in Neuroblastomzelllinien als auch in Tumorbiopsien mit amplifiziertem ALK-Gen eine Überexpression von ALK-Protein beobachtet werden (Miyake et al. 2002, Osajima-Hakomori et al. 2005). Jedoch wurden in Zellen mit punktmutierten ALK-Formen insgesamt signifikant höhere ALK-mRNA-Levels nachgewiesen als in Zellen mit amplifizierter ALK (Duijkers et al. 2011). Nichtsdestotrotz stellt die Amplifikation des ALK-Gens einen weiteren onkogenen Mechanismus im Neuroblastom dar.

1.2.3.1.3 Intragenes Rearrangement

In einigen Proben mit ALK-Amplifikation konnten zudem komplexe genomische Rearrangements mit zahlreichen Strangbrüchen innerhalb des amplifizierten Bereichs detektiert werden. Trotz dieser gestörten DNA-Folge wurden in diesen Proben hohe Levels phosphorylierter ALK nachgewiesen. Diese Erhebungen kennzeichnen einen weiteren, wenn auch seltenen, Aktivierungsmechanismus der ALK. Eine derartige Konstellation lag jedoch lediglich in 4 von 332 Tumorproben und in 2 von 13 Zelllinien vor (Fransson et al. 2015).

Zudem zeigten Gen-Analysen aus Neuroblastomen bei Erstdiagnose und Neuroblastom-Rezidiven, dass Rearrangements vorrangig in Rezidiven auftreten und somit einen Marker für die Aggressivität des Tumors darstellen (Cazes et al. 2013).

1.2.3.2 Sonstige Theorien

Wie bereits erwähnt, werden Rezeptortyrosinkinasen typischerweise durch Liganden-induzierte Rezeptor-Oligomeration aktiviert. Daraus resultiert die Autophosphorylierung des Rezeptors an dessen Tyrosin-Resten (Ullrich und Schlessinger 1990, Heldin 1995, Blume-Jensen und Hunter 2001).

In anderen Studien wird ALK jedoch als „Abhängigkeits-Rezeptor“ dargestellt, welcher Apoptose induziert, wenn er nicht von einem Ligand besetzt wird. Bindet ALK einen Liganden oder tritt als Fusionsprotein auf, so verhindert die RTK hingegen die Apoptose (Mourali et al. 2006, Allouche 2007).

1.2.3.2.1 ALK-Liganden

Die Struktur der ALK als Rezeptor der Zelloberfläche lässt ebenfalls vermuten, dass die ALK-Aktivität einer Regulation durch Liganden unterliegt (Mano 2012).

1.2.3.2.1.1 ALK-Liganden in *Drosophila melanogaster*

Dabei wurde zunächst *Jelly belly* als Ligand der *Drosophila*-ALK bekannt (Englund et al. 2003). In Säugetieren konnte jedoch kein Analogon zu *Jelly belly* identifiziert werden (Mano 2012).

1.2.3.2.1.2 Liganden der Säugetier-ALK

Bezüglich der Säugetier-ALK wurden zunächst Midkine (Tomomura et al. 1990, Vigny et al. 1989) und Pleiotropin (Merenmies und Rauvala 1990) als aktivierende ALK-Liganden in Betracht gezogen. Midkine ist ein entwicklungsgesteuerter Wachstumsfaktor und homolog zu Pleiotropin (Uehara et al. 1992, Lai et al. 1992, Lai et al. 1995, Stoica et al. 2002). Es stellte sich heraus, dass Midkine und Pleiotropin um die Bindung an ALK konkurrieren (Stoica et al. 2002).

Midkine und Pleiotropin können zudem auch an andere Rezeptoren binden, unter anderem an die receptor protein tyrosine phosphatase- β (RPTP β) und receptor protein tyrosine phosphatase- ζ (RPTP ζ) (Palmer et al. 2009), welche nachfolgend noch detailliert beleuchtet werden. Reiff et al. (2011) postulierten zudem, dass Ausmaß und Timing der Sympathikus-Neurogenese durch Midkine-Signalisierung via ALK kontrolliert wird.

Darüber hinaus gibt es weitere kontroverse Spekulationen (Mathivet et al. 2007) bezüglich eines aktivierenden ALK-Liganden, so sind auch die Moleküle HBNF (heparin-binding neurotropic factor) (Kovesdi et al. 1990), OSF-1 (osteoblast-specific factor 1) (Tezuka et al. 1990) und HARP (heparin affinity regulatory peptide) (Courty et al. 1991) als mögliche Liganden im Gespräch (Stoica et al. 2001, Stoica et al. 2002). Außerdem wurde Heparin als Ligand der extrazellulären ALK-Domäne in Betracht gezogen. Kurzkettenige Heparine binden dabei zwar monovalent an die ALK, aktivieren den Rezeptor jedoch nicht. Langkettenige Heparine hingegen induzieren die ALK-Dimerisation und Aktivierung in Neuroblastomzellen (Murray et al. 2015).

Unlängst konnte gezeigt werden, dass die humane ALK/LTK-Subfamilie von dem erst kürzlich beschriebenen Peptid- beziehungsweise Proteinliganden FAM150A (AUG β) und FAM150B (AUG α) aktiviert wird (Zhang et al. 2014, Reshetnyak et al. 2015, Guan et al. 2015). FAM150A und FAM150B aktivieren dabei sowohl Wildtyp-ALK als auch ALK-Mutanten im Neuroblastom (Guan et al. 2015). Fraglich bleibt jedoch weiterhin, inwiefern abgesehen davon noch zusätzliche Aktivatoren der humanen ALK existieren und welche Relevanz den FAM150A/B (AUG) Liganden überhaupt zukommt (Hallberg und Palmer 2016).

1.2.3.2.2 Phosphatasen als ALK-Gegenspieler

Die beschriebene Tyrosin-Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinasen ist das Ergebnis einer dynamischen Balance aus Aktivität der Tyrosinkinasen und Tyrosinphosphatasen. Die Phosphatasen bilden die Gegenspieler zu den Kinasen (Xu und Fisher 2012). ALK ist dabei ein Substrat der Phosphatasen RPTP β und RPTP ζ (Perez-Pinera et al. 2007). Wie bereits erwähnt, sind Midkine und Pleiotropin Liganden der RPTP β / ζ (Maeda et al. 1996, Meng et al. 2000).

Deuel (2013) beschreibt eine „Liganden-unabhängige Aktivierung“ der ALK. Das Zytokin Pleiotropin zum Beispiel inaktiviert nach dieser Hypothese die katalytische Aktivität der RPTP β und RPTP ζ . Sind diese hingegen im aktivierten Zustand, dephosphorylieren sie den ALK-Rezeptor und wirken somit als Gegenspieler der ALK-Aktivität.

Der Hauptmechanismus der Inhibition intrinsischer Tyrosinphosphatase-Aktivität scheint dabei deren Liganden-induzierte Dimerisierung und dadurch Blockierung der Substrat-bindungsstelle zu sein (Fukada et al. 2006). Der inhibitorische Effekt von beispielsweise Pleiotropin auf die enzymatische Aktivität von RPTP ζ verstärkt somit indirekt die Tyrosinphosphorylierung der RPTP ζ -Substrate und damit deren Aktivierung (Xu und Fisher 2012).

1.2.3.2.3 NLRR1 als negativer ALK-Regulator

Das Neuronal leucin-rich repeat 1, kurz NLRR1, ist ein Typ 1 transmembranes Protein, welches in Neuroblastomen in hohem Maße exprimiert wird und potentiell die Signalwege der Rezeptortyrosinkinasen beeinflusst. *In vitro* interagiert die NLRR1-Ektodomäne mit ALK und vermindert deren Phosphorylierung, wodurch die Proliferation ALK-mutierter Neuroblastomzellen herabgesetzt wird. NLRR1 ist demzufolge ein negativer Regulator der ALK-Signalisierung im Neuroblastom und in der neuronalen Entwicklung (Sato et al. 2016).

1.2.3.2.4 Flotillin-1 als negativer ALK-Regulator

Flotillin-1, ein Plasmamembran-Protein, das in die Endozytose involviert ist, konnte als ALK-Bindungspartner identifiziert werden. Dabei soll es die Assoziation der ALK mit der Plasmamembran regulieren und darüber auch die ALK-Aktivität. Wurde die Expression von Flotillin-1 in Neuroblastomzellen abgeschwächt, kam es zu einer Dissoziation der ALK aus Endosomen und Akkumulation an der Zellmembran, wodurch die der ALK nachgeschalteten Signalwege verstärkt aktiviert wurden (Tomiya et al. 2014). Flotillin-1 stellt somit ebenfalls einen negativen Regulator der ALK-Aktivität dar.

1.2.4 ALK-Signalisierung: Mutmaßliche Signalwege

Nach der Darlegung der bestehenden Aktivierungsmechanismen der ALK stellt sich weitergehend die Frage nach den nachgeschalteten Signalwegen, die durch den autophosphorylierten ALK-Rezeptor aktiviert werden und letztlich Zellproliferation und -Überleben bedingen. Angenommen wird, dass ALK mehrere verschiedene Signalwege aktiviert (Zhao et al. 2015). Dabei werden in der Literatur hauptsächlich folgende drei Signalkaskaden angenommen: Der Ras/MAPK- (Zou et al. 2007), der PI3K/AKT- (Bai et al. 2000) und der JAK/STAT- (Chiarle et al. 2005, Kasprzycka et al. 2006) Signalweg. Auch in Zellen mit mutierter oder amplifizierter ALK werden die genannten Signalwege hinsichtlich der ALK-Signalisierung favorisiert (Miyake et al. 2002). Darüber hinaus werden in der Literatur noch weitere Signalmoleküle in Betracht gezogen.

1.2.5 ALK als therapeutisches Target

Als 2008 die ALK-Mutationen im Neuroblastom entdeckt wurde, sollte möglichst rasch eine wirksame *targeted therapy* entwickelt werden (Versteeg und George 2016). Mit solchen zielgerichteten Therapien kann die Effektivität der Therapie erhöht werden, ohne deren Toxizität

zu steigern (Matthay et al. 2016). In der heutigen Zeit gelten Tyrosinkinase als attraktives Target in der zielgerichteten Krebsbehandlung (McDermott et al. 2008). So stellt auch der ALK-Rezeptor im Neuroblastom einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt dar (Rodrigues et al. 2012). Ziel dabei ist, die konstitutive ALK-Aktivierung auszuschalten (Wellstein und Toretzky 2011).

1.2.5.1 Der ALK-Inhibitor Crizotinib

Crizotinib, auch bekannt als PF-02341066, ist in den USA seit 2011 zugelassen (Mesaros et al. 2014). Erstmals wurde es von Pfizer als „Xalkori“ auf den Markt gebracht (Ardini und Galvani 2012). Crizotinib zeigt in Verbindung mit den Chemotherapeutika Topotecan und Cyclophosphamid einen synergistischen Effekt, allerdings auch erhöhte Toxizität in der Behandlung von Neuroblastom-Patienten (Krytska et al. 2016).

Durch Crizotinib konnte die Proliferation von ALK^{R1275Q}- und Wildtyp-ALK-exprimierenden Neuroblastomzellen inhibiert werden. (Bresler et al. 2011). Die verschiedenen ALK-Mutanten reagieren jedoch unterschiedlich hinsichtlich ihrer Sensitivität. So ist beispielsweise die F1174L-Variante der ALK resistent gegen Crizotinib (Infarinato et al. 2016).

Bedeutend ist somit eine rasche Erhebung des ALK-Mutationsstatus, um eine Crizotinib-Resistenz vor Therapiebeginn auszuschließen (Esposito et al. 2017). Da eine Tumorbioptie nicht in allen Fällen möglich ist, werden derzeit Verfahren entwickelt, mit welchen der Mutationsstatus des ALK-Gens aus dem peripheren Blut ermittelt werden kann (Combaret et al. 2015).

Darüber hinaus bietet die Methode des *deep sequencing* eine höhere Sensitivität bei der Untersuchung aktivierender Punktmutationen der ALK (Bellini et al. 2015) als konventionelle Untersuchungsmethoden wie beispielsweise Sanger Sequencing. In der Hoffnung, mittels *deep sequencing* Crizotinib-resistente Mutationen rasch und effizient detektieren zu können (Huang et al. 2013), ergibt sich eine weitere zukunftsweisende Strategie in der Neuroblastomtherapie.

1.2.5.2 Weitere ALK-Inhibitoren in (prä)klinischen Studien

Zahlreiche weitere ALK-Inhibitoren befinden sich in präklinischen und klinischen Studien. Der Trend geht dabei in Richtung personalisierter Medizin (Esposito et al. 2017), wobei der ALK-Status letztlich das entscheidende Merkmal für die Neuroblastomtherapie darstellt.

So hemmt der ALK-Inhibitor PF-06463922 die ALK-Kinaseaktivität *in vitro* effektiver als Crizotinib und inhibiert auch Crizotinib-resistente ALK-Formen (Infarinato et al. 2016). PF-06463922 ist somit ein ALK-Inhibitor der nächsten Generation (Guan et al. 2016). Auch der ALK-Inhibitor X-396 erwies sich potenter als Crizotinib bei der Hemmung der Proliferation von Neuroblastomzellen *in vitro* (Di Paolo et al. 2015).

Ein weiterer, aktuell getesteter ALK-Inhibitor ist Entrectinib (Lee et al. 2015). Dieser wirkt vor allem auf ALK-amplifizierte Neuroblastomzellen. Bei ALK-mutierten Zellen, zum Beispiel bei ALK^{F1174L} und ALK^{R1275Q}, sowie bei Wildtyp-ALK besteht für Entrectinib hingegen eine reduzierte Sensitivität (Aveic et al. 2016). In Versuchen mit murinen Xenograft-Modellen erwies sich Entrectinib als potenter ALK-Inhibitor (Iyer et al. 2016).

Die konstitutiv aktiven ALK-Mutanten G1128A, I1171N, F1174L, R1192P, F1245C und R1275Q konnten dagegen durch den ALK-Inhibitor NVP-TAE684 effektiv gehemmt werden (Schönherr et al. 2011/1b). Diese ALK-punktmutierten Neuroblastomzelllinien wiesen dabei eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber dem ALK Inhibitor TAE684 auf als Wildtyp-ALK-Zelllinien (Duijkers et al. 2011). Zudem ist ALK^{F1174L} sensitiver gegenüber NVP-TAE684 als ALK^{R1275Q} (George et al. 2008). Genomische Veränderungen der ALK können Tumoren folglich für bestimmte ALK-Inhibitoren sensitivieren (McDermott et al. 2008).

Darüber hinaus stellt Brigatinib einen weiteren ALK-Inhibitor dar, welcher Aktivität und Wachstum ALK-positiver Zellen herabsetzt (Siaw et al. 2016). Auch weitere ALK-Inhibitoren wie zum Beispiel LDK378 (Schulte et al. 2013 b) und Alectinib (McKeage 2015) befinden sich derzeit in Testphasen zur Anwendung in der Neuroblastomtherapie.

1.2.5.3 ALK-Inhibitoren *in vitro*

Laborexperimentell wird hinsichtlich der ALK-Inhibition in viele Richtungen geforscht, um neue Ansätze für die Neuroblastomtherapie zu schaffen. Einige davon sollen hier exemplarisch dargelegt werden, ohne jedoch einen Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben.

So experimentierten Carpenter et al. (2012) beispielsweise mit einem gegen ALK gerichteten, antagonistischen Antikörper. Dieser wirkte zytotoxisch sowohl auf Wildtyp- als auch auf Mutanten-ALK exprimierende Zellen. Zudem konnte mit 3,5-Diamino-1,2,4-triazol-Harnstoff eine ALK-Inhibition in den Neuroblastomzelllinien KELLY und SH-SY5Y herbeigeführt werden (Deng et al. 2011).

Als weiterer Ansatz wurden Peptide synthetisiert, die die proapoptotische Domäne des ALK-Rezeptors nachahmen. Dabei wurde ein Peptid aus 36 Aminosäuren, P36, entwickelt, welches zytotoxisch auf ALK-positive Neuroblastomzellen und ALCL-Zellen wirkte. Der zytotoxische Effekt wurde dabei durch Caspasen vermittelt. Auf ALK-negative Zellen zeigte das Peptid keinen Effekt. Diese von ALK abstammenden Peptide könnten ebenfalls einen neuen Therapieansatz für ALK-positive Tumoren darstellen (Aubry et al. 2015).

Ähnlich dazu modifizierten Vishwamitra et al. (2012) die Expression von ALK in Neuroblastomzellen durch eingebrachte MicroRNA als post-transkriptionalen Suppressor.

Eine synergistische Wirkung war hinsichtlich des Smac-Mimetikums LCL161 und des ALK-Inhibitors TAE684 zu verzeichnen. Physiologisch wird Smac, der *second mitochondria-derived activator of caspase*, als Reaktion auf verschiedene apoptotische Stimuli aus den Mitochondrien ausgeschüttet und begünstigt den Zelltod. Dass LCL161 Neuroblastomzellen für die Chemotherapie sensitiviert, könnte zukunftsweisend für die Neuroblastomtherapie sein (Najem et al. 2016).

Auch der ALK-Inhibitor AZD3463 konnte die Proliferation von Neuroblastomzellen, die Wildtyp-ALK oder eine der beiden aktivierenden Mutationen ALK^{F1174L} oder ALK^{D1091N} exprimierten, effektiv unterdrücken (Wang et al. 2016). Ferner werden intrazellulär wirkende ALK-Inhibitoren als Inhibitoren der nächsten Generation angestrebt (Carpenter und Mosse 2012).

Schlussendlich wird mit all diesen Studien und Testläufen versucht, sich effizienteren neuen Therapiestrategien anzunähern, um die Anzahl der Neuroblastom-bedingten Todesfälle zu reduzieren (Luksch et al. 2016).

1.3 Erkenntnisgewinn dieser Arbeit

Der vorhergehende Überblick über die anaplastische Lymphomkinase im Neuroblastom macht deutlich, dass es sich um ein kontrovers diskutiertes Subjekt der Forschung handelt. Sowohl hinsichtlich Aktivierung als auch Signalisierung divergieren die Auffassungen in der Literatur.

1.3.1 Aktivierung

1.3.1.1 Expressionslevel und ALK-Aktivierung

Hinsichtlich der Aktivierung der ALK stellte sich vor Beginn dieser Arbeit die Frage, wie sich die ALK-Aktivität in Abhängigkeit vom ALK-Expressionslevel verhält.

Aus der Literatur war zuvor bekannt, dass der Wildtyp-ALK-Rezeptor, welcher keine Mutationen trägt, ab einem gewissen Expressionslevel ebenfalls ein onkogenes Potential entwickelt (Passoni et al. 2009). Aber auch bezüglich aberranter ALK besteht in Neuroblastomen eine Korrelation zwischen hohen Expressionslevel und Tumorprogression, beziehungsweise schlechtem klinischem Outcome (Passoni et al. 2009, Parodi et al. 2011).

Passoni et al. (2009) stellten dazu sogar die Hypothese auf, dass hohe ALK-Level unabhängig vom Mutationsstatus mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Dem steht jedoch entgegen, dass punktmutierte ALK per se signifikant höhere mRNA-Level im Vergleich zu amplifizierter oder Wildtyp-ALK bedingt (Duijkers et al. 2011). Dennoch führt die forcierte Expression von Wildtyp-ALK ebenso wie konstitutiv aktive ALK-Mutanten in Kulturen unreifer Sympathikus-Neurone zu einem starken Anstieg der Proliferation (Reiff et al. 2011). Das Level der Expression ist dabei mit einem ungünstigen Verlauf assoziiert (Chen et al. 2014).

Um dem nachzugehen, beziehungsweise ein Muster der ALK-Aktivierung ab einem gewissen Expressionslevel ableiten zu können, bestand der gewünschte Versuchsaufbau also in der Herstellung einer „Messreihe“ von Zellen mit verschiedenem Gehalt an ALK-Rezeptoren. Die ALK-Phosphorylierung wurde dabei als Aktivierung bewertet. Bei der Untersuchung der ALK-Phosphorylierung *in vitro* drängt sich die Frage auf, inwiefern ALK *in vivo* phosphoryliert vorliegt. In einem Screening von 289 Tumoren wurde in 99% der Tumoren ALK exprimiert und in 48% lag ALK in phosphorylierter Form vor (Regairaz et al. 2016). Somit sind *in vitro*-Beobachtungen hinsichtlich phosphorylierter ALK durchaus auf in Neuroblastomen exprimierte ALK übertragbar.

Zudem sollte ermittelt werden, ob sich die ALK-Aktivität in Abhängigkeit von der Rezeptormenge innerhalb der verschiedenen ALK-Mutanten unterscheidet. Zwar postulierten Regairaz et al. (2016), die Aktivierung der ALK sei unabhängig von deren Mutationen. Jedoch zeigen Neuroblastom-Patienten, deren Tumoren die ALK^{F1174L}-Mutation aufweisen, ein signifikant schlechteres Outcome. Die ALK^{R1275Q}-Mutation hingegen bedingt dahingehend keinen Unterschied (de Brouwer et al. 2010). Diese Diskrepanzen ließen es sinnvoll erscheinen, das Verhalten einzelner ALK-Mutanten auf zellulärer Ebene vergleichend gegenüberzustellen. Dazu wurden die im Folgenden beschriebenen ALK-Varianten ausgewählt.

1.3.1.1.1 Wildtyp-ALK

Wildtyp-ALK sollte als ALK-Variante, welche frei von Mutationen ist, als Referenz für die Untersuchungen der ALK-Mutanten dienen.

1.3.1.1.2 F1174L

Der konstitutiv aktive Rezeptor ALK^{F1174L} (Chen et al. 2008, George et al. 2008, Janoueix-Lerosey et al. 2008, Mosse et al. 2008) stellt eine De-novo-Mutation dar (Debruyne et al. 2016). Die F1174L-Mutante zählt zu den häufigsten Punktmutationen im ALK-Gen. Bereits aus der Literatur bekannt ist dabei, dass ALK^{F1174L} im Vergleich zu ALK^{R1275Q} eine verstärkte Autophosphorylierung aufweist (de Brouwer et al. 2010). F1174L wird von Schulte et al. (2013 a) sogar als die aggressivste aktivierte ALK-Mutante bezeichnet. Insofern stellte die F1174L-Variante der ALK ein spannendes Subjekt für die Betrachtung von Expressionslevel und Aktivierung dar.

1.3.1.1.3 R1275Q

R1275Q beschreibt ebenfalls eine aktivierende Punktmutation des ALK-Rezeptors (Chen et al. 2008, George et al. 2008, Janoueix-Lerosey et al. 2008, Mosse et al. 2008). Zudem bildet ALK^{R1275Q} die häufigste ALK-Mutation, weshalb auch hierbei galt, Untersuchungen zur Kinase-Aktivität zu erheben. Zudem bietet ALK^{R1275Q} als weitere konstitutiv aktive ALK-Form gute Vergleichswerte zu ALK^{F1174L}.

1.3.1.1.4 Y1604F

Y1604 bildet eine endogene Phosphorylierungsdomäne des humanen ALK-Rezeptors (Palmer et al. 2009). Die Phosphorylierung der Position Y1604 im ALK-Rezeptor verkörpert dessen Aktivierung (Chand et al. 2013). So liegt die Position Y1604 beispielsweise in ALK^{F1174L} phosphoryliert vor (McDuff et al. 2013).

In dieser Arbeit wurde das Konstrukt ALK^{Y1604F} untersucht, bei welchem der endogen zu phosphorylierende Tyrosinrest an Position 1604 durch die Aminosäure Phenylalanin ersetzt ist. Eine Tyrosinphosphorylierung dieser Domäne ist dadurch nicht mehr möglich. Theoretisch betrachtet bildet ALK^{Y1604F} letztlich ein Analogon zu Wildtyp-ALK unter Ausschaltung der Phosphorylierungsdomäne Y1604. Es handelt sich hierbei um eine *in vitro* Mutante, welche bis dato nicht *in vivo* in Neuroblastomen zu detektieren war.

ALK^{Y1604F} ist bis dato kaum erforscht, lediglich im Rahmen einer einzigen Dissertation wurde ALK^{Y1604F} bisher untersucht. Dabei ergab sich, dass ALK^{Y1604F} in Bezug auf die Aktivierung der Signalmoleküle PLC γ ₁ und PLC γ ₂ ein analoges Verhalten zu Wildtyp-ALK aufweist (Bühler 2013).

Um die Relevanz der Phosphorylierungsdomäne Y1604 im ALK-Rezeptor zu analysieren, wurde diese Variante der ALK ebenfalls untersucht, wobei ALK^{Y1604F} wie erwähnt im Gegensatz zu den anderen hier beleuchteten ALK-Varianten kein bekanntes Vorkommen *in vivo* bietet.

1.3.1.1.5 I1250T

Die ALK^{I1250T} gilt als inaktive Kinase (Schönherr et al. 2011 a). Insofern stellte sich hierbei die Frage, wie sich die Aktivität der I1250T-ALK in Bezug zu deren Expressionslevel verhält.

1.3.1.2 ALK-Autophosphorylierung

Neben der Aktivierung der Tyrosinkinase in Abhängigkeit vom Expressionslevel belief sich das Interesse zudem auf das Ausmaß der Autophosphorylierung der verschiedenen ALK-Varianten. Das Ziel der diesbezüglichen Untersuchungen bestand in der direkten Vergleichbarkeit der verschiedenen ALK-Subtypen im Hinblick auf deren Kinase-Aktivität, welche durch die Autophosphorylierung widerspiegelt wird.

1.3.2 Zytomorphologie

Ohne vorausgehende Planung entstanden die Beobachtungen zur Zytomorphologie der Zellen, die die genannten ALK-Formen exprimierten, erst bei der mikroskopischen Durchsicht. Auf diese Weise erfolgte eine erstmalige Analyse der Zytomorphologie der ALK-Formen Y1604F und I1250T.

1.3.3 Signalisierung

Ein weiteres Vorhaben dieser Arbeit bestand darin, den Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalmoleküle und damit deren Aktivität zu vergleichen. Zum einen bestand generell die Fragestellung dabei darin, ob sich hinsichtlich eines Signalwegs ein Vorrang abzeichnet. Zum anderen wurden die ALK-Varianten Wildtyp-ALK, ALK^{F1174L} und ALK^{I1250T} bezüglich ihrer phosphorylierten Signalmoleküle verglichen mit der Frage nach Unterschieden in der Signalisierung innerhalb der ALK-Subtypen.

1.3.3.1 ERK1/2-Inhibition

In der Literatur wird dem Ras/MAP-Kinase-Signalweg eine wichtige Rolle in der Neuroblastom-Pathogenese zugeschrieben. Die MAP-Kinase ERK bildet das letzte Glied in diesem Signaltransduktionsweg und kontrolliert die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Nucleus sowie Proliferation, Zellüberleben und -wachstum (Hilger et al. 2002).

Da das Ausmaß der Phosphorylierung im Rahmen der zur Signalisierung getätigten Versuche jedoch entgegen der Erwartung eher mäßig ausfiel, sollten die Ergebnisse durch den Einsatz eines ERK-Inhibitors verifiziert werden. Je nach Beeinflussung des ERK-Inhibitors auf das Verhalten der untersuchten Zellen konnten somit auch Aussagen zur entsprechenden Relevanz der Ras/MAPK-Signalkaskade getroffen werden. Dazu sollten alle unter 1.3.1.1 genannten ALK-Varianten untersucht werden.

1.3.4 Die Umsetzung

1.3.4.1 Wahl von Materialien und Methoden

1.3.4.1.1 Zelllinien

Alle Versuche dieser Arbeit sollten mit der Neuroblastomzelllinie SK-N-AS durchgeführt werden. SK-N-AS-Zellen sind wenig differenzierte (Zins et al. 2016), humane Wildtyp-ALK-Zellen (Lambertz et al. 2015). Die Wahl dieser Zelllinie lag darin begründet, dass mit Einbringung eines punktmutierten ALK-Rezeptors in SK-N-AS-Zellen die im Neuroblastom beschriebene, somatisch akquirierte ALK-Punktmutation imitiert wird.

Einige der Versuche sollten mit NIH/3T3-Zellen wiederholt werden, um die mit SK-N-AS-Zellen erzielten Ergebnisse zu validieren. NIH/3T3-Zellen sind murine embryonische Fibroblasten (Park et al. 2006). Auf diese Weise konnten die Effekte der punktmutierten, beziehungsweise Wildtyp-ALK auf „neutralem Grund“ untersucht werden, da in den NIH/3T3-Zellen keine endogene ALK vorliegt und es sich nicht um Neuronen handelt.

1.3.4.1.2 Plasmide

Die unter 1.3.1.1 genannte Wildtyp-ALK sowie die punktmutierten ALK-Varianten sollten in die jeweiligen Zellen mit Hilfe von Plasmid-Vektoren eingebracht werden. Dazu sollten Plasmide verwendet werden, in denen die Codierung für den Fluoreszenzfarbstoff GFP an das ALK-Gen grenzt, sodass diese zusammen exprimiert werden. Auf diese Weise konnte der eingebrachte ALK-Rezeptor mit dem Fluoreszenzfarbstoff GFP verknüpft exprimiert, ergo mit GFP markiert werden.

1.3.4.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Das besagte GFP, das *green fluorescent protein* bleibt bemerkenswert stabil gegenüber der Einwirkung einer Bandbreite von pH-Werten und Temperaturen (Patterson et al. 1997). Somit schien es für die geplanten Versuche gut geeignet. Zudem bildet GFP mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 ein geeignetes Förster Donor-Acceptor-Paar (Ng et al. 1999), entsprechend den Erfordernissen der geplanten Versuche. Cy3 sollte dabei an gegen Phosphotyrosin gerichtete Antikörper gekoppelt eingesetzt werden. Diese sollten unter anderem die phosphorylierten Tyrosinreste des ALK-Rezeptors opsonieren.

1.3.4.1.4 Transfektion

Die Transfektion bezeichnet die Einbringung exogener DNA in eukaryote Zellen (Buddecke 2002), im Falle dieser Arbeit also die unter 1.3.4.1.2 beschriebenen Plasmide in die entsprechenden Zellen. Auf diese Weise sollten letztendlich zelluläre Modelle der verschiedenen ALK-Rezeptoren entstehen.

1.3.4.1.4.1 Transiente Transfektion

Bei der „stabilen“ Transfektion erfolgt die Integration der exogen eingebrachten DNA in das Genom der Zielzelle. Bei der „transienten“ Transfektion hingegen erfolgt keine Inkorporation der eingebrachten DNA, sondern diese verbleibt lediglich vorübergehend im Zellkern der Zielzelle (Buddecke 2002). Bei der Zellteilung wird die exogene DNA folglich nicht repliziert (Storhas et al. 2013). Dennoch liefert sie Gen-Expressionsprodukte (Buddecke 2002), welche

meist 24 bis 48 Stunden nach Transfektion das höchste Expressionslevel erreichen (Storhas et al. 2013). Die transiente Transfektion ist zudem besonders dazu geeignet, hohe intrazelluläre Konzentrationen eines gewünschten Genprodukts zu erzeugen (Buddecke 2002).

In dieser Arbeit sollte die transiente Transfektion zudem eingesetzt werden, um Zellen mit unterschiedlichen Plasmid-Gehalten, ergo mit verschiedenen ALK-Rezeptormengen herzustellen. Da die Aufnahme der Plasmide dabei zufällig erfolgt, entsteht innerhalb der Zellen eine Bandbreite aufgenommener exogener DNA. Auf diese Weise konnte eine „Messreihe“ verschiedener ALK-Expressionslevel produziert werden.

1.3.4.1.4.2 Lipofektion als Transfektionsmethode

Die Lipofektion ist eine verbreitete Methode der Geneinschleusung in Zellen. Die Technik beruht auf kationischen Lipidmolekülen, welche unilamelläre Liposomen formen (Felgner et al. 1987, Felgner et al. 1994, Wiesenhofer und Humpel 2000, Ohki et al. 2001, Sariyer 2013). Die unilamellären Liposomen können die einzubringende DNA umschließen (Felgner et al. 1987). Diese Liposomen-DNA-Komplexe fusionieren bei Applikation auf die Zielzelle mit der Zellmembran und die DNA gelangt in den Zellkern (Mühlhardt 2013).

Die dazu benötigten Lipidmoleküle sind in Form einer Transfektionsreagenz als lyophilisierter Lipidfilm zu erwerben (Mühlhardt 2013). Als solches Transfektionsreagenz sollte in dieser Arbeit Fugene-6 zum Einsatz kommen. Die Anwendung sollte im optimalen Verhältnis von 3:1 zur DNA erfolgen, da Fugene sonst toxisch wirken kann. Die Transfektion mit Fugene-6 ist dabei noch eine der am wenigsten toxischen Methoden der DNA-Transfektion in Zellen. Fugene-6 von Promega erbringt zudem eine gute Transfektionseffizienz in neuronalen Zellkulturen (Sariyer 2013), zu welchen die SK-N-AS-Zellen ebenfalls zählen.

1.3.4.1.5 Mikroskopie

Um messbare Daten der transfizierten Zellen zu generieren, sollten sowohl Aufnahmen mit dem Weitfeld- als auch mit dem konfokalen Mikroskop erfolgen.

1.3.4.1.5.1 Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie

Um die unter 1.3.4.1.3 genannten Fluoreszenzfarbstoffe zu erfassen, sollte ein Fluoreszenzmikroskop zum Einsatz kommen. Das Fluoreszenzmikroskop ähnelt dabei einem gewöhnlichen Lichtmikroskop. Im Gegensatz dazu durchtritt das Licht jedoch in der Fluoreszenzmikroskopie zwei Filtersysteme. Der erste Filter selektiert die Wellenlängen, die den Fluoreszenzfarbstoff der zu untersuchenden Proben anregt (Alberts et al. 2012). Die Anregung von GFP erfolgt dabei mit Licht der Wellenlänge 455 nm und von Cy3 mit Licht der Wellenlänge 530 nm (Majoul et al. 2006). Danach fallen die angeregten Elektronen des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs spontan in ihren Grundzustand zurück, emittiert wird dabei Licht mit einer größeren Wellenlänge als das der Anregung (Vögtle et al. 2007). Die emittierten Wellenlängen treten schließlich durch den zweiten Filter, welcher jedoch die Wellenlängen der Anregung blockiert (Alberts et al. 2012).

Der Begriff der Weitfeldmikroskopie beschreibt dabei jegliche Art der Mikroskopie, in der bei der Bildentstehung kein Abtasten der Probe mit einem Scanner stattfindet, sondern das Bild direkt durch die Linse des Mikroskops entsteht. Dieses Bild kann zudem auf eine Kamera projiziert werden (van Munster und Gadella 2005).

Auf diese Weise sollten Aufnahmen der transfizierten Zellen unter dem Weitfeldmikroskop erstellt werden, welche deren Fluoreszenzintensitäten für die beiden Farbstoffe GFP und Cy3

wiedergeben. Die Intensität des GFP-Bildes sollte dabei den ALK-Rezeptorstatus verkörpern und das Cy3-Bild die Gesamtheit des Phosphotyrosins der einzelnen Zelle.

1.3.4.1.5.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

In der konventionellen Mikroskopie wird die ganze Probe beleuchtet und über eine vergrößernde Optik abgebildet. In der konfokalen Mikroskopie hingegen tastet lediglich ein einziger Lichtfokus die zu untersuchende Probe ab. Dieser fällt mit dem Fokus des Detektors zusammen. Daher stammt die Bezeichnung „konfokal“ (Gmeinwieser 2006). Der Detektor blendet auf diese Weise Signale außerhalb der Fokusebene aus (Wegerhoff 2015). Das entstehende Bild ergibt sich aus zusammengesetzten Bildpunkten, die bei dem beschriebenen Abrastungsvorgang, dem sogenannten *scannen*, entstehen (Gmeinwieser 2006). Die konfokale Mikroskopie verbindet dabei „die hohe Auflösung eines Lichtmikroskops quer zur optischen Achse des Mikroskops (d.h. in der x-y-Ebene) mit einer vergleichbar hohen Auflösung in der z-Richtung“ (Demtröder 2013, S.372).

In modernen konfokalen Systemen kommen dabei zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen Laser unterschiedlicher Wellenlänge zur Anwendung. Das zu untersuchende Präparat wird wie beschrieben mit einem fokussierten Laser abgetastet, mit anderen Worten „gescannt“. Die Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe des Präparats werden im Anschluss durch einen lichtempfindlichen Sensor detektiert, in diesem Falle durch eine Photomultipliertube (PMT) (Wegerhoff 2015).

Dabei sollte hier bei den Aufnahmen eine sequenzielle Anregung und Akquisition erfolgen, um ein Überlappen der Emissionsspektren der beiden Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Auf diese Weise sollte dieses als *bleed through* bezeichnete Phänomen (Hibbs et al. 2006) umgangen werden.

Insgesamt sollten hier durch den Einsatz der konfokalen Mikroskopie die Präparate in optische Schnitte zerlegt und zudem eine gesteigerte Auflösung erzielt werden (Wegerhoff 2015).

1.3.4.1.5.2.1 Aufnahmen zur Beurteilung von Zytomorphologie und Fluoreszenzverteilung

Diese Eigenschaften sollten zur Beurteilung der Zytomorphologie genutzt werden. Die entsprechende Intention bestand in der Gewinnung von Informationen über die Verteilung der Fluoreszenz auf die Zellmembran, respektive das Zytosol durch die schichtweise Betrachtung der Zellen „im Querschnitt“.

Zu diesem Zwecke sollten zudem Z-Stacks erstellt werden. Z-Stacks bezeichnen schrittweise erfolgende Aufnahme verschiedener Bildebenen einer Probe, wodurch diese in ihrem gesamten Volumen visuell dargestellt werden kann (Center for advanced microscopy, Northwestern University).

1.3.4.1.5.2.2 Acceptorphotobleaching-Aufnahmen zur FRET-Messung

Des Weiteren sollte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie die Messung eines *fluorescence* oder auch *Förster resonance energy transfer* (FRET) (Gerritsen et al 2006) erfolgen. Dies erforderte die Erstellung von Acceptorphotobleaching-Aufnahmen.

1.3.4.1.5.2.2.1 FRET-Theorie

Vor über als 50 Jahren entdeckte der deutsche Wissenschaftler Förster, dass sich die spektralen Eigenschaften zweier Fluoreszenzfarbstoffe auf bestimmte Weise verändern, sobald diese sich in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Dabei beschrieb er, dass ein Donor aufgrund von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen kürzer im angeregten Zustand verweilt, wenn sich in nächster Nähe ein Acceptor befindet (Förster 1948, Förster 1949, Majoul et al. 2006). Voraussetzung dabei ist unter anderem, dass sich das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Acceptors überlappen (Majoul et al. 2006).

Wie unter 1.3.4.1.3 bereits erwähnt, bilden GFP und Cy3 ein gut funktionierendes Donor-Acceptor-Paar, wobei GFP den Donor und Cy3 den Acceptor darstellt (Bastiaens und Squire 1999, Ng et al. 1999, Day 2010). Die Energieübertragung erfolgt vom Donor auf den Acceptor (Majoul et al. 2006). FRET beschreibt dabei, dass der Donor nach Anregung bei der Rückkehr in seinen Grundzustand nicht durch Strahlung, sondern via Dipol-Dipol-Wechselwirkung Energie an den Acceptor überträgt (Helms 2008). Hierbei ist eine direkte Beobachtung des FRET-Phänomens nicht möglich, FRET ist lediglich unmittelbar nach dem eigentlichen Energietransfer zu detektieren (Majoul et al. 2006). Bezüglich GFP und Cy3 ergibt sich ein messbares FRET-Signal, wenn deren Distanz bis zu etwa 9 nm beträgt (Wouters und Bastiaens 1999).

In dieser Arbeit sollte nun, wie bereits erläutert, in den transfizierten Zellen der ALK-Rezeptor an GFP gekoppelt exprimiert und das Phosphotyrosin der Zelle mit Cy3-tragenden Antikörpern opsoniert werden. Auch die Tyrosinphosphorylierung des ALK-Rezeptors würde dabei Cy3-markiert. Wäre nun ein FRET-Signal zu detektieren, würde dies einen Abstand von circa 9 nm zwischen dem GFP der ALK und einem phosphorylierten Tyrosin beweisen. Mit Hilfe der FRET-Messung kann somit nanometergenau die unmittelbare Nähe zweier Moleküle angegeben werden. Dies ermöglicht wiederum Rückschlüsse auf deren molekulare Interaktionen (Gerritsen et al. 2006).

Aufgrund dieses geringen Abstands handelt es sich bei dem entsprechenden Phosphotyrosin höchstwahrscheinlich um einen phosphorylierten Tyrosinrest der ALK-Kinasedomäne und nicht etwa um beispielsweise ein im Zytosol vorliegendes Phosphotyrosin. Ergo wäre die detektierte FRET-Effizienz der Phosphorylierung des ALK-Rezeptors gleichzusetzen. Auf diese Weise sollte die Autophosphorylierung der verschiedenen ALK-Varianten quantifiziert und vergleichbar gemacht werden.

1.3.4.1.5.2.2.2 Acceptorphotobleaching

Zu besagter Quantifizierung sollte eine Ermittlung der FRET-Effizienzen erfolgen. Eine gute Möglichkeit zur Bestimmung der FRET-Effizienz besteht in der Detektion der Donor-Emission sowohl vor als auch nach dem selektiven Photobleaching der Acceptors-Fluoreszenz (Bastiaens et al. 1996, Bastiaens und Jovin 1996, Bastiaens und Jovin 1998, Wouters et al. 1998, Wouters et al. 2001), dem sogenannten Acceptorphotobleaching.

Liegt dabei ein *fluorescence resonance energy transfer* von Donor zu Acceptor vor, nimmt die Fluoreszenz des Donors nach dem Ausbleichen des Acceptors zu, da der Acceptor dabei inaktiviert wird (Majoul et al. 2006).

Ebenso wie wiederholtes konfokales Scannen (Bernas et al. 2004), führt dabei auch die Erhöhung der Anregungs-Intensität sowie –Dauer zur Destruktion der Fluoreszenz (Vigers et al. 1988, Johnson 2006). In dieser Absicht sollte hier beim Acceptorphotobleaching die Laser-

leistung des Cy3-anregenden 559 nm Lasers 100% betragen, statt der für die konfokalen Aufnahmen eingestellten 3%.

Anhand der Zunahme der Fluoreszenzintensität des Donors können Rückschlüsse auf die FRET-Effizienz gezogen werden (Wouters et al. 1998, Llopis et al. 2000, Chan et al. 2001, Kenworthy 2001, Mochizuki et al. 2001, Sato et al. 2002, Gu et al. 2004, van Munster et al. 2005). Dies sollte hierbei mit einer von Prof. Dr. Wouters programmierten Software zur Auswertung der FRET-Effizienz aus Acceptorphotobleaching-Aufnahmen erfolgen.

1.3.4.1.6 Pathscan: Sandwich-Immunoassay

Wie unter 1.3.3 geschildert, bestand das Vorhaben dieser Arbeit des Weiteren in der Ergründung der intrazellulären Signalwege der zellulären ALK-Modelle der Wildtyp-, F1174L- und I1250T-ALK. Zur Umsetzung dessen sollten *Pathscan*-Versuche von Cell-Signaling durchgeführt werden.

Dieses Versuchskit beinhaltet neben den benötigten Reagenzien einen *Array slide*. Dieser bezeichnet im Wesentlichen einen Objektträger, auf welchem in bestimmter Anordnung Antikörper in Feldern aufgetragen sind. Die mit den verschiedenen ALK-Varianten exprimierenden Zellen werden jeweils lysiert und aufgebracht. Das Prinzip dieses Versuchs entspricht einem Sandwich-Immunoassay (Cell Signaling).

Dabei liegt ein „Fängerantikörper“ an eine feste Phase gebunden vor. Das mit dem Fängerantikörper reagierende Antigen, der Analyt, wird in Lösung zugeführt. Die Reaktion zwischen Fängerantikörper und Analyt wird schließlich durch einen im Überschuss eingesetzten, markierten Sekundärantikörper ausgelesen (Hering und Schönfelder 2012).

Der Pathscan-Versuchsaufbau ermöglicht hierbei die Untersuchung 18 verschiedener Signalmoleküle, auch *targets* genannt. Davon werden zwei Moleküle in gespaltener Form detektiert, alle übrigen jedoch im phosphorylierten Zustand. Der Sekundärantikörper trägt dabei einen Fluoreszenzfarbstoff. Über eine Messung der Fluoreszenzintensität ist schließlich eine Quantifizierung der Phosphorylierung der einzelnen Signalmoleküle möglich (Cell Signaling).

Für die Protein-Interaktionen innerhalb einer Zelle ist die Protein-Phosphorylierung von entscheidender Bedeutung (Palacios-Moreno et al. 2015). Anhand dieses Versuchs sollten letztendlich Erkenntnisse gewonnen werden, welche Signalmoleküle besonders aktiv, sprich vermehrt phosphoryliert vorliegen.

Unter den 18 untersuchten Signalmolekülen fanden sich dabei unter anderem wichtige Vertreter des PI3K/Akt-, des JAK/STAT- und des Ras/MAPK-Signalwegs. Aufgrund der Favorisierung dieser Signalkaskaden in der Literatur sollte auf die entsprechenden Moleküle besonderes Augenmerk gelegt werden.

1.3.4.1.6.1 FACS: Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)

Um im Pathscan-Versuch genauere Ergebnisse zu erhalten sollte nach der ersten Versuchsdurchführung ein weiterer Durchgang mit sortierten Zellen erfolgen. Konkret bedeutet dies, dass eine Passage der Zellen nach der transienten Transfektion und 24-stündiger Expressionszeit nach GFP-positiven, sprich transfizierten und GFP-negativen, untransfizierten Zellen aufgetrennt würde.

Dies sollte mittels FACS erfolgen, dem fluorescence activated cell sorting oder auch Durchflusszytometrie genannt. Mit diesem Verfahren können Zellen mit bestimmten molekularen oder physikalischen Eigenschaften gezählt und getrennt werden (Mulisch 2015). GFP bildet dabei ein geeignetes Markerprotein, um Zellen aus einer gemischten Population auszusortieren (Bevan und Rees 2006).

Das Prinzip der Methode besteht darin, dass einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom transportiert werden. Darin passieren die Zellen nacheinander einen Laserstrahl. Trägt die Zelle einen von dem Laserstrahl angeregten Fluoreszenzfarbstoff, so emittiert dieser nach der Exzitation längerwelliges Licht. Dieses wird durch entsprechende Filter abgetrennt und durch eine Photomultipliertube als elektrischer Impuls registriert (Renz und Gierten 2013). Um die entsprechenden Zellen aufzufangen, werden diese nach dem Gang durch den Laserstrahl in einen mit jeweils positiver oder negativer Ladung versehenen Flüssigkeitsfilm gehüllt. Durch ein elektrisches Feld werden die jeweilig umhüllten Zellen anschließend entlang ihrer Ladung in Auffanggefäße geleitet (Mulisch 2015). Auf diese Weise konnten transfizierte und untransfizierte Zellen selektiert und spezifisch untersucht werden.

Entsprechend sollte den Ergebnissen dieser verbesserten Pathscan-Versuchsdurchführung mit ausgelesenen Zellen eine größere Gewichtung zukommen als der ersten Durchführung mit unsortierten Zellen.

1.3.4.1.7 ERK-Inhibitor: FR180204

Wie unter 1.3.3.1 beschrieben sollte getestet werden, ob eine Inhibition der Signalmoleküle ERK1 und ERK2 Auswirkung auf die Phosphorylierung der mit den verschiedenen ALK-Varianten transfizierten Zellen hat. Dazu wurde FR180204, ein ATP-kompetitiver, selektiver Inhibitor von ERK 1 und 2 eingesetzt. Dessen mittlere inhibitorische Konzentration beträgt für ERK1 0,51 μM und für ERK2 0,33 μM (Ohori et al. 2005). Um beide Moleküle zuverlässig zu inhibieren, sollte FR180204 mit einer Konzentration von 10 μM eingesetzt werden. Zudem sollten nicht-inhibierte Zellen als Kontrollen den Versuch durchlaufen, um die Ergebnisse zu validieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer und Lösungen

2.1.1.1 Lösungen für die Zellkultur

Substanz	Hersteller
Poly-L-lysine hydrobromide	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Foetal Calf Serum	PAA, Pasching, Österreich
0.05% Trypsin-EDTA	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol vergällt	Chemie-Vertrieb Hannover, Hannover, Deutschland
PBS (10x), pH 7,4	Gibco, Darmstadt, Deutschland
PBS 1x	
PBS (10x), pH 7,4 100 ml	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Aqua bidest. 900 ml	

Tab. 1: Lösungen für Zellkultur

2.1.1.2 Fixierlösung

Substanz	Hersteller
Paraformaldehyd (PFA) 8%	Ridel-de Haën, Seelze, Deutschland

Tab. 2: Fixierlösung

2.1.1.3 Chemikalien für die Transfektion

Produkt	Hersteller
Dulbecco's modified Eagle's medium +Glutamax 500 ml	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Fugene-6 Transfection Reagent	Promega, Madison, Wisconsin, USA
OmicsLink Expression Clone EX-T1863-M03	GeneCopoeia, Rockville, Maryland, USA
DNA	
ALK-GFP	Die bereits vorliegenden DNA-Plasmid-Konstrukte wurden von Gertrude Bunt mittels gezielter Mutagenese aus dem Expressionsklon EX-T1863-M03 hergestellt.
F1174L	
R1275Q	
Y1604F	
I1250T	
Hy Pure Molecular Biology Grade Water	Thermo, Waltham, Massachusetts, USA

Tab. 3: Chemikalien für die Transfektion

2.1.1.4 Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbung

Substanz	Hersteller
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Quench Buffer	

100 mM Glycin 3,75 g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua bidest. 400 ml	
10x PBS 50 ml	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Permeabilisation Buffer	
Tx-100 4,72 g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua bidest. 50 ml	
10x PBS 20 ml	Gibco, Darmstadt, Deutschland
0,2% Gelatine/PBS	
Gelatine 1g	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
1x PBS 400 ml	Gibco, Darmstadt, Deutschland

Tab. 4: Puffer und Lösungen für die Immunofluoreszenzfärbung

2.1.2 Zellen

2.1.2.1 Humane Neuroblastomzellen: SK-N-AS

Die humane Neuroblastomzelllinie SK-N-AS stammt von der Firma ATCC mit dem Hauptsitz in Manassas, Virginia, USA (Produkt ATCC-CRL-2137). Die Zellen wurden 1981 einer Knochenmarkmetastase eines 6-jährigen Kindes mit schwach differenziertem embryonalem Neuroblastom entnommen.

2.1.2.2 Murine embryonale Fibroblastenzellen: NIH/3T3

Die murine embryonale Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 stammt ebenfalls von der Firma ATCC (Produkt ATCC-CRL-1658).

2.1.3 Kulturmedien

Produkt	Hersteller
SK-N-AS-Kultivierungsmedium	
Dulbecco's modified Eagle's medium +Glutamax 500 ml	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Foetal Calf Serum 50 ml	PAA, Pasching, Österreich
MEM-NEAA (Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids) (100x) 5 ml	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin 5ml	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
NIH-3T3-Kultivierungsmedium	
Dulbecco's modified Eagle's medium +Glutamax 500 ml	Gibco, Darmstadt, Deutschland
100 mM Pyruvat 50 µl	Life Technologies, Carlsbad, California, USA
Penicillin-Streptomycin 5 ml	Sigma, St. Louis, Missouri, USA

Tab. 5: Kulturmedien

2.1.4 Zellinhibitoren

Produkt	Hersteller
ERK Inhibitor II, FR 180204	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tab. 6: Zellinhibitoren

2.1.5 Antikörper und Farbstoffe

Produkt	Spezies	Hersteller
Primärantikörper		
Anti-Phosphotyrosine, clone PY20	Maus	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Sekundärantikörper		
Cy TM 3-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG	Ziege	Jackson Immuno Research, West Grove, Pennsylvania, USA
Farbstoffe		
4'-6'-diamino-2-phenylindole (DAPI)		Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

Tab. 7: Antikörper und Farbstoffe

2.1.6 Spezielle Reagenzien und Kits

Pathscan Intracellular Signaling Array Kit (Fluorescent Readout)	Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, USA
Lysis Buffer 1x	
Array Diluent Buffer	
Array Blocking Buffer	
Array Wash Buffer 20x	
Detection AB-Cocktail	
Dylight 680 ®'-linked Streptavidin (10x)	
Array Slides	
16-Well-Gasket	Thermo, Waltham, Massachusetts, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	
BCA Reagent A	
BCA Reagent B	
Albumin Standard Ampules, 2 mg/ml	

Tab. 8: Spezielle Reagenzien und Kits

2.1.7 Zubehör

Zellkulturflaschen T25, T50	Nunc, Roskilde, Dänemark
6-Well-Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark
12-Well-Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well-Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Coverslips 15 mm	Thermo, Waltham, Massachusetts, USA
Einmal-Sterilglasspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning, Corning, New York, USA
Pipettierhilfe: Pipettboy acu	Integra, Zizers, Schweiz
Pipetten: pipetman P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge: Micro Centrifuge SD	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge: Labofuge 400R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge: Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge: Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tischzentrifuge: miniSpin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cellstar-Tubes 15 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar-Tubes 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Tubes 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger: Menzel-Gläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Gefriertubes Kryo-S	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Horizontalschüttler: Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Vortex: Reax control	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Gefriertruhe -150 °C: Ultra Low	Sanyo, Osaka, Japan
Gefrierschrank -20 °C: Liebherr Premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Sterilbank: Herasafe	Thermo, Waltham, Massachusetts
Inkubator: CO ₂ Incubator	Sanyo, Osaka, Japan

Tab. 9: Zubehör

2.1.8 Spezielle Geräte und zugehörige Computersoftware

Odyssey CLx Software: LI-COR Biosciences Odyssey imaging system	Li-cor, Lincoln, Nebraska, USA
Infinite M200 Pro Reader Software: Magellan 7	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskope	
Cell Observer Software: Axiovision	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Olympus Fluoview FV1000 Software: Fluoview Version 3.1, PicoQuant SymphoTime	Olympus, Tokio, Japan
Biorevo BZ-9000 Software: BZ-II Viewer, BZ-II Analyzer	Keyence, Osaka, Japan
Odyssey Sa Infrared Imaging System Software: Odyssey Sa Imager	Li-cor, Lincoln, Nebraska, USA
BD FACSAria II Software: BD facsdiva	BD Biosciences; Franklin Lakes, New Jersey, USA

Tab. 10: Spezielle Geräte und zugehörige Computersoftware

2.1.9 Weitere Computersoftware und Internetadressen

Igor pro	WaveMetrics, Lake Oswego, Oregon
ImageJ	Wayne Rasband for National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA
Ubuntu	Debian GNU/Linux
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	

Tab. 11: Weitere Computersoftware und Internetadressen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zur Vermeidung von Kontaminationen der kultivierten Zellen und der verwendeten Lösungen wurden alle hier genannten Vorgänge unter der Sterilbank Herasafe durchgeführt.

2.2.1.1 Auftauen der Zellen

Die jeweilige Gefriertube mit tiefgefrorenen Zellen wurde der Kühlbox(-120 °C) entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt des Gefriertubes in ein 15ml Tube mit 7 ml des jeweiligen Mediums gefüllt, anschließend fünf Minuten bei 437 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zell-Pellet in 5 ml des jeweiligen Mediums resuspendiert und in eine 25-cm²-Zellkulturflasche überführt, welche dann im Inkubator bei 37 °C und dem entsprechend benötigten CO₂-Gehalt platziert wurde. Um den vorhandenen Grundstock an Zellen konstant zu halten, wurden Zellen von möglichst niedriger Passagenummer in zwei 75 cm²-Zellkulturflaschen angezüchtet, und im weiteren Verlauf in 10 Gefriertubes zu je 1 ml in DMEM-Medium unter fünfprozentiger Zugabe von DMSO eingefroren.

2.2.1.2 Kultivieren der Zellen

Beide genutzten Zelllinien wurden vor dem Splitten, also dem Aufteilen in neue Kulturflaschen, mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst.

2.2.1.2.1 NIH/3T3-Zelllinie

Die NIH/3T3-Zellen der Firma ATCC wurden in 75 cm²-Flaschen in Kultur gehalten und zweimal wöchentlich weitergesetzt. Bei einer Konfluenz von 100% wurden jeweils 600 µl überführt. Die benötigte CO₂-Konzentration im Inkubator bei 37 °C betrug 5%.

2.2.1.2.2 SK-N-AS-Zelllinie

Die SK-N-AS-Zellen von ATCC wurden ebenfalls zweimal pro Woche gesplittet. Bei vollständiger Konfluenz wurden kontinuierlich 2,5 ml der mit Trypsin gelösten Zellen in eine neue 75-cm²-Zellkulturflasche überführt. Hierbei bedurfte es eines zehnpromtigen CO₂-Gehalts der 37 °C warmen Luft im Brutschrank.

2.2.2 Herstellung von Mikroskopie-Präparaten

In nachfolgend beschriebener Weise wurden für diese Arbeit je vier Versuche für Wildtyp-, F1174L-, R1275Q- und Y1604F-ALK-SK-N-AS-Zellen durchgeführt, für I1250T-ALK-SK-N-AS-Zellen wurden drei Versuchsdurchführungen zur weiteren Auswertung verwendet. Mit NIH/3T3-Zellen wurden mittels vier Versuchsdurchführungen Mikroskopie-Präparate hergestellt. Zudem wurden einmalig Zellen, zusätzlich zu der im Folgenden ausgeführten Prozedur,

mit einem Inhibitor behandelt und anschließend ebenfalls zu Mikroskopie-Präparaten verarbeitet.

2.2.2.1 Aussäen in 12-Well-Platten

Zunächst wurde in jede Kammer einer 12-Well-Platte der Firma Nunc ein Coverslip mit 15 mm-Durchmesser von Thermo Scientific eingebracht. Die Zellen wurden in gewünschter Anzahl der Zellkulturflasche entnommen und in einer 15 ml Tube mit dem entsprechenden Medium vermengt. Damit wurde die 12-Well-Platte mit je 1 ml pro Well befüllt. Bis zur Erreichung der für die Transfektion gewünschten Konfluenz von 50-70% wurde die 12-Well-Platte bei 37 °C im Inkubator platziert.

2.2.2.1.1 PLL-Coating

Vor der Aussaat der NIH/3T3-Zellen in eine 12-Well-Platte wurden deren Kammern, die die Coverslips enthielten, mit 1 ml Poly-L-Lysin pro Well versehen, dann für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Coverslips dreimal mit destilliertem Wasser gespült und einmal mit PBS gewaschen, jeweils mit zwei Minuten Einwirkzeit. Nach dem Absaugen der PBS-Lösung wurden die Zellen, wie im Vorherigen beschrieben, ausgesät.

2.2.2.2 Transfektion

Vorerst wurden die in DNA-Stocks eingefrorenen Plasmide, welche in der Arbeitsgruppe Wouters bereits vorlagen, mit Hy Pure Molecular Biology Grade Water von Thermo, jeweils auf die Konzentration von 1 µg/µl, zur Verwendung als Arbeitslösungen verdünnt. Zur Herstellung eines Transfektionsansatzes wurde unter der Sterilbank in 12 1,5 ml Tubes jeweils 1 µl der gewünschten DNA, 47 µl serumfreiem DMEM-Medium und 3 µl Fugene-6 pipettiert und mit dem Vortex Reax Control von Heidolph vermischt. Nach 30 Minuten Einwirkzeit wurden die verschiedenen Transfektionslösungen nach dem jeweiligen Schema in die Kammern der 12-Well-Platte eingetropf. Die 12-Well-Platte wurde anschließend für 24 Stunden bei 37 °C in den Inkubator gestellt.

2.2.2.3 Fixierung

Vorbereitend wurde die achtprozentige Paraformaldehydlösung von Rideld-de Haën mit PBS-Lösung auf 4% verdünnt. Aus der 12-Well-Platte wurden nach der 24-stündigen Expressionsphase das Medium und die darin eingetropfte Transfektionslösung entfernt und die transfizierten Zellen mit warmem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit der 4%-Paraformaldehydlösung bedeckt und 30 Minuten auf Eis gestellt. Nachfolgend wurde die Fixierlösung aus der 12-Well-Platte entfernt und PBS eingefüllt.

2.2.2.4 Immunofluoreszenzfärbung

Die mit PBS bedeckten, fixierten Zellen wurden zweimal mit Quenchbuffer gewaschen, dabei beim zweiten Durchgang fünf Minuten bei Raumtemperatur darin belassen. Anschließend wurden die Zellen mit Permeabilisation Buffer bedeckt, ebenfalls mit fünfminütiger Einwirkzeit. Darauf folgte ein Waschvorgang mit 0,2% Gelatine/PBS und zehnminütiger Inkubation. Der Primärantikörper Anti-Phosphotyrosine, clone PY20 von Millipore wurde in 0,2% Gelan-

tine/PBS im Verhältnis 1:1000 verdünnt und davon 12 Tropfen zu je 50 µl nach dem Muster einer 12-Well-Platte auf einen Streifen Parafilm pipettiert, der zuvor in einer Metallschale fixiert worden war. Auf diese Tropfen wurden die einzelnen Coverslips für eine Stunde zum Inkubieren gelegt. Daraufhin folgte ein viermalig wiederholtes Waschen der Coverslips mit 0,2% Gelatine/PBS mit jeweils fünf Minuten Einwirkzeit. Darauf erfolgte die Anwendung des Sekundärantikörpers CyTM3-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG von Jackson ImmunoResearch nach identischem Schema wie der Primärantikörper. Im Anschluss wurden die Coverslips analog nochmals viermal mit 0,2% Gelatine/PBS gewaschen. Darauf folgte ein zweimaliger Waschvorgang mit PBS-Lösung und jeweils fünf Minuten Einwirkzeit. Nach kurzem Eintauchen in destilliertes Wasser wurden die Coverslips mit Mowiol auf Objektträger aufgebracht und für acht Stunden bei 4 °C zum Trocknen gelegt.

2.2.3 Mikroskopie

2.2.3.1 Weitfeldmikroskopie

Die Einzelbildaufnahmen wurden mit dem Cell Observer und der Software Axiovision von Zeiss in zwei Dimensionen, wahlweise mit einem 63x oder einem 40x Ölimmersionsobjektiv, angefertigt. Zur Anregung von GFP wurde eine LED mit der Wellenlänge 455 nm eingesetzt und für Cy3 eine LED mit 530 nm. Die Belichtungszeiten in Millisekunden für GFP und Cy3 wurden für jedes Bild individuell festgelegt, um saturierte Pixel durch Überbelichtung zu vermeiden. Bei saturierten Aufnahmen wird das Detektionslimit überschritten und dies hätte zu falsch-niedrigen Ergebnissen hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten geführt (Hsiao et al. 2002). Vorhandene Fluoreszenz hätte somit nicht mehr korrekt erfasst werden können. Bei jeder Aufnahme im Weitfeldmikroskop entstanden zwei Bilder, eines bildet den GFP-Fluoreszenzkanal, das andere die Cy3-Fluoreszenz.

Wie bereits ausgeführt wurden Wildtyp-, F1174L-, R1275Q- und Y1604F-ALK-Zellen aus vier unabhängig voneinander hergestellten Mikroskopie-Präparaten aufgenommen, I1250T-ALK-Zellen aus drei. Zudem wurden Aufnahmen von NIH/3T3-Zellen aus insgesamt vier für sich stehenden Präparaten erstellt. Überdies erfolgten Aufnahmen von Präparaten, die wie weiter unten beschrieben, zusätzlich zu der gewohnten Methode, mit einem ERK-Inhibitor versetzt wurden.

2.2.3.2 Konfokale Mikroskopie

Die konfokalen Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop Olympus Fluoview FV1000 von Olympus angefertigt und mit Hilfe der Software Fluoview, Version 3.1, mit einer Bildgröße von 256x256mm rekonstruiert. Sowohl bei den Z-Stacks als auch beim Acceptor-photobleaching kam ein 60x Ölimmersionsobjektiv zur Anwendung. GFP wurde hierbei mit einem Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm mit einer Laserleistung von 1,5% angeregt, detektiert wurde zwischen 500 und 545 nm. Zur Anregung der rot leuchtenden Fluoreszenz Cy3 wurde ein Laser mit 559 nm und 3% Leistung eingesetzt, wobei der Spektralbereich des Emissionsfilters zwischen 570 und 670 nm lag. Die konfokale Apertur blieb mit 800 µm stets vollständig geöffnet. Die Bilderfassung erfolgte sequenziell im Kalman-Modus, mit dessen Hilfe aus drei Messungen der Mittelwert pro aufzulösenden Pixel erfasst wurde. Die Spannung über dem PMT wurde sowohl für den GFP- als auch den Cy3-Kanal für jede Zelle individuell angepasst. Die Lesegeschwindigkeit betrug 8 µs/Pixel. Bei trivialen konfokalen Auf-

nahmen wurden jeweils zwei Bilder generiert. Darunter wurden die GFP-Bilder in einer grünen und die Cy3-Bilder in einer roten Farbskala abgedruckt.

2.2.3.2.1 Z-Stacks

Die Aufnahmen der Z-Stacks erfolgten mit den oben genannten Einstellungen und einer step size von 0,5 μm .

2.2.3.2.2 Acceptorphotobleaching

Hierbei wurde ein Anregungsintervall von 8000 ms verwendet, welches konstant gehalten wurde. Die zum Bleichen eingestellte Laserleistung des 559-Lasers betrug 100%. Zudem wurde versucht, ein gleichbleibendes Gesichtsfeld beizubehalten. Von Zellen, welche zuvor Wildtyp-ALK transfiziert worden waren, wurden von insgesamt 86 Zellen Acceptorphotobleaching-Aufnahmen gefertigt. Weiterhin wurden für 90 F1174L-ALK-Zellen, 89 Y1604F-ALK-Zellen, 79 R1275Q-ALK-Zellen und 80 I1250T-ALK-Zellen Acceptorphotobleaching-Versuche durchgeführt. Pro Acceptorphotobleaching-Versuch wurde durch die Software eine oib-Datei erstellt. Diese mittels beispielsweise ImageJ aufschließbare Datei gab vier Einzelbildern frei, darunter jeweils ein Donor-beziehungsweise Acceptorbild vor und nach dem Acceptorphotobleaching.

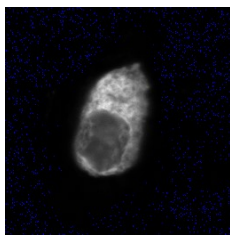


Abb. 1: Donor prebleached

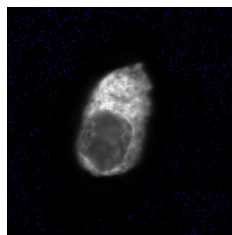


Abb. 2 Donor postbleached

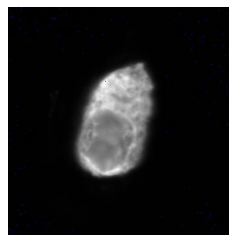


Abb. 3: Acceptor prebleached

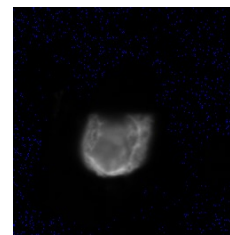


Abb. 4: Acceptor postbleached

Abb. 1 - Abb. 4: Je Acceptorphotobleaching-Versuch wird eine oib-Datei erzeugt, welche vier Bilder der jeweils aufgenommenen Zelle beinhaltet. Diese sind hier am Beispiel einer mit F1174L-ALK transfizierten SK-N-AS-Zelle exemplarisch dargestellt. In Abb. 1 zu sehen das Donor *prebleached* Bild, welches den Donor, also den GFP-Fluoreszenzkanal vor dem Acceptorphotobleaching zeigt. Daneben in Abb. 2 steht das Donor *postbleached*, welches entsprechend dem GFP-Signal nach dem Acceptorphotobleaching entspricht. Abb. 3 zeigt den Acceptor *prebleached*, Abb. 4 den Acceptor *postbleached*, beide Bilder illustrieren somit den Cy3-Kanal jeweils vor und nach dem Acceptorphotobleaching.

2.2.4 Auswertung der Aufnahmen

2.2.4.1 Auswertung der Weitfeldmikroskop-Aufnahmen

2.2.4.1.1 Auswertung der Zytomorphologie

Um die Morphologie der Zellen, die mit den verschiedenen ALK-Subtypen transfiziert wurden, zu beurteilen, wurden die Weitfeld-Aufnahmen mit dem Programm ImageJ geöffnet. Um die Zytomorphologie ausreichend zu erfassen, wurde zum Teil die Einstellung *Brightness and Contrast* modifiziert und damit Kontrast- und Helligkeit der einzelnen Aufnahmen optimiert. Wie bereits erwähnt, entstanden aus jeder Aufnahme mit dem Weitfeldmikroskop zwei Bilder, jeweils für den GFP- und den Cy3-Fluoreszenzkanal. Zur besseren Veranschaulichung wurde bei der Darstellung mittels ImageJ für Abbilder des GFP-Fluoreszenzkanals der

Lookup Table *green* und für Cy3 der Lookup Table *red* gewählt, ergo sind im Folgenden die GFP-Bilder in Grün- und die der Cy3-Bilder in Rottönen abgebildet.

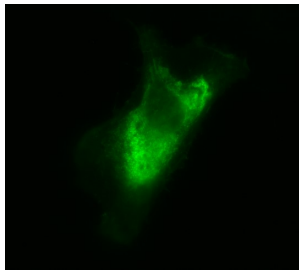


Abb. 5: GFP-Fluoreszenzkanal im Weitfeldmikroskop

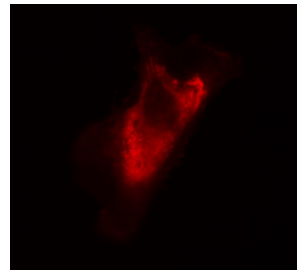


Abb. 6: Cy3-Fluoreszenzkanal im Weitfeldmikroskop

Abb. 5, Abb. 6: Fluoreszenzkanäle der Weitfeldmikroskopie. Abb. 5 stellt den GFP-Kanal dar, Abb. 6 das Cy3-Signal. Zur Veranschaulichung wurde für Abbilder des GFP-Kanals eine grüne und für die des Cy3-Kanals eine rote Farbskala gewählt.

2.2.4.1.2 Auswertung der Fluoreszenzintensitäten

Nach ihrer Akquisition wurden die Weitfeld-Bilder im tiff-Format als c0 und c1-Datei gespeichert, wobei die c0-Datei die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals enthält und die c1-Datei das Cy3-Signal.

Prof. Dr. Wouters programmierte die Software Ubuntu, die aus einer auf dem Betriebssystem Debian basierenden Sammlung von Linux stammt und zur Messung der Fluoreszenzintensitäten der Weitfeld-Aufnahmen dient. Das Programm registrierte dabei die einzelnen Zellen jeder Aufnahme voneinander getrennt und berechnete die Intensität der enthaltenen Fluoreszenz pro Zelle gemäß der eingesetzten Belichtungszeit, welche vorbereitend im Dateinamen der Bilder als Addendum eingefügt werden musste. Die errechneten Fluoreszenzintensitäten wurden von dem Programm als Textdokument ausgegeben. Mit diesem konnte die Darstellung mit der Software Igor pro erfolgen.

2.2.4.1.2.1 Darstellung in Igor pro

Mit dem Programm Igor pro wurden die einzelnen Cy3-Intensitäten gegen deren zugehörige GFP-Intensitäten aufgetragen. In dem daraus resultierenden Streudiagramm entsprach folglich jeder der Punkte einer der im Weitfeldmikroskop abgelichteten Zellen. Die Abszisse wurde jeweils im binären Logarithmus skaliert und ein Spektrum zwischen 0.15 und etwa 22.61 ausgewählt, beziehungsweise teilweisevergrößerte Abschnitte aus diesem Bereich dargestellt. Für die Ordinate wurde eine lineare Skalierung gewählt und ein Spektrum bis 18.71.

Bezüglich der SK-N-AS-Zellen wurden aus Wildtyp-ALK-exprimierenden Zellen insgesamt 2149 Zellen ausgewertet und dargestellt, für F1174L 1194, für R1275Q 1019, für Y1604F 1068 und für I1250T 1248 Zellen. Wie bereits beschrieben wurden diese Daten aus vier voneinander unabhängigen Versuchsdurchführungen erhoben, für die I1250-Mutante aus drei Versuchsdurchführungen. Aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Ergebnisse konnten die Daten jeder einzelnen Mutante vermengt werden. Bei der Herstellung von Mikroskopie-Präparaten mit NIH/3T3-Zellen wurden 601 Wildtyp-, 661 F1174L-, 748 R1275Q-, 636 Y1604F- und 810 I1250T-ALK-Zellen herangezogen und abgebildet. Im Rahmen des Versuchs, in welchem zuvor transfizierte SK-N-AS-Zellen mit ERKII-Inhibitor versetzt worden waren, wurden von inhibierten Wildtyp-Zellen 345, von inhibierten F1174L-Zellen 305, von inhibierten R1275Q-Zellen 462, von inhibierten Y1604F-Zellen 290 und von inhibierten I1250T-Zellen 386 aufgenommen und aufgetragen. Zudem wurden bei diesem Versuch auch nicht-behandelte Zellen

für Wildtyp und F1174L mitgeführt, von denen 454 Wildtyp-Zellen und 250 F1174L-Zellen erfasst wurden.

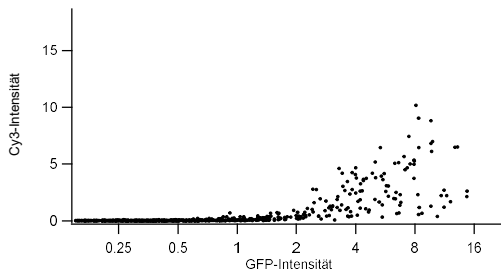


Abb. 7: Wildtyp-ALK-SK-N-AS-Zellen der ersten Versuchsdurchführung

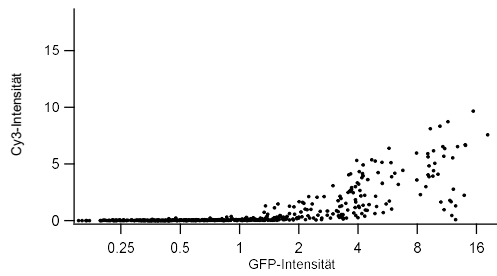


Abb. 8: Wildtyp-ALK-SK-N-AS-Zellen der zweiten Versuchsdurchführung

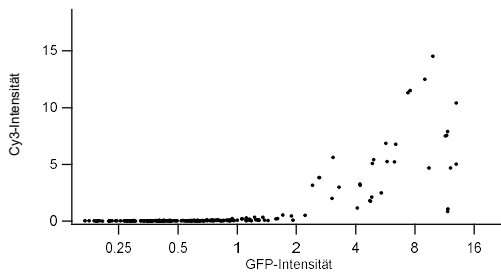


Abb. 9: Wildtyp-ALK-SK-N-AS-Zellen der dritten Versuchsdurchführung

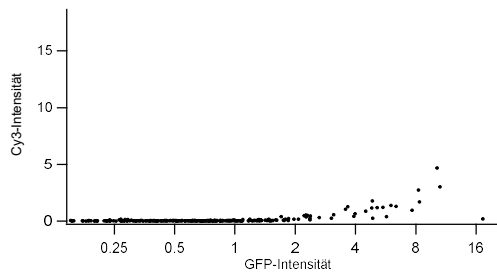


Abb. 10: Wildtyp-ALK-SK-N-AS-Zellen der vierten Versuchsdurchführung

Abb. 7 -Abb. 10: Überblick über die Ergebnisse von vier voneinander unabhängig hergestellten Mikroskopie-Präparaten Wildtyp-ALK exprimierender SK-N-AS-Zellen. Eine genaue Beschreibung und Analyse der Streudiagramme soll hier nicht erfolgen. Dieser Überblick soll lediglich die ähnliche Tendenz der vier Diagramme darlegen, aufgrund derer diese miteinander vermengt werden konnten.

2.2.4.2 Auswertung der konfokalen Aufnahmen

2.2.4.2.1 Darstellung der konfokalen Aufnahmen

Zur Beurteilung der Zytomorphologie wurden die mit dem Konfokalmikroskop erstellten Aufnahmen, ähnlich den Weitfeld-Aufnahmen, mit ImageJ geöffnet und hinsichtlich Kontrast und Helligkeit zur bestmöglichen Darstellung gebracht. Die Z-Stack-Aufnahmen kamen als Montage zur Darstellung, das heißt, dass die verschiedenen Ebenen der z-Achse nebeneinander in Reihen abgebildet wurden.

2.2.4.2.2 Bestimmung der FRET-Effizienzen

Auch zur Errechnung der FRET-Effizienzen wurde ein Datenblatt im Programm Ubuntu von Prof. Dr. Wouters erstellt. Mit diesem wurde aus den vier Aufnahmen jeder Zelle die Fret-Effizienz E in Prozent aus den Donor-Bildern vor (D_{pre}) und nach (D_{post}) dem Acceptorphotobleaching errechnet:

$$E(\%) = \frac{D_{post} - D_{pre}}{D_{post}}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung der FRET-Effizienz

Zudem stellte die Software die Differenz zwischen beiden Donor-Aufnahmen nochmals bildlich dar, sowie eine Kurve mit der Verteilung der Fret-Effizienzen. Auch eine Fret-Kontrolle außerhalb der *region of interest* wurde errechnet.

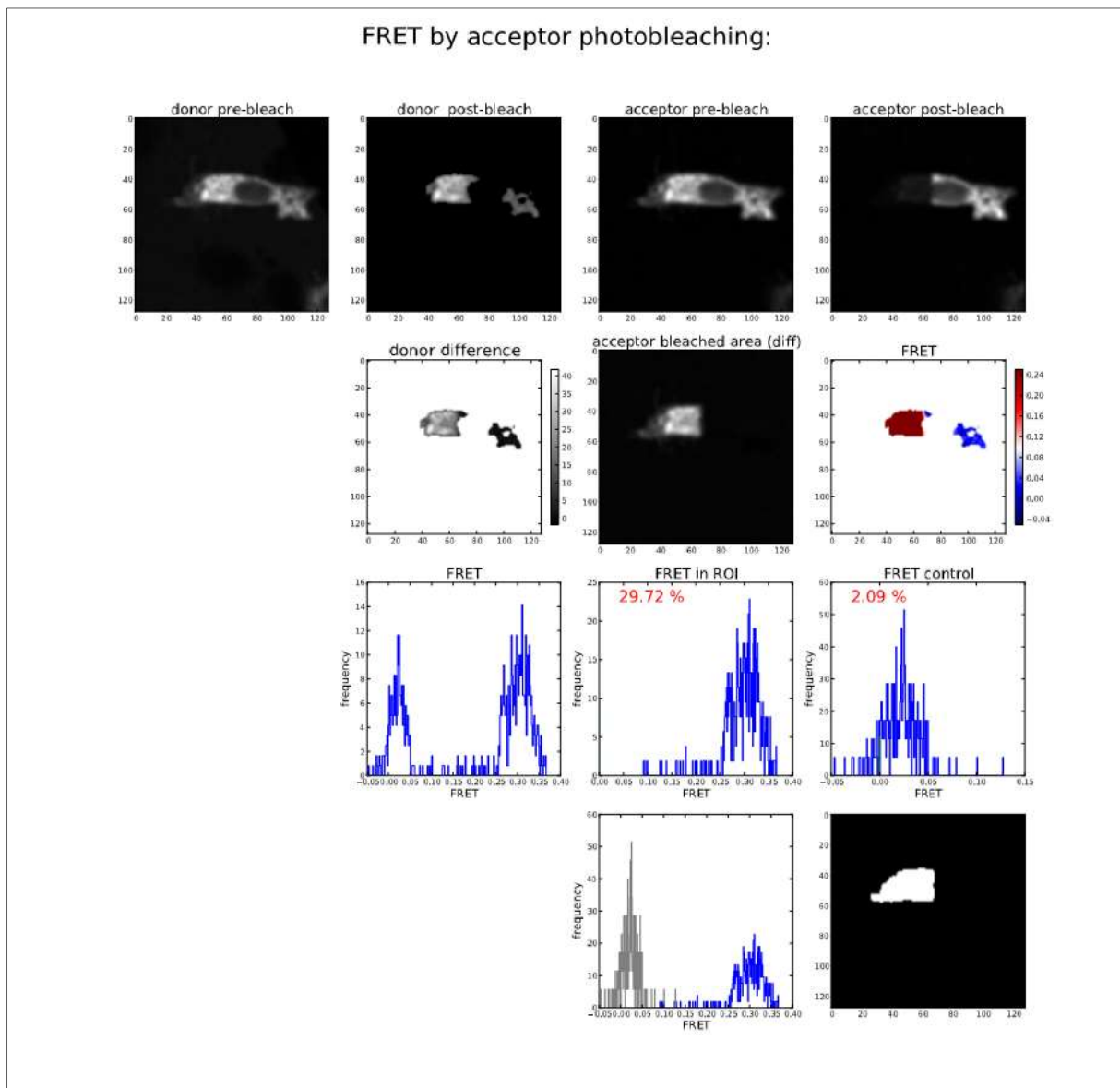


Abb. 11: Datenblatt einer FRET-Auswertung

Exemplarische Darstellung eines per Software erstellten Datenblattes zur Auswertung der FRET-Effizienz einer F1174L-ALK exprimierenden SK-N-AS-Zelle. Die Aufnahmen *donor pre-bleach* und *donor post-bleach* illustrieren das GFP-Signal vor und nach dem Prozess des Acceptorphotobleachings, *acceptor pre-bleach* und *acceptor post-bleach* das jeweilige Cy3-Signal. Der fehlende Teil der Zelle im *acceptor post-bleach*-Bild entspricht der durch das Acceptorphotobleaching verblichene Cy3-Fluoreszenz. Dieser Bereich der Zelle im Donor-, also GFP-Bild entspricht der ROI, der *region of interest*. Besteht nun ein *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), so steigt das GFP-Signal der ROI nach dem Acceptorphotobleaching des Cy3-Signals in der ROI. Der Anstieg des GFP-Signals wird durch die Graphik *donor difference* veranschaulicht. In diesem Beispiel hat das GFP-Signal durch das Ausbleichen von Cy3 in der ROI ein höheres Fluoreszenzsignal erreicht, es besteht also FRET zwischen GFP und Cy3. Dies wird durch FRET in ROI angegeben und beträgt in diesem Beispiel 29,72%.

Die bereits vorher erwähnten Acceptorphotobleaching-Aufnahmen der einzelnen ALK-Subtypen wurden nach beschriebenem Schema ausgewertet. Anschließend wurde für jede ALK-Mutante der Mittelwert aller erhobenen FRET-Effizienzen errechnet. Dies geschah für Wildtyp aus 86, für F1174L aus 90, für Y1604F aus 89, für R1275Q aus 79 und für I1250T aus 10 FRET-Messungen. In den übrigen 70 Acceptorphotobleaching-Aufnahmen der I1250-Mutante konnte kein *fluorescence resonance energy transfer* detektiert werden.

2.2.5 Pathscan

Das Pathscan Intracellular Signaling Array Kit, vereinfacht als Pathscan bezeichnet, von Cell Signaling wurde zweimalig angewendet. Im ersten Versuch kamen Lysate ohne vorherige Sortierung zum Einsatz, im Rahmen des zweiten Versuchs wurden Lysate angewandt, die zuvor mittels FACS sortiert worden waren. Der präzise Versuchsablauf beider Durchführungen soll im Folgenden dargelegt werden.

2.2.5.1 Pathscan mit unsortierten Lysaten(ohne FACS)

2.2.5.1.1 Herstellung der Lysate

Zunächst wurden SK-N-AS-Zellen in vier 12-Well-Platten ausgesät und im Verlauf jeweils eine Platte davon mit den Konstrukten WT, F1174L und I1250T transfiziert, wobei eine der Platten unbehandelt blieb. Nach bereits oben erwähnter 24-stündiger Expressionsphase wurden die Zellen mit Pathscan Lysis Buffer lysiert, wobei 30 µl pro Well Anwendung fand. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.2.5.1.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei den im Vorhergehenden genannten vier 12-Well-Platten wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz jeweils ein Coverslip in einer der Kammern mitgeführt. Dieser durchlief den identischen Prozess der Transfektion wie die übrigen Zellen der jeweiligen 12-Well-Platte. Damit erschloss sich nachfolgend aus einer Berechnung der Transfektionseffizienz der Zellen dieses Coverslips die Transfektionseffizienz der übrigen Zellen der 12-Well-Platte.

Nach 24-stündiger Expression wurden die einzelnen Coverslips nach bereits bekannter Methode fixiert. Die Herstellung der unter 2.2.5.1.1 beschriebenen Lysate erfolgte zum selben Zeitpunkt.

2.2.5.1.2.1 DAPI-Färbung

Nach der Fixierung wurden besagte Coverslips mit 4'-6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) von Molecular Probes gefärbt. Dabei wurde der Farbstoff im Verhältnis 1:1000 in PBS verdünnt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf die Coverslips gegeben. Anschließend wurde jeder Coverslip kurz in destilliertes Wasser getaucht und mit Mowiol auf einen Objektträger verbracht.

2.2.5.1.2.2 Bildgebung und Errechnung der Transfektionseffizienz

Mit dem Mikroskop Bioevo BZ-9000 und der Software BZ-II Viewer sowie BZ-II Analyzer von Keyence Corporation wurden von den Zellen jedes einzelnen Coverslips 15 Bilder erstellt. Diese wurden mit dem Programm ImageJ geöffnet und die Anzahl aller erfassten Zellen ausgezählt. Anschließend wurde das entsprechende Bild in eine 8-bit Datei umgewandelt und mit einem Medianfilter von 0,5 geglättet, zusätzlich kam ein Threshold-Filter zur Anwendung. Nach Umwandlung in ein *Watershed*-Binärbild wurde eine Einstellung für die ausschließliche Sichtbarmachung von Partikeln ab einer Größe von 1000 Pixeln gewählt. Die danach stehen gebliebenen Umrisse konnten als transfizierte Zellen gewertet und ausgezählt werden.

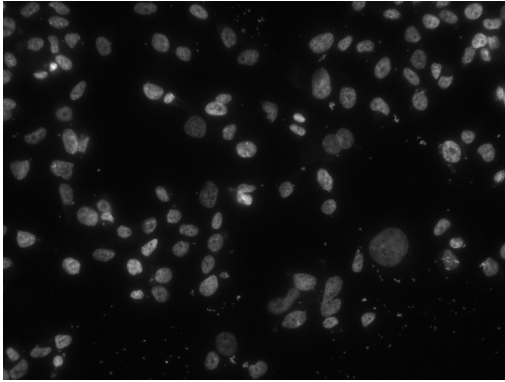


Abb. 12: Blickfeld 15 aus F1174L-ALK-Zellen

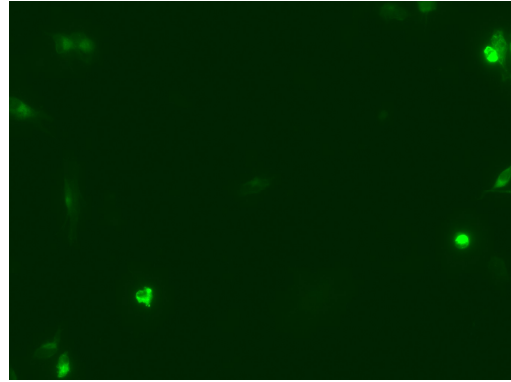


Abb. 13: Blickfeld 15 aus F1174L-ALK-Zellen nach Bildbearbeitung zur Auszählung der Transfektionseffizienz

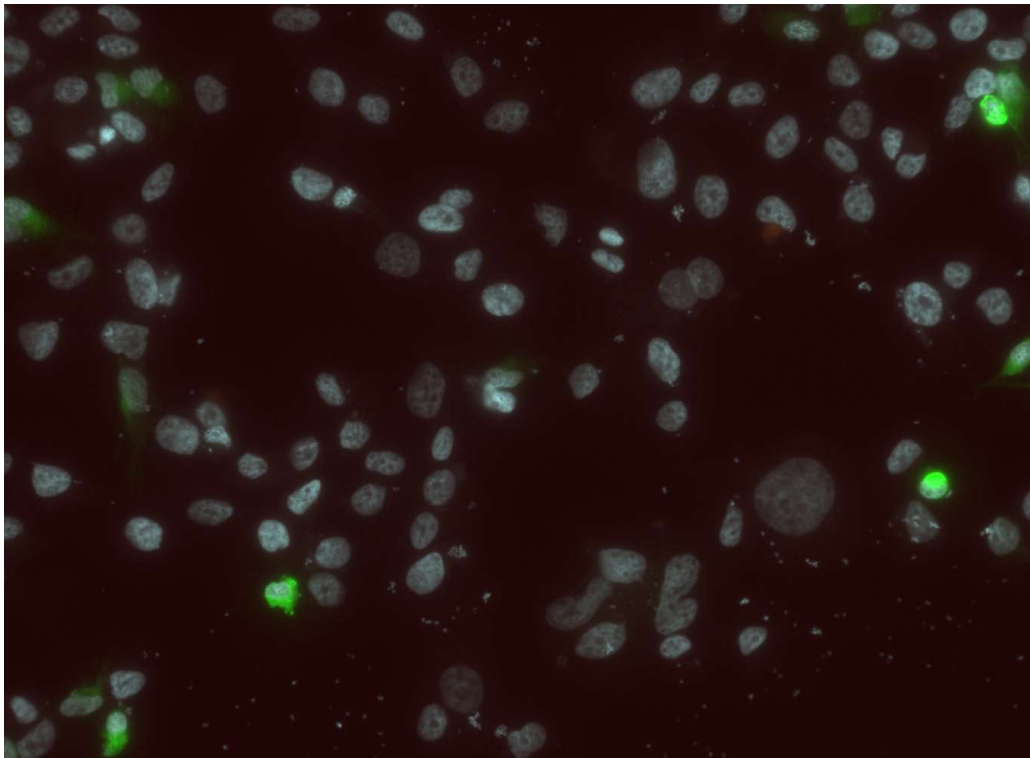


Abb. 14: Overlay von Abb. 12 und Abb. 13

Abb. 12 - Abb. 14: Aufnahmen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz. Dargestellt ist dabei oben links das Blickfeld 15 der F1174L-ALK-Zellen, worauf insgesamt 102 Zellen abgebildet sind. Rechts daneben ist das mit ImageJ zwecks Auszählung bearbeitete Bild. Zur Veranschaulichung wurde eine Darstellung in Grüntönen gewählt. Helligkeit und Kontrast wurden modifiziert, um alle transfizierten Zellen zu erfassen. Abb. 14 zeigt ein Overlay der beiden obigen Abbildungen.

Blickfeld	Gesamtzahl Zellen/Blickfeld	Transfizierte Zellen /Blickfeld
1	160	20
2	186	12
3	138	14
4	173	17
5	87	10
6	87	9
7	117	8
8	99	18
9	80	6
10	115	13
11	95	6
12	85	7
13	109	14
14	120	11
15	102	14
Summe	1753	179

Tab. 12: Exemplarische Auszählung für die Ermittlung der Transfektionseffizienz

Tab. 12: Aufgelistet sind 15 Blickfelder im Mikroskop Biorevo BZ-9000. Diese wurden abgelichtet und die entstandenen Bilder nachfolgend mit der Software ImageJ geöffnet. Anschließend erfolgte die Auszählung einerseits sämtlicher Zellen jedes einzelnen Blickfelds und andererseits der transfizierten Zellen jedes Blickfelds. Mit diesen Werten konnte im Folgenden die Transfektionseffizienz der einzelnen ALK-Subtypen errechnet werden. Diese Tabelle zeigt beispielhaft die Ergebnisse für die ALK-Mutante F1174L.

Aus der zu Anfang ausgezählten Gesamtzahl der Zellen eines jeden Bildes und der jeweiligen Anzahl von transfizierten Zellen ließ sich nun die Transfektionseffizienz in Prozent für jedes Plasmidkonstrukt in seinem jeweiligen Lysat errechnen.

$$\text{Transfektionseffizienz} = \frac{\text{Anzahl transfizierter Zellen}}{\text{Gesamtzahl erfasster Zellen}}$$

Formel 2: Ermittlung der Transfektionseffizienz

$$\text{Transfektionseffizienz(F1174L)} = \frac{179}{1753} = 0,10211 = 10\%$$

Formel 3: Exemplarische Errechnung der Transfektionseffizienz anhand der Mutante F1174L

2.2.5.1.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der in 2.2.5.1.1 beschriebenen Lysate wurde mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits von Thermo bestimmt. Dazu wurden zwei BSA-Eichstandardreihen in aufsteigender Verdünnung aus einem BSA-Stock der Konzentration 1 mg/ml und destilliertem Wasser nach vorgegebenem Schema in eine 96-Well-Platte pipettiert. Pro Lysat wurden ebenfalls zwei aufsteigende Verdünnungsreihen mit Lysis Buffer hergestellt und in die 96-Well-Platte gefüllt. Im Anschluss wurde rasch 200 µl der BCA-Reagenz, zusammengesetzt im Verhältnis 50:1 der Reagenz A zur Reagenz B, in jedes Well pipettiert und die 96-Well-Platte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Auslesen erfolgte mit dem Gerät infinite M200 Pro Reader und der Software Magellan 7 von Tecan bei einer Absorption von 562 nm. Anschließend wurde mit dem Programm Igor Pro eine Tabelle mit den Mittelwerten des BSA-Eichstandards hergestellt und eine BSA-Eichgerade aufgetragen, deren Steigung notiert wurde. Auch die gemittelten Werte der einzelnen Proben wurden in Tabellen eingetragen. Durch die daraus resultierenden Koordinaten wurde jeweils eine Gerade gelegt, deren Steigung

ebenfalls niedergeschrieben wurde. Die Proteinkonzentration der jeweiligen Proben errechnete sich schließlich folgendermaßen:

$$\text{Proteinkonzentration in } \mu\text{g/ml} = \frac{\text{Steigung der Geraden der jeweiligen Probe}}{\text{Steigung der Eichgeraden}}$$

Formel 4: Berechnung der Proteinkonzentration

Anschließend wurden die Lysate mit Pathscan Lysis Buffer auf eine einheitliche Konzentration hin verdünnt. Somit wurde eine Vergleichbarkeit der nun in identischer Konzentration vorliegenden Mutanten innerhalb des im Folgenden beschriebenen Versuchs geschaffen.

2.2.5.1.4 Präparation des Pathscan-Arrays

Aus dem Pathscan Intracellular Signaling Array Kit von Cell Signaling wurden zunächst Array Slide und Array Blocking Buffer auf Raumtemperatur gebracht. Der Array Wash Buffer wurde mit destilliertem Wasser, der Detection Antibody Cocktail und Dy-light 680-linked Streptavidin mit Array Diluent Buffer verdünnt und im weiteren Verlauf lichtgeschützt auf Eis gekühlt. Das 16-Well-Gasket wurde mit dem Array Slide verbunden. Die Kammern des 16-Well-Gaskets wurden mit 100 μl Array Blocking Buffer befüllt, mit Parafilm abgedeckt und für 15 Minuten auf dem Horizontal-Schüttler bewegt. Anschließend wurde der Array Blocking Buffer dekantiert und jeweils 75 μl der verdünnten Lysate in die jeweiligen Wells pipettiert, mit Parafilm bedeckt und über Nacht bei 4 °C auf dem Horizontalschüttler platziert. Die Proben wurden dabei entsprechend Abb. 15 auf die Felder des Array Slides aufgetragen.

untransfiziert	Wildtyp	F1174L	I1250T
untransfiziert	Wildtyp	F1174L	I1250T

Abb. 15: Schema der Auftragung unsortierter Proben auf den Pathscan Array Slide
Diese Darstellung veranschaulicht schematisch die Aufbringung der Proben, welche nicht mittels FACS sortiert wurden, auf die acht verwendeten Versuchsfelder des Pathscan Array Slides. Es wurden untransfizierte Zellen, Wildtyp-Zellen und die Mutanten F1174L und I1250T mit jeweils einer Kontrolle untersucht.

Am folgenden Tag wurden die Lysate aus dem 16-Well-Gasket entfernt und 100 μl Array Wash Buffer pro Well für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Vorgangs wurden 75 μl des vorbereiteten Detection Antibody Cocktail in jedes Well pipettiert, wiederum mit Parafilm abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Horizontalschüttler gestellt. Anschließend erfolgte ein viermaliger Waschvorgang mit je 100 μl Array Wash Buffer für je fünf Minuten. Danach wurden 75 μl des vorbereiteten Dy-light 680-linked Streptavidin in jedes Well gegeben, mit Parafilm abgedeckt und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler bewegt. Danach wurden die Wells analog wiederholt viermal gewaschen und der Array Slide konnte von dem 16-Well-Gasket gelöst werden. Nach 10-sekündigem Waschvorgang in destilliertem Wasser wurde der Array Slide zum Trocknen gelegt.

2.2.5.1.5 Fluorescent Readout

Mit dem Odyssey Sa Infrared Imaging System und der zugehörigen Software Odyssey Sa Imager von Li-cor wurde ein Bild vom Array Slide des Pathscan Intracellular Signaling Array

Kits aufgenommen. Dabei wurde die bestmögliche Auflösung von 20 μm pro Pixel gewählt und mit einer Wellenlänge von 700 nm detektiert.

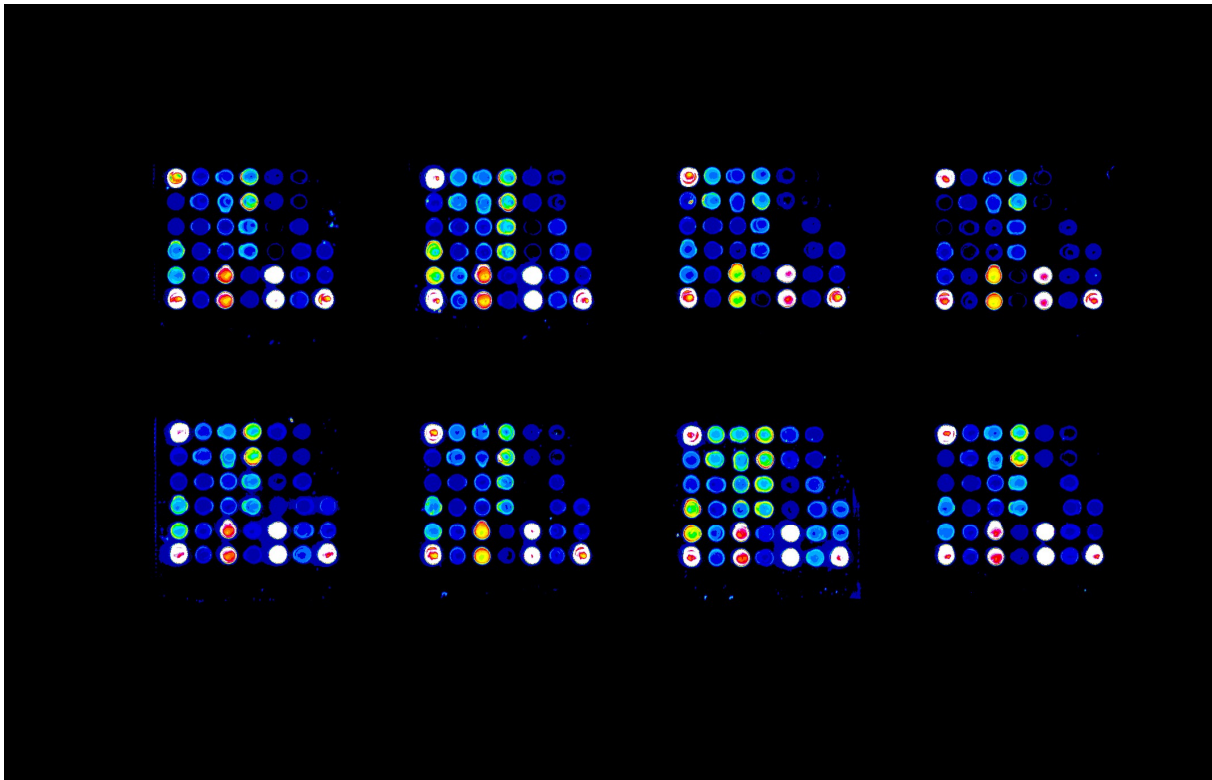


Abb. 16: Fluorescent Readout des Pathscan Array Slides (unsortierte Lysate)

Innerhalb der acht dargestellten Quadrate zeigen sich jeweils 42 Spots, die mit 18 verschiedenen Target-Antikörpern belegt sind. Dabei existieren für jeden Antikörper zwei nebeneinander liegende Spots. Die Position 1 und 6 in der ersten Spalte sowie Position 6 der siebten Spalte jedes Quadrats stellen Positivkontrollen dar, welche die korrekte Versuchsdurchführung belegen. Position 1,2 und 3 der siebten Spalte dienen als Negativkontrollen.

Die Aufnahmen wurden mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Zunächst wurde hierbei die Hintergrundfluoreszenz eliminiert. Dazu wurde der Mittelwert der Hintergrundfluoreszenz der Aufnahme des Pathscan Array Slides außerhalb der aufgetragenen Versuchsreagenzien ermittelt und von der gesamten Aufnahme subtrahiert. Dadurch konnten nach oben verfälschte Verhältnisse der Signalunterschiede durch die Wegnahme des „Hintergrundrauschens“ verhindert werden.

Anschließend wurden die einzelnen Quadrate des Array Slides untereinander quantitativ vergleichbar gemacht. Unter der Annahme, dass die Menge der Target-Antikörper, die bei der maschinellen Herstellung auf den Array Slide aufgebracht wird, nicht für jedes Quadrat identisch ist, wurden die acht Quadrate des Array Slides anhand ihrer Positivkontrollen untereinander geeicht. Dazu wurden die Fluoreszenzintensitäten der drei Positiv-Kontrollen pro Quadrat mit ImageJ gemessen und daraus ein Mittelwert errechnet. Dieser Mittelwert wurde für alle acht Quadrate bestimmt. Anschließend wurden die Quadrate 2 bis 8 mit dem Quotienten aus dem Mittelwert des ersten Quadrats und dem Mittelwert des jeweiligen Quadrats multipliziert. Damit konnte eine quantitative Vergleichbarkeit aller Punkte der acht Quadrate untereinander hergestellt werden.

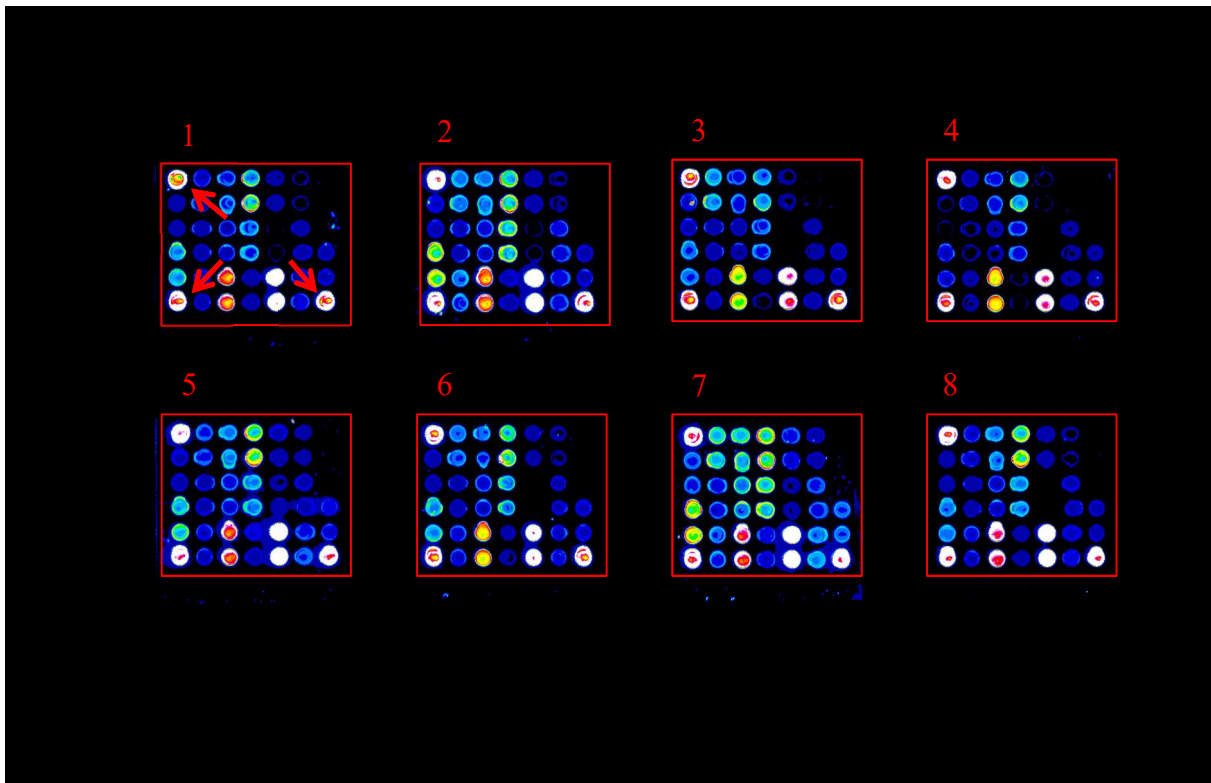


Abb. 17: Pathscan Array Slide mit Orientierungshilfen

Es stellen sich acht Quadrate dar. Die drei mit Pfeilen markierten Punkte sind die drei Positivkontrollen des ersten Quadrats. Nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz wurde mit Hilfe der Positivkontrollen eine quantitative Vergleichbarkeit zwischen den Quadraten hergestellt, indem der Mittelwert der Positivkontrollen jedes der Quadrate 2 bis 8 auf den Mittelwert des Quadrates 1 geeicht wurde.

Schlussendlich wurden die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Punkte jedes Quadrats mittels Image J bei konstant bleibender Messfeldgröße gemessen. Um alle Punkte präzise erfassen zu können, wurde mittels ImageJ Helligkeit und Kontrast modifiziert. Da sich jeder der 18 aufgetragenen Target-Antikörper eines Quadrats auf zwei nebeneinander liegenden Spots befand, wurden deren Werte gemittelt. Weiterhin wurde jede Mutante auf zwei Quadraten untersucht, unter denen wiederum ein Mittelwert für den jeweiligen Antikörper errechnet wurde. Die ermittelten Werte wurden anschließend mit dem Programm Excel graphisch dargestellt.

2.2.5.2 Pathscan mit sortierten Lysaten

2.2.5.2.1 Sortierung mittels FACS (Fluorescent activated cell sorting)

Um die Menge transfizierter Zellen in den Lysaten für den Pathscan zu erhöhen, wurden die transfizierten Zellen mittels FACS sortiert. Dabei kam das Gerät BD Facsaria II der Firma BD Biosciences mit der zugehörigen Software BD facsdiva, ebenfalls von BD Biosciences, zum Einsatz. In der Vorbereitung dafür wurden SK-N-AS-Zellen, wie oben beschrieben, in vier 12-Well-Platten ausgesät und nach dem Anwachsen jeweils einer Transfektion mit Wildtyp-, F1174L- und I1250T-Plasmiden unterzogen, wobei auch hierbei eine der Platten untransfiziert blieb. Nach 24-stündiger Expressionszeit wurden die Zellen aus den 12-Well-Platten geschabt und jeweils in 1,5 ml Tubes mit PBS überführt, die auf Eis kaltgestellt wurden. Mittels FACS wurden die transfizierten von den nicht-transfizierten Zellen der einzelnen Mutanten nach GFP in 1,5 ml Tubes sortiert, welche PBS enthielten und anschließend wieder auf Eis gekühlt wurden. Dabei entsprechen die nicht von der Transfektion affektierten Zellen den GFP-negativen Anteilen einer Probe und die transfizierten Zellen den GFP-positiven Anteilen. Eine

Probe mit untransfizierten Zellen wurde ebenfalls in das FACS-Gerät eingegeben, dabei wurden entsprechend nur GFP-negative Zellen erfasst. In der Kühlzentrifuge wurden die Tubes bei 4 °C für fünf Minuten mit 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die einzelnen Zellpellets in 78 µl Pathscan Lysis Buffer aufgenommen. Bis zur Durchführung des Pathscan wurden die Lysate bei -20 °C eingefroren. Dass die mittels FACS sortierten GFP-positiven Zellen der einzelnen Mutanten in annähernd gleicher Anzahl vorlagen erlaubt deren vergleichende Betrachtung in der Auswertung. Die GFP-negativen Anteile der Proben und die untransfizierten Zellen zeigten eine ähnlich hohe Anzahl, woraus im Folgenden eine Vergleichbarkeit dieser Proben hervorgeht. Unzulässig ist allerdings die vergleichende Betrachtung zwischen GFP-positiven und GFP-negativen Proben, beziehungsweise zwischen GFP-positiven und nicht-transfizierten Zellen aufgrund der quantitativen Unterschiede.

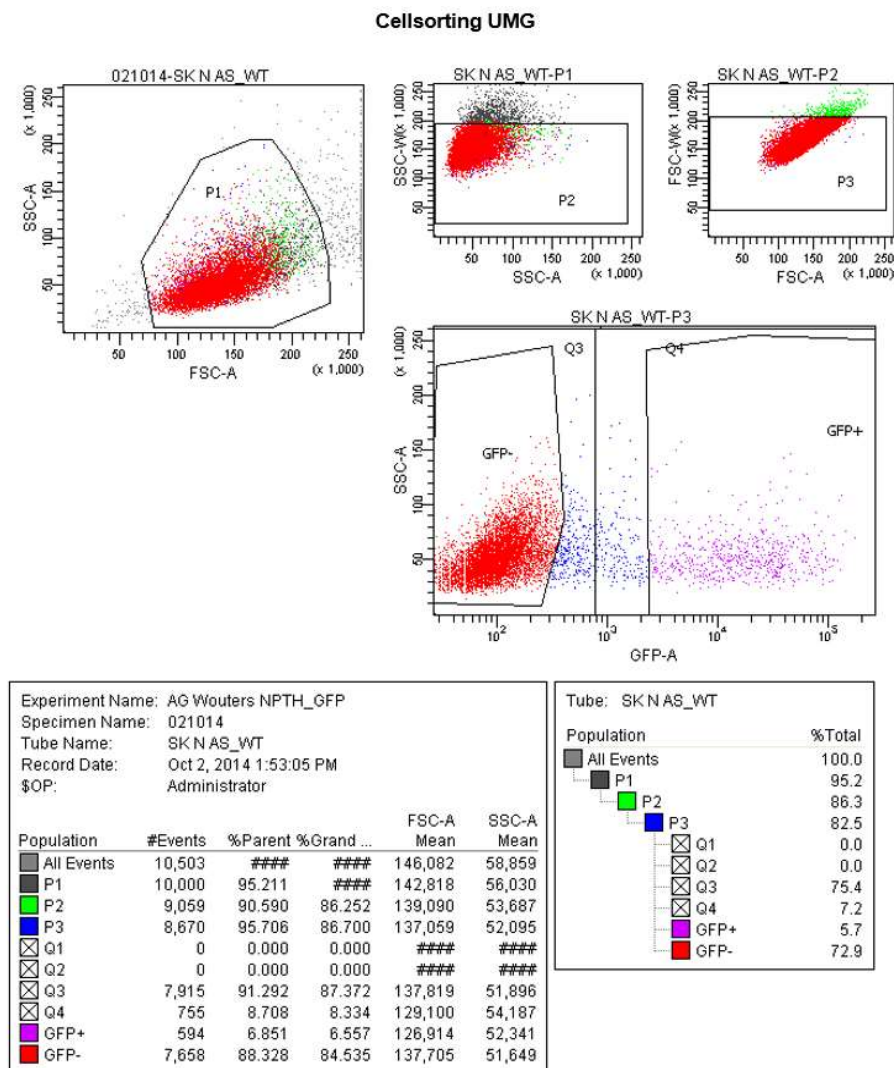


Abb. 18: FACS-Datenblatt für Wildtyp-ALK-Zellen
Beispielhafte Darstellung der FACS-Ergebnisse für mit Wildtyp-Plasmiden transfizierte SK-N-AS-Zellen.

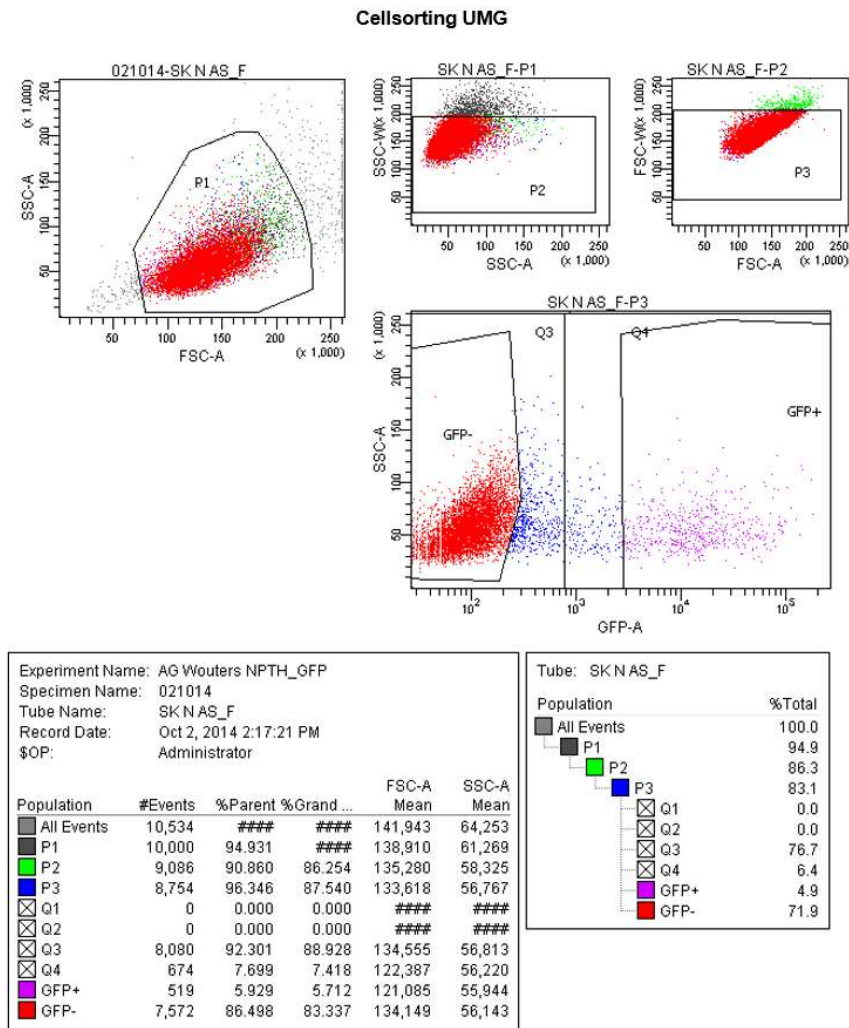


Abb. 19: FACS-Datenblatt für F1174L-ALK-Zellen
Dargestellt ist hier das Ergebnis des FACS-Vorgangs für die Mutante F1174L.

2.2.5.2.2 Durchführung des Pathscan

Die hergestellten Proben wurden nach folgendem Schema auf den Pathscan Array aufgetragen.

nur Reagenz	Wildtyp GFP-	F1174L GFP-	I1250T GFP-
untransfiziert	Wildtyp GFP+	F1174L GFP+	I1250T GFP+

Abb. 20: Schema der Auftragung sortierter Proben auf den Pathscan Array Slide
Schematische Darstellung der Anordnung der mittels FACS sortierten Proben auf dem Pathscan Array Slide. Im Feld oben links kam lediglich Versuchsreagenz ohne Zelllysate zur Anwendung, dieses Feld bildet somit den „Leerwert“. Weiterhin wurden die GFP-negativen Proben des FACS sowie die GFP-positiven, sprich transfizierten Zellen in lysierter Form aufgetragen. Unten links wurden nicht-transfizierte, also unbehandelte Zellen aufgebracht.

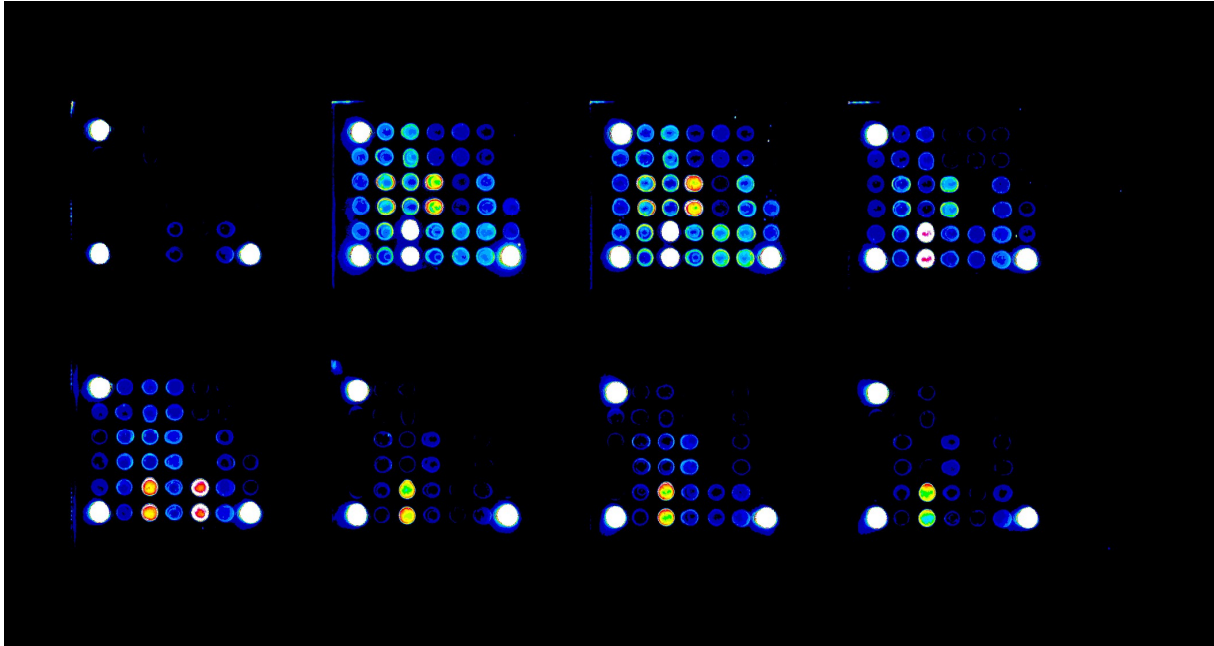


Abb. 21: Fluorescent Readout des Pathscan Array Slides (sortierte Lysate)

Aufnahme des mit sortierten Lysaten durchgeführten Pathscan nach Subtraktion des Hintergrundes und Normierung der Referenzspots. Im Quadrat oben links wurde nur Versuchsreagenz ohne Zellysate aufgetragen, nach rechts folgen die GFP-negativen Zellen von Wildtyp, F1174L und I1250T. Unten links wurde ein Lysat nicht-transfizierter Zellen aufgetragen, nach rechts analog die GFP-positiven Zellen von Wildtyp, F1174L und I1250T.

Die weitere Präparation des Pathscan-Arrays sowie Auslesen und Auswerten der Fluoreszenzintensitäten erfolgten nach identischem Schema wie bereits ausgeführt. Jedoch wurde bei dieser Auswertung für jedes der 18 untersuchten Targets ein „Leerwert“ aus dem Quadrat, welches nur Reagenz enthielt, ermittelt. Dieses wurde von dem jeweiligen Wert jedes anderen Quadrats subtrahiert. Somit konnte die Fluoreszenz, die lediglich durch die Reagenzien des Kits ausgelöst wurde, in der finalen Darstellung ausgeblendet werden.

2.2.6 Behandlung der Zellen mit ERK1/2-Inhibitor

Vorbereitend wurden SK-N-AS-Zellen in eine 12-Well-Platte ausgesät und nach oben beschriebener Methode mit den verschiedenen Plasmid-Konstrukten transfiziert. Dabei befanden sich Wildtyp und die F1174-Mutante jeweils zweimal nebeneinander, sodass im Anschluss eines der Wells mit Inhibitor behandelt werden konnte und das andere zum Vergleich verblieb. Nach 24-stündiger Expression wurden die Zellen mit Inhibitor behandelt. Hierzu wurde 1 mg des ERK-Inhibitors FR180204 von Calbiochem in 100 μ l DMSO gelöst und aliquotiert. Aus diesem Stock wurden 2 μ l in 6 ml Medium gelöst. Da die mittlere inhibitorische Konzentration von FR180204 wie einleitend erwähnt für ERK1 0,51 μ M und für ERK2 0,33 μ M beträgt (Ohuri et al. 2005) ist davon auszugehen, dass sowohl ERK1, als auch ERK2 durch die eingesetzte Konzentration des Inhibitors von 10 μ M sicher blockiert wird. Das Medium der zu behandelnden Wells wurde entfernt und durch jeweils 1 ml des Inhibitor-Medium-Gemischs ersetzt. Der Inhibitor inkubierte für sechs Stunden bei 37 °C. Danach wurden die Coverslips nach oben beschriebener Methode fixiert und einer Immunofluoreszenzfärbung unterzogen. Von den Präparaten wurden mit den oben beschriebenen Einstellungen Bilder mit dem Weitfeldmikroskop Cell Observer von Carl Zeiss aufgenommen. Nach Auswertung mit der Software Ubuntu konnten die Ergebnisse mit dem Programm Igor pro dargestellt werden. Für inhibierte Wildtyp-Zellen kamen 345, für inhibierte F1174L-Zellen 305, für inhibierte R1275Q-Zellen 462, für inhibierte Y1604F-Zellen 290 und für inhibierte I1250T-Zellen 386 Zellen zur Darstellung. Die Ergebnisse der einzelnen Mutanten ohne Inhibitor wurden jenen

mit Inhibitor zum Vergleich gegenübergestellt, darunter 454 nicht mit Inhibitor behandelte Wildtyp- und 250 unbehandelte F1174L-Zellen. Die inhibierten Mutanten R1275Q, Y1604F und I1250T hingegen wurden mit ihren Ergebnissen aus vorherigen, nicht-inhibierten Proben verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Fluoreszenzverteilung bei Wildtyp-ALK und den ALK-Mutanten F1174L, R1275Q, Y1604F und I1250T

3.1.1 Phosphotyrosin-Level versus GFP-Level

Die im Weitfeldmikroskop aufgenommenen SK-N-AS-Zellen, deren Cy3-Intensität gegen die Intensität im GFP-Fluoreszenzkanal in ein Diagramm aufgetragen wurde, wiesen hinsichtlich ihres Phosphotyrosingehalts erhebliche Unterschiede auf. Wie bereits erwähnt, stellt jeder einzelne Punkt eine der aufgenommenen Zellen dar. Der Einsatz der transienten Transfektion war an dieser Stelle bewusst gewählt worden. Durch die unregelmäßige Aufnahme des im Transfektionsreagenz zugegebenen ALK-Rezeptors, beziehungsweise dessen Mutanten, konnte eine Bandbreite an verschiedener Rezeptormenge in den Zellen erzeugt werden. Dadurch gelang es, die Abszisse breit abzudecken, ergo Zellen mit relativ wenigen und Zellen mit relativ vielen ALK-Rezeptoren zu vergleichen. Die Abszisse ist als GFP-Intensität gleichzusetzen mit der Menge an ALK-Rezeptor in der Zelle, da dieser mit GFP-Fluoreszenz versehen ist. Die Ordinate spiegelt die Intensität des Cy3-Signals wider und somit die Menge an Phosphotyrosin in der jeweiligen Zelle. Dieses wurde durch die eingesetzten Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert und verkörpert die Gesamtmenge der individuellen Zelle an phosphoryliertem Tyrosin, das als Marker für Aktivität gilt. Es werden hier nicht nur die phosphorylierten Tyrosin-Moleküle des eingebrachten ALK-Rezeptors betrachtet, sondern die Gesamtheit des Phosphotyrosin der jeweiligen Zelle. De facto soll die Gesamtaktivität jeder einzelnen Zelle durch die Cy3-Intensität dargestellt werden. Sie fungiert als quantitative Messung sämtlicher durch Phosphorylierung aktivierter Signalwege, sowohl mit, als auch ohne Kausalität zum ALK-Rezeptor.

Im Folgenden soll das Verhalten der untersuchten Mutanten F1174L, R1275Q, Y1604F, I1250T und ALK-Wildtyp in SK-N-AS-Zellen miteinander verglichen werden. Anschließend erfolgte jeweils eine Verifizierung der Ergebnisse durch eine Wiederholung des Versuchs mit NIH/3T3-Zellen.

3.1.1.1 Wildtyp-ALK

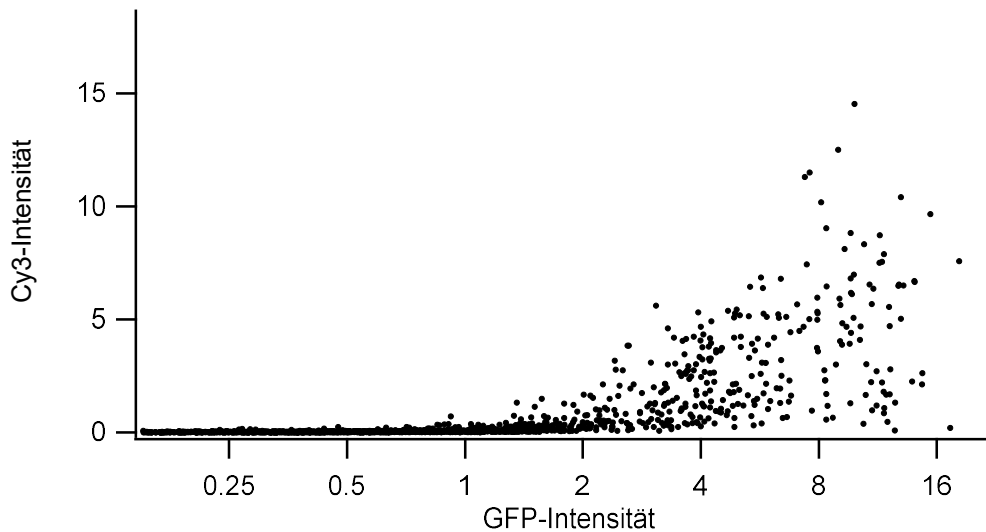


Abb. 22: Streudiagramm: Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen

Dargestellt sind 2149 Neuroblastomzellen der Zelllinie SK-N-AS aus vier verschiedenen Proben, die mit GFP-markierten Wildtyp-ALK-Rezeptor transfiziert und deren Phosphotyrosin-Moleküle anschließend mit Cy3-Antikörpern opsoniert wurden. Aus den im Weitfeldmikroskop aufgenommenen Bildern der Zellen wurde die Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe GFP und Cy3 ermittelt und hier graphisch gegeneinander aufgetragen. Die Cy3-Intensität verkörpert dabei den Phosphotyrosin-Level der Zelle und die GFP-Intensität ihre Gesamtmenge an ALK-Rezeptoren. Somit entspricht jeder Punkt je einer Zelle. Bis zu einer GFP-Intensität von 2 zeigen sich lediglich niedrige Cy3-Intensitäten. Bei höheren GFP-Werten fächert sich eine große Bandbreite der Cy3-Verteilung hinsichtlich der zugehörigen Cy3-Werte auf.

Auffällig bei diesen SK-N-AS-Zellen mit eingebrachtem Wildtyp-ALK-Rezeptor ist, dass sich die Cy3-Intensitäten bis hin zu einer GFP-Intensität von 2 relativ gleich verhalten. In einer vergrößerten Darstellung lässt sich ablesen, dass vor besagter GFP-Intensität kaum Cy3-Intensitäten über 0,4 erreicht werden. Der Großteil der Cy3-Intensitäten befindet sich zwischen 0 und 0,1.

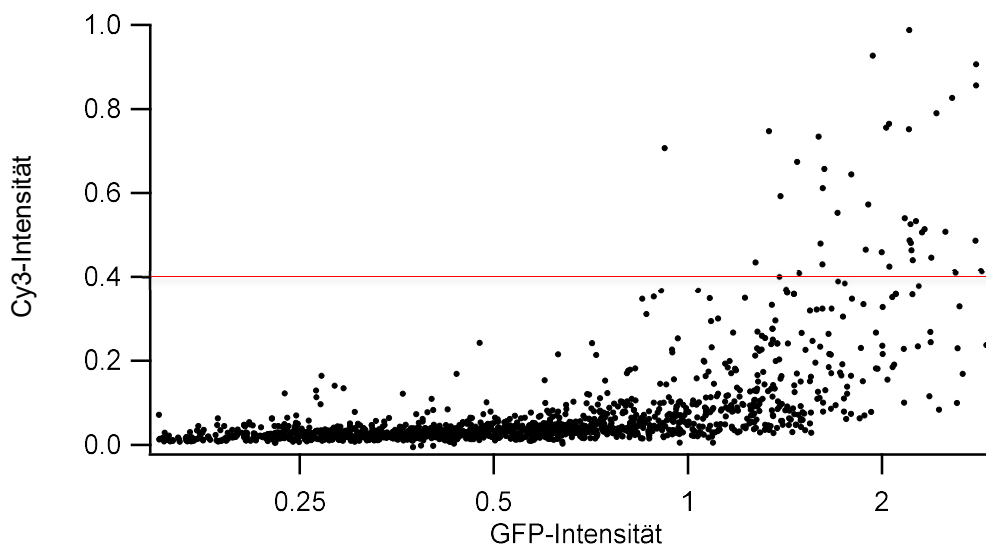


Abb. 23: Vergrößerter Ausschnitt des Streudiagramms für Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen

Bis zu einer GFP-Intensität von 2 verhalten sich die mit Wildtyp-ALK transfizierten Zellen weitestgehend gleich. Ein Wert von 0,4 wird nur selten überschritten. Die Überzahl der Cy3-Intensitäten befindet sich bei Werten zwischen 0 und 0,1.

In Abb. 22 hingegen finden sich bei höheren x-Koordinaten zugehörige Cy3-Intensitäten bis maximal 14,53. Ab einer GFP-Intensität von 2 zeigen die Ordinaten-Werte in gewisser Weise eine Auffächerung, sprich eine sehr variable Verteilung der Cy3-Intensitäten. Die Rezeptor-

menge scheint ab diesem Abszissenwert nicht mehr mit dem Phosphotyrosingehalt der Zelle zu korrelieren. Die GFP-Intensität von 2 ist somit als eine Art „Schwellenwert“ zu interpretieren, ab welchem die Zellen ein variables Verhalten zeigen. Einige Zellen mit GFP-Intensitäten von 2 bis 16, also mit relativ hoher Rezeptormenge, befinden sich unterhalb einer Cy3-Intensität von 2. Annähernd gleich viele Zellen in diesem Abszissenbereich besitzen jedoch Cy3-Intensitäten im Bereich zwischen 2 und 8. Wenige sich sehr weit rechts auf der Abszisse befindende Zellen erreichen Cy3-Intensitäten von 8 bis knapp über 14. Ab einer GFP-Intensität von 2 stellt sich somit eine vollständige Entkopplung von ALK-Rezeptormenge und phosphoryliertem Tyrosin dar. Zellen mit einer relativ geringen Menge an ALK-Rezeptoren können durch Phosphorylierung „aktivierter“ sein als Zellen mit einem höherem Gehalt an Rezeptoren und umgekehrt.

Anzumerken ist jedoch, dass exorbitante Cy3-Intensitäten nicht unmittelbar nach Erreichen des Schwellenwerts, sondern erst sehr weit rechts auf der Abszisse erreicht werden. Ab einer bestimmten, hohen Rezeptormenge scheint also nicht nur eine Entkopplung von Cy3- und GFP-Intensität stattzufinden, sondern zudem auch eine überschießende Aktivierung der Zellen. Diese wird durch den Cy3-Gehalt verkörpert.

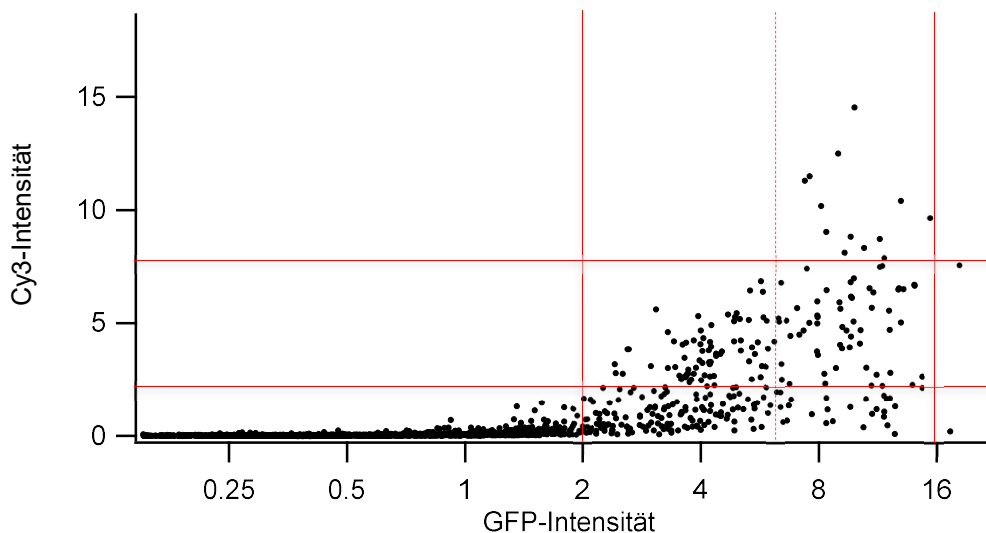


Abb. 24: Kartiertes Streudiagramm für Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen

Ab dem Schwellenwert 2 sind Cy3- und GFP-Intensität vollständig voneinander entkoppelt. In verschiedenen Zellen mit hoher GFP-Intensität, was einem hohen Rezeptor-Gehalt entspricht, sind sowohl hohe als auch niedrige Cy3-Werte zu beobachten. Im Bereich von GFP-Intensitäten zwischen 2 und 16 befinden sich etwa gleich viele Zellen unter einer Cy3-Intensität von 2 wie darüber. Nur einige Zellen erreichen Cy3-Werte über 8. Diese liegen isoliert rechts von einem Abszissenwert von etwa 7.

Als Übertragung dieses variablen, gar paradoxen Verhaltens der Zellen ab einem Schwellenwert ist neben den Streudiagrammen ebenfalls in der Mikroskopie zu beobachten: Zellen, die einen annähernd gleichen GFP-Gehalt aufweisen, sich also in einem Fluoreszenzkanal nahezu ähneln, stellen sich im Cy3-Kanal vollkommen arbiträr dar. So können zwei sich im GFP-Fluoreszenzkanal nahezu gleichende Zellen im Cy3-Kanal eine gänzlich unterschiedliche Gestalt besitzen.

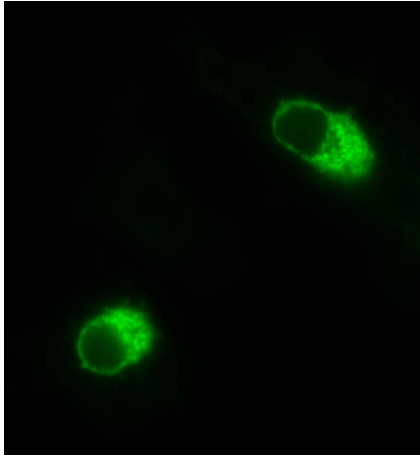


Abb. 25: Zwei Wildtyp-ALK exprimierende SK-N-AS-Zellen (GFP-Fluoreszenzkanal)

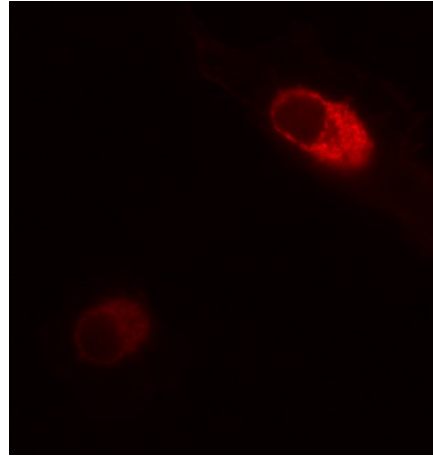


Abb. 26: Zwei Wildtyp-ALK exprimierende SK-N-AS-Zellen (Cy3-Fluoreszenzkanal)

Abb. 25, Abb. 26: Bildbeispiel zur Veranschaulichung verschiedener Phosphorylierungsintensitäten bei vergleichbarem GFP-Gehalt. Im GFP-Fluoreszenzkanal (Abb. 25) erscheinen die beiden Zellen von nahezu identischem Gehalt an grüner Fluoreszenz. Im zugehörigen Cy3-Bild (Abb. 26) zeigt die obere Zelle eine mit bloßem Auge erkennbare, höhere Fluoreszenzintensität als die untere Zelle. Folglich besitzen die Zellen bei gleichem GFP-Gehalt eine unterschiedliche Phosphotyrosinmenge.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem dargelegten Verhalten ausschließlich um ein in der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-AS auftretendes Phänomen handelt, wurde der gleiche Versuch ebenfalls mit der Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 vollzogen. Ein Grund für die Wahl dieser Fibroblasten-Zelllinie besteht darin, dass diese per se keine ALK-Rezeptoren exprimiert, wie die Neuroblastom-Zelllinie SK-N-AS. Auf diese Weise ist zudem das Argument, dass das Verhalten der transfizierten Zellen von der intrinsischen ALK der SK-N-AS-Zellen bedingt sein könnte, zu widerlegen.

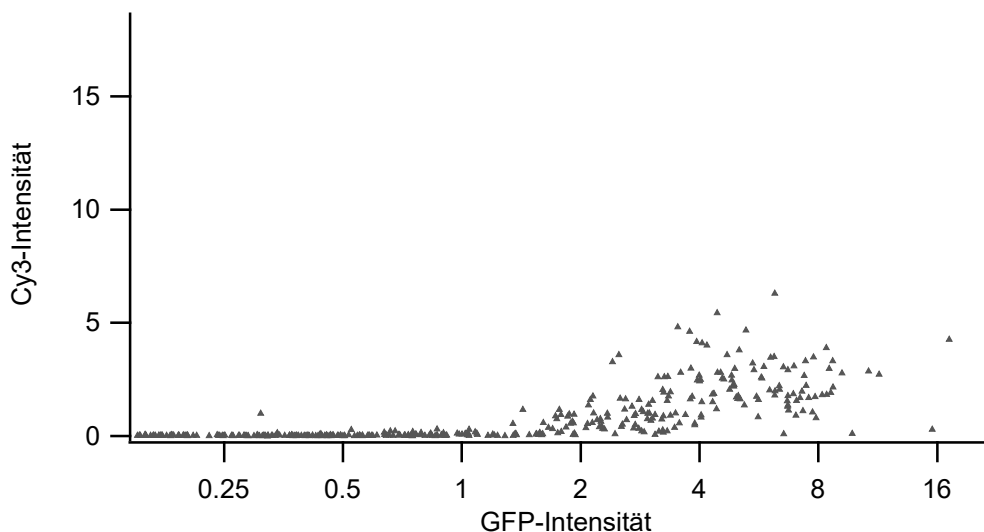


Abb. 27: Streudiagramm für Wildtyp-ALK in NIH/3T3-Zellen

Dargestellt ist die Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3, transfiziert mit dem Wildtyp-ALK-Rezeptor. Ihr Verhalten hinsichtlich ihres Phosphotyrosingehalts in Bezug auf ihre GFP-Menge zeigt kaum Abweichungen im Vergleich zu Zellen der Linie SK-N-AS nach Transfektion mit Wildtyp-ALK. Es wird lediglich eine geringere Anzahl an Ordinatenwerten über 5 erreicht als bei den SK-N-AS-Zellen, was sicherlich auf den kleineren Datensatz der NIH/3T3-Zellen von 601 Zellen im Gegensatz zu 2149 Zellen bei dem Versuch mit SK-N-AS-Zellen zurückzuführen ist.

Auch bei dieser Zelllinie zeigte sich das oben beschriebene Verhalten. Bis zum „Schwellenwert“, der GFP-Intensität von 2, verhalten die Zellen sich wiederholt relativ gleich und der Großteil der Cy3-Intensitäten befindet sich zwischen 0 und 0.1. Jenseits des Schwellenwerts

zeigt sich abermals eine Varianz im Phosphotyrosin-Gehalt der Zellen, unabhängig vom GFP-Gehalt. Auffällig ist, dass Ordinatenwerte von 8 nicht überschritten werden.

Dazu sei anzumerken, dass auch bei den SK-N-AS-Zellen unstetig Ordinatenwerte über 14 erreicht wurden. In einigen Experimenten erreichten die Zellen trotz gleichbleibender Versuchsbedingungen weniger bis gar keine vergleichbar hohen y-Koordinaten, was in Abb. 7 bis Abb. 10 nachvollzogen werden kann.

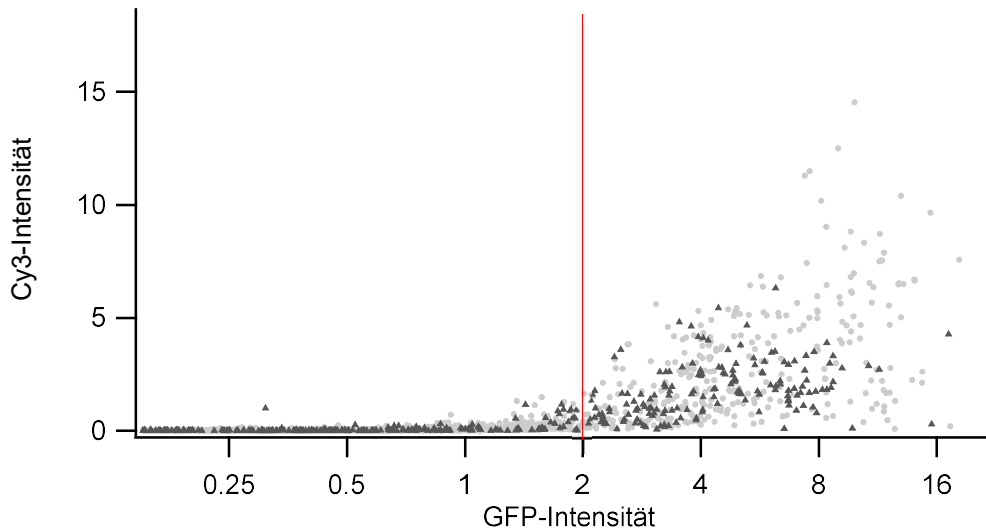


Abb. 28: Overlay der Streudiagramme für Wildtyp-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen
Dreieckig dargestellt ist die Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3, blass hinterlegt die Zelllinie SK-N-AS, beide nach Transfektion mit dem Wildtyp-ALK-Rezeptor. Bis auf das Fehlen einiger höherer Cy3-Intensitäten seitens der NIH/3T3-Zellen verhalten sich die beiden Zelltypen nahezu gleich. Der obig beschriebene Schwellenwert bei 2 auf der Abszisse ist bei den NIH/3T3-Zellen ebenfalls zu beobachten.

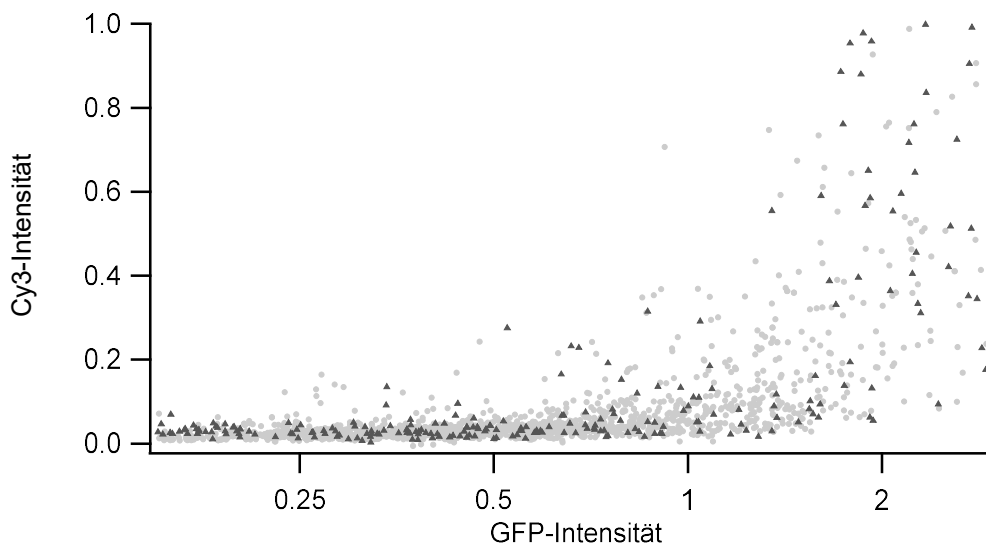


Abb. 29: Vergrößerung des Overlays der Streudiagramme für Wildtyp-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen
Der Abszissenabschnitt von 0 bis zum Schwellenwert 2 ist vergrößert dargestellt. Dreieckig abgebildet sind die NIH/3T3-Zellen, blass-grau die SK-N-AS-Zellen, beide wurden mit dem Wildtyp-ALK-Rezeptor transfiziert. In Analogie zu den SK-N-AS-Zellen liegen die Ordinatenwerte der NIH/3T3-Zellen bis zum Schwellenwert vorwiegend unter 0,2, der Großteil der NIH/3T3-Zellen befindet sich zwischen Cy3-Werten von 0 bis 0,1. Ab dem genannten Abszissenwert von 2 ist bei beiden Zelllinien die Verbreiterung in eine variabelere Verteilung zu beobachten.

3.1.1.2 ALK-Mutante F1174L

Auch das Verhalten der ALK-Mutante F1174L wurde in der Zelllinie SK-N-AS anhand von 1194 Zellen untersucht. Ähnlich des oben dargestellten Wildtyp-Graphen zeigt die F1174-Mutante bis zu einem Schwellenwert ein relativ gleichförmiges Phosphorylierungsverhalten. Bei der F1174-Mutante beginnt die Zunahme des Gehalts an Phosphotyrosin-Molekülen jedoch bereits ab einer nennenswert geringeren Menge an ALK-Rezeptoren.

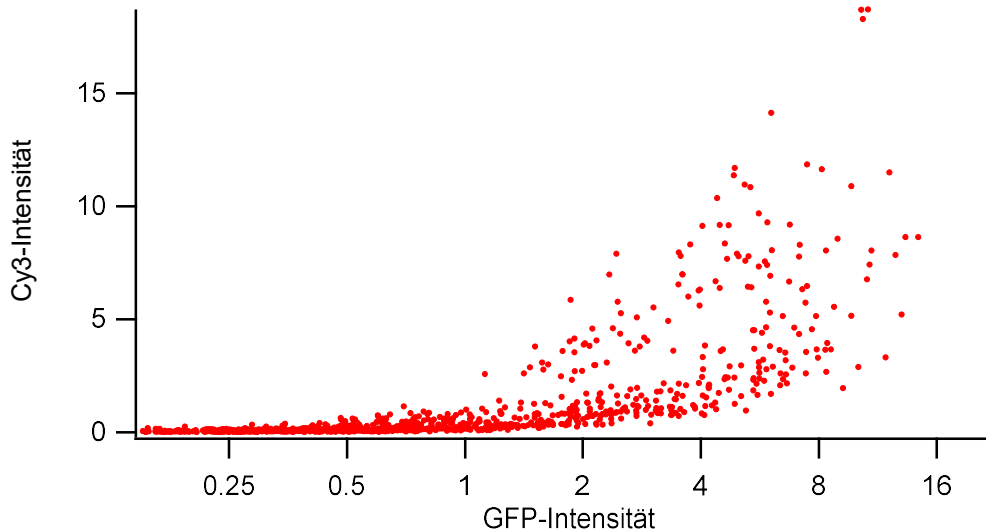


Abb. 30: Streudiagramm: F1174L-ALK in SK-N-AS-Zellen

Die roten Punkte stellen 1194 SK-N-AS-Zellen dar, transfiziert mit der ALK-Mutante F1174L. Der oben beschriebene Schwellenwert der GFP-Intensität von 2 wird bei dieser Variante des ALK-Rezeptors bereits weiter links auf der Abszisse erreicht. Zudem werden Cy3-Intensitäten von 15 übertroffen, bis zu einem Cy3-Maximum von 18.7.

In folgender Graphik wurden zum Vergleich in schwarz die Daten von Wildtyp-ALK in SK-N-AS unterlegt. Es fällt auf, dass der GFP-Schwellenwert bei der F1174L-Mutante bereits bei etwa 0,5 erreicht ist.

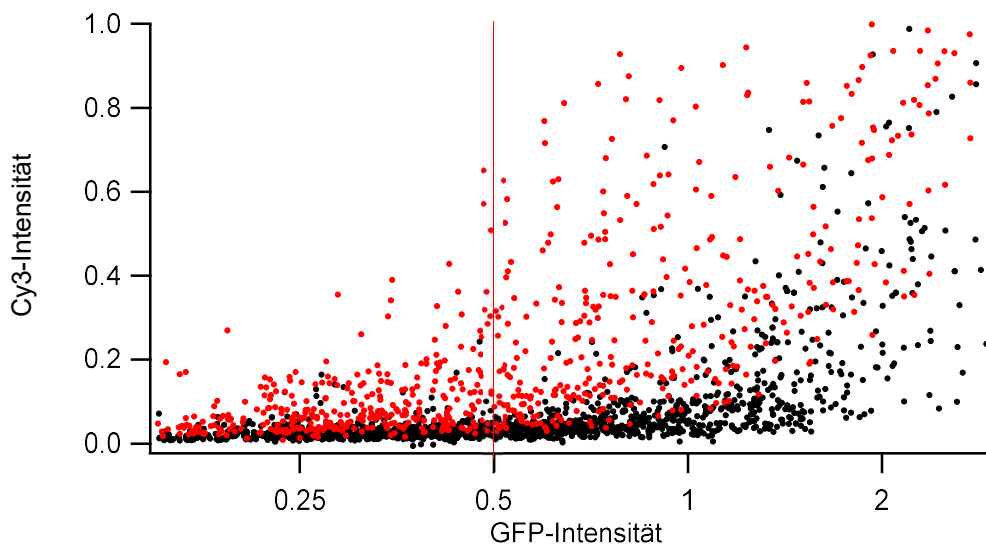


Abb. 31: Vergrößerter Ausschnitt des Overlays der Streudiagramme für F1174L- und Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen

Die F1174L-Mutante des ALK-Rezeptors ist rot abgebildet, der Wildtyp-ALK-Rezeptor schwarz, beide wurden in SK-N-AS-Zellen transfiziert. Der Abszissenbereich ist vergrößert dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass der bereits erwähnte Schwellenwert der F-Mutante schon bei einer GFP-Intensität von etwa 0.5 erreicht wird als bei den Zellen mit Wildtyp-ALK-Rezeptor.

Auch nach Erreichen des Schwellenwerts liegt die Verteilung der Cy3-Intensitäten mehrheitlich höher als bei Wildtyp-ALK. Die maximal erreichten Abszissenschnittpunkte des ALK-Wildtyps in SK-N-AS-Zellen werden übertroffen. In Zellen mit eingebrachter F1174L-Mutante des ALK-Rezeptors liegen quantitativ mehr phosphorylierte Tyrosinmoleküle vor als in Zellen mit ALK-Wildtyp, da deutlich mehr F1174L-ALK-Zellen von der Abszisse „abheben“.

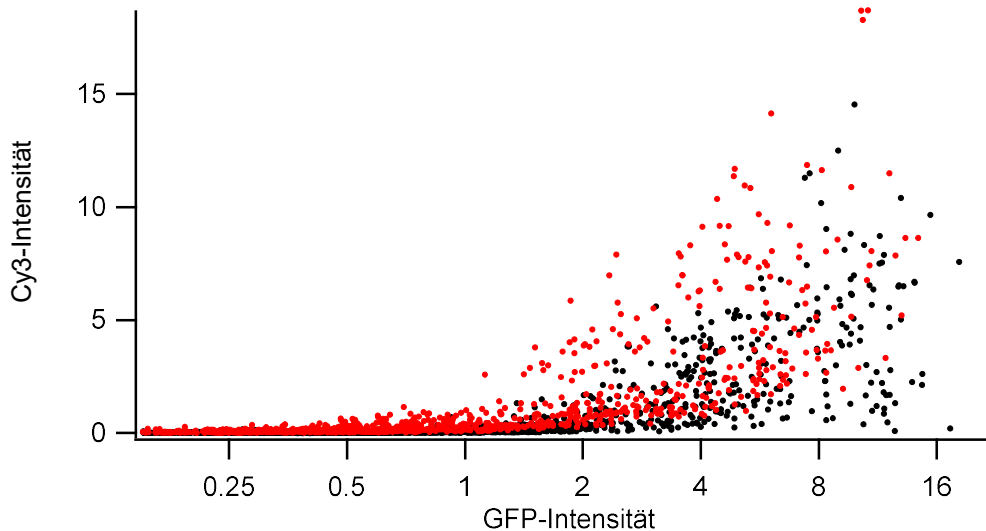


Abb. 32: Overlay der Streudiagramme für F1174L- und Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen
Die F1174-Mutante in SK-N-AS-Zellen ist rot abgebildet, Wildtyp-ALK in schwarz illustriert. Die Zellen mit F1174L-Rezeptor erreichen bereits weiter links auf der Abszisse höhere Cy3-Intensitäten als jene mit Wildtyp-ALK. Zudem wird das Wildtyp-Maximum der Cy3-Intensität von der F1174-Mutante übertroffen. Es findet sich allgemein ein höherer Phosphotyrosin-Gehalt in F1174L- als in WT-Zellen, da die roten Zellen durchweg einen größeren Abstand zur Abszisse aufweisen als die Wildtyp-Zellen.

Auch hier wurde der zusätzliche Nachweis des Phosphorylierungsverhaltens der F1174-Mutante in der Zelllinie NIH/3T3 anhand von 661 untersuchten Zellen erbracht. Die folgende Abbildung zeigt das nahezu identische Verhalten der F1174L-Mutante des ALK-Rezeptors in der Fibroblasten- und Neuroblastom-Zelllinie.

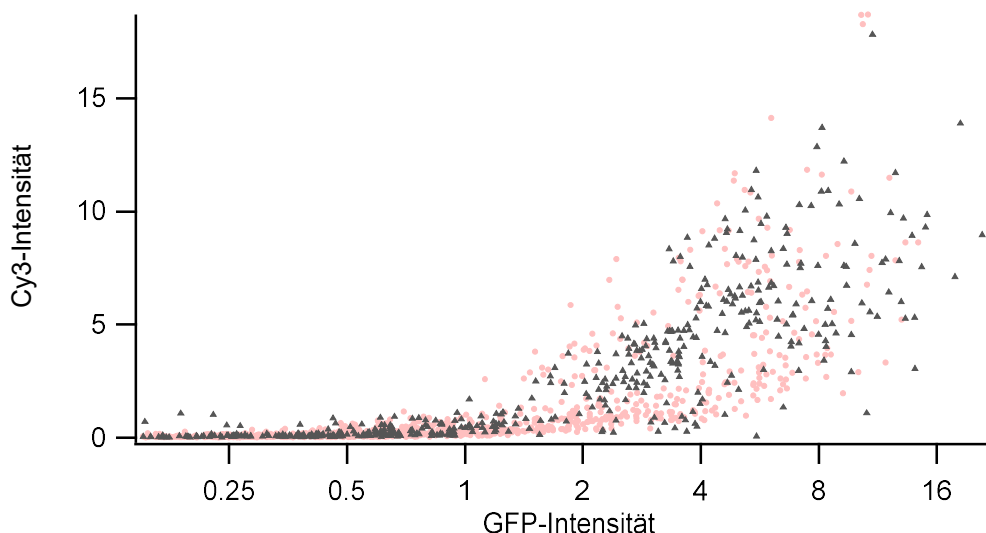


Abb. 33: Overlay der Streudiagramme für F1174L-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen
Die F1174L-Mutante ist dreieckig in NIH/3T3-Zellen und rot hinterlegt in SK-N-AS-Zellen aufgetragen. Die Symbole beider Zelllinien überlappen fast vollständig. Diese Abbildung beweist somit das identische Verhalten des F1174L-Konstrukts in beiden Zelllinien. Das von den F1174L-ALK-SK-N-AS-Zellen erreichte Cy3-Maximum liegt bei den NIH/3T3-Zellen bei 17.8.

3.1.1.3 ALK-Mutante R1275Q

Nur wesentlich geringere Werte auf der Ordinate als die bisher aufgeführten ALK-Formen Wildtyp und F1174L erreicht die Mutante R1275Q. Während bei F1174L- und Wildtyp-Zellen Maxima um die 18 beziehungsweise 14 erreicht werden, bleibt die Cy3-Intensität der R1275-Mutante mehrheitlich unter 2. Ihr Spitzenwert liegt bei 2.4.

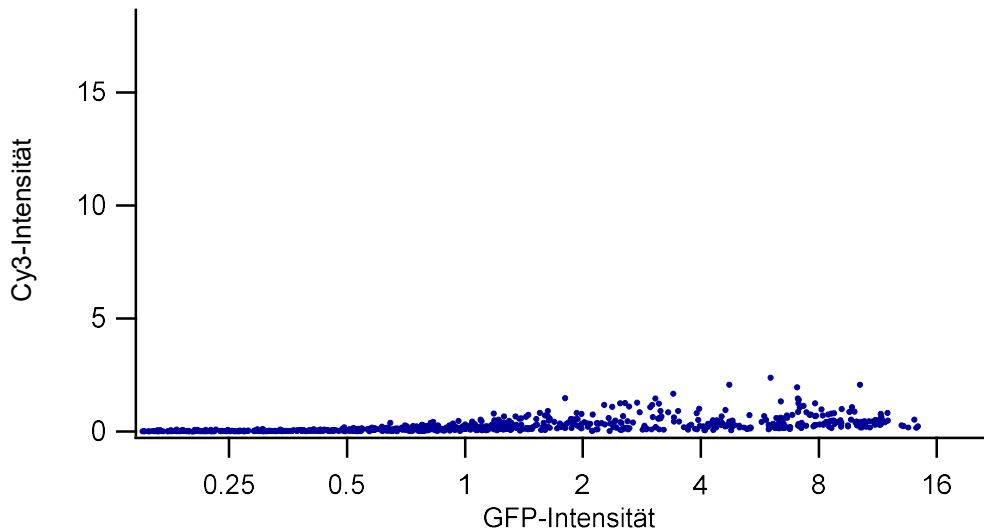


Abb. 34: Streudiagramm: R1275Q-ALK in SK-N-AS-Zellen

In blau dargestellt ist die Mutante R1275Q des ALK-Rezeptors in SK-N-AS-Zellen. Gezeigt sind insgesamt 1019 Zellen. Diese erreichen ein Cy3-Maximum von 2.4.

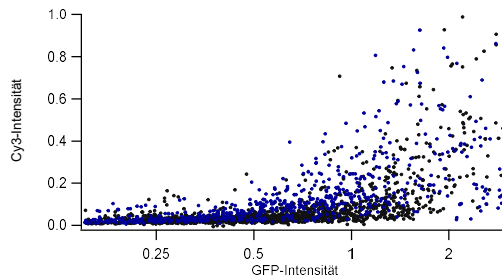


Abb. 35: Overlay der Streudiagramme für R1275Q- und Wildtyp-ALK

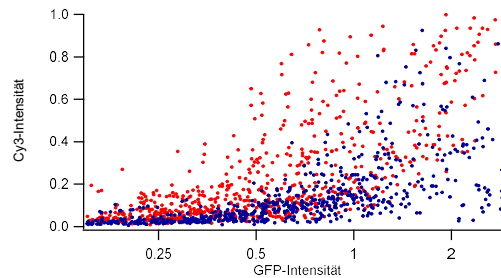


Abb. 36: Overlay der Streudiagramme für R1275Q- und F1174L-ALK

Abb. 35, Abb. 36: Overlay der Streudiagramme für R1275Q- und Wildtyp-ALK (Abb. 35) bzw. F1174L-ALK (Abb. 36) in SK-N-AS-Zellen. Die Abbildung Abb. 35 stellt in schwarz den Wildtyp-ALK-Rezeptor in SK-N-AS-Zellen dar. In Abb. 36 ist die F-Mutante rot abgebildet. Die R1275Q-Mutante ist in beiden Graphen in blau illustriert. Im Vergleich zu Wildtyp und F1174L werden die wesentlich geringeren Cy3-Intensitäten der R1275-Mutante deutlich.

Der bereits erwähnte Schwellenwert, ab welchem die Zellen bezüglich ihres Phosphotyrosin-gehalts eine größere Bandbreite einnehmen, ist bei R1275Q schon ab einer GFP-Intensität von 0.5 erreicht. Damit ist der R1275Q-Schwellenwert identisch mit dem der F1174-Mutante und kleiner als der bei Wildtyp-ALK auftretende Schwellenwert.

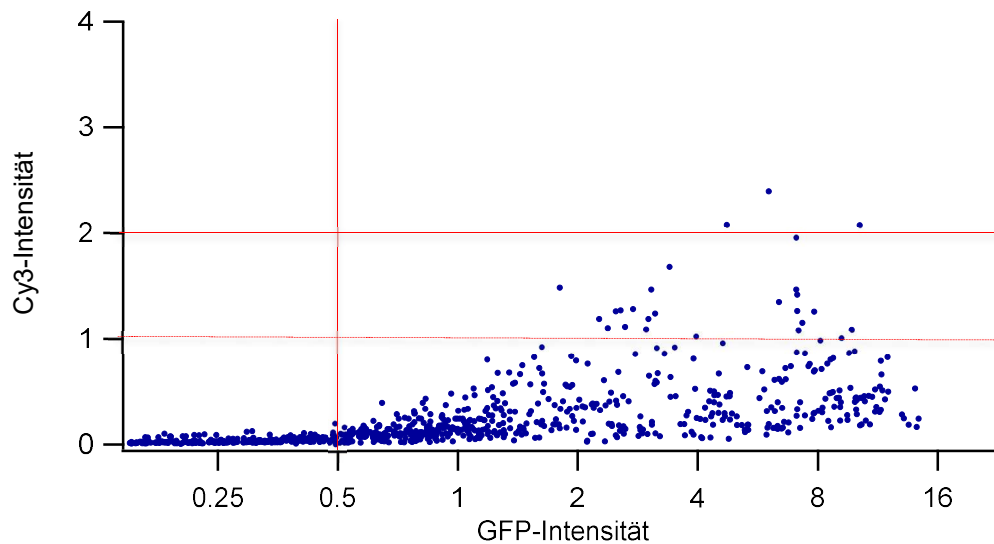


Abb. 37: Kartiertes Streudiagramm für R1275Q-ALK in SK-N-AS-Zellen mit vergrößertem Ordinatenabschnitt
 Hier findet sich die obige Darstellung der R1275Q-Mutante mit etwa 5-fach vergrößerter Ordinate. Der Schwellenwert, ab dem sich die Verteilung hinsichtlich der Ordinate variabel zeigt, wird bei etwa 0.5 erreicht. Nur wenige Cy3-Intensitäten liegen über 2, der Großteil der Zellen erreicht y-Koordinaten zwischen 0 und 1.

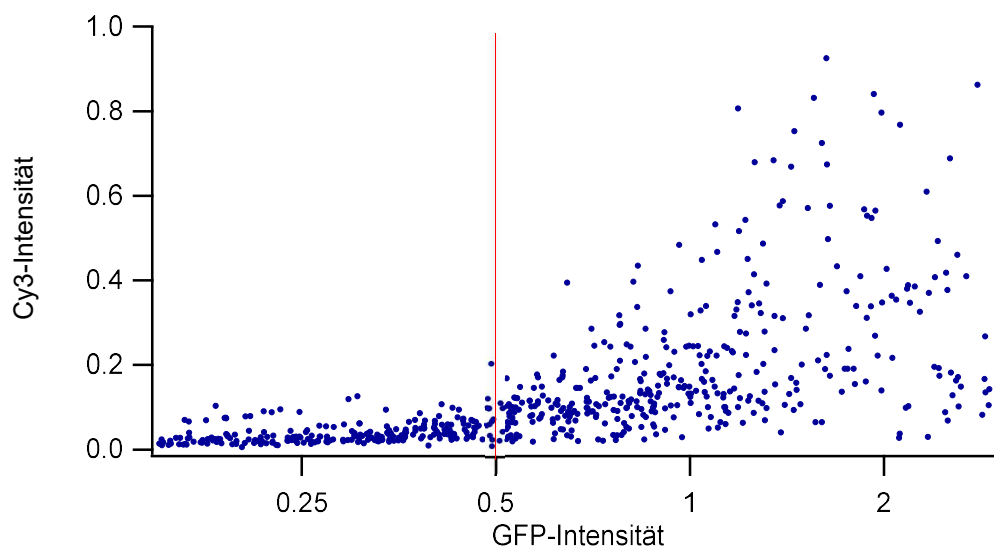


Abb. 38: Vergrößerter Ausschnitt des Streudiagramms für R1275Q-ALK in SK-N-AS-Zellen
 Vergrößerter Abszissenabschnitt der darüber liegenden Abbildung. Deutlich zu erkennen ist die GFP-Intensität von 0.5 als Schwellenwert. Die Cy3-Intensitäten der links davon liegenden Zellen befinden sich hauptsächlich zwischen 0 und 0.1.

Wie im Folgenden dargestellt, zeigte sich auch bei der R1275-Mutante des ALK-Rezeptors in der Zelllinie NIH/3T3 kein deviantes Verhalten. Dazu wurden 748 R1275Q-ALK exprimierende NIH/3T3-Zellen untersucht.

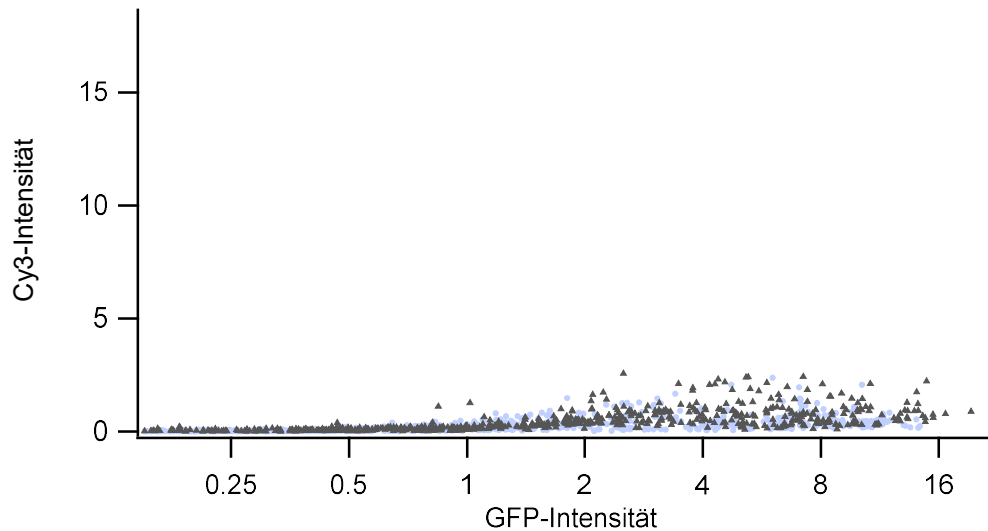


Abb. 39: Overlay der Streudiagramme für R1275Q-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen
 In Dreiecksform sind NIH/3T3-Zellen, hellblau die SK-N-AS-Zellen dargestellt. Beide wurden mit ALK-Rezeptor mit der Mutation R1275Q transfiziert. Das Resultat beider Zelllinien zeigt sich gleichförmig. Das Cy3-Maximum der mit R1275Q-ALK transfizierten NIH/3T3-Zellen liegt bei 2.6, das der entsprechenden SK-N-AS-Zellen bei 2.4.

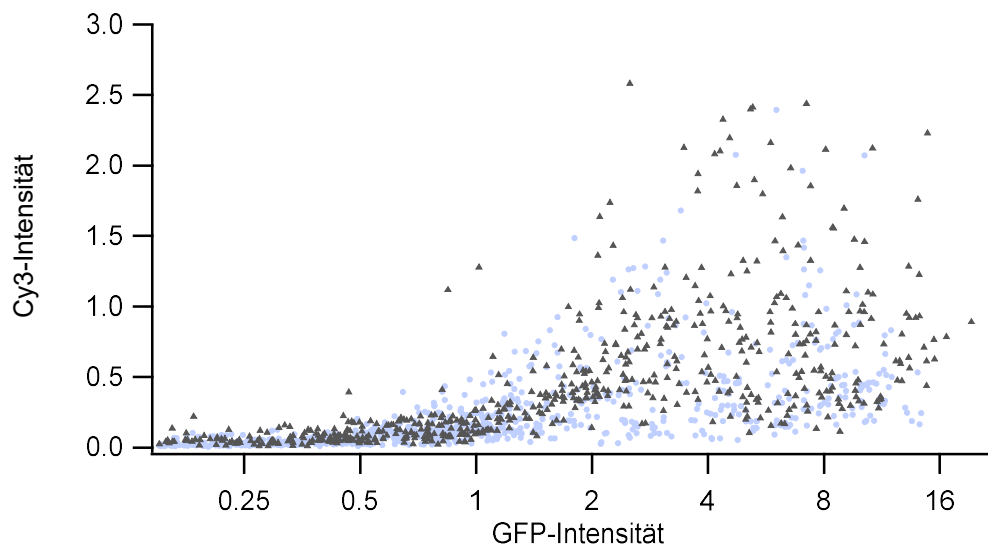


Abb. 40: Vergrößerter Ordinatenabschnitt des Overlays der Streudiagramme für R1275Q-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen

Diese Wiederholung der vorhergehenden Abbildung verdeutlicht durch die Vergrößerung eines Ordinatenabschnitts das einheitliche Verhalten der R1275-Mutante in SK-N-AS- und NIH/3T3-Zellen.

3.1.1.4 ALK-Mutante Y1604F

In ihrem Phosphorylierungsverhalten dem Wildtyp sehr ähnlich zeigt sich die ALK-Mutante Y1604F. Bis der Schwellenwert von 2 erreicht wird, liegen ihre Ordinatenwerte mehrheitlich unter 1.

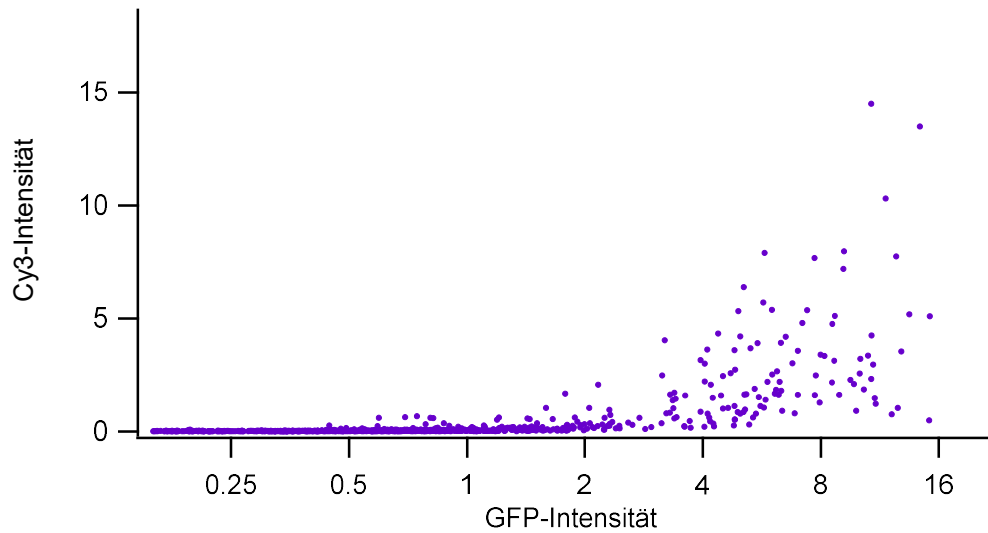


Abb. 41: Streudiagramm: Y1604F-ALK in SK-N-AS-Zellen
 Dargestellt sind 1068 SK-N-AS-Zellen, die den ALK-Rezeptor mit der Mutation Y1604F exprimieren.

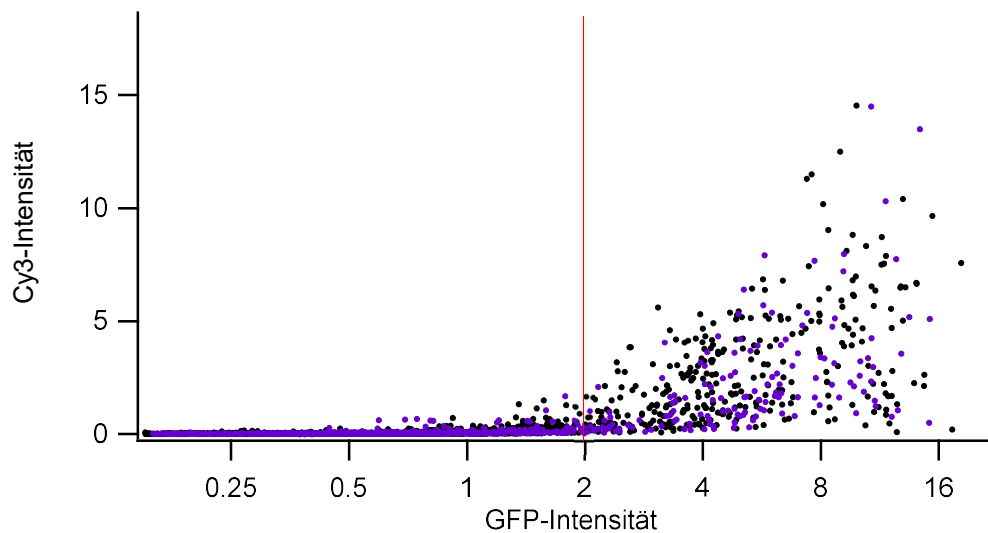


Abb. 42: Overlay der Streudiagramme für Y1604F- und Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen
 Violett sind die bereits in der obigen Abbildung dargestellten Zellen und in schwarz die mit dem Wildtyp-ALK-Rezeptor transfizierten SK-N-AS-Zellen illustriert. Es zeigt sich ein nahezu identisches Verhalten hinsichtlich GFP- und Cy3-Intensität. Beide ALK-Subtypen haben den gleichen Schwellenwert von 2. Zudem stimmen sie hinsichtlich ihrer maximal erreichten Cy3-Intensitäten genau überein. Die Y1604F-Zellen erzielten denselben Maximalwert von 14.5 wie die Wildtyp-Zellen.

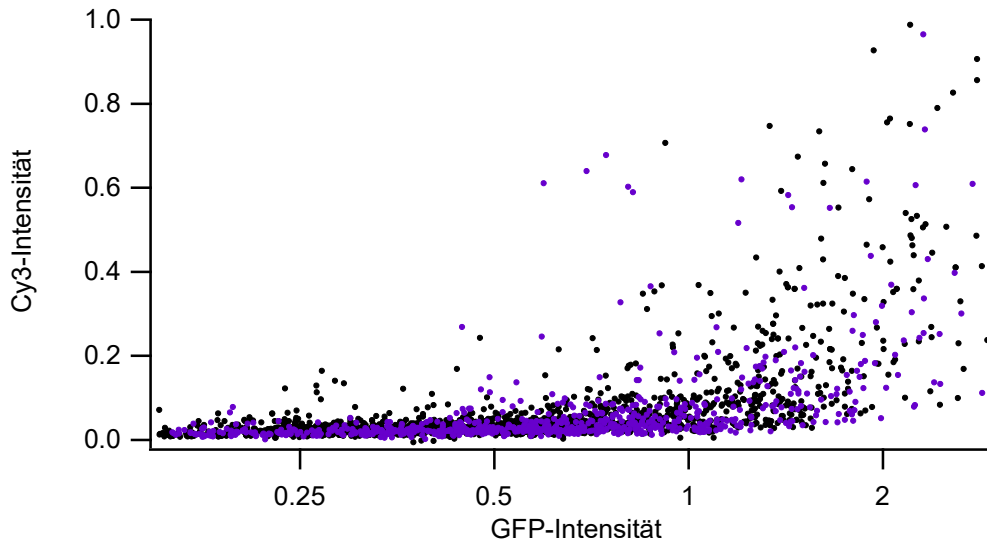


Abb. 43: Vergrößerter Ausschnitt des Streudiagramms für Y1604F-ALK in SK-N-AS-Zellen
Die Vergrößerung des Ordinatenabschnitts lässt das nahezu vollständige Überlappen der Y1604F-ALK-Zellen (violett) und der Wildtyp-Zellen (schwarz) auch vor dem Schwellenwert 2 erkennen.

Wie bei Wildtyp und F1174-Mutante befinden sich rechts vom Schwellenwert auf der Abszisse ein deutlicher Aufschwung und eine breite Verteilung der Cy3-Intensitäten, nahezu unabhängig von der Menge der Rezeptoren in der Zelle. Die maximale Cy3-Intensität der Y1604-Mutante liegt bei 14.5 und somit nahe dem Wildtyp-Maximum von 14.53.

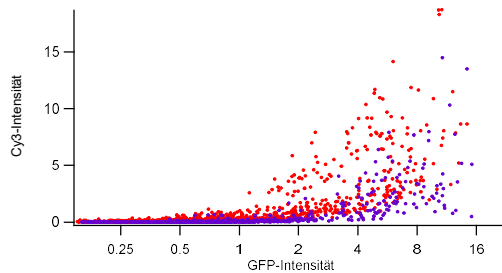


Abb. 44: Overlay der Streudiagramme für Y1604F- und F1174L-ALK

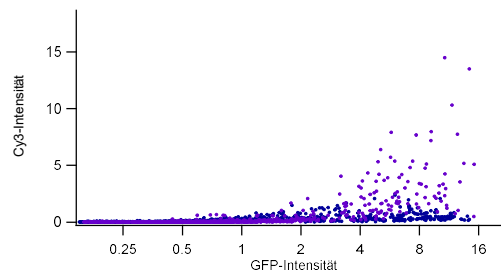


Abb. 45: Overlay der Streudiagramme für Y1604F- und R1275Q-ALK

Abb. 44Abb. 45: Overlay der Streudiagramme für Y1604F- und F1174L-ALK bzw. R1275Q-ALK in SK-N-AS-Zellen
In Abb. 44 ist die F1174L-Mutante des ALK-Rezeptors rot dargestellt, Abb. 45 illustriert in blau die Mutante R1275Q. Violett ist jeweils die Y1604-Mutante des ALK-Rezeptors gezeigt. Alle dargestellten Zellen entstammen der Zelllinie SK-N-AS. Ebenso wie Wildtyp-ALK hat die Y1604F-Mutante einen Schwellenwert von etwa 2 im Gegensatz zur F1174-Mutante, deren Cy3-Werte bereits ab einer GFP-Intensität von 0.5 ansteigen. Auch das Cy3-Maximum von Y1604F wird von F1174L übertroffen. Die Abbildung Abb. 45 veranschaulicht, dass die Y1604-Mutante im Vergleich zu R1275Q deutlich höhere Abschnitte auf der y-Achse und somit einen höheren Gehalt an Phosphotyrosin als die R1275-Mutante aufweist.

Auch bei der Y1604-Mutante konnte ein weitgehend identisches Verhalten in Fibroblasten-Zellen vom Typ NIH3T3 im Vergleich zur Zelllinie SK-N-AS gezeigt werden. Untersucht wurden dazu 636 entsprechende NIH/3T3-Zellen.

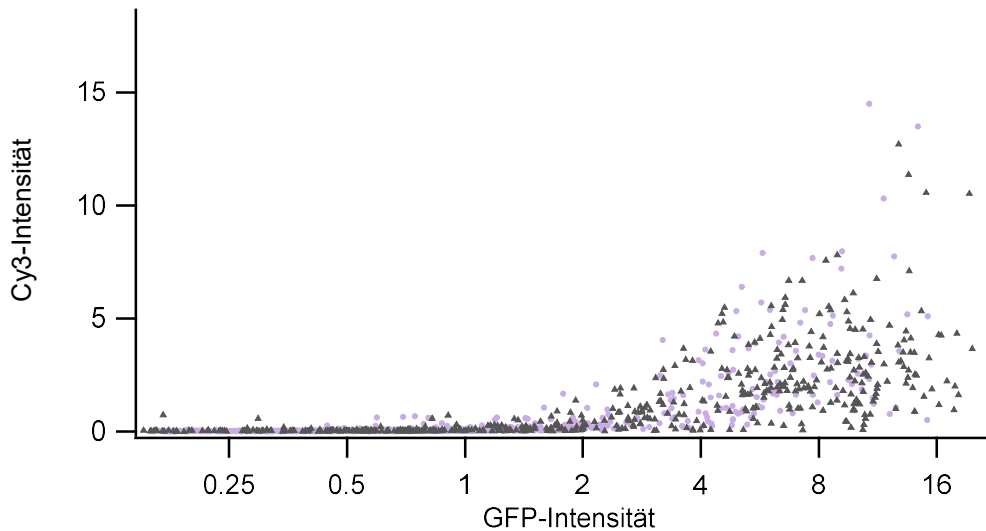


Abb. 46: Overlay der Streudiagramme für Y1604F-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen
 Die Dreiecke stellen NIH/3T3-Zellen dar, die blass-violetten Kreise SK-N-AS-Zellen. Beide Zelllinien exprimieren die Y1604F-Mutante des ALK-Rezeptors. Die weitreichende Deckungsgleichheit beider Kurven zeigt, dass das Y1604F-Konstrukt in beiden Zelllinien dieselben Effekte bewirkt. Die NIH/3T3-Zellen erreichen ein Cy3-Maximum von 15,9, welches dem der SK-N-AS-Zellen von 14,5 sehr nahe kommt.

3.1.1.5 ALK-Mutante I1250T

Die 1348 untersuchten, I1250T-ALK exprimierenden SK-N-AS-Zellen sistieren auf der gesamten Breite der Abszisse unter Ordinatenwerten von 0,6. Lediglich ihr Maximum für die Cy3-Intensität liegt bei 0,7. Interessanterweise findet sich dieses relativ weit links auf der Abszisse bei 0,87. Bei x-Werten ab 2 wird kein annähernd hoher Ordinatenwert mehr erreicht. Ansonsten finden sich vereinzelt zwischen 0,3 und 1,1 etwas höhere Cy3-Werte als 0,1. Dieser Anstieg wird lediglich von 30 aus insgesamt 1348 Zellen, ergo 2% bestritten und ist somit zu vernachlässigen.

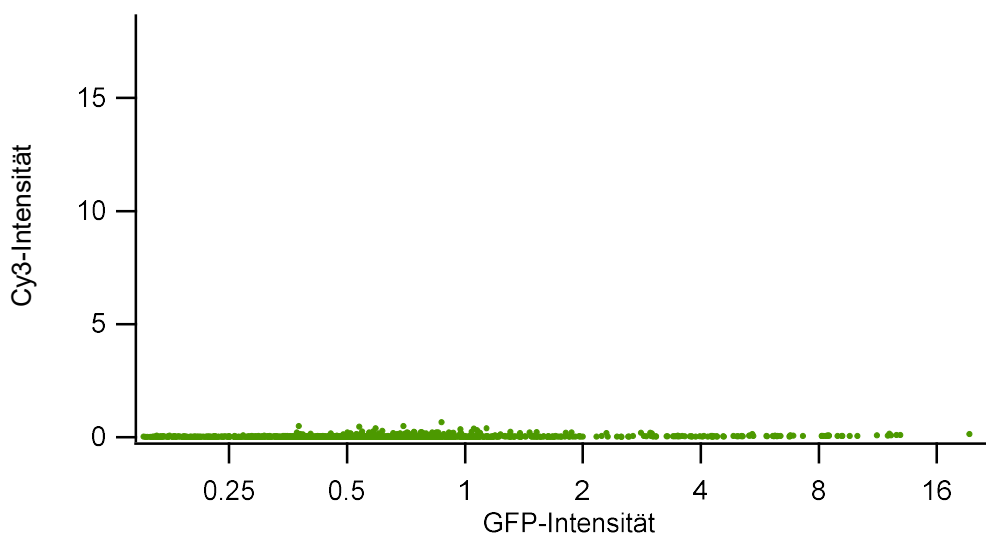


Abb. 47: Streudiagramm: I1250T-ALK in SK-N-AS-Zellen
 Die grünen Kreise verkörpern SK-N-AS-Zellen, in die der ALK-Rezeptor mit der Mutation I1250T eingebracht wurde.

Im Gegensatz zu den anderen Mutanten ist rechts vom Abszissenwert 2, beziehungsweise 0,5 kein Anstieg der Cy3-Intensitäten zu beobachten. Wird die GFP-Menge erreicht, bei welcher die anderen Mutanten sich breit auffächern, bleibt die I1250-Mutante hingegen supprimiert,

hat also insgesamt kaum ein Phosphotyrosin-Signal aufzuweisen. Dies spricht für die durchweg geringe Autophosphorylierung der I1250T-ALK-Moleküle und folglich für eine nur sehr geringe bis vernachlässigbare Aktivität der I1250-Mutante. Hinsichtlich I1250T-ALK ist somit nicht von einem Schwellenwert zu sprechen. Dies führt zu der Annahme, dass die I1250T-Zellen, die weit rechts auf der Abszisse zu finden sind und somit quantitativ viele ALK-Rezeptoren exprimieren, einer Suppression unterliegen könnten.

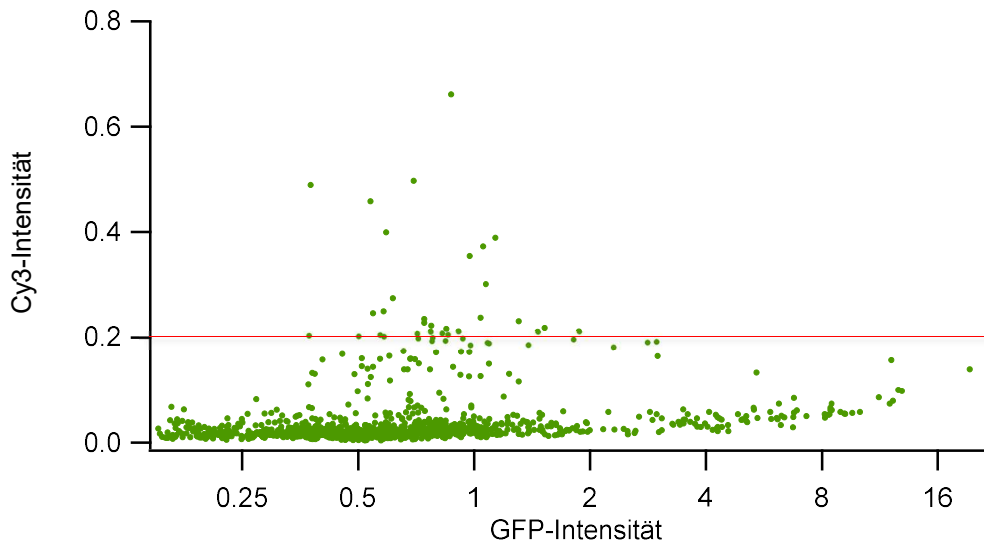


Abb. 48: Vergrößerter Ausschnitt des Streudiagramms für I1250T-ALK in SK-N-AS-Zellen

Gezeigt ist die obige Abbildung mit etwa 19-fach vergrößerter Ordinate. Bei der I1250-Mutante ist kein Schwellenwert zu beobachten. Die Cy3-Intensitäten bleiben nahezu vollständig unter 0,3. Der Großteil der y-Werte befindet sich zwischen 0 und 0,1. Zwischen den GFP-Intensitäten von 0,3 bis 1,1 kommt es zu einer Häufung von etwas höheren Cy3-Intensitäten. Das Cy3-Maximum von 0,7 liegt bei einem Abszissenwert von 0,87. Im Gegensatz zu den anderen ALK-Mutanten zeigt sich rechts der GFP-Intensität von 2 kein Anstieg der Cy3-Werte, keiner der dortigen Cy3-Werte übersteigt 0,2.

Betrachtet man die ALK-Subtypen Wildtyp-, F1174L-, Y1604F- und R1275Q-ALK im Vergleich zur I1250-Mutante, so zeigt sich diese hinsichtlich der Cy3-Intensitäten stets unterlegen. Bis auf den beschriebenen, minimalen Anstieg zwischen 0,3 und 1,1 ist bei der I-Mutante keine weitere Steigung mehr zu verzeichnen. Jener Anstieg verkörpert eine augmentierte Autophosphorylierung der I1250T-Zellen in diesem Abszissenabschnitt, also dem entsprechenden GFP-Gehalt. Somit ist bei der I1250-Mutante im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Mutanten das Maximum, beziehungsweise der maximale Bereich der Autophosphorylierung bei geringen GFP-Intensitäten zu finden. Das Maß der Autophosphorylierung ist jedoch hier keinesfalls mit dem der anderen Mutanten zu vergleichen, da lediglich ein Cy3-Maximum von 0,7 erreicht wird, welches verhältnismäßig als minimal und vernachlässigbar zu beschreiben ist.

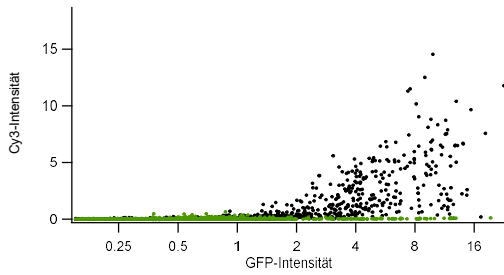


Abb. 49: Overlay der Streudiagramme für I1250T- und Wildtyp-ALK

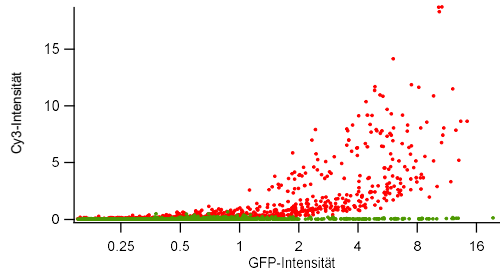


Abb. 50: Overlay der Streudiagramme für I1250T- und F1174L-ALK

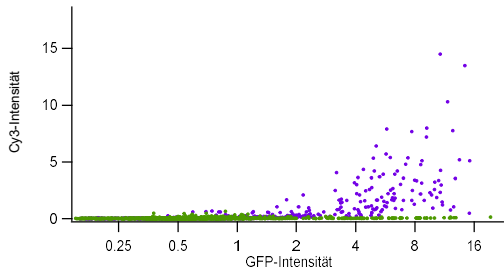


Abb. 51: Overlay der Streudiagramme für I1250T- und Y1604F-ALK

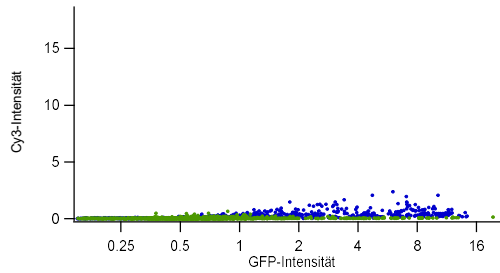


Abb. 52: Overlay der Streudiagramme für I1250T- und R1275Q-ALK

Abb. 49 - Abb. 52: Übersicht über die verschiedenen ALK-Subtypen in Relation zur I1250-Mutante. Die farbliche Darstellung der einzelnen Mutanten ist der Farblegende zu entnehmen. In der vergleichenden Zusammenschau wird die stets unterlegene Position der I1250T-ALK-Zellen bezüglich der Cy3-Werte gegenüber den anderen untersuchten ALK-Mutanten.

schwarz	=	Wildtyp
rot	=	F1174L
violett	=	Y1604F
blau	=	R1275Q
grün	=	I1250T

Overlay-Darstellungen der einzelnen Streudiagramme der untersuchten ALK-Subtypen und I1250T-ALK-Zellen zeigen, dass das bekannte Muster der anderen ALK-Subtypen keine Korrelation zur I1250-Mutante aufweist. Der bereits beschriebene kleine An- und Abstieg der I1250T-ALK-Zellen findet vollkommen unabhängig von dem "Schwellenwert-Verhalten" der anderen Mutanten statt. Von den F1174L-ALK-Zellen wird die I1250-Mutante von vorneherein hinsichtlich ihrer Cy3-Koordinaten übertroffen.

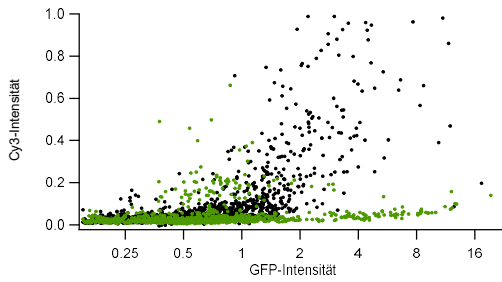


Abb. 53: Vergrößerter Ordinatenabschnitt des Overlays der Streudiagramme für I1250T- und Wildtyp-ALK

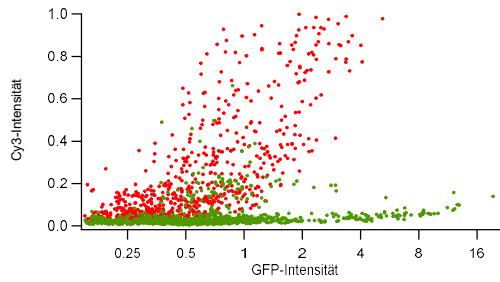


Abb. 54: Vergrößerter Ordinatenabschnitt des Overlays der Streudiagramme für I1250T- und F1174L-ALK

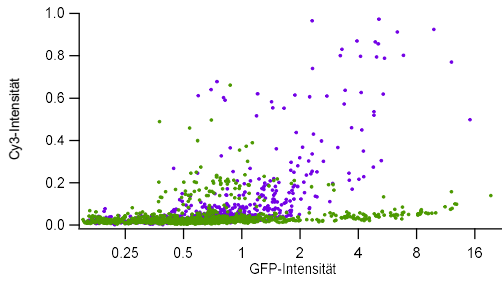


Abb. 55: Vergrößerter Ordinatenabschnitt des Overlays der Streudiagramme für I1250T- und Y1604F-ALK

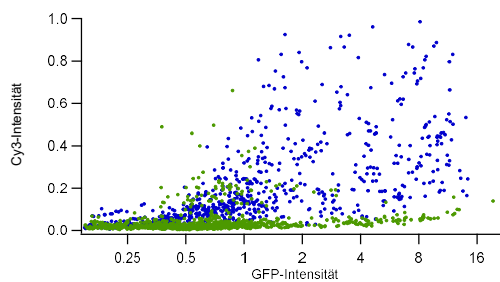


Abb. 56: Vergrößerter Ordinatenabschnitt des Overlays der Streudiagramme für I1250T- und R1275Q-ALK

Abb. 53 - Abb. 56: Übersicht über das Verhalten der I1250T-ALK-Mutante hinsichtlich des Schwellenwerts der Mutanten. Die kennzeichnenden Farben sind durch die Farblegende festgelegt. Die Ordinate ist circa 19-fach vergrößert. Offenkundig übertrifft lediglich die F1174-Mutante die I1250T-ALK-Zellen von vorneherein. Bei den Wildtyp-, Y1604F- und R1275Q-Zellen bleibt die I1250-Mutante bis zum Erreichen des jeweiligen Schwellenwerts weitestgehend gleichauf und bildet zwischen 0.3 und 1.1 einen kleinen Anstieg. Hat die jeweilige Mutante einmal ihren Schwellenwert erreicht, wird die I1250-Mutante großflächig überragt.

schwarz	=	Wildtyp
rot	=	F1174L
violett	=	Y1604F
blau	=	R1275Q
grün	=	I1250T

Bei der I1250-Mutante trat das gleiche, inaktive Verhalten in der Zelllinie NIH/3T3 auf wie in SK-N-AS-Zellen. Untersucht wurden dabei 810 NIH/3T3-Zellen. Der bei den I1250T-ALK exprimierenden SK-N-AS-Zellen aufgetretene minimale Anstieg zwischen 0.3 und 1.1 war bei den NIH/3T3-Zellen nicht zu beobachten. Nun stellt dieser entweder ein zufälliges Ergebnis dar oder dieses Merkmal konnte sich in den NIH/3T3-Zellen nicht ausprägen. Auf die intrinsische Aktivität der SK-N-AS-Zellen ist dieser Anstieg nicht zurückzuführen, da er in den anderen untersuchten Streudiagrammen ausbleibt, wie aus Abb. 53, Abb. 55 und Abb. 56 zu entnehmen ist.

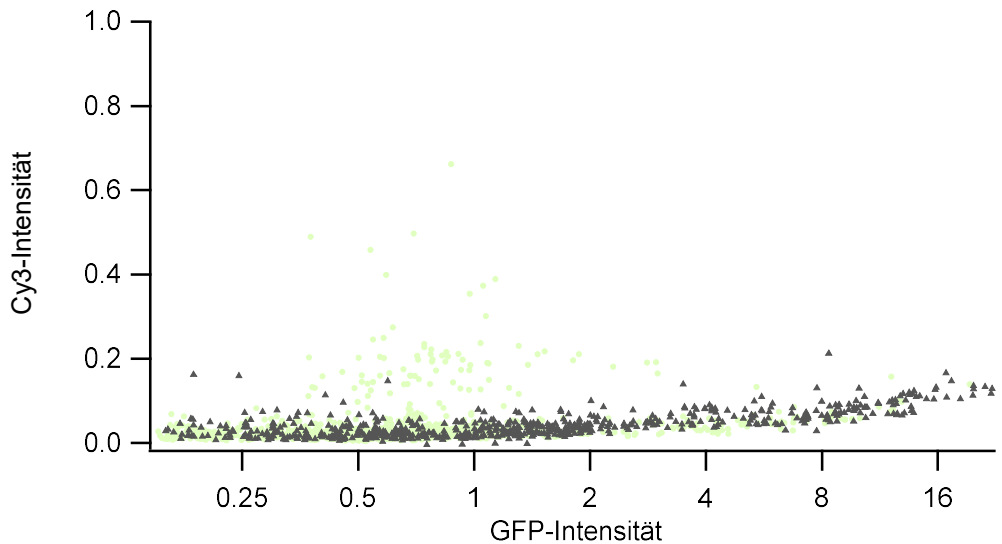


Abb. 57: Overlay der Streudiagramme für I1250T-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen
 Blass-grün hinterlegt sind SK-N-AS-Zellen, grau die NIH/3T3-Zellen, wobei beide den ALK-Rezeptor mit der I1250T-Mutation exprimieren. Die Koordinaten der beiden Zelllinien sind überwiegend deckungsgleich, somit ist das dargestellte Verhalten der I1250T-Mutation nicht auf die Zelllinie SK-N-AS beschränkt. Der für die I1250-Mutante beschriebene Anstieg zwischen 0.3 und 1.1 bleibt aus. Das Cy3-Maximum NIH/3T3-Zellen ist bei einer GFP-Intensität von 8.3 zu verorten und liegt mit 0.2 extrem niedrig. Zudem übertrifft es die anderen Werte kaum und ist somit als unwesentlich zu erachten.

3.1.1.6 Vergleichender Überblick über die ALK-Mutanten

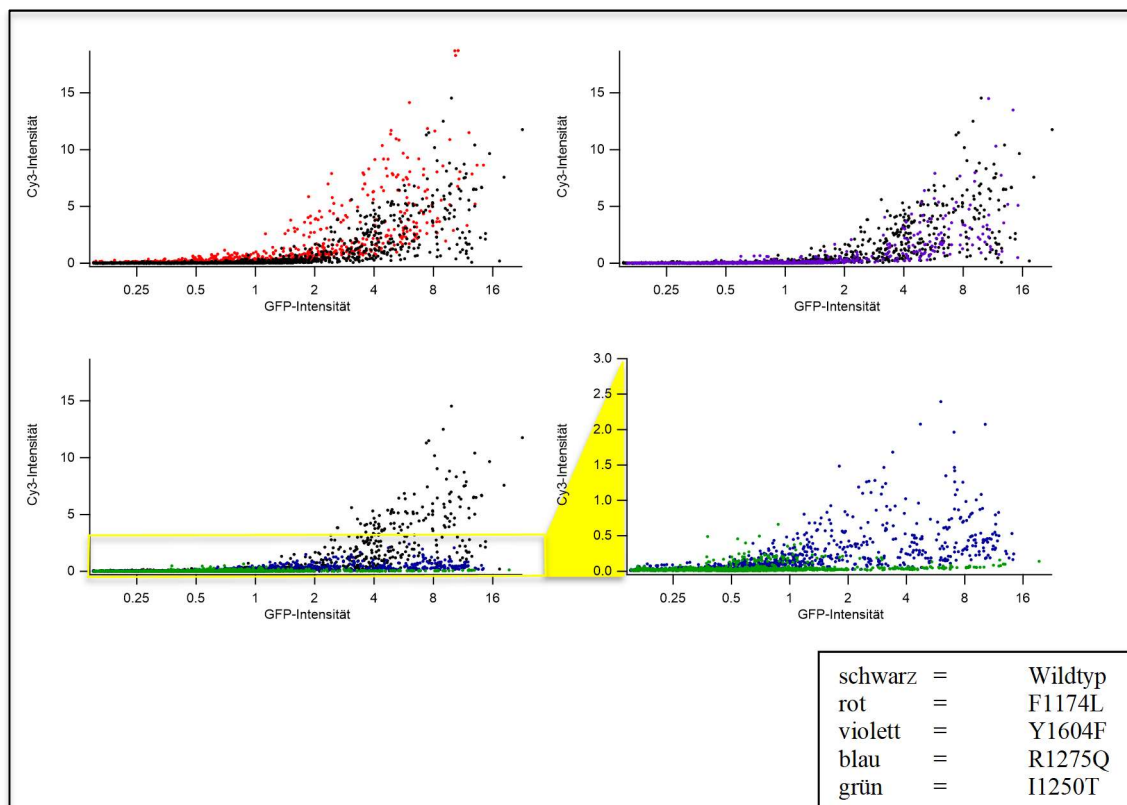


Abb. 58: Vergleichender Überblick über alle Streudiagramme
 Die verschiedenen ALK-Subtypen sind der Farbenlegende entsprechend dargestellt. Das Streudiagramm unten rechts zeigt einen vergrößerten Ordinatenabschnitt des nebenstehenden Diagramms. Auffällig ist die überschießende Cy3-Intensität der F1174-Mutante gegenüber den anderen ALK-Subtypen. Wildtyp- und Y1604F-ALK verhalten sich relativ kongruent, unter anderem betrefflich ihres Schwellenwerts bei einer GFP-Intensität von 2. Weiterhin zeigen sich wiederholt die relativ geringen Cy3-Intensitäten von R1275Q- und I1250T-ALK. Das rechts unten stehende Diagramm lässt jedoch erkennen, dass die R1275-Mutante im Vergleich zu I1250T insgesamt höhere Cy3-Intensitäten erreicht. Bei der I-Mutante hingegen ist keinerlei nennenswertes Cy3-Signal zu verzeichnen.

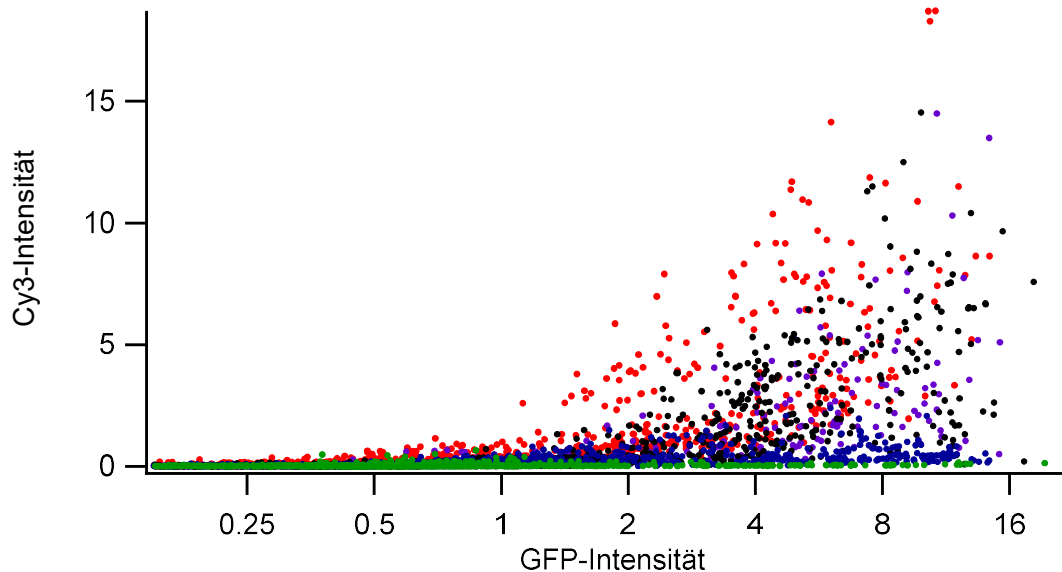


Abb. 59: Overlay der Streudiagramme aller untersuchten ALK-Subtypen

3.1.2 FRET-Messungen

3.1.2.1 FRET als Messinstrument für ALK-Autophosphorylierung

Durch die FRET-Messungen innerhalb der einzelnen Mutanten wurde versucht, die Phosphorylierungsrate der verschiedenen ALK-Rezeptoren zu erfassen. Wie einleitend bereits erklärt, fungiert beim *fluorescence resonance energy transfer* GFP als Donor und Cy3 als Acceptor. Ebenfalls erwähnt wurde bereits, dass das Auftreten des FRET einen maximalen Abstand von etwa 9 nm zwischen Acceptor und Donor beweist. Dass im Rahmen dieser Arbeit alle zur Transfektion verwendeten ALK-Rezeptoren an GFP gekoppelt exprimiert wurden, erlaubt die Gleichsetzung von ALK-Rezeptor und GFP-Signal. Der andere eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff Cy3 ist gegen Phosphotyrosinmoleküle gerichtet. In jeder Zelle liegt eine Gesamtheit an Phosphotyrosinmolekülen vor, welche von dem Cy3-Antikörper opsoniert werden können. Zu berücksichtigen ist dabei natürlich, dass in jeder Zelle ein Teil der Cy3-Fluoreszenz an Phosphotyrosine gebunden vorliegt, die sich unabhängig von der anaplastischen Lymphomkinase in phosphorylierter Form befinden. Liegt nun die Tyrosinkinase ALK in phosphorylierter und somit aktivierter Form vor, trägt sie ebenfalls ein Phosphotyrosin, welches opsoniert werden kann. Mit diesem Versuch konnte also zudem gezeigt werden, dass die Cy3-opsonierten Phosphotyrosinmoleküle jeder transfizierten SK-N-AS-Zelle zumindest zu einem bestimmten Teil den Phosphorylierungen des jeweiligen ALK-Rezeptors entsprechen. Diese Aussage ist dadurch möglich, dass bei den FRET-Untersuchungen nach dem Acceptorphotobleaching eine Signalerhöhung des GFP-Signals auftrat. Somit gilt ein Energie-Transfer von GFP zu Cy3 bei intaktem Cy3 als bewiesen und zudem ein Abstand der beiden Moleküle von maximal 10 nm. Dieser geringe Abstand ist hochsuggestiv dafür, dass das vor dem Acceptorphotobleaching die Energie aufnehmende Cy3-Molekül einer Phosphorylierung des ALK-Rezeptors entspricht. Somit ist in dieser Arbeit zumindest ein gewisser Anteil des Cy3-Signals mit den Phosphorylierungen des ALK-Rezeptors gleichzusetzen. Untersucht werden sollte jedoch in erster Linie, wie sich die FRET-Effizienzen der verschiedenen ALK-Subtypen im Vergleich verhalten respektive in welchem Maße die Rezeptortyrosinkinase bei den verschiedenen Subtypen autophosphoryliert vorliegt. Denn der Grad der Autophosphorylierung, wie einleitend erklärt, erlaubt letztendlich Rückschlüsse auf die ALK-Aktivität.

Betrachtet man nun die FRET-Effizienzen der einzelnen Mutanten im Vergleich, so liegt die F1174-Mutante vorne. Bei 62 von 90 untersuchten F1174L-ALK^{F1174L}-Zellen und somit knapp 69% lag die FRET-Effizienz über 10%. Darunter zeigten 32% der Zellen FRET-Werte über 15% und 10% Werte über 20% FRET. Bei 4% lag die FRET-Effizienz sogar über 25%. Die maximal erreichte FRET-Effizienz betrug 31%.

Danach folgte die Wildtyp-ALK mit 54 von 86 Zellen und damit knapp 63%, welche eine FRET-Effizienz von über 10% aufwiesen. Unter diesen war wiederum bei etwa 28% der Zellen über 15% FRET nachweisbar und 13% mit über 20% FRET-Effizienz. Nur 1% der erreichten FRET-Werte lag über 25%, darunter das Maximum mit 25,6%.

Ein leichter Abfall der FRET-Werte zeigte sich für die Y1604-Mutante. Hier lagen 47% der Events über 10% FRET, entsprechend 42 von 89 untersuchten Zellen. Davon erreichten 19% Werte über 15% FRET, Ergebnisse über 20% FRET wurden in knapp 6% der Messungen erzielt. Werte über 25% FRET wurden nicht erreicht. Die maximale FRET-Effizienz betrug 23,5%.

Die R1275-Mutante hingegen erzielte nicht einmal FRET-Werte über 15%. Bei lediglich 13 von 79 Zellen und somit 16% der Events lag das FRET-Ergebnis über 10%. Folglich ist bei ALK^{R1275Q}-Zellen aufgrund eines durchweg eher moderaten FRET-Signals von einer im Gegensatz zu ALK^{F1174L}, Wildtyp-ALK und ALK^{Y1604F} verminderten Autophosphorylierung der ALK-Rezeptortyrosinkinasen auszugehen.

Bei ALK^{I1250T}-Zellen blieb ein FRET-Signal bis auf einige geringe Schwankungen vollständig aus. Bei 70 von den 80 hier akquirierten Acceptorphotobleaching-Aufnahmen konnte überhaupt kein FRET detektiert werden. Bei 10 Aufnahmen wurde mit durchschnittlich 4,8% FRET lediglich ein Aufkommen unter dem Signifikanzniveau erreicht. Dies lässt darauf schließen, dass die ALK-Rezeptortyrosinkinase in den I1250T-ALK-Zellen gar nicht oder nur in unwesentlicher Anzahl autophosphoryliert vorliegt.

Wildtyp

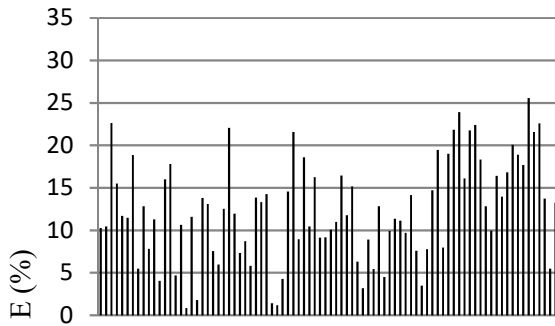


Abb. 60: FRET-Effizienzen der Wildtyp-ALK-Zellen

F1174L

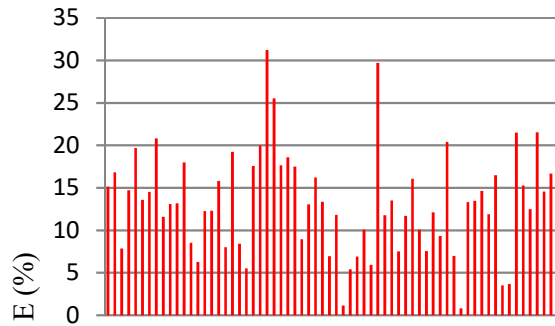


Abb. 61: FRET-Effizienzen der F1174L-ALK-Zellen

Y1604F

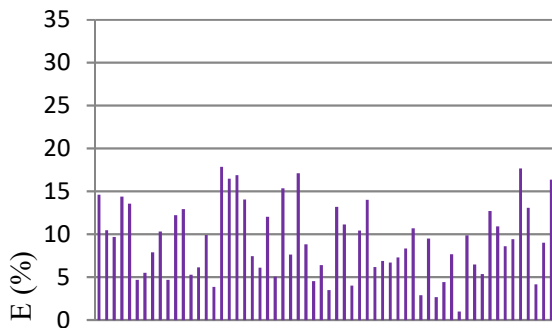


Abb. 62: FRET-Effizienzen der Y1604F-ALK-Zellen

R1275Q

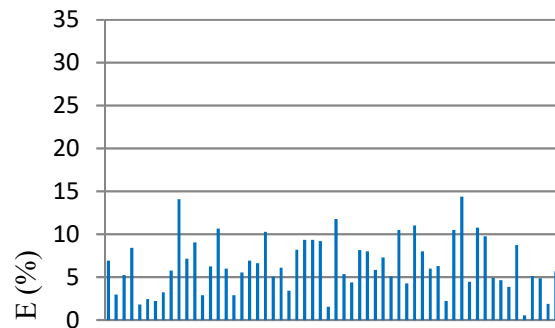


Abb. 63: FRET-Effizienzen der R1275Q-ALK-Zellen

Abb. 60 - Abb. 63: Darstellung der einzelnen, gemessenen FRET-Ergebnisse für die untersuchten Mutanten. Jeder Balken repräsentiert eine Messung und somit die Autophosphorylierung einer Zelle, an welcher eine FRET-Messung vorgenommen wurde. Die Werte der I1250T-Mutante sind nicht illustriert, da diese vernachlässigbar sind. Bei F1174L werden die höchsten FRET-Effizienzen erreicht, 69% liegen über 10% FRET, 10% über 20% FRET und 4% über 25% FRET. Bei Wildtyp-ALK liegen 63% der FRET-Effizienzen über 10, 13% über 20% FRET und 1% über 25% FRET. Bei Y1604F erreicht keine Zelle eine FRET-Effizienz über 25%, jedoch 6% der Events 20% und 47% zeigen über 10% FRET. Bei der R1275-Mutante erreichten 16% der Zellen FRET-Werte zwischen 10 und 15%, jedoch keine Werte darüber hinaus.

Weiterhin wurde der Mittelwert für jeden untersuchten ALK-Subtyp errechnet. Dabei ergab sich für F1174L ein durchschnittlicher FRET-Wert von 13%, für Wildtyp 12%, für Y1604F von 10% und für R1275Q von 6%. Die gemittelten Werte der I1250T-ALK-Zellen lagen unter 5%, zudem war bei zahlreichen anderen Messungen von ALK^{I1250T}-Zellen gar kein *fluorescence resonance energy transfer* detektiert worden. Eine relevante FRET-Effizienz galt bei dieser Mutante somit als nicht nachweisbar.

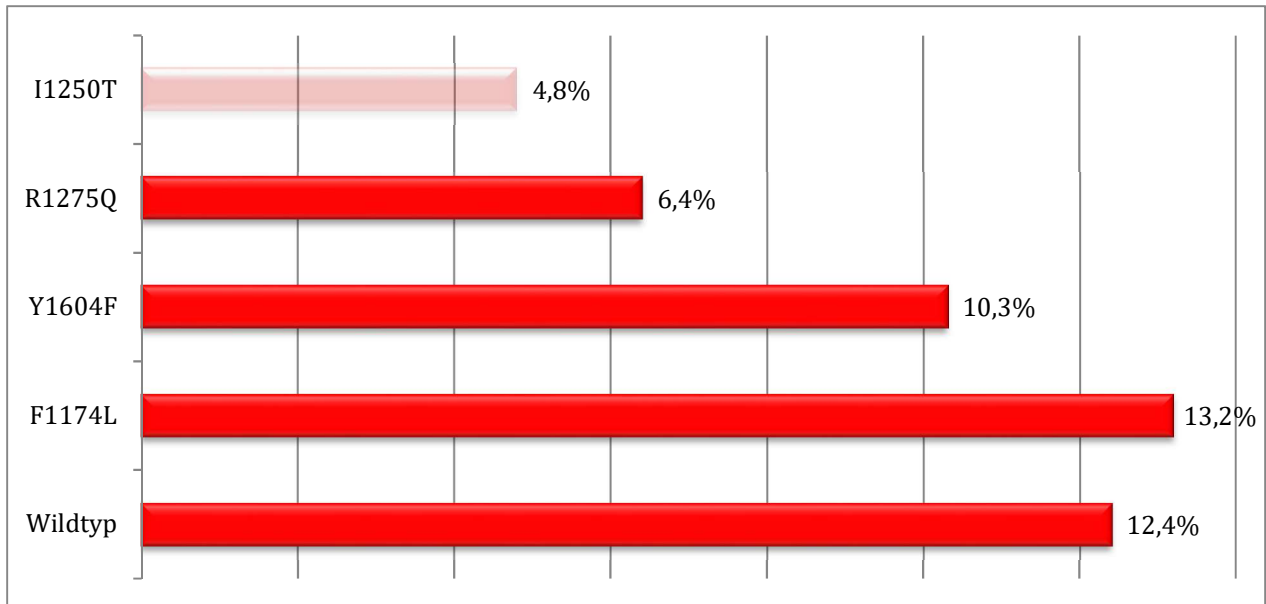


Abb. 64: Histogramm der gemittelten FRET-Werte der ALK-Subtypen

F1174L zeigt mit 13,2 Prozent die durchschnittlich höchsten FRET-Effizienzen. Danach folgen direkt die Wildtyp-ALK-Zellen mit im Schnitt 12,4% FRET. Ein leichter Abfall zeigt sich bei der Y1604-Mutante mit 10,3% FRET. Die R1275Q-ALK-Zellen zeigten durchschnittliche FRET-Effizienzen von 6,4% und besitzen damit ein eher gemäßigtes FRET-Signal. Die I1250-Mutante ist zur Vollständigkeit aufgeführt, verfügt jedoch nicht über nennenswerte FRET-Werte.

Konkret bedeuten die aufgeführten Ergebnisse, dass in ALK^{F1174L} exprimierenden Zellen der ALK-Rezeptor am häufigsten autophosphoryliert vorliegt. Dadurch wird wiederum eine vergleichsweise hohe Aktivität von F1174L-ALK nahegelegt. Gefolgt wird diese von Wildtyp- und Y1604F-ALK. Die R1275-Mutante weist dagegen gemäßigte FRET-Effizienzen auf, ergo liegt ALK^{R1275Q} relativ gering autophosphoryliert vor. ALK^{I1250T} scheint mit der weitaus geringsten Häufigkeit phosphoryliert zu sein.

Bei Betrachtung der FRET-Effizienzen im Zusammenschau mit den im Vorhergehenden dargelegten Streudiagrammen der verschiedenen ALK-Subtypen zeigen sich vor allem im Hinblick auf die maximal erreichte Cy3-Intensität deutliche Parallelen. Die F1174-Mutante weist mit 13% die höchste durchschnittliche FRET-Effizienz auf und liegt auch hinsichtlich ihres Cy3-Maximums weit über den anderen ALK-Subtypen mit Ordinatenwerten über 15. Nahe dahinter folgt die Wildtyp-ALK mit einem maximalen Cy3-Wert von 14,53 und auch hinsichtlich der FRET-Messung der F1174-Mutante ähnlichen Werten. ALK^{Y1604F} nimmt sowohl in den Streudiagrammen, als auch bezüglich der FRET-Effizienzen eine Intermediärposition zwischen F1174L und Wildtyp einerseits und R1275Q und I1250T andererseits ein. R1275Q und I1250T liegen analog bei der FRET-Messung und dem Cy3-Maximum mit großem Abstand hinter den anderen ALK-Subtypen.

Diese Beobachtung erlaubt den Rückschluss, dass die Cy3-Level der Zellen hier sehr wahrscheinlich durch die Menge autophosphorylierter ALK-Moleküle bestimmt sind. Das Cy3-oponierete Phosphotyrosin scheint damit zu einem Großteil den Phosphorylierungen des ALK-Rezeptors zu entsprechen, beziehungsweise den durch ALK phosphorylierten Signalkaskaden.

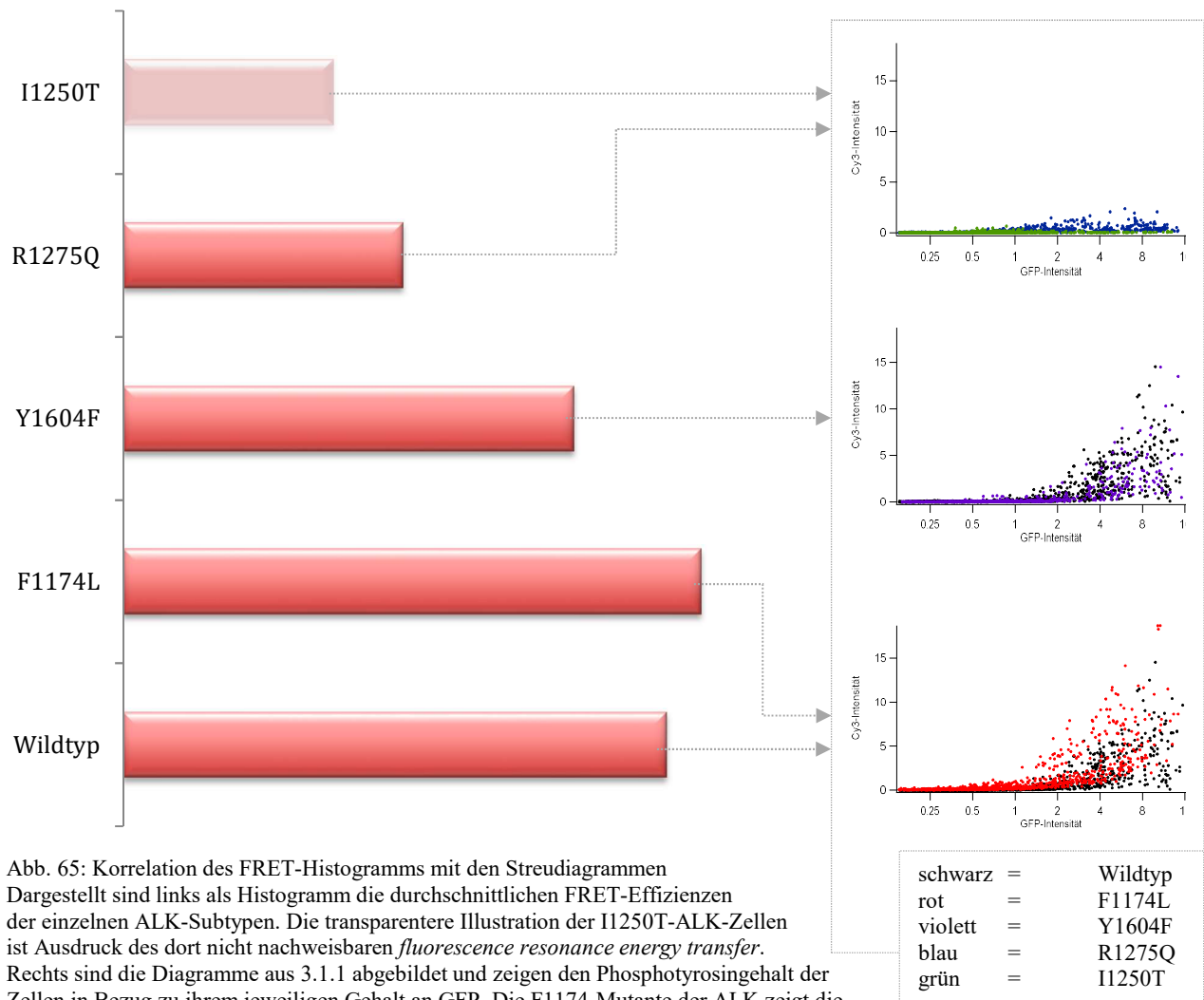


Abb. 65: Korrelation des FRET-Histogramms mit den Streudiagrammen
 Dargestellt sind links als Histogramm die durchschnittlichen FRET-Effizienzen der einzelnen ALK-Subtypen. Die transparentere Illustration der I1250T-ALK-Zellen ist Ausdruck des dort nicht nachweisbaren *fluorescence resonance energy transfer*. Rechts sind die Diagramme aus 3.1.1 abgebildet und zeigen den Phosphotyrosingehalt der Zellen in Bezug zu ihrem jeweiligen Gehalt an GFP. Die F1174-Mutante der ALK zeigt die Höchste FRET-Effizienz und auch den höchsten Ordinatenwert für Cy3 (Streudiagramm rechts, rot). Wildtyp und Y1604F liegen hinsichtlich ihrer FRET-Werte gleichauf und weisen zudem ungefähr gleich hohe Cy3-Maxima auf. Die R1275- und I1250-Mutante der ALK liegen sowohl hinsichtlich des FRET-Aufkommens als auch der Cy3-Werte deutlich hinter den anderen ALK-Formen zurück.

3.1.3 Zytomorphologie der ALK-Subtypen

Innerhalb der ALK-Subtypen konnten bei der Durchsicht mehrerer hundert unter dem Mikroskop aufgenommener Zellen morphologische Unterschiede hinsichtlich Fluoreszenz-Konfiguration und intrazellulärer Verteilung des GFP-Signals festgestellt werden. Da das GFP-Signal an die jeweils eingebrachten ALK-Rezeptor-Subtypen gekoppelt exprimiert wird, erlaubt die grüne GFP-Fluoreszenz Rückschlüsse auf Lokalisation und Verteilung der ALK-Rezeptoren innerhalb der Zelle. Auf Fluoreszenzsignale und Zytomorphologie der untersuchten Zelltypen soll im Folgenden eingegangen werden. Dabei wird auf die am häufigsten registrierte Morphologie jeder Mutante eingegangen, dies soll jedoch nicht heißen, dass die jeweiligen Zellen ausschließlich in dieser Gestalt vorlagen. Zur Illustration zeigen die folgenden Abbildungen Aufnahmen von SK-N-AS-Zellen mit dem Weitfeld- und Konfokalmikroskop. Wie bereits ausgeführt fluoresziert GFP dabei mit einem grünen und Cy3 mit einem roten Signal. Da die Fokaladhäsionen der Zellen ebenfalls Phosphotyrosin enthalten (Wouters und Bastiaens 1999), sind diese oftmals punktförmig im Cy3-Fluoreszenzsignal zu erkennen.

3.1.3.1 Morphologie der Wildtyp-ALK

Die mit Wildtyp-ALK transfizierten Zellen sind mehrheitlich durch ein flächiges GFP-Signal gekennzeichnet. Wurde beim Mikroskopieren auf die Zellmembran fokussiert, konnten die Zellen in ihrer gesamten Ausdehnung abgebildet werden, selbst zarte Membran-Ausläufer zeigten ein GFP-Signal.

Um den Zellkern herum ist häufig eine Steigerung der GFP-Intensität zu beobachten. Am ehesten weist dies auf eine perinukleäre Anreicherung von Rezeptormolekülen hin.

Die Cy3-Fluoreszenz als rotes Signal variiert von nur einigen punktförmigen Fokaladhäsionen bis hin zu einer flächigen, dem GFP-Signal entsprechenden Cy3-Fluoreszenz. Der eingesetzte Cy3-Antikörper opsoniert zwar die Gesamtheit aller Phosphotyrosinmoleküle der Zelle und nicht nur die phosphorylierten ALK-Rezeptortyrosinkinasen, trotzdem ähnelt die Cy3-Verteilung dabei auffällig oft deren GFP-Muster. Dies bildet ein weiteres Indiz für die durch aktivierte ALK bedingte Phosphotyrosinmenge der Zellen.

Zytomorphologisch präsentierten sich die mit Wildtyp-ALK transfizierten Zellen breit aufsitzend mit zahlreichen Ausläufern und im Vergleich zu den anderen ALK-Subtypen wenig kompakt. Dieses breitgewalzte Wachstum bedingt umfangreichen Kontakt zur Auflagefläche und könnte eventuell auf eine gesteigerte Adhäsivität der Zellen hindeuten.

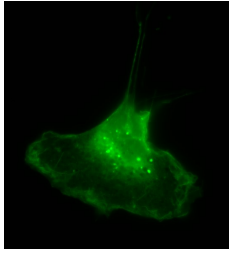


Abb. 66: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

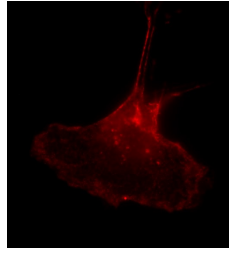


Abb. 67: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

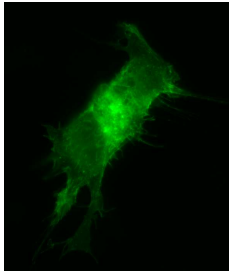


Abb. 68: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

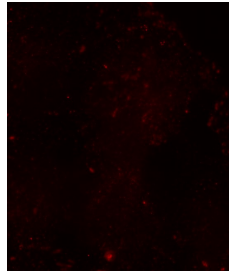


Abb. 69: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

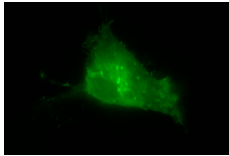


Abb. 70: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

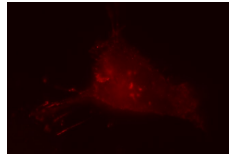


Abb. 71: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

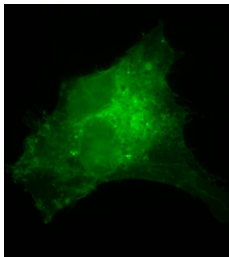


Abb. 72: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

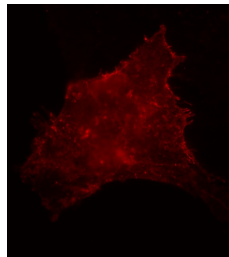


Abb. 73: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

Abb. 68 - Abb. 73: Abgebildet sind mit Wildtyp-ALK transizierte SK-N-AS-Zellen. Dabei bildet jede Reihe eine Zelle ab, das jeweils linke, grüne Bild zeigt den GFP-Fluoreszenzkanal, das rechte, rote Bild den Cy3-Kanal. Die Zellen zeigen sich flächig und breit aufsitzend mit zahlreichen feinen Ausläufern. Perinukleär zeigen sich klumpige GFP-Konglomerate mit hoher Fluoreszenzintensität. Das Cy3-Signal variiert in seiner Intensität von spärlichen Fokaladhäsionen wie in Abb. 69, bis hin zu einem kräftigen roten Fluoreszenzsignal, entsprechend Abb. 73. Besteht ein gut abgrenzbares Cy3-Signal, so korreliert es stets zu der Verteilung der GFP-Fluoreszenz.

Des Weiteren fiel in der Mikroskopie ein dichtes Zusammenwachsen der Zellen im Verband auf. Interzellulär zeigten sich Zytoplasmabrücken, am ehesten im Sinne adhäsiver Prozesse. Häufig wuchsen die Zellen regelrecht übereinander.

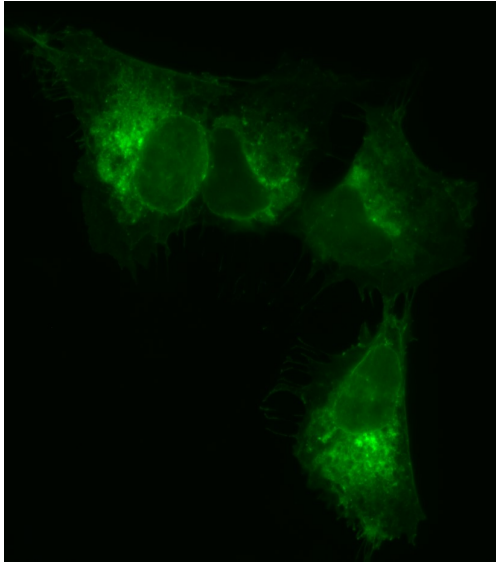


Abb. 74: Wildtyp-ALK-exprimierende SK-N-AS-Zellen

Abb. 74 - Abb. 76: Drei verschiedene Aufnahmen mit Wildtyp-ALK transfizierter SK-N-AS-Zellen im GFP-Fluoreszenzkanal. Die Zellen wachsen dicht aneinander heran. Interzellulär sind deutliche Zytoplasmabrücken zu erkennen. Abb. 74 lässt zudem bei der Betrachtung der Zellen links oben ein Wachstum übereinander vermuten.

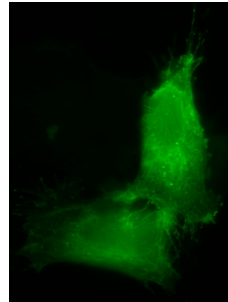


Abb. 75: Wildtyp-ALK-exprimierende SK-N-AS-Zellen

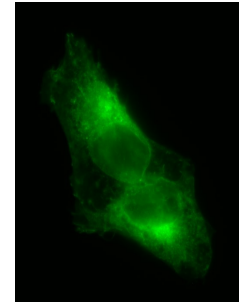


Abb. 76: Wildtyp-ALK-exprimierende SK-N-AS-Zellen

Zudem konnten bei Wildtyp-ALK-Zellen zahlreiche kreisrunde Aussparungen, am ehesten Einschlüsse oder Vakuolen verschiedener Größe beobachtet werden.

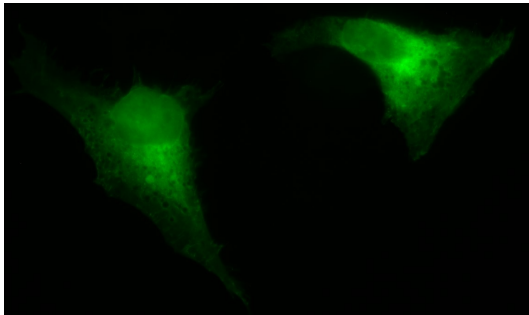


Abb. 77: Vakuolen in Wildtyp-ALK-Zellen

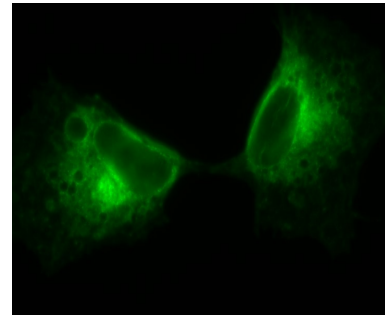


Abb. 78: Vakuolen in Wildtyp-ALK-Zellen

Abb. 77, Abb. 78: Exemplarische Darstellung mit Wildtyp-ALK transfizierter SK-N-AS-Zellen. Beide Abbildungen zeigen zahlreiche kreisrunde dunkle Aussparungen verschiedener Größe, die am ehesten als Vakuolen oder sonstige Einschlüsse im Zytoplasma zu verstehen sind.

Zudem wurden Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop erstellt. Bei Fokussierung auf die Zellmembran stellte sich wiederholt das bereits im Weitfeldmikroskop beobachtete, flächig-homogene Fluoreszenzmuster dar.

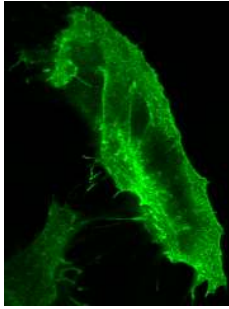


Abb. 79: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop

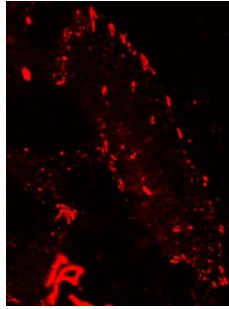


Abb. 80: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop

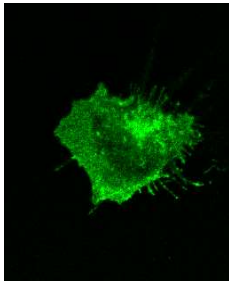


Abb. 81: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop

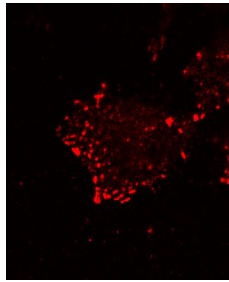


Abb. 82: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop

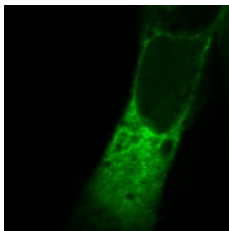


Abb. 83: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop

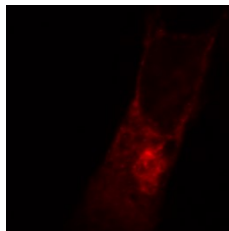


Abb. 84: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop

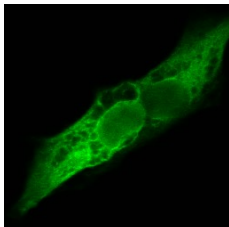


Abb. 85: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop

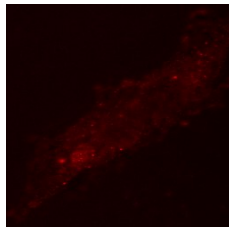


Abb. 86: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop

Abb. 79 - Abb. 86: Konfokale Aufnahmen Wildtyp-ALK exprimierender SK-N-AS-Zellen. Zytomorphologisch imponieren die abgebildeten Zellen breit ausgezogen und plan. Bei Fokussierung auf die Zellmembran in Abb. 79 - Abb. 82 zeigt sich ein flächiges, konturierendes Fluoreszenzmuster. Zahlreiche Ausläufer säumen die Zellmembran. Im Cy3-Kanal dieser Beispiele zeigen sich punktförmige Fokaladhäsionen. Die Abb. 83 - Abb. 86 zeigen einen axialen Querschnitt durch das Zytoplasma. Dort ist das GFP-Signal von zahlreichen Einschlüssen, beziehungsweise Vakuolen durchsetzt und die Intensität vergleichbar mit dem GFP-Signal der Zellmembran. Das Cy3-Signal dieser Aufnahmen bildet ein schwaches Abbild des grünen GFP-Musters.

Um das Fluoreszenzmuster der gesamten Wildtyp-ALK-Zelle im Querschnitt zu beurteilen, wurden mit dem Konfokalmikroskop Z-Stacks erstellt. Dabei erfolgte eine in der Transversalebene geschichtete Darstellung der jeweiligen Zelle. Bis auf die bereits beschriebene perinukleäre Signalsteigerung zeigte das GFP-Signal der Zellmembran und des Zytoplasmas eine homogene Verteilung. Als Abbild dessen stellt sich auch das Cy3-Signal dar.

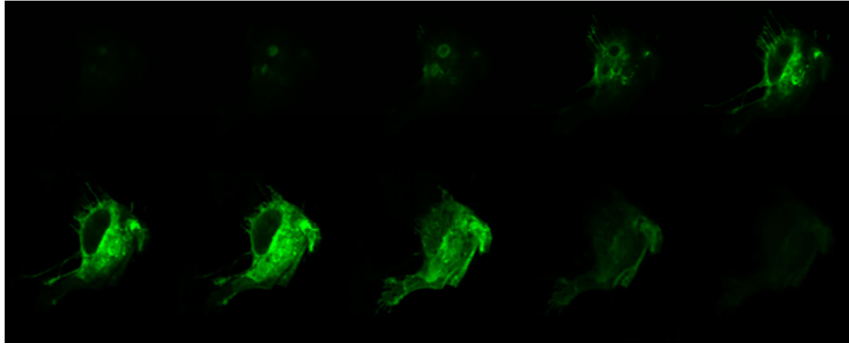


Abb. 87: Z-Stack einer Wildtyp-ALK-Zelle (GFP-Bild)

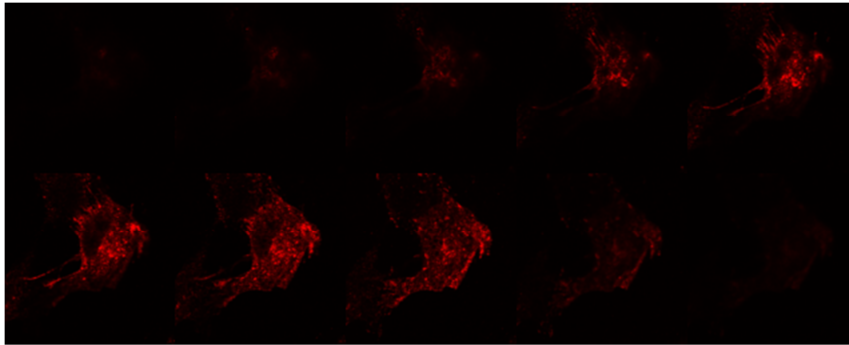


Abb. 88: Z-Stack einer Wildtyp-ALK-Zelle (Cy3-Bild)

Abb. 87, Abb. 88: Z-Stack einer Wildtyp-ALK-Zelle. Abb. 87 zeigt die GFP-Fluoreszenz einer Wildtyp-ALK exprimierenden SK-N-AS-Zelle. Diese wurde als Z-Stack mit dem Konfokalmikroskop aufgenommen und ist hier als Montage dargestellt. Das bedeutet, dass die Zelle in der transversalen z-Achse "durchgefächert" wird, in der Abbildung begonnen links oben bis rechts unten. Abb. 88 zeigt analog das Cy3-Signal derselben Zelle. Es zeigt sich eine weitestgehend homogene Verteilung der GFP-Fluoreszenz über die gesamte Zelle, jedoch mit perinukleärer Zunahme der Fluoreszenzintensität. Das Cy3-Signal folgt dieser Verteilung.

3.1.3.2 Morphologie der F1174L-Mutante

Die Mehrheit der F1174L-ALK exprimierenden SK-N-AS-Zellen stellen sich in der Mikroskopie als dicht gepackte Zellen mit krauser, schaumiger Struktur dar. Das kompakte Zytoplasma und die nur blass fluoreszierende Zellmembran lassen eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation der Rezeptormoleküle vermuten. Zytomorphologisch betrachtet imponieren die Zellen überwiegend oval bis rundlich und im Gegensatz zu den vorher betrachteten, flächigen Wildtyp-ALK-Zellen eher kugelig als flächig.

Auch hier präsentiert sich eine Variabilität der Cy3-Fluoreszenz, jedoch treten hier deutlich häufiger kräftige Cy3-Signale als bei den anderen Mutanten auf. Möglicherweise ist bei ALK^{F1174L}-Zellen grundsätzlich von einem höheren intrazellulären Phosphotyrosinlevel auszugehen. Auch das perinukleär gehäufte GFP- und Cy3-Signal bildet sich hierbei deutlicher ab als bei Wildtyp-ALK-Zellen.

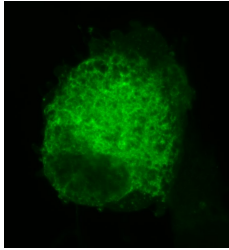


Abb. 89: GFP-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

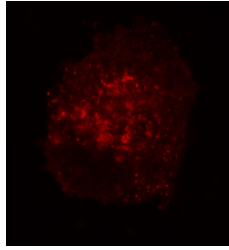


Abb. 90: Cy3-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

Abb. 89 - Abb. 94: Dargestellt sind Aufnahmen von F1174L-ALK exprimierenden SK-N-AS-Zellen im Weitfeldmikroskop. Im GFP-Kanal zeigt sich im Zytoplasma gekräuselt-schaumig und kompakt angeordnete grüne Fluoreszenz. Im jeweiligen C3-Bild korreliert dazu ein kräftiges, rotes Fluoreszenzsignal.

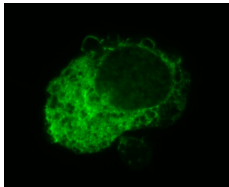


Abb. 91: GFP-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

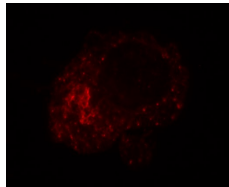


Abb. 92: Cy3-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

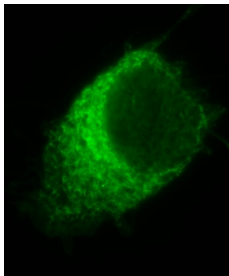


Abb. 93: GFP-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

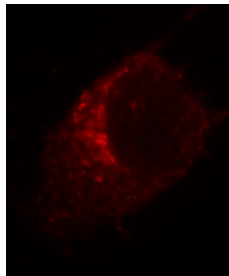


Abb. 94: Cy3-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

Bei den F1174L-Zellen waren, analog zu den Wildtyp-Zellen, perinukleär lokalisierte Fluoreszenzaggregate zu beobachten.

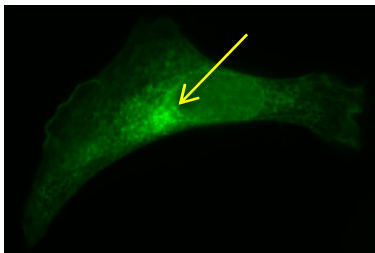


Abb. 95: Fluoreszenz-Konglomerat in einer F1174L-ALK-Zelle (GFP-Bild)

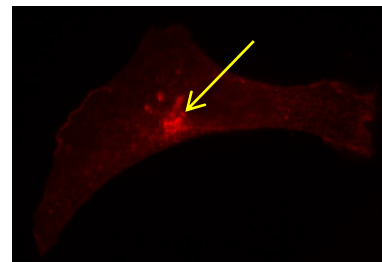


Abb. 96: Fluoreszenz-Konglomerat in einer F1174L-ALK-Zelle (Cy3-Bild)

Abb. 95, Abb. 96: Darstellung zweier mit F1174L-ALK transfizierter SK-N-AS-Zellen, Abb. 95 zeigt die GFP-Fluoreszenz, Abb. 96 das Cy3-Signal. Der gelbe Pfeil markiert jeweils ein dem Zellkern direkt anliegendes, fluoreszierendes Aggregat.

Auch die mit ALK^{F1174L} transfizierten Zellen wachsen dicht aneinander. Abermals konnten stark vernetzte übereinander wachsende Zellen beobachtet werden.

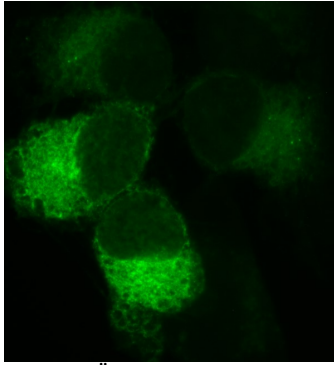


Abb. 97: Übereinander wachsende F1174L-ALK-Zellen

Abb. 97, Abb. 98: Abbildungen diverser F1174L-ALK exprimierender SK-N-AS-Zellen. Die Zellen wachsen, teilweise mit direktem Kontakt, dicht aneinander. Abb. 98 lässt zudem vermuten, dass die Zellen übereinander wachsen.

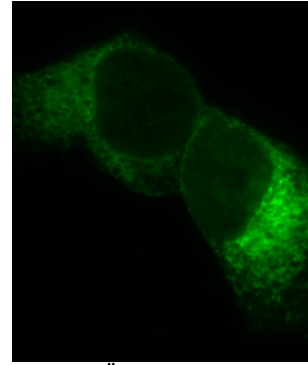


Abb. 98: Übereinander wachsende F1174L-ALK-Zellen

Auch von der F1174-Mutante wurden konfokale Aufnahmen zur genaueren Analyse intrazellulärer Strukturen erstellt. Im Querschnitt zeigt sich das gesamte Zytoplasma dicht mit GFP- und auch Cy3-Fluoreszenz gefüllt.

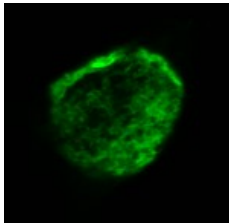


Abb. 99: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)

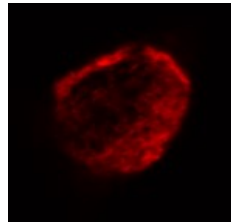


Abb. 100: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild)

Abb. 99 - Abb. 104: Mit F1174L-ALK transfizierten SK-N-AS-Zellen in der konfokalen Mikroskopie. Die linksstehenden Abbildungen illustrieren das GFP-, die rechtsstehenden Abbildungen das Cy3-Signal. Die Zellen imponieren kugelig und oval bis rundlich. Die im Zytoplasma der Zelle enthaltene GFP-Fluoreszenz wirkt schaumig und kompakt.

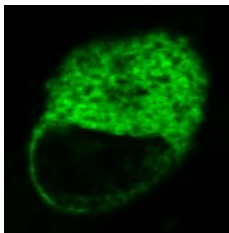


Abb. 101: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)

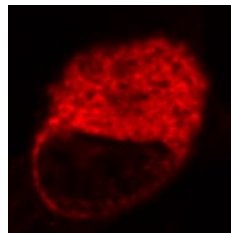


Abb. 102: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild)

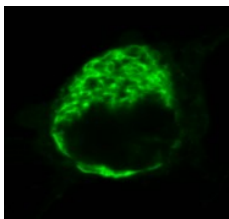


Abb. 103: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)

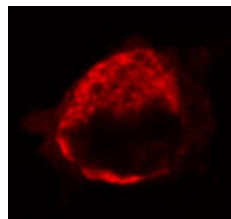


Abb. 104: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild)

In der transversalen Durchfächerung der F1174L-ALK-Zellen mittels der Anfertigung von Z-Stacks zeigten sich die Zellen, unter Aussparung des Nukleus, dicht mit GFP-Fluoreszenz durchsetzt. Beinahe von gleicher Intensität präsentierte sich das Cy3-Signal in der transversalen Durchsicht, ein weiterer Hinweis auf das hohe Phosphotyrosinlevel dieser Mutante.

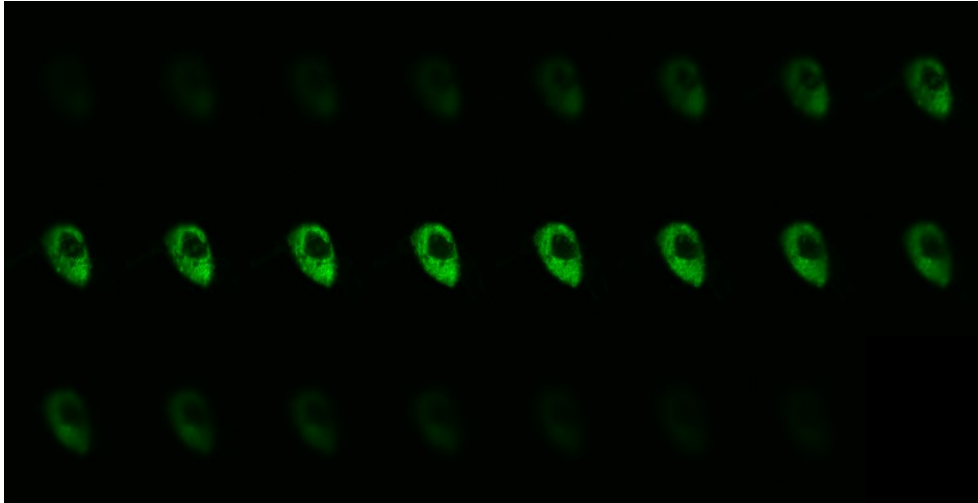


Abb. 105: Z-Stack einer F1174L-ALK-Zelle (GFP-Signal)

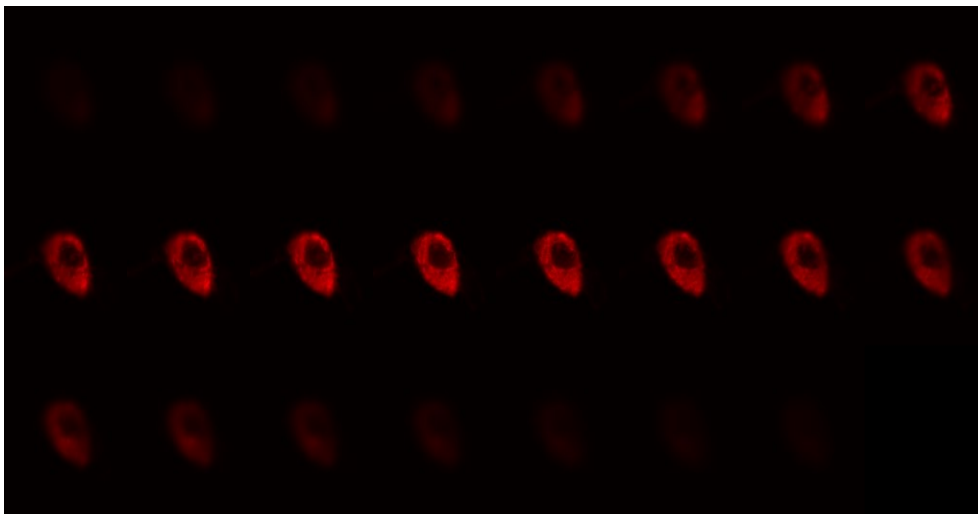


Abb. 106: Z-Stack einer F1174L-ALK-Zelle (Cy3-Signal)

Abb. 105, Abb. 106: F1174L-exprimierende SK-N-AS-Zellen, transversal geschichtet, von links oben nach rechts unten abgebildet. Das GFP-Signal in Abb. 105 durchsetzt kompakt die gesamte Zelle, das Cy3-Signal in Abb. 106 folgt dieser Anordnung.

3.1.3.3 Morphologie der R1275Q-Mutante

Ähnlich der F1174-Mutante imponiert das Zytoplasma der R1275Q-Mutante schaumig und gekräuselt, jedoch ist die Fluoreszenz weniger dicht angeordnet. Das Zellinnere wirkt aufgelockert mit gleichmäßiger, retikulärer Struktur. Betont häufig zeigen sich perinukleäre Areale mit erhöhter Fluoreszenzintensität. Insgesamt wirken die ALK^{R1275Q} -Zellen weniger kugelig und leicht entrundet im Vergleich zu den ALK^{F1174L} -Zellen. Zudem weisen die Cy3-Signale im Vergleich zur F1174-Mutante vorwiegend geringere Fluoreszenzintensitäten auf.

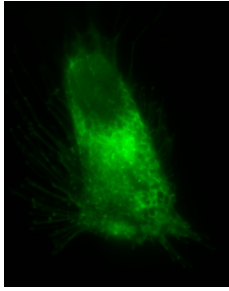


Abb. 107: GFP-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

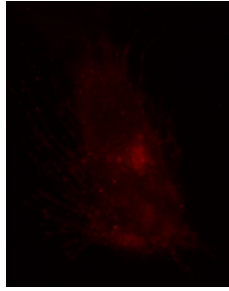


Abb. 108: Cy3-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

Abb. 107 - Abb. 116: Dargestellt sind R1275Q-ALK exprimierende SK-N-AS-Zellen im Weitfeldmikroskop. Links ist der GFP-, rechts der Cy3-Fluoreszenzkanal illustriert. Das GFP-Signal des Zytoplasmas imponiert schaumig-retikulär und aufgelockert. Die Zellen wirken nicht ganz kugelig, vielmehr abgeflacht mit feinen Ausziehungen. Der Cy3-Kanal bildet ein schwaches Abbild der grünen Fluoreszenz. Die hellen Areale des GFP-Bilds zeigen sich mit gesteigerter Fluoreszenz im Cy3-Bild.

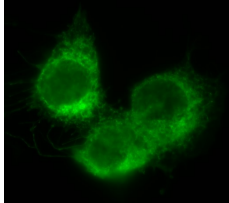


Abb. 109: GFP-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

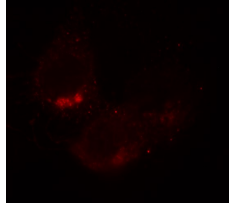


Abb. 110: Cy3-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

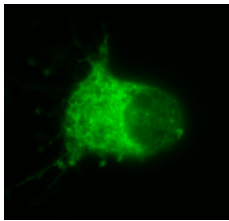


Abb. 111: GFP-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

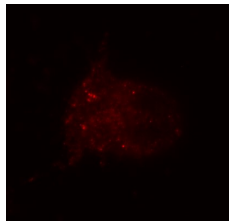


Abb. 112: Cy3-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

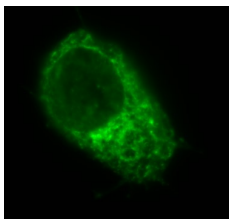


Abb. 113: GFP-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

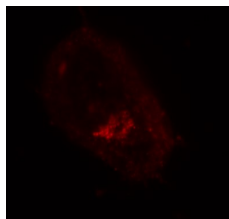


Abb. 114: Cy3-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

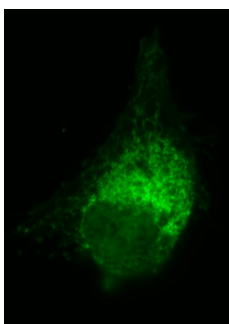


Abb. 115: GFP-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

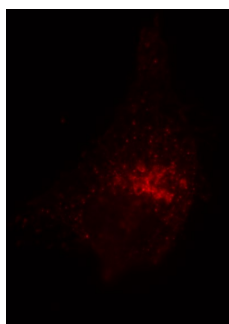


Abb. 116: Cy3-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

Im Vergleich zu den anderen ALK-Subtypen tritt bei der R1275-Mutante gehäuft ein akkumuliertes GFP-Signal im perinukleären Bereich auf. Im Cy3-Bild korreliert dazu in den entsprechenden Arealen eine dicht-komprimierte rote Fluoreszenz.

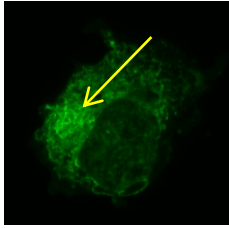


Abb. 117: Perinukleär akkumulierte Fluoreszenz in R1275Q-ALK-Zellen (GFP-Bild)

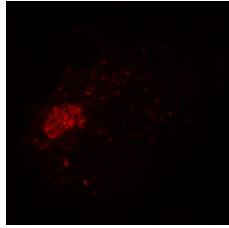


Abb. 118: Perinukleär akkumulierte Fluoreszenz in R1275Q-ALK-Zellen (Cy3-Bild)

Abb. 117 - Abb. 120: Gezeigt sind Aufnahmen von R1275Q-ALK-Zellen im Weitfeldmikroskop. Im GFP-Kanal zeigt sich ein retikuläres grünes Signal, die gelben Pfeile kennzeichnen perinukleäre Aufhellungen. Diesen entspricht im jeweiligen Cy3-Bild ein Aggregat roter Fluoreszenz. Diese zeigt höchstwahrscheinlich die phosphorylierten ALK-Moleküle dieses Areals an.



Abb. 119: Perinukleär akkumulierte Fluoreszenz in R1275Q-ALK-Zellen (GFP-Bild)

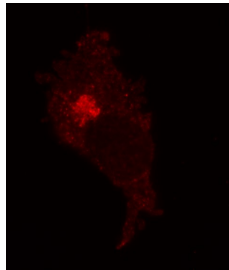


Abb. 120: Perinukleär akkumulierte Fluoreszenz in R1275Q-ALK-Zellen (Cy3-Bild)

Das bereits bei Wildtyp und F1174L beschriebene dichte Wachstum der Zellen an- und übereinander ist bei R1275Q-ALK-Zellen ebenfalls zu beobachten.

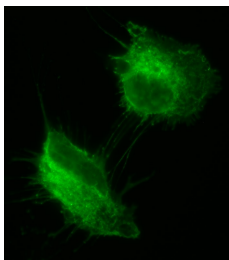


Abb. 121: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (GFP-Signal)

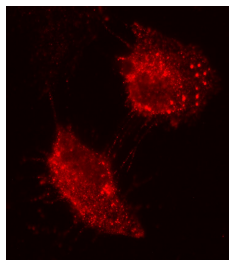


Abb. 122: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (Cy3-Signal)

Abb. 121 - Abb. 126: Gezeigt sind mit R1275Q-ALK transfizierten SK-N-AS-Zellen im Weitfeldmikroskop. Zu sehen sind interzelluläre Zytoplasmabrücken, dichtes aneinander, beziehungsweise übereinander Wachsen der Zellen. In Abb. 125 und Abb. 126 erscheinen die Zellen optisch nicht voneinander getrennt.

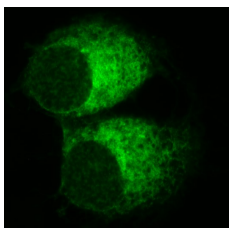


Abb. 123: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (GFP-Signal)

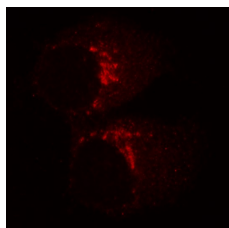


Abb. 124: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (Cy3-Signal)

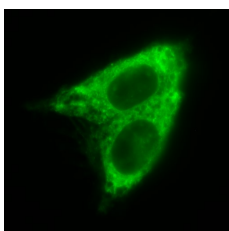


Abb. 125: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (GFP-Signal)

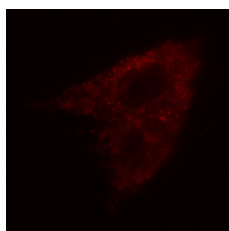


Abb. 126: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (Cy3-Signal)

Im Querschnitt durch das Innere der Zelle mittels konfokaler Mikroskopie ist abermals eine perinukleäre Anhäufung der Fluoreszenz zu verzeichnen. Weiterhin kommt die im Gegensatz zu den kugeligen F1174L-Zellen eher flächige Konfiguration der R1275-Mutante zur Darstellung, ebenso wie dezent fluoreszierende Ausziehungen der Zellmembran.

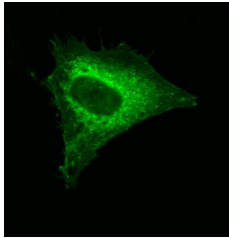


Abb. 127: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Kanal)

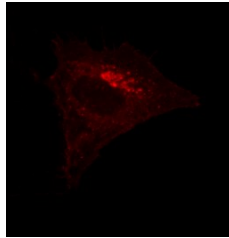


Abb. 128: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Kanal)

Abb. 127 - Abb. 132: Abgebildet sind konfokale Aufnahmen von R1275Q exprimierenden SK-N-AS-Zellen im GFP- und im Cy3-Kanal. Die Zellen zeigen allesamt eine perinukleär konzentrierte grüne Fluoreszenz. Nach peripher läuft die Zelle unter abnehmendem Fluoreszenzsignal aus. Das rote Cy3-Signal folgt dem Muster des GFP-Signals.

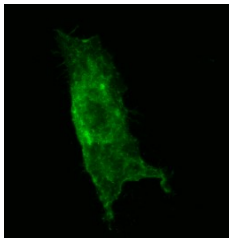


Abb. 129: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Kanal)

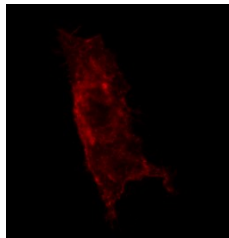


Abb. 130: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Kanal)

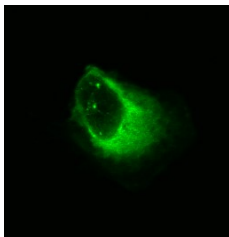


Abb. 131: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Kanal)

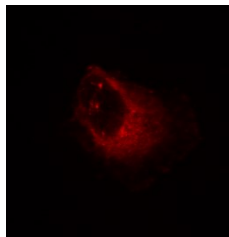


Abb. 132: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Kanal)

Auch die Betrachtung einer in der z-Achse gefächerten ALK^{R1275Q} -Zelle stützt die Annahme, dass das stärkste GFP-Signal und damit die meisten Rezeptormoleküle im perinukleären Zytoplasma zu verorten sind. Als Cy3-Korrelat findet sich dort konzentrierte rote Fluoreszenz.

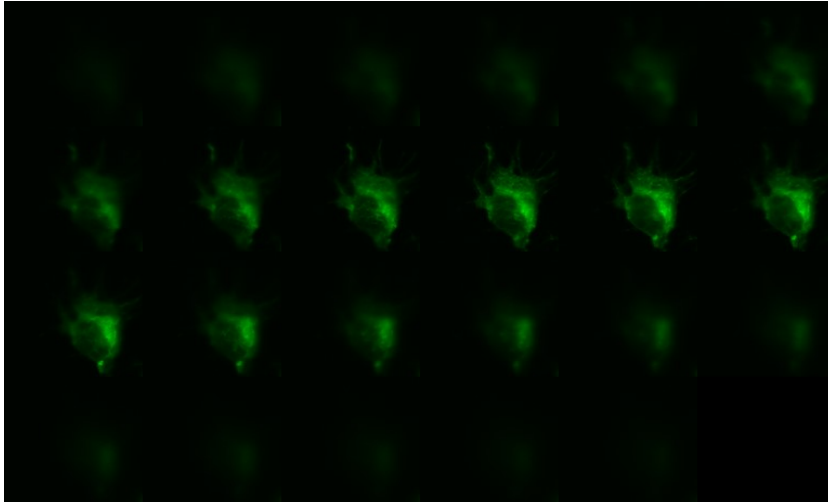


Abb. 133: Z-Stack einer R1275Q-ALK-Zelle (GFP-Signal)

Abb. 133, Abb. 134: Dargestellt ist eine axial gefächerte, R1275Q-ALK exprimierende SK-N-AS-Zelle. Das GFP-Signal zeigt sich perinukleär konzentriert und nach peripher abnehmend. Die Zelle ist wenig kugelig, sondern liegt flächig auf. Das Cy3-Bild folgt ebenfalls dieser Beschreibung, das Gros der roten Fluoreszenz grenzt an den Nukleus der Zelle, nach außen nimmt die Fluoreszenzintensität ab.

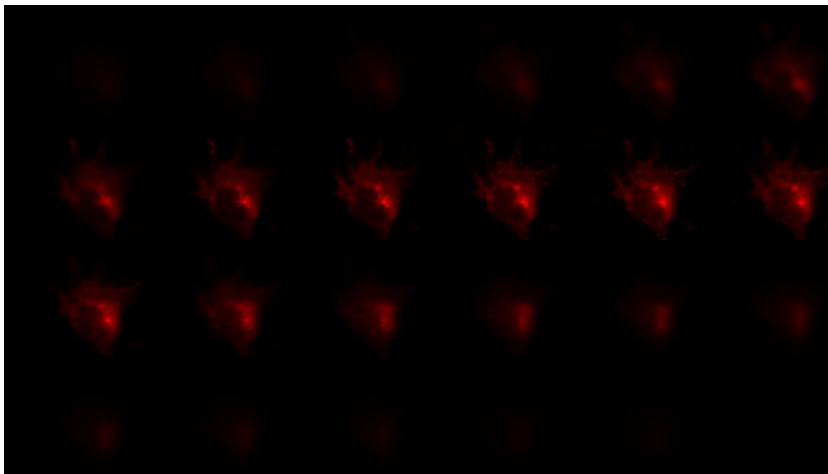


Abb. 134: Z-Stack einer R1275Q-ALK-Zelle (Cy3-Signal)

3.1.3.4 Morphologie der Y1604F-Mutante

Die mit ALK^{Y1604F} transfizierten Zellen lassen ein ALK^{F1174L} und ALK^{R1275Q} ähnelndes, gekräuselt-schaumiges GFP-Signal erkennen, das jedoch vergleichsweise verwaschen und inhomogen erscheint. Zudem liegen die Zellen zum Großteil deutlich flächiger auf als bei R1275Q und sind in diesem Aspekt eher mit der Gestalt der Wildtyp-Zellen vereinbar. Wie in allen Mutanten variiert das Cy3-Signal, auch hier zeigen sich mitunter akkumulierte rote Signale als Korrelat der GFP-Aggregate. Das bereits bei Wildtyp-, F1174L- und R1275Q beobachtete Wachstum der Zellen nah aneinander beziehungsweise übereinander konnte auch bei der Y1604-Mutante registriert werden.

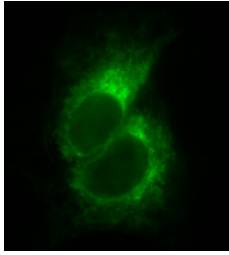


Abb. 135: GFP-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

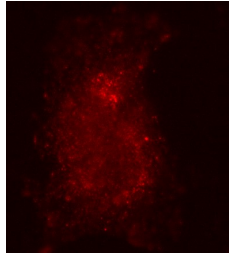


Abb. 136: Cy3-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

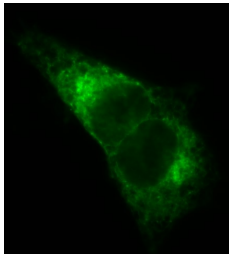


Abb. 137: GFP-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

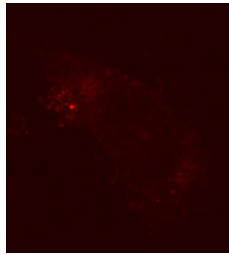


Abb. 138: Cy3-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

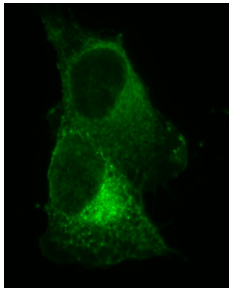


Abb. 139: GFP-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

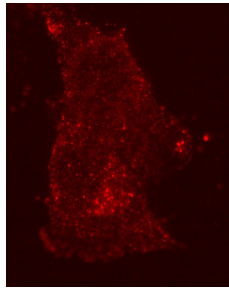


Abb. 140: Cy3-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

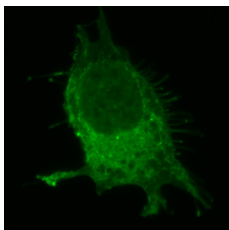


Abb. 141: GFP-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

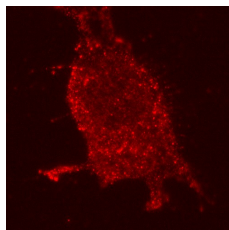


Abb. 142: Cy3-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop

Abb. 135 - Abb. 142: Aufnahmen von Y1604F-ALK exprimierenden Zellen unter dem Weitfeldmikroskop. Links in grün ist der GFP-Fluoreszenzkanal dargestellt, rechts daneben in rot der Cy3-Kanal. Die GFP-Fluoreszenz zeigt sich gekräuselt-schaumig und verwaschen. Das Zytoplasma imponiert inhomogen. Die Zelle scheint breitgewalzt und relativ flächig aufzuliegen. Das Cy3-Signal zeigt sich variabel, beispielsweise konzentriert sich in Abb. 138 die rote Fluoreszenz weitgehend auf ein kleines Aggregat, in Abb. 142 hingegen breitet sich die rote Fluoreszenz über die gesamte Ausdehnung der Zelle aus. Die Zellen wachsen dicht aneinander heran, in Abb. 135 - Abb. 140 scheinen sie sich sogar zu berühren.

Auch im konfokalen Mikroskop bildete sich die oben beschriebene, gekräuselt-verwaschene, inhomogene Struktur des GFP-Signals ab. War ein kräftiges rotes Cy3-Signal zu erkennen, zeichnete dies die inhomogene Struktur des grünen Signals nach. Im Querschnitt betrachtet stellte sich erneut die mit den Wildtyp-ALK-Zellen vergleichbare, flächige Gestalt der ALK^{Y1604F}-Zellen dar.

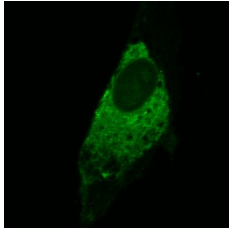


Abb. 143: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)

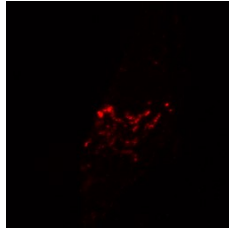


Abb. 144: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild)

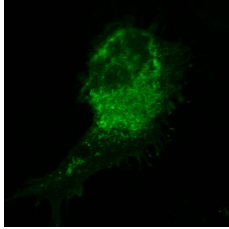


Abb. 145: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)

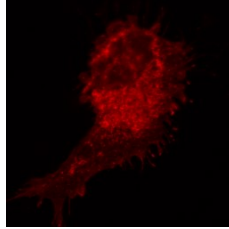


Abb. 146: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild)

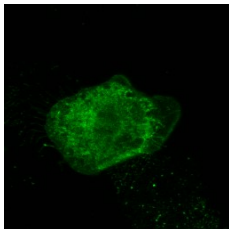


Abb. 147: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)

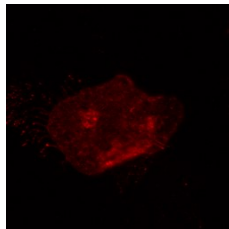


Abb. 148: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild)

Abb. 143 - Abb. 148: Aufnahmen Y1604F-ALK exprimierender SK-N-AS-Zellen im Rahmen der konfokalen Mikroskopie. Das GFP-Signal weist eine gekräuselte, flau-verwaschene Struktur und inhomogene Verteilung auf. Das Cy3-Signal variiert von Fokaladhäsionen, wie in Abb. 144, bis hin zu einem kräftigen roten Fluoreszenzmuster in Abb. 146. Die abgebildeten Zellen imponieren allesamt flächig und diffus ausgebreitet.

Axial geschichtet kommt abermals die inhomogene Verteilung und schaumig-verwaschene Struktur der GFP-Fluoreszenz zur Geltung. Das Cy3-Signal folgt dabei dem inhomogenen GFP-Muster.

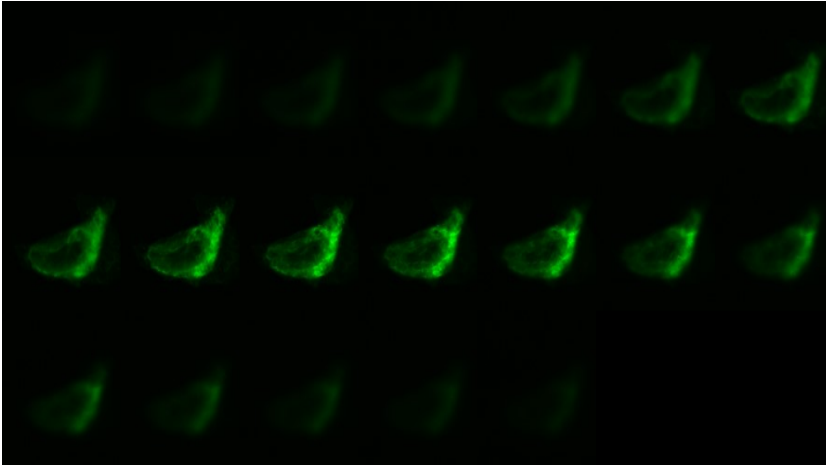


Abb. 149: Z-Stack einer Y1604F-ALK-Zelle (GFP-Fluoreszenz)

Abb. 149, Abb. 150: Die mit Y1604F transizierte Zelle wird von links oben nach rechts unten in Schichten dargestellt. Die grüne Fluoreszenz zeigt eine irreguläre Verteilung im Zytoplasma der Zelle und imponiert schaumig-verwaschen. Zudem wirkt das Zytoplasma aufgelockert und die Zelle flächig ausgezogen. Die Cy3-Bilder folgen dem inhomogenen GFP-Muster.

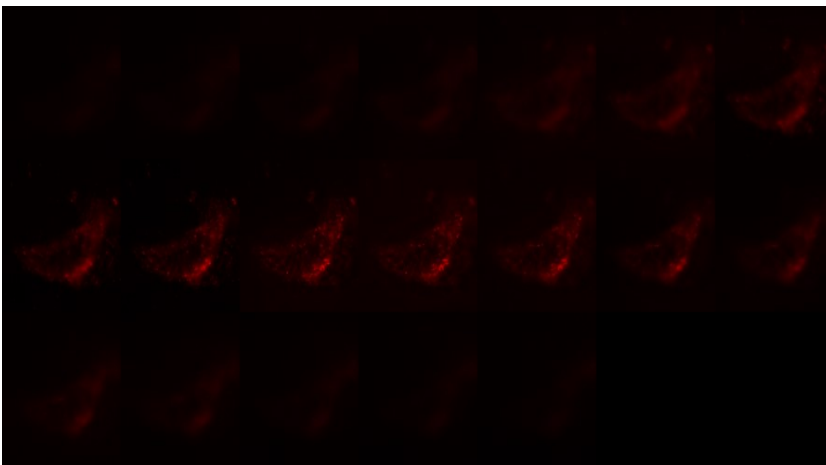


Abb. 150: Z-Stack einer Y1604F-ALK-Zelle (Cy3-Fluoreszenz)

3.1.3.5 Morphologie der I1250T-Mutante

Die I1250T-Mutante, deren geringe Phosphotyrosin-Levelns bereits im Vorhergehenden auffielen, weist auch in der Mikroskopie kaum rote Cy3-Fluoreszenz auf. Das GFP-Signal entspricht weitestgehend einer deutlich aufgelockerten, wenig kompakten Variante der ALK^{F1174L} -Zellen. Das Zytoplasma der ALK^{I1250T} -Zellen ist unscharf begrenzt.

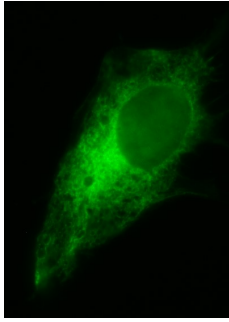


Abb. 151: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (GFP-Signal)

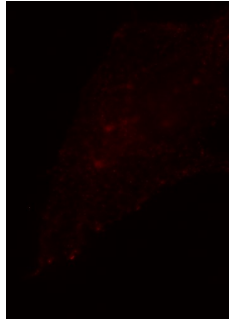


Abb. 152: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (Cy3P-Signal)

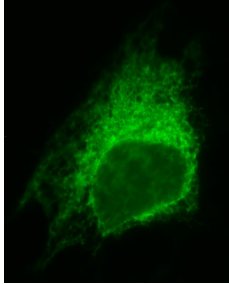


Abb. 153: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (GFP-Signal)

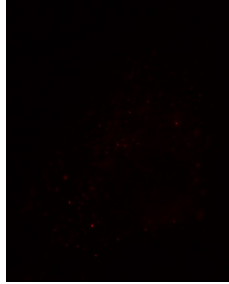


Abb. 154: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (Cy3P-Signal)

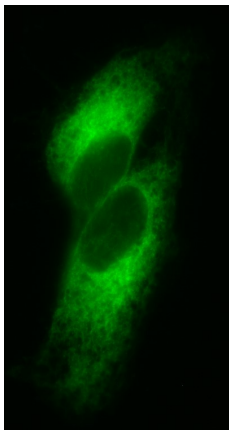


Abb. 155: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (GFP-Signal)

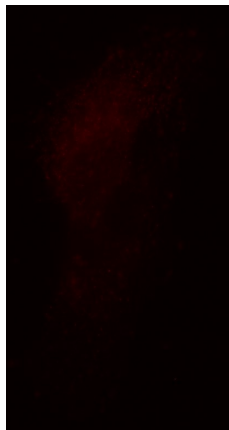


Abb. 156: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (Cy3P-Signal)

Abb. 151 - Abb. 156: Dargestellt sind mit I1250T-ALK transfizierte SK-N-AS-Zellen unter dem Weitfeldmikroskop. Links in grün ist der GFP-Fluoreszenzkanal illustriert, rechts daneben das zugehörige Cy3-Signal. Die grüne Fluoreszenz besitzt eine krause Struktur, das Zytoplasma wirkt unscharf begrenzt. Die Zelle in Abb. 151 weist einige Vakuolen auf. In Abb. 155 wachsen zwei Zellen sehr dicht an-, beziehungsweise übereinander. Alle abgebildeten Zellen zeigen als typisches Merkmal für I1250T nur sehr schwache Cy3-Fluoreszenz.

Das bei nunmehr allen untersuchten ALK-Mutanten beschriebene, dichte Wachstum der Zellen aneinander sowie übereinander ist auch bei der I1250-Mutante zu verzeichnen. Auch hier konnten interzelluläre Zytoplasmabrücken beobachtet werden.

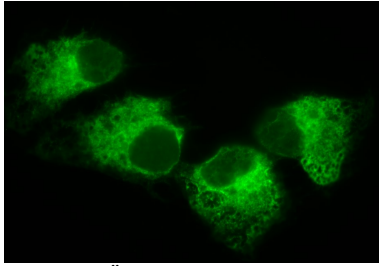


Abb. 157: Übereinander wachsende I1250T-ALK-Zellen (GFP-Fluoreszenz)

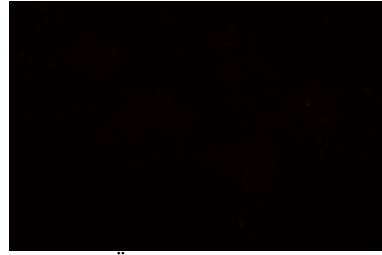


Abb. 158: Übereinander wachsende I1250T-ALK-Zellen (Cy3-Fluoreszenz)

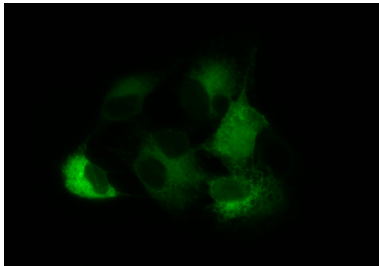


Abb. 159: Übereinander wachsende I1250T-ALK-Zellen (GFP-Fluoreszenz)

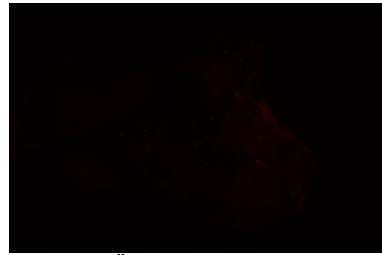


Abb. 160: Übereinander wachsende I1250T-ALK-Zellen (Cy3-Fluoreszenz)

Abb. 157 - Abb. 160: Gruppierungen von I1250T exprimierenden SK-N-AS-Zellen. Linksseitig ist der GFP-Fluoreszenzkanal der Aufnahmen abgebildet, dort ist ein dichtes Wachstum der Zellen aneinander zu verzeichnen. Ferner sind zahlreiche Zytoplasmabrücken zwischen den Zellen zu erkennen. Das zugehörige Cy3-Signal zeichnet sich so schwach ab, dass es kaum erkennbar ist.

In konfokalen Schichtaufnahmen formiert sich bei der I1250-Mutante im Querschnitt durch das Zellinnere eine schaumig-homogene GFP-Ansammlung. Im Cy3-Fluoreszenzkanal imponiert lediglich ein verschwindend geringes Cy3-Signal, hauptsächlich sind dabei punktförmige Fokaladhäsionen zu erkennen.

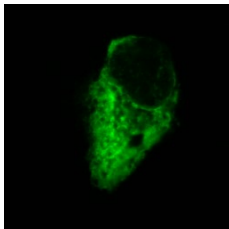


Abb. 161: I1250T-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)

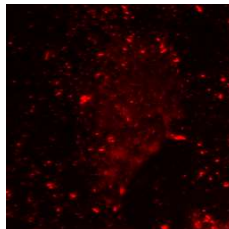


Abb. 162: I1250T-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild)

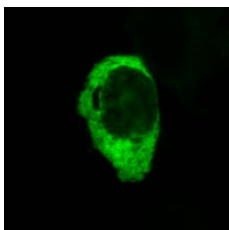


Abb. 163: I1250T-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)

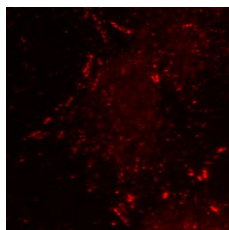


Abb. 164: I1250T-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild)

Abb. 161 - Abb. 164: Aufnahmen zweier I1250T-ALK ausprägender SK-N-AS-Zellen in der konfokalen Mikroskopie. Das GFP-Signal lässt eine aufgelockerte, schaumige Struktur erkennen. Die zugehörigen Cy3-Bilder werden von punktförmigen, rot fluoreszierenden Fokaladhäsionen dominiert. Das eigentlich relevante Cy3-Signal, welches dem opsonierten Phosphotyrosin der Zelle entspricht, ist nur schemenhaft als schwache rote Fluoreszenz abzugrenzen.

In der transversalen Durchsicht durch eine ALK^{I1250T}-Zelle zeigt sich erneut ein kräftiges, homogenes GFP-Signal. In den korrelierenden Cy3-Schichten ist dagegen nur eine dezente, Cy3-Fluoreszenz zu verzeichnen. Dominierend treten in den Cy3-Bildern rot fluoreszierende Fokaladhäsionen auf.

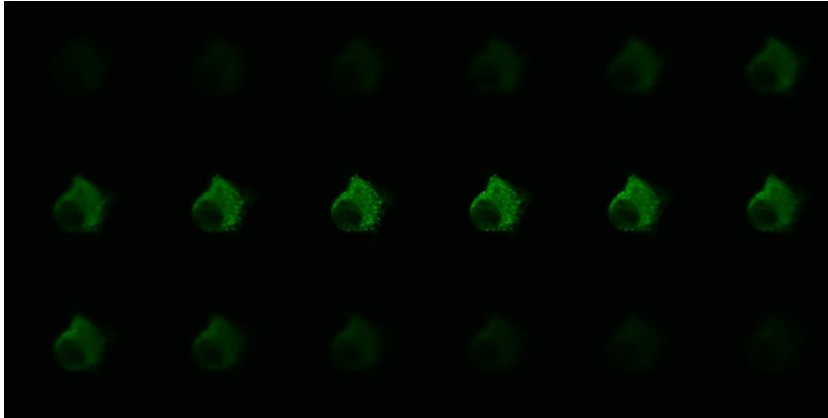


Abb. 165: Z-Stack einer I1250T-ALK-Zelle (GFP-Kanal)

Abb. 165, Abb. 166: Z-Stack einer I1250T-ALK exprimierenden Zelle, Abb. 165 zeigt den GFP-Kanal, Abb. 166 illustriert die Cy3-Fluoreszenz. Die Struktur der GFP-Fluoreszenz erscheint schaumig-gekräuselt und unscharf begrenzt. Das rote Cy3-Signal ist nur schwach erkennbar, in einigen Schichten überwiegen fluoreszierende Fokaladhäsionen.

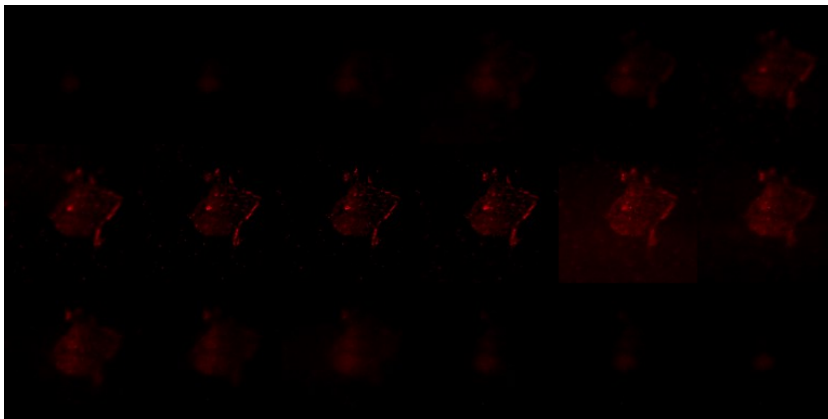


Abb. 166: Z-Stack einer I1250T-ALK-Zelle (Cy3-Kanal)

3.2 Pathscan

Wie bereits beschrieben wurde der Pathscan einmal mit unsortierten und ein weiteres Mal mit FACS sortierten Zelllysaten durchgeführt. Um einen angemessenen Umfang dieser Arbeit zu gewährleisten, soll im Folgenden nicht auf alle getesteten Targets detailliert eingegangen werden.

3.2.1 Durchführung mit unsortierten Lysaten (ohne FACS)

Mit dem Pathscan Intracellular Signaling Array Kit wurden die Mutanten ALK-Wildtyp, F1174L und I1250T in SK-N-AS-Zellen gegen nicht transfizierte SK-N-AS Zellen hinsichtlich ihrer Signalmoleküle verglichen.

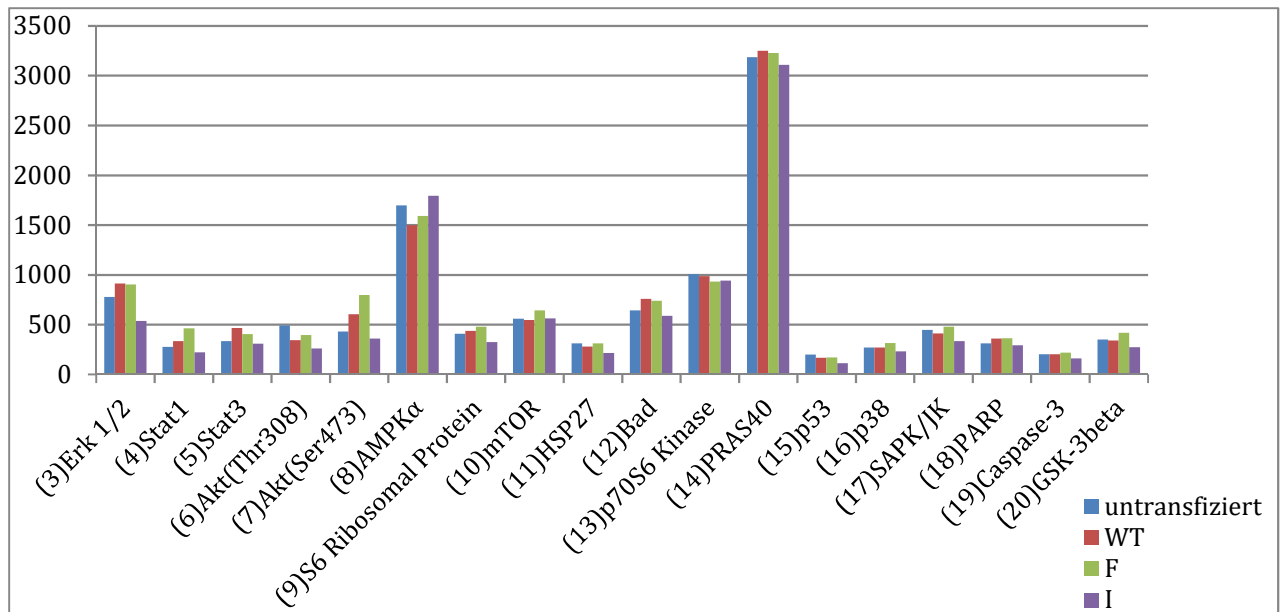


Abb. 167: Säulendiagramm der Ergebnisse des Pathscan-Versuchs mit unsortierten Lysaten

Die untersuchten Signalmoleküle sind auf der Abszisse gelistet, die Nummerierung beginnt analog zum Pathscan Manual bei 3 mit Erk 1 und 2. Die Ordinate beschreibt die Intensität des Fluoreszenzsignals. Ein Signalmolekül besitzt, mit Ausnahme von Caspase-3 und PARP, ein Fluoreszenzsignal, sofern es in phosphorylierter Form vorliegt, was eine Aktivierung anzeigt. Die am hervorstechendsten gesteigerte Aktivität zeigt sich für alle Zelltypen bei den Signalmolekülen AMPK α und PRAS40, gefolgt von ERK1/2, Bad und der p79S6 Kinase.

Bei der Auswertung des Pathscan tragen die Targets, also die Signalmoleküle, welche in den zugehörigen Abbildungen auf der Abszisse aufgetragen sind, ein Fluoreszenzsignal, wenn sie phosphoryliert vorliegen. Lediglich Caspase-3 und PARP werden in gespaltener Form in ein Fluoreszenzsignal transformiert. Die beiden Target-Antikörper für Akt unterscheiden sich hinsichtlich der Akt-Phosphorylierungsstellen. Die Positionen Thr308 und Ser473 stellen die entscheidenden Phosphorylierungsstellen der Akt dar (Partovian et al. 2008) und werden deshalb im Folgenden gleichwertig als Maß für die Akt-Phosphorylierung verwendet.

In der obigen Abbildung ist auf der Ordinate die Intensität der Fluoreszenzsignale aufgetragen, welche durch Fluorescent Readout des Pathscan Arrays ermittelt wurden. Je höher dieses Signal, desto höher die Phosphorylierungs- beziehungsweise Teilungsrate des jeweiligen Signalmoleküls im untersuchten Zelltyp.

Besonders hohe Intensitäten bestehen für alle vier untersuchten Zelltypen bei AMPK α und PRAS40. Auch Erk 1 und 2, Bad und p70S6-Kinase weisen eine relativ gesteigerte Aktivität gegenüber den übrigen Targets auf. Besonders geringe Phosphorylierungsraten sind für p53 und Caspase-3 bezüglich aller untersuchten Zellen zu verzeichnen.

3.2.1.1 Signalmoleküle in Wildtyp-ALK-, ALK^{F1174L}-, ALK^{I1250T}-Zellen im Verhältnis zu untransfizierten Zellen

Vorrangig stellt sich hinsichtlich der im Vorhergehenden erhobenen Ergebnisse die Frage, wie sich die Aktivität der einzelnen Signalmoleküle in den unterschiedlich transfizierten Zellen im Vergleich zu deren Aktivität in nicht-transfizierten Zellen verhält. Zur vergleichenden Darstellung wurden Quotienten aus den Werten der untersuchten Mutanten und der untransfizierten Zellen gebildet. Damit konnte das Verhältnis der einzelnen Signalmoleküle hinsichtlich ihrer Aktivität in den jeweiligen Mutanten zu der Aktivität in den nicht-transfizierten Zellen dargestellt werden.

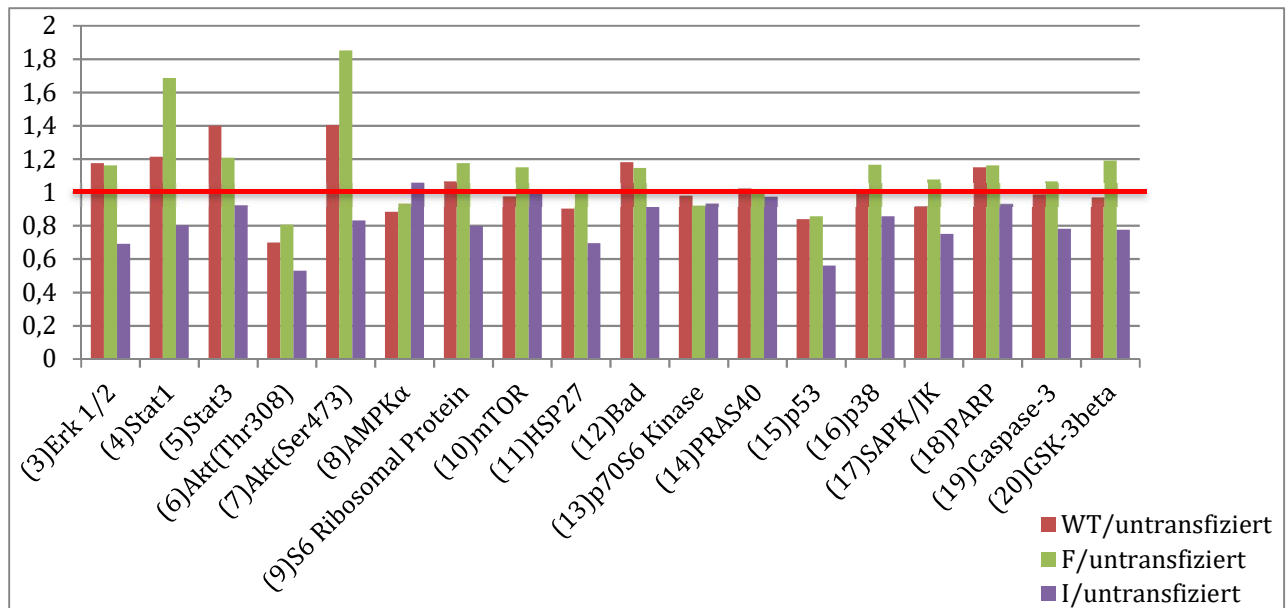


Abb. 168: Diagramm der Quotienten aus den Mutante und untransfizierten Zellen für jedes Signalmolekül. Die Abszisse beinhaltet die untersuchten Signalmoleküle, die Ordinate spiegelt die Fluoreszenzintensität und damit Aktivität des Targets im untersuchten Zelltyp wider. Dadurch wird das Verhältnis der Aktivität des jeweiligen Signalmoleküls in den einzelnen transfizierten Zellen im Vergleich zu der Aktivität in untransfizierten Zellen veranschaulicht. Bewegt sich das Verhältnis um 1, so ist von einer etwa gleichen Phosphorylierungsrate des Signalmoleküls in untransfizierten und jeweilig transfizierten Zellen auszugehen. Liegt das Ergebnis unter 1, so besitzt das Target eine höhere Aktivität in den untransfizierten Zellen. Bei einem Verhältnis, das größer als 1 ist, ist hingegen von einer höheren Aktivität in den jeweiligen transfizierten Zellen auszugehen.

Befindet sich das Verhältnis auf der Ordinate bei 1, so ist von einer etwa gleichen Aktivität des Targets in der jeweiligen Mutante und der nicht-transfizierten Zelle auszugehen.

So gruppieren sich die Quotienten für AMPK α , PRAS40 und p70S6 Kinase allesamt um 1. Am deutlichsten trifft dies für PRAS40 zu, dessen Aktivität somit den SK-N-AS-Zellen als endogenes Merkmal zuzuschreiben ist, welches unabhängig vom eingebrachten ALK-Rezeptor auftritt.

Auffällig ist, dass für die F1174L-Mutante die meisten Quotienten über 1 liegen, ergo verfügen ALK^{F1174L}-Zellen über mehr phosphorylierte Targets im Vergleich zu untransfizierten Zellen. Ausgesprochen hoch ist hierbei die Aktivität der Stat- und Akt-Signalmoleküle. Bei Stat1 und Akt mit Phosphorylierungsposition Ser473 nähert sich das Verhältnis sogar dem Ordinatenwert 2, somit ist von einer annähernd doppelt so hohen Phosphorylierungsrate dieser Signalmoleküle in der F1174-Mutante gegenüber den untransfizierten Zellen auszugehen. Die Akt-Phosphorylierungsposition Thr308 ist zwar bei untransfizierten Zellen etwas häufiger phosphoryliert als bei den transfizierten Zellen, insgesamt ist die Akt-Aktivität von Wildtyp- und F1174L-ALK-Zellen jedoch aufgrund der überschießenden Phosphorylierung der Position Ser473 deutlich höher zu bewerten.

Die Quotienten der Wildtyp-ALK-Zellen liegen insgesamt deutlich seltener über 1 als die der ALK^{F1174L}. Dennoch ist auch bezüglich der Wildtyp-ALK eine hohe Aktivität für Stat- und Akt-Targets zu verzeichnen.

Die Moleküle Erk1 und Erk2 liegen zwar bei Wildtyp- und F1174L-ALK-Zellen leicht über 1, eine überschießende Aktivität wie bei Stat und Akt ist dabei jedoch nicht zu erfassen.

Bei der I-Mutante überwiegt lediglich die Aktivität von AMPK α gegenüber den nicht-transfizierten Zellen, der betreffende Quotient befindet sich jedoch nur minimal über 1 und ist

somit nicht als ausschlaggebender Befund zu bewerten. Bei allen übrigen Targets unterliegt die I1250-Mutante den unbehandelten SK-N-AS-Zellen. Jedoch wird interessanterweise nicht einmal die basale Aktivität erreicht, die bei 1 liegen würde, sondern die Targets sind sogar weniger phosphoryliert als in nicht-transfizierten Neuroblastomzellen. In den ALK^{I1250T}-Zellen scheinen also sämtliche Signalmoleküle weitestgehend „ausgeschaltet“ zu sein.

Bezüglich p53 scheint ebenfalls eine gegenüber untransfizierten Zellen verminderte Phosphorylierung vorzuliegen, alle untersuchten ALK-Subformen betreffend.

Zu beachten gilt bei der Bewertung dieser Quotienten, dass lediglich durch rechnerische Schritte ermittelt werden konnte, inwiefern sich die Aktivitäten der transfizierten Zellen zu denen der untransfizierten Zellen verhalten. Die Lysate der transfizierten Zellen enthielten dabei jedoch trotz allem auch untransfizierte Zellen. Im Folgenden sollen Aussagen zu sortierten untransfizierten und transfizierten Zellen getroffen werden, die im Vergleich zu den unter diesem Punkt erhobenen Befunden deutlich aussagekräftiger sind.

3.2.2 Durchführung mit sortierten Lysaten (FACS)

An dieser Stelle sollte an die quantitativen Unterschiede der Lysate aus GFP-positiven Zellen einerseits sowie GFP-negativen und untransfizierten Zellen andererseits erinnert werden, was die Vergleichbarkeit dieser beiden Komponenten ausschließt. Konkret bedeutet dies, dass ein quantitativer Vergleich nur innerhalb, jedoch nicht zwischen den zwei folgenden Abbildungen stattfinden darf.

3.2.2.1 FACS: GFP-negative Zellen

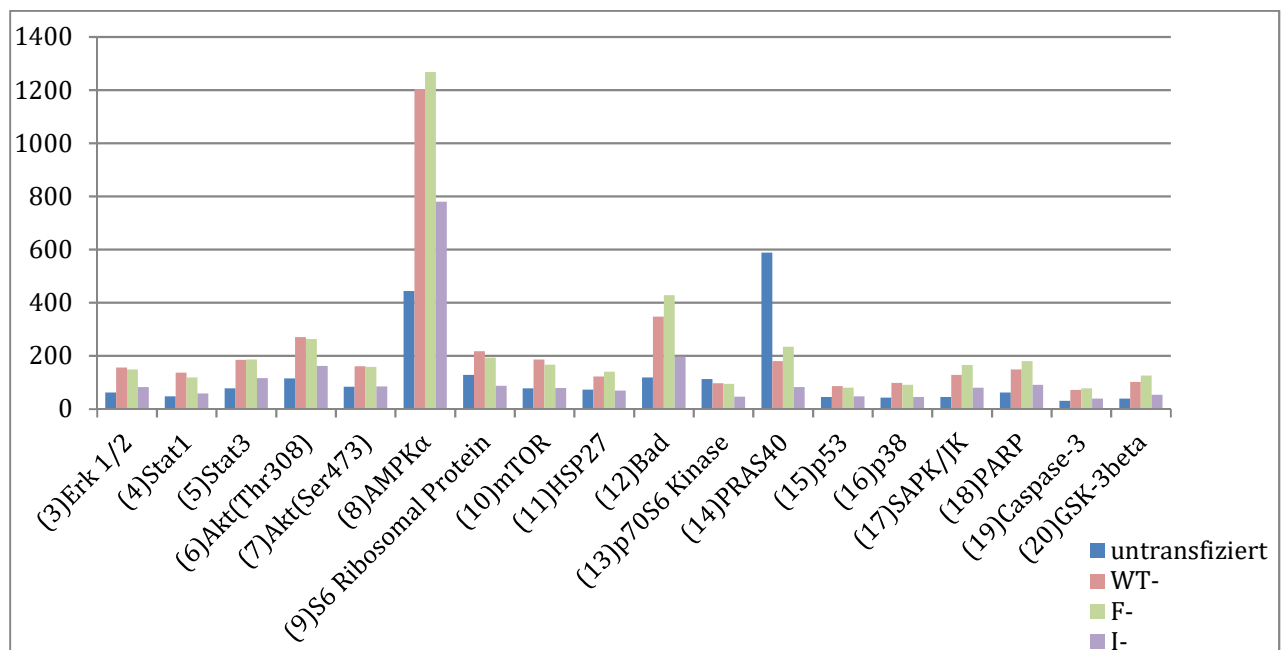


Abb. 169: Säulendiagramm der Ergebnisse des Pathscan-Versuchs mit sortierten Lysaten: GFP-negative Zellen
 Auf der Abszisse sind die untersuchten Signalmoleküle aufgetragen, die Ordinate spiegelt die Fluoreszenzintensitäten der Targets wider. Die Höhe der jeweiligen Intensität gibt Aufschluss über die Menge des in phosphorylierter Form vorliegenden Targets und somit über dessen Aktivität. In blau kommen die untransfizierten Zellen des Versuchs zur Darstellung. Weiterhin sind die als GFP-negativ aussortierten Zellen der jeweiligen Mutanten aufgetragen. Auffällig hohe Intensitäten zeigen sich für alle Zelltypen bei AMPKα und für Wildtyp- und F1174L-GFP-negative Zellen zusätzlich bei Akt(Thr308) und Bad. Die untransfizierten Zellen zeigen überschießende Aktivität für AMPKα und PRAS40.

Wie bereits im Vorhergehenden vermutet, besitzen unbehandelte SK-N-AS-Zellen eine hohe AMPK- α - und PRAS40-Aktivität.

Bei sämtlichen Signalmolekülen außer PRAS40 fällt die erhöhte Aktivität der FACS-negativen „Umgebungs-Zellen“ von Wildtyp, F1174L und I1250T gegenüber den untransfizierten Zellen auf. An dieser Stelle ist die Vermutung auszusprechen, dass transfizierte Zellen die nicht-transfizierten Zellen ihrer Umgebung beeinflussen. Die ALK^{I1250T}-Zellen bilden bezüglich dieses Phänomens den Nachzügler.

3.2.2.2 FACS: GFP-positive Zellen

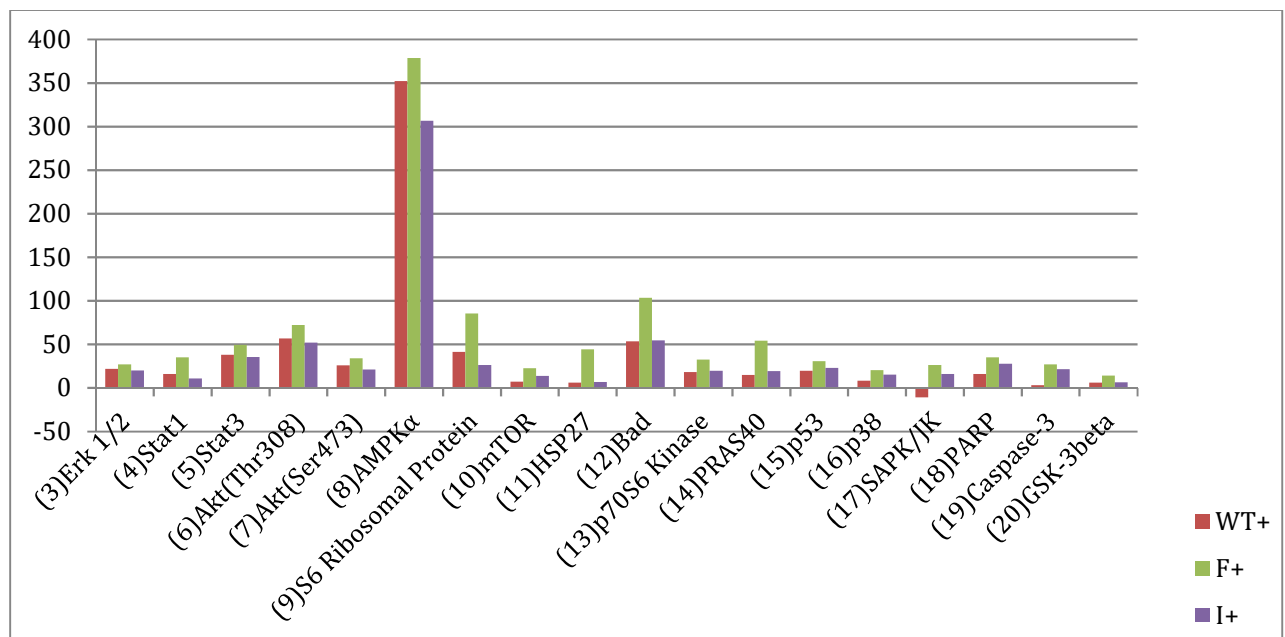


Abb. 170: Säulendiagramm der Ergebnisse des Pathscan-Versuchs mit sortierten Lysaten: GFP-positive Zellen
Analog zur vorangehenden Abbildung sind die Ergebnisse der Durchführung des Pathscan mit FACS sortierten Zelllysaten dargestellt. Gegenüber der vorhergehenden Abbildung werden weniger hohe Ordinatenwerte erreicht, da quantitativ weniger Zellen zur Anwendung kamen, was eine Vergleichbarkeit dieser Abbildung mit der vorhergehenden ausschließt. Die in grün aufgetragene Mutante F1174L führt hinsichtlich der Aktivität aller Signalmoleküle. Alle Mutanten weisen ein überschießendes Signal für AMPK α auf. Das negative Ergebnis für Wildtyp-ALK bei SAPK/JK ist durch Rechenschritte der Versuchsauswertung bedingt.

Die hier abgebildeten, als GFP-positiv sortierten und somit garantiert transfizierten Zellen weisen insgesamt hohe Aktivitäten hinsichtlich AMPK α , Stat3, Akt(Thr308) und Bad auf.

Auffällig ist die bereits in der ersten Versuchsdurchführung führende Position der F1174L-Mutante. Besonders bei den Targets S6 Ribosomal Protein, HSP27, Bad und PRAS40 ist die Aktivität der F-Mutante gegenüber Wildtyp- und I1250T-ALK signifikant erhöht.

Die Wildtyp-ALK-Zellen nehmen den zweiten Rang hinsichtlich der aktivierten Signalmoleküle hinter ALK^{F1174L} ein. Die Stat- und Akt-Signalmoleküle sowie S6 Ribosomal Protein sind in den Wildtyp-Zellen deutlich aktiver als in den ALK^{I1250T}-Zellen.

Die I1250T-Mutante bildet in der Gesamtheit ihrer phosphorylierten Moleküle, wie bereits beim ersten Pathscan-Experiment, das Schlusslicht. Lediglich vereinzelte Targets liegen in den I1250T-ALK-Zellen stärker aktiviert beziehungsweise in häufiger gespaltener Form vor als in den Wildtyp-ALK-Zellen, beispielsweise PARP.

Auffällig ist, dass sich ALK^{F1174L}, Wildtyp-ALK und ALK^{I1250T} zwar meist in dieser beschriebenen „Rangfolge“ anordnen, hinsichtlich der aktivierten Signalmoleküle jedoch keinerlei größeren abweichenden Tendenzen zeigen. So fällt keine der ALK-Subformen hinsichtlich der hochaktiven Signalmoleküle deutlich aus der Reihe.

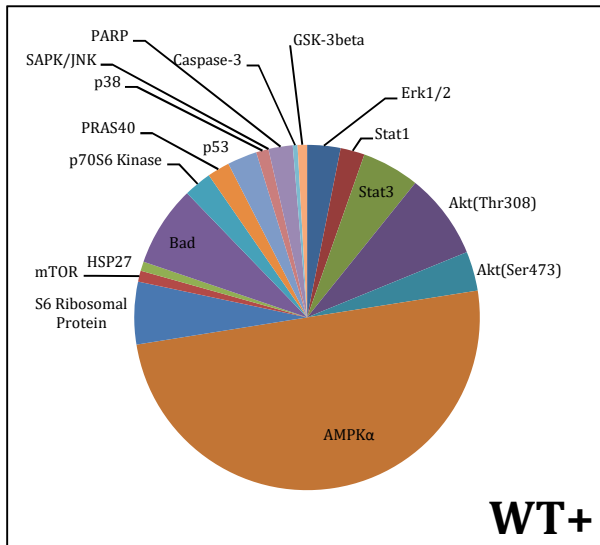


Abb. 171: Kreisdiagramm der Aktivität der Signalmoleküle in Wildtyp-ALK-Zellen

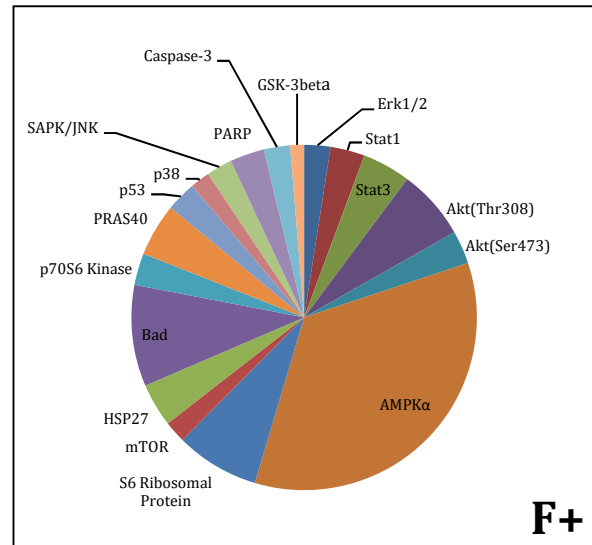


Abb. 172: Kreisdiagramm der Aktivität der Signalmoleküle in F1174L-ALK-Zellen

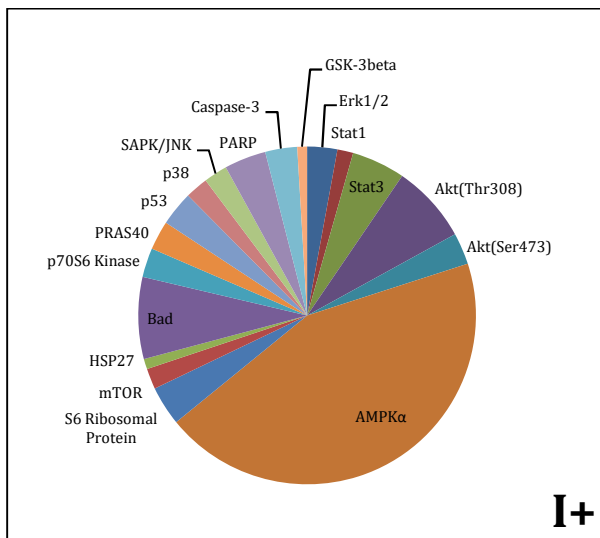


Abb. 173: Kreisdiagramm der Aktivität der Signalmoleküle in I1250T-ALK-Zellen

Abb. 171 - Abb. 173: Kreisdiagramme der Aktivität der Signalmoleküle in den untersuchten Mutanten. Die drei Kreisdiagramme zeigen die Anteile der einzelnen Signalmoleküle an der Gesamtaktivität der untersuchten Mutanten F1174L(F+), Wildtyp(WT+) und I1250T(I+). Auf den ersten Blick ist die große Phosphorylierungsrate von AMPK α für alle drei Mutanten erkennbar. Für F1174L zeigen sich zudem gesteigerte Aktivitäten für Bad, S6 Ribosomal Protein, Akt(Thr308) und PRAS40. In den Wildtyp- und I1250T-Zellen liegt die größte Aktivität neben AMPK α bei Akt(Thr308) und Bad, ebenso liegt bei beiden eine hohe Aktivität für Stat3 vor. In den Wildtyp-Zellen ist außerdem eine gesteigerte Aktivität hinsichtlich S6 Ribosomal Protein zu beobachten. In allen Zelltypen überwiegt der Anteil der Akt-Aktivität hinsichtlich der Thr308-Phosphorylierungsposition gegenüber Ser473.

Insgesamt ergab sich bei diesem Versuch für die ALK^{F1174L}-Zellen ein hoher Anteil an der Gesamtaktivität für AMPK α , Bad, S6 Ribosomal Protein, Akt(Thr308) und PRAS40.

Bei den Wildtyp-ALK exprimierenden Zellen fanden sich die höchsten Phosphorylierungsraten bei AMPK α , Akt (Thr308), Bad, S6 Ribosomal Protein und Stat3.

In den ALK^{I1250T}-Zellen lagen AMPK α , Bad, Akt(Thr308) und Stat3 mit der vergleichsweise höchsten Aktivität vor. Zudem fällt bei der I1250-Mutante hinsichtlich PARP eine relative hohe Aktivität auf.

Wie bei vielen anderen Signalmolekülen ergab sich für alle untersuchten GFP-positiven Zellen auch für ERK1/2, mTOR und p53 grundlegend eine basale Phosphorylierungsrate. Die

geringe Aktivität der GSK-3beta ist hingegen zu vernachlässigen. Ebenfalls unbedeutend ist der Wert der Wildtyp-Zellen für Caspase-3 einzustufen, welche bei ALK^{F1174L} und ALK^{I1250T} vergleichsweise deutlich phosphoryliert vorlag.

	F1174L		Wildtyp		I1250T	
		%		%		%
% Aktivität an Gesamtaktivität	AMPK α	43,7	AMPK α	50,7	AMPK α	44,1
	Bad	9,5	Akt(Thr308)	8,2	Bad	7,8
	S6 Rib. Protein	7,8	Bad	7,7	Akt(Thr308)	7,6
	Akt(Thr308)	6,6	S6 Rib. Protein	6	Stat3	5,1
	PRAS40	5	Stat3	5,5	PARP	4
	Stat3	4,5	Akt(Ser473)	3,7	S6 Rib. Protein	3,8
	HSP27	4	Erk1/2	3,2	P53	3,3
	Stat1	3,2	P53	2,8	Akt(Ser473)	3
	PARP	3,2	P70S6 Kinase	2,6	Caspase-3	3
	Akt(Ser473)	3,1	PARP	2,3	Erk1/2	2,9
	P70S6 Kinase	3	Stat1	2,3	PRAS40	2,8
	P53	2,8	PRAS40	2,1	P70S6 Kinase	2,8
	Caspase-3	2,5	P38	1,2	SAPK/JNK	2,3
	Erk 1/2	2,5	mTOR	1	P38	2,2
	SAPK/JNK	2,4	GSK-3beta	0,9	mTOR	2
	mTOR	2	HSP27	0,9	Stat1	1,5
	P38	1,9	Caspase-3	0,5	HSP27	1
	GSK-3beta	1,3	SAPK/JNK	-1,6	GSK-3beta	0,9

Tab. 13: Rangliste der prozentualen Aktivität der Signalmoleküle an der Gesamtaktivität

Gezeigt sind Ranglisten der prozentualen Anteile der Signalmoleküle an der Gesamtaktivität der untersuchten Mutanten F1174L, Wildtyp und I1250T. Die Prozentangaben sind dabei auf eine Nachkommastelle gerundet. Die Spalten der jeweiligen Mutanten sind zur Unterscheidbarkeit farblich gekennzeichnet, die Signalmoleküle mit einem Anteil von mindestens 5% an der Gesamtaktivität sind dunkel abgesetzt. AMPK α besitzt bei allen Zelltypen die höchste Aktivität. Auch Bad und Akt(Thr308) zeigen sich in allen Zellen aktiv. GSK-3beta weist hingegen in allen drei Mutanten eine niedrige Aktivität auf. Der negative Prozentwert für SAPK/JNK bei den Wildtyp-Zellen kommt durch einen rechnerischen Schritt zu Stande und bezeichnet im Wesentlichen den fehlenden Anteil von SAPK/JNK an der Gesamtaktivität von Wildtyp.

Bezüglich SAPK/JNK ergab sich für Wildtyp-ALK ein negativer Wert, bei ALK^{F1174L} lag die SAPK/JNK-Aktivität etwa doppelt so hoch wie bei ALK^{I1250T}. Der negative Wert der Wildtyp-Zellen kommt durch die Subtraktion des Leerwerts und möglicherweise durch leichte Messungenauigkeiten zustande. Zu dem Wert der GFP-positiven Wildtyp-ALK-Zellen wird darum im Folgenden keine Aussage hinsichtlich SAPK/JNK getroffen.

In einem Feld des Pathscan Arrays war das Fluoreszenzsignal der bloßen Versuchsreagenzien ohne Einsatz eines Zelllysats untersucht und von allen übrigen Werten als „Leerwert“ subtrahiert worden, um die durch die Zelllysate erzeugten Fluoreszenzsignale noch genauer darstellen zu können.

3.2.3 Pathscan-Ergebnisse: Resümee

In Zusammenschau mit den Ergebnissen des Pathscans mit nicht-sortierten Lysaten sind zwar viele der genannten Ergebnisse in beiden Varianten des Versuchs wiederzufinden, ein direkter Vergleich ist aufgrund der „Verunreinigung“ der nicht-sortierten Lysate mit untransfizierten

Zellen jedoch nicht angezeigt. Das fluorescence activated cell sorting im zweiten Versuchsdurchlauf könnte zudem einen Einflussfaktor der untersuchten Parameter darstellen.

In der Zusammenschau weisen beide Pathscan-Versuche auf eine hohe Aktivität aller untersuchten Zellen für AMPK α auf. Allgemein ist in den transfizierten Zellen in beiden Versuchen eine deutlich erhöhte Phosphorylierung von Stat, Akt und Bad zu erkennen.

In Wildtyp- und F1174L-ALK-Zellen zeigte sich zudem in beiden Versuchen eine hohe Aktivität für S6 Ribosomal Protein.

Erk1 und 2, mTOR und p53 sowie zahlreiche andere Signalmoleküle zeigten sich in den transfizierten Zellen stets grundlegend phosphoryliert, es fiel dabei jedoch keine überschießende Aktivität auf. Vernachlässigbar gering fiel die Phosphorylierung von GSK-3beta für alle Konstrukte aus.

Den ALK^{F1174L}-Zellen ist eine generell erhöhte Aktivität hinsichtlich sämtlicher Signalmoleküle zuzuschreiben. Vor allem hinsichtlich S6 Ribosomal Protein, HSP27, Bad und PRAS40 ist der F1174-Mutante eine vergleichsweise aufschlagende Aktivität zuzuschreiben. Diametral dazu verhalten sich die ALK^{I1250T}-Zellen, die grundsätzlich die geringste Aktivität aufweisen. Die Wildtyp-Zellen nehmen eine intermediäre Position ein.

Als Kernaussage ist hier jedoch vor allem bemerkenswert, dass zwar einige der Targets deutlich aktiver sind als andere, aber innerhalb der Mutanten keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der aktivierten Targets bestehen. AMPK α , Stat, Akt und Bad gehören bei allen untersuchten ALK-Subformen zu den aktivsten Signalmolekülen, der Anteil an der jeweiligen Gesamtaktivität variiert nur in Nuancen.

Einen weiteren interessanten Aspekt bildet die unter 3.2.2.1 erhobene Beobachtung, dass die FACS-negativen „Umgebungs-Zellen“ hinsichtlich der Aktivitäten der Signalmoleküle deutlich von den untransfizierten Zellen abweichen. Dies führt zu der Annahme, dass die transfizierten Zellen einen Einfluss auf die Zellen ihrer Umgebung ausüben. Bedeutend ist an dieser Stelle, dass die führende Rolle der ALK^{F1174L} sowie die „Nachzügler“-Position der ALK^{I1250T} auch hierbei in Erscheinung treten.

3.3 ERK1/2-Inhibitor

Um zu untersuchen, welche Rolle den ERK1- und ERK2-Molekülen in der ALK-Signalisierung zukommt, wurden beide im Rahmen dieses Versuchs mit dem Inhibitor FR180204 in nachgewiesen wirksam hemmender Konzentration ausgeschaltet. Dabei wurde das Phosphorylierungsverhalten der einzelnen ALK-Mutanten in SK-N-AS-Zellen mit und ohne ERK-Inhibitor gegenübergestellt. Hätte die ERK-Signalisierung eine ausschlaggebende Rolle in der ALK-Signalisierung, würden die inhibierten Zellen weniger Gesamtyosphotyrosin aufweisen, da das Phosphotyrosin der durch ERK phosphorylierten Substrate wegfällt. In diesem Falle würden weniger hohe Werte auf der Ordinate erreicht, welche die Cy3-Intensität und somit die Tyrosin-Phosphorylierung widerspiegeln.

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse von Wildtyp-ALK ohne Inhibitor den Ergebnissen von inhibiertem Wildtyp-ALK gegenübergestellt. Dabei stellt sich das Verhalten der Wildtyp-Zellen durch den Inhibitor unbeeinflusst dar, die Streudiagramme stimmen nahezu überein. Beide Kurven ordnen sich bis zu einem Abszissenwert von 2 relativ flach an, danach fächern sich die Cy3-Intensitäten breit auf. ERK1 und 2 scheinen auf die Phosphorylierung und damit auf die Aktivität der Zellen keinen nennenswerten Einfluss zu haben.

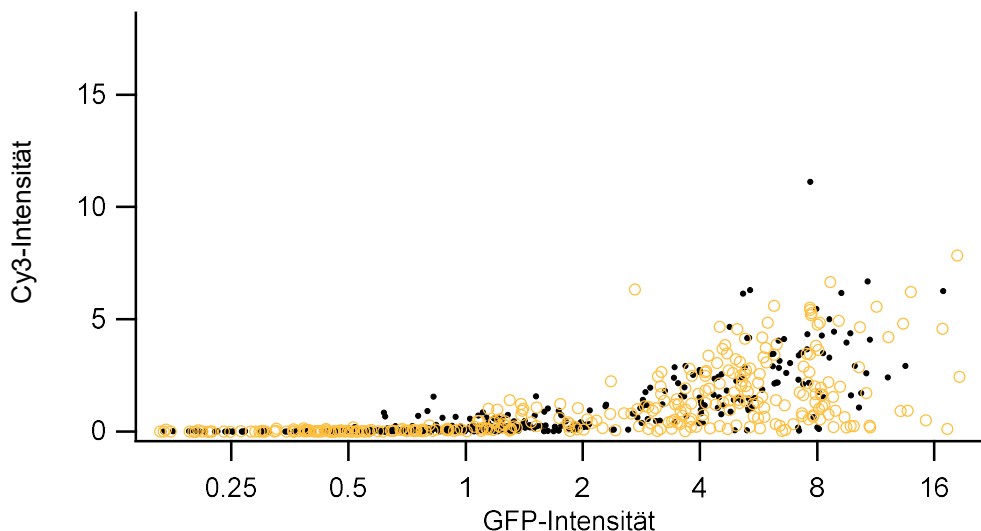


Abb. 174: Overlay von unbehandelten Wildtyp-ALK-Zellen (schwarz) und mit ERK-Inhibitor versetzten Wildtyp-ALK-Zellen (gelb)

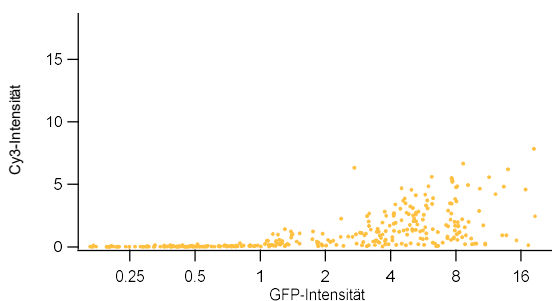


Abb. 175: Mit ERK-Inhibitor versetzte Wildtyp-ALK-Zellen

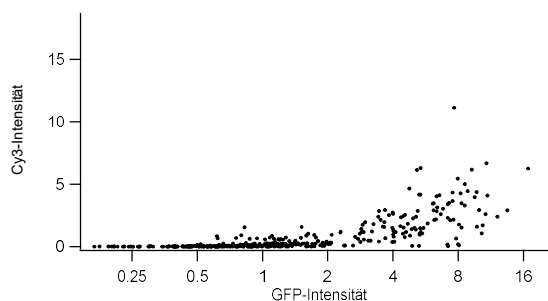


Abb. 176: Unbehandelte Wildtyp-ALK-Zellen

Abb. 174 - Abb. 176: Gegenüberstellung der Streudiagramme mit ERK-Inhibitor versetzter und unbehandelter Wildtyp-ALK-Zellen. Gezeigt sind in Abb. 175 gelb 345 Wildtyp-ALK exprimierende SK-N-AS-Zellen, die mit ERK-Inhibitor versetzt wurden. Daneben in schwarz 454 Wildtyp-ALK-SK-N-AS-Zellen, denen kein ERK-Inhibitor zugeführt wurde, die jedoch ansonsten den identischen Versuchsprozess durchliefen. Der Verlauf der beiden Streudiagramme ist nahezu identisch. Es konnte kein Einfluss des ERK-Inhibitors FR180204 nachgewiesen werden.

Auch die Zellen der ALK^{F1174L}-Mutante stellen sich unbeeinflusst vom ERK-Inhibitor dar. Wieder kann ein nahezu gleichförmiges Verhalten in der Gegenüberstellung der nicht-inhibierten Form der F-Mutante mit ihrer inhibierten Form beobachtet werden. Jedoch scheinen die gehemmten Zellen ab einer GFP-Intensität von etwa 1,5 deutlich weniger Ordinatenwerte unter 1 aufzuweisen. Dies stellt ein weiteres Indiz dafür dar, dass die Menge des Gesamtphosphotyrosins der F1174L-ALK-Zellen im Wesentlichen nicht von der ERK1- und ERK2-Signalisierung abhängt.

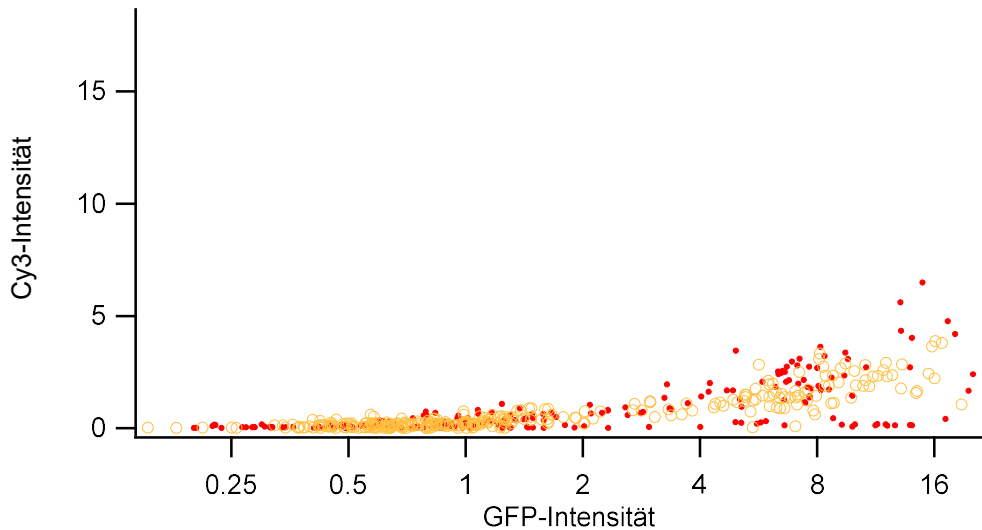


Abb. 177: Overlay von unbehandelten F1174L-ALK-Zellen(rot) und mit ERK1/2-Inhibitor versetzten F1174L-ALK-Zellen (gelb)

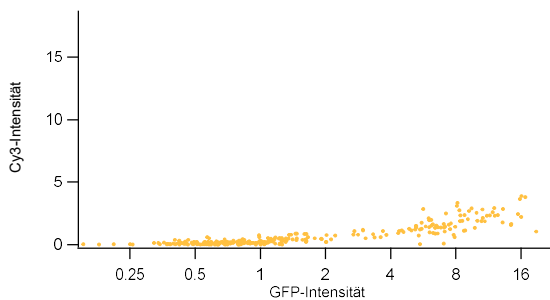


Abb. 178: Mit ERK1/2-Inhibitor versetzte F1174L-ALK-Zellen

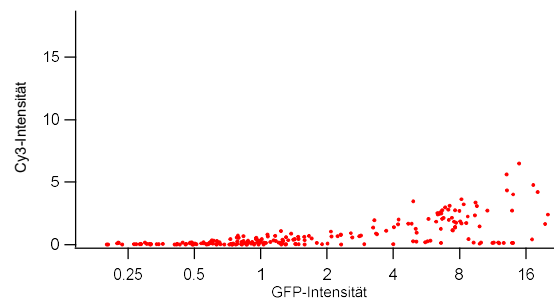


Abb. 179: Unbehandelte F1174L-ALK-Zellen

Abb. 177 - Abb. 179: Vergleich der inhibierten und nicht-inhibierten F1174L-ALK-SK-N-AS-Zellen. Ab dem Abszissenwert von etwa 1,5 werden treten deutlich weniger niedrige y-Koordinaten auf. Ansonsten zeigen die beiden Verteilungen im Vergleich jedoch keine nennenswerten Unterschiede.

Wie zu erwarten, zeichnet sich auch bei der R1275Q-Mutante keine relevante Auswirkung des ERK-Inhibitors auf die GFP- beziehungsweise Phosphotyrosin-Verteilung ab. Die Koordinaten der Streudiagramme beider Versuche sind nahezu deckungsgleich, bei den gehemmten R1275Q-ALK-Zellen treten sogar vereinzelt höhere Werte auf.

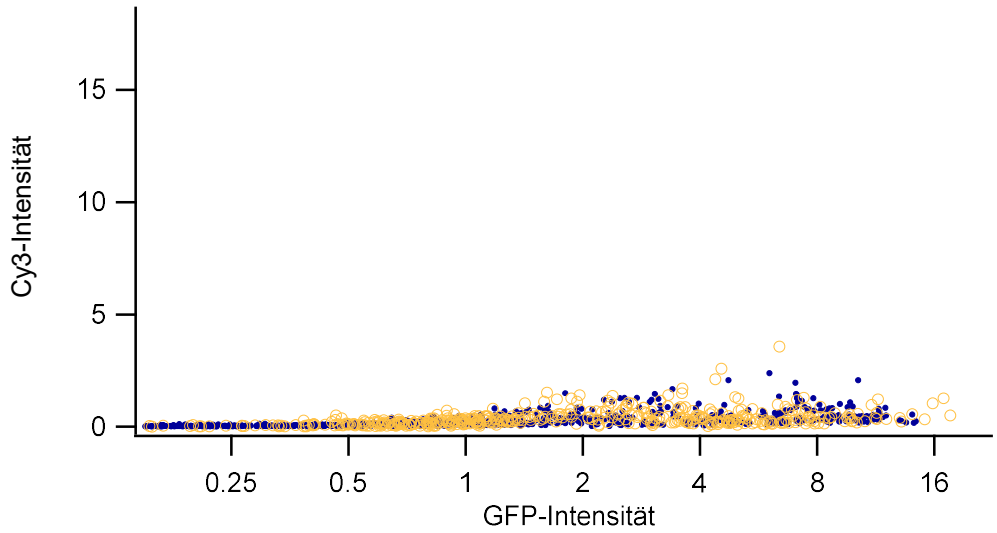


Abb. 180: Overlay von unbehandelten R1275Q-ALK-Zellen(blau) und mit ERK1/2-Inhibitor versetzten R1275Q-ALK-Zellen (gelb)

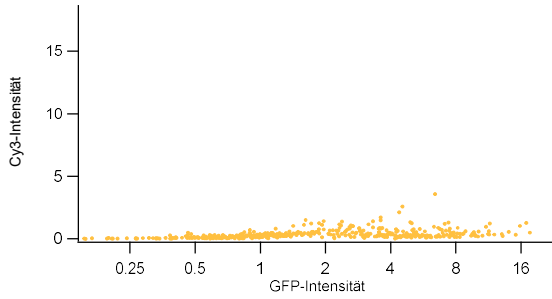


Abb. 181: Mit ERK1/2-Inhibitor versetzte R1275Q-ALK-Zellen

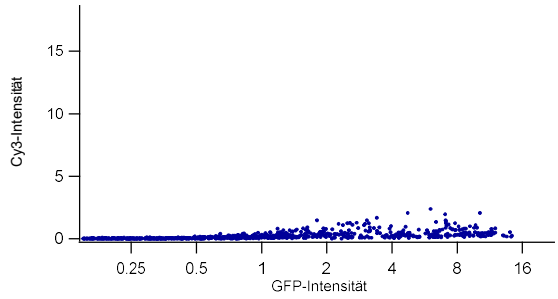


Abb. 182: Unbehandelte R1275Q-ALK-Zellen

Abb. 180 - Abb. 182: Vergleichende Zusammenschau inhibierter und unbehandelter R1275Q-ALK-SK-N-AS-Zellen. Beide Kurven sind beinahe kongruent, lediglich einige sporadische Werte der inhibierten R1275-Mutante übertreffen den maximalen Abszissenwert der nicht-inhibierten Form.

Auch die Anordnung der Y1604F-ALK-Zellen bleibt nach Verabreichung des ERK-Inhibitors gleichförmig. Die mit Inhibitor versetzte Probe erreicht zwar keine y-Koordinaten über 10, ansonsten kommen die beiden Verteilungen jedoch beinahe zur vollständigen Deckung.

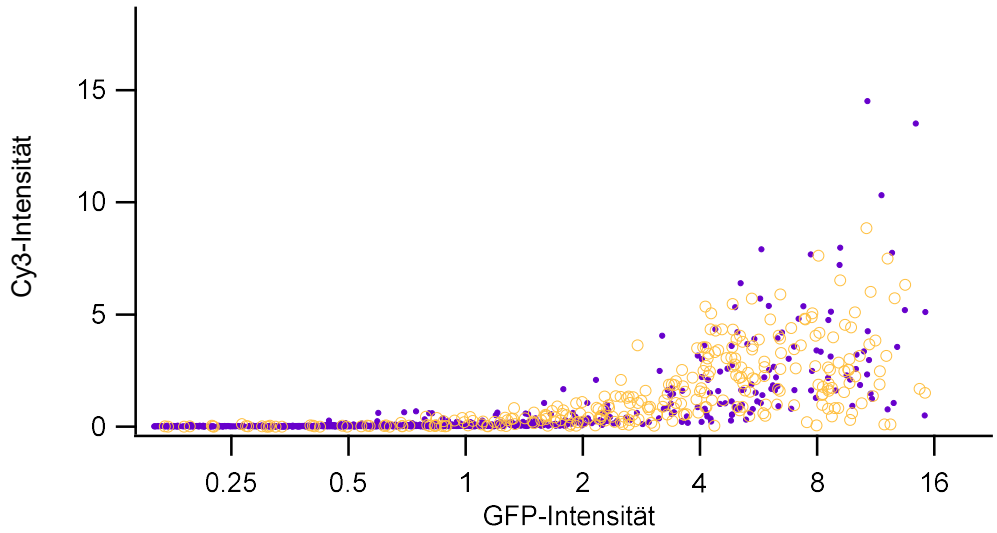


Abb. 183: Overlay von unbehandelten Y1604F-ALK-Zellen(violett) und mit ERK1/2-Inhibitor versetzten Y1604F-ALK-Zellen (gelb)

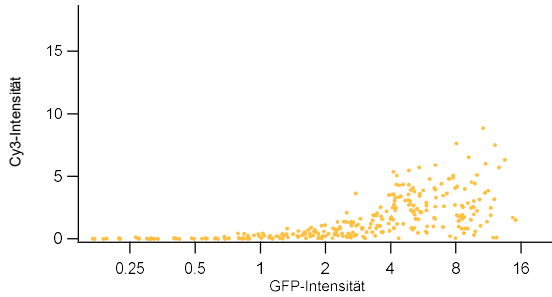


Abb. 184: Mit ERK1/2-Inhibitor versetzte Y1604F-ALK-Zellen

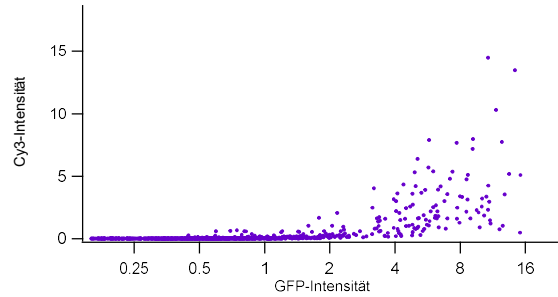


Abb. 185: Unbehandelte Y1604F-ALK-Zellen

Abb. 183 - Abb. 185: Gegenüberstellung inhibierter und nicht-inhibierter Y1604F-ALK-SK-N-AS-Zellen. Die mit Inhibitor versetzten Zellen übertrafen keine y-Werte über 10. Ansonsten sind die beiden Verteilungen beinahe identisch.

Bei der I1250T-Mutante zeigen sich letztlich ebenfalls keine relevanten Auswirkungen des ERK-Inhibitors. Lediglich das minimale Cy3-Plateau der nicht-inhibierten Zellen zwischen GFP-Intensitäten von 0.3 bis 1.1 bleibt bei den gehemmten I1250T-Zellen aus. Dies ist möglicherweise schlichtweg auf die voneinander getrennt stattgefundene Versuchsdurchführung zurückzuführen.

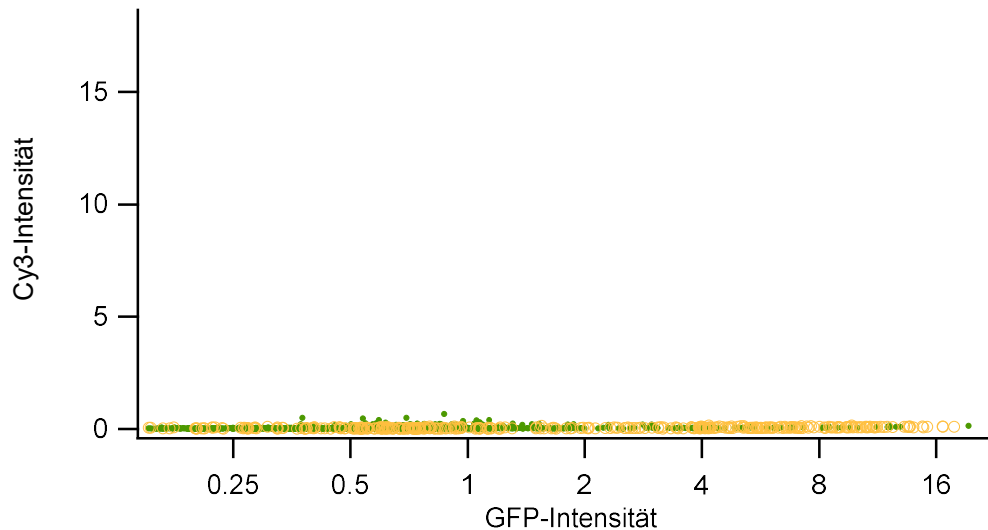


Abb. 186: Overlay von I1250T-Zellen mit(gelb) und ohne(grün) ERK1/2-Inhibitor

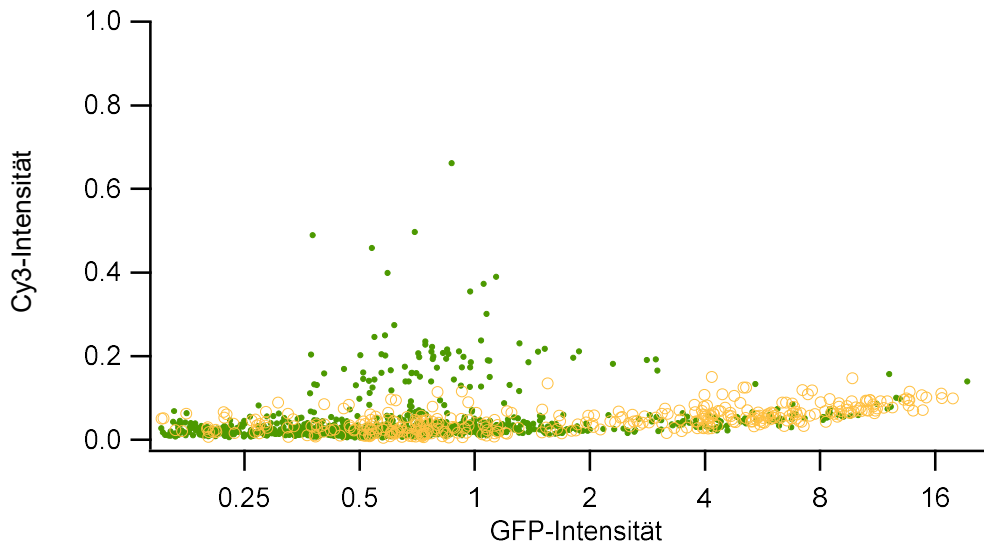


Abb. 187: Overlay von unbehandelten I1250T-ALK-Zellen(grün) und mit ERK1/2-Inhibitor versetzten I1250T-ALK-Zellen (gelb) mit vergrößertem Ordinatenabschnitt

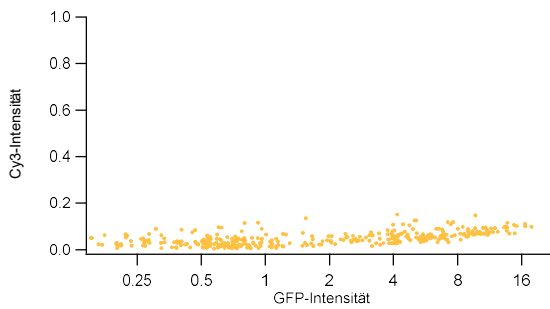


Abb. 188: Mit ERK1/2-Inhibitor versetzte I1250T-ALK-Zellen

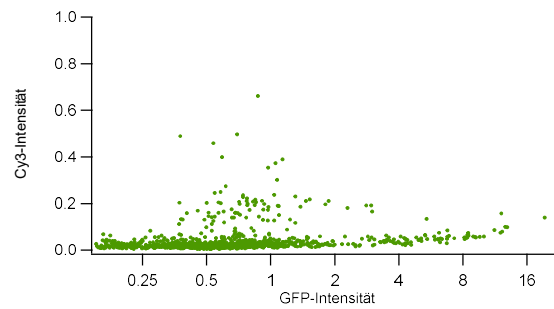


Abb. 189: Unbehandelte I1250T-ALK-Zellen

Abb. 187 - Abb. 189: Mit vergrößerter Ordinate dargestellte Streudiagramme von I1250T-ALK exprimierenden SK-N-AS-Zellen mit(gelb) und ohne (grün) Inhibitor. Bis auf den minimalen An- und Abstieg der unbehandelten I1250T-Zellen in Abb. 189 zeigt sich die Anordnung der Koordinaten kongruent zu der in Abb. 188.

Zusammenfassend ist zu berichten, dass der ERK-Inhibitor FR180204 auf keinen der untersuchten ALK-Subtypen einen relevanten Effekt ausübt.

3.4 Übersicht

	Wildtyp-ALK	F1174L	R1275Q	Y1604F	I1250T
Schwellenwert	2	0,5	0,5	2	-
Cy3-Maximum	14.5	18.7	2.4	14.5	0.7
GFP-Signal	flächig, homogen	kompakt, kraus, schaumig	schaumig, aufgelockert, perinukleär konzentriert	schaumig verwaschen, inhomogen	kraus, aufgelockert
Zytomorphologie	plan, breit/flächig Zytoplasma-Ausläufer, Vakuolen/Einschlüsse	kugelig, oval/rund	entrundet, abgeflacht	breit/flächig	unscharf begrenzt
Fret-Effizienz(%), Durchschnitt	12,4	13,2	6,4	10,3	4,8
Fret-Effizienz(%), Maximum	25,6	31,2	14,4	23,48	8,8
Hochaktive Signalmoleküle	AMPK α Akt(Thr308) Bad S6 Ribosomal Protein Stat3	AMPK α Bad S6 Ribosomal Protein Akt(Thr308) PRAS40 Stat3	(nicht untersucht)		AMPK α Bad Akt(Thr308) Stat3 PARP
ERK1/2-Inhibitor	kein Effekt				

Tab. 14: Übersicht über die wichtigsten Eckdaten der Ergebnisse der untersuchten ALK-Subtypen

4 Diskussion

4.1 ALK-Aktivierung: Schwellenwerte und Autophosphorylierung

Als Ergebnis wurde dargelegt, inwiefern der Phosphotyrosingehalt transfizierter SK-N-AS- und NIH/3T3-Zellen von der ALK-Rezeptorquantität abhängt. Für die ALK-Subtypen Wildtyp-, F1174L-, R1275Q- und Y1604F demarkierte sich ein jeweils individueller GFP-„Schwellenwert“, ab welchem die Zellen einerseits sehr hohe, zugleich aber auch niedrige Cy3-Intensitäten aufwiesen. Vor Erreichen des Schwellenwerts verhielten sich die Zellen weitestgehend gleichförmig. Lediglich bei I1250T-ALK exprimierenden Zellen war ein von diesem Schema gänzlich abweichendes Verhalten zu beobachten.

Zudem konnte hinsichtlich der Wildtyp-, F1174L-, R1275Q- und Y1604F-ALK der Nachweis über ein signifikantes FRET-Aufkommen erbracht werden. Einerseits erlaubt dies den Rückschluss, dass das in Form von Cy3-Fluoreszenz gemessene Phosphotyrosin mit der Phosphorylierung und damit Aktivierung der RTK ALK korreliert. Andererseits ermöglichen die FRET-Ergebnisse eine Aussage bezüglich der Autophosphorylierung und damit Aktivierung der einzelnen Mutanten im Vergleich.

Im Folgenden soll eine Verbindung zwischen diesen erbrachten Ergebnissen und den bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur bezüglich der untersuchten ALK-Subformen hergestellt werden.

4.1.1 Wildtyp-ALK: Expressionslevel bestimmt Tumorigenität

Die humane Wildtyp-ALK ist ein Protein, das eine extrazelluläre Domäne, eine transmembranöse Sequenz und eine intrazelluläre Region aufweist, wobei in letzterer die Kinasedomäne der ALK zu finden ist (Epstein et al. 2012). Die ALK-Aktivierung wurde ursächlich Punktmutationen in dieser Kinaseregion zugeordnet (Passoni et al. 2009). Dies würde eine Aktivierung der RTK lediglich bei mutierten ALK-Rezeptoren erwarten lassen. Passoni et al. (2009) beschrieben mittels Western-Blot-Verfahren jedoch auch bei Wildtyp-ALK in IMR-Zellen eine konstitutive Phosphorylierung. Der Wildtyp-ALK-Rezeptor benötigte hierfür jedoch einen gewissen „kritischen Schwellenwert“. Diese Beobachtung ist vereinbar mit dem in den Ergebnissen dargestellten Schwellenwert der Wildtyp-ALK-SK-N-AS- sowie NIH/3T3-Zellen, der etwa bei der GFP-Fluoreszenzintensität 2 beginnt. Überdies kann dieser „kritische Schwellenwert“ in dieser Arbeit durch Benennung von Fluoreszenzintensitäten in Form von konkreten Zahlenwerten objektiviert werden.

Von Interesse für die hier getätigten Untersuchungen ist, dass bei dem Vergleich einer Kohorte mit Wildtyp-ALK-exprimierenden Neuroblastomen und einer Kohorte von Neuroblastomen mit mutierter ALK das Gesamtüberleben der Kohorte mit mutierter ALK signifikant schlechter ausfiel als das der Wildtyp-Kohorte. In den Neuroblastomen, in denen die Wildtyp-ALK in einer quantitativ vergleichbaren Menge exprimiert wurde wie in jenen mit mutierter ALK, war die Prognose jedoch ähnlich schlecht (Schulte et al. 2011). Wendet man das Ergebnis dieser Kohortenstudie auf die unter 3.1.1 erstellten Streudiagramme an, so wäre der Schwellenwert von 2 bei Wildtyp-ALK, beziehungsweise 0,5 bei R1275Q- und F1174L-ALK auf deren Ergebnisse übertragbar. Denn die Wildtyp-Zellen zeigen ab dem Schwellenwert 2

eine insgesamt ähnlich hohe Aktivität wie die Zellen der F1174L-Mutante und übertreffen zudem großzügig die Aktivität der R1275Q-Zellen. Die F1174L- und R1275Q-Mutanten zeigen hingegen schon ab einer GFP-Fluoreszenzintensität von 0,5 eine aufschnellende Aktivität.

Des Weiteren wurde von Schulte et al. (2011) vermutet, dass der maligne Phänotyp bei Wildtyp-ALK und mutierter ALK durch ähnliche molekulare Funktionsweisen ausgeprägt wird, sobald ein quantitativ vergleichbares Expressionslevel erreicht wurde. Das Pendant auf zellulärer Ebene zeigt sich in den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit. Dabei entwickeln ALK^{F1174L} und ALK^{R1275Q} die volle und vermutlich tumorigene Aktivität bereits bei einem Viertel der Anzahl exprimierter ALK-Rezeptoren wie Wildtyp-ALK.

In Kongruenz zu obigen Hypothesen steht die von Duijkers et al. (2011) aufgestellte Behauptung, hohe ALK-Levels seien mit einer ungünstigen Prognose korreliert, unabhängig vom Mutations-Status der ALK. An dieser Stelle wirft sich jedoch die Frage auf, durch welche Mechanismen das ALK-Expressionslevel erhöht werden kann.

4.1.1.1 Mögliche Erklärungen für gesteigerte ALK-Expression

Nachfolgend werden zwei Mechanismen aufgezeigt, die das ALK-Expressionslevel beeinflussen. In dem hier vorliegenden Versuchsaufbau bei der Untersuchung der Wildtyp-ALK ist jedoch anzunehmen, dass dabei derartig hohe Expressionslevel erreicht wurden, da SK-N-AS-Zellen bereits Wildtyp-ALK exprimieren und die eingebrachten Plasmide mit Wildtyp-ALK eine additive Expression der Wildtyp-ALK zur Folge haben.

4.1.1.1.1 NeuroD1

Ebenso könnte das Auftreten erhöhter ALK-Expression aus der Beeinflussung der Transkription durch den neuronalen Differenzierungsfaktor NeuroD1 resultieren. Lu et al. (2015) konnten nachweisen, dass die ALK-Expression mutmaßlich durch NeuroD1 hervorgerufen wird, welches an die Promoterregion des ALK-Gens bindet.

4.1.1.1.2 MYCN

Darüber hinaus wird eine Modifikation der ALK-Expression durch MYCN angenommen (Hasan et al. 2013). Wie einleitend beschrieben, handelt es sich bei MYCN um einen Transkriptionsfaktor, welcher in 20% aller Neuroblastome und 45% aller *high-risk*-Neuroblastome zu finden ist.

Zudem erwies sich in Neuroblastombiopsien mit amplifiziertem MYCN-Gen die ALK-Expression als signifikant erhöht. Eine Analyse der Promoterregion ergab, dass ALK ein direktes transkriptionales Target von MYCN bildet, sprich, dass MYCN die ALK-Expression begünstigt (Hasan et al. 2013). Außerdem konnten Schönherr et al. (2012) darlegen, dass sowohl Wildtyp-ALK, als auch gain-of-function-mutierte ALK die Transkription von MYCN steigert. Demzufolge scheinen MYCN und ALK sich gegenseitig zu bedingen. Dies könnte eine weitere Erklärung für überhöhte ALK-Expressionslevel im Neuroblastom bilden.

4.1.2 F1174L-ALK: aktivierteste Mutante

Bereits Chen et al. (2008) beschrieben ALK^{F1174L} als gain-of-function-Mutation. Diese ist neben ALK^{R1275Q} die meist verbreitete, aktivierende Punktmutation in der Kinase-Domäne der ALK (Epstein et al. 2012).

Schulte et al. (2013 a) bewerten ALK^{F1174L} als die aggressivste aktivierende Mutante. Dies stimmt mit den hier erhobenen Beobachtungen überein, denn die F1174-Mutante der ALK wies im Rahmen der angefertigten Streudiagramme stets die höchsten Cy3-Werte und einen vergleichsweise geringen Schwellenwert von 0.5 auf. Diese Ergebnisse suggerieren, dass in F1174L-ALK-Zellen bereits ab einer relativ kleinen Menge an ALK-Rezeptortyrosinkinasen eine immense Autophosphorylierung stattfindet und die Tumorzellen dadurch „hochaktiv“ sind.

Besagte Autophosphorylierung kann durch die FRET-Messungen bewiesen werden, bei welchen die F1174L-Zellen durchweg höhere Werte im Vergleich zu den anderen untersuchten Mutanten erzielten. In Analogie zu dieser Beobachtung demonstrierten Montavon et al. (2014), dass mit F1174L-ALK transduzierte murine Neurralleisten-Progenitorzellen der Linie MONC-1 binnen drei Wochen hochaggressive Tumoren in sämtlichen damit behandelten Mäusen hervorriefen und damit ein stark akzeleriertes Tumorwachstum bewirkten. Auch Berry et al. (2012) postulierten eine erhöhte Tumorigenität der ALK^{F1174L} in transgenen Tieren. Weiterhin wird die F1174L-Mutation von Genannten als potenter im Vergleich zu anderen Mutationen beschrieben, da sie im Vergleich höhere Autophosphorylierungslevel und Tumortransformationskapazität aufweist.

Ferner stellte sich heraus, dass Neuroblastomzellen, welche die F1174L-Mutation tragen, relativ resistent gegen Crizotinib sind (George et al. 2008). Ursächlich für diese relative Resistenz zeigte sich eine verstärkte ATP-Bindungs-Affinität der ALK^{F1174L} (Bresler et al. 2011). Diese verstärkte Bindungsaffinität könnte eine plausible Erklärung sowohl für die in dieser Arbeit erhobenen hohen Phosphorylierungslevel, als auch für die gesteigerte Autophosphorylierung der F1174L-ALK darstellen.

Als weiteren Erklärungsansatz der überschießenden Aktivität der ALK^{F1174L} beschreiben Bresler et al. (2011) die Position F1174 als Teil eines hydrophoben Kerns nahe der *activation loop*. Ist diese Position in Form von F1174L mutiert, so ist dieser hydrophobe Kern gestört. Als Folge dessen wird die Tyrosinkinasedomäne befähigt, ihre aktivierte Konfiguration einzunehmen.

Neben der F1174L-Mutation existiert ebenfalls eine F1174S-Mutation, bei welcher Serin statt Leucin an der Position F1174 steht. Diese Mutation geht ebenfalls mit aggressiver Tumorprogression einher (Martinsson et al. 2011). Diese Tatsache bildet einen weiteren Hinweis auf die Position F1174 als Sollbruchstelle für aggressiv aktivierende Mutationen.

Hinsichtlich ALK^{F1174L} wurde eine vermehrte Proliferation und verminderte Apoptoserate postuliert (George et al. 2008) sowie eine nachweislich schlechte klinische Prognose (Sasaki et al. 2010). Diese Annahmen stehen mit den hier erbrachten Ergebnissen im Einklang, in denen die F1174L-Mutante stets die höchste Aktivität auf zellulärer Ebene aufweist.

Häufig ist die F1174L-Mutation mit MYCN-Amplifikation vergesellschaftet. Dieses kombinierte Auftreten ist dabei mit schlechtem Outcome assoziiert, was einen synergistischen Effekt dieser beiden Aberrationen nahelegt (de Brouwer et al. 2010).

4.1.3 R1275Q-ALK: häufige Mutation, geringe Aktivität

In etwa 50% aller Neuroblastome kann die ALK^{R1275Q}-Mutation detektiert werden (Carpenter und Mosse 2012). R1275Q ist neben F1174L die meist verbreitete, aktivierende Punktmutation von ALK in der Kinase-Domäne (Epstein et al. 2012).

Im Vergleich zu den anderen hier untersuchten Mutationen manifestierte sich bezüglich ALK^{R1275Q} eine vergleichsweise geringe Aktivität. Sowohl hinsichtlich der Cy3-Werte als auch der Autophosphorylierung blieb die R1275Q-Mutante weit hinter ALK^{F1174L} und Wildtyp-ALK zurück. Jedoch hinsichtlich des Schwellenwertes zeigte ALK^{R1275Q} analog zu ALK^{F1174L} eine relativ hochschießende Aktivierung ab einer GFP-Intensität von 0.5. Die R1275-Mutante scheint somit zwar bereits ab einer geringen RTK-Expression autophosphoryliert und aktiviert, jedoch in der Summe nicht so stark autophosphoryliert wie andere Mutanten zu sein. R1275Q und F1174L führten zu konstitutiver ALK-Phosphorylierung in Zelllinien, die diese ALK-Formen endogen exprimieren (Chen et al. 2008), aber auch in 3T3-Zellen (George et al. 2008).

Lee et al. (2010) behaupten, dass ALK^{R1275Q} und ALK^{F1174L} gleichwohl zu einer Destabilisation der inaktiven Form der ALK führen. Aus biochemischen Daten ging jedoch hervor, dass die R1275Q-Mutation die auto-inhibitorische Konformation der Tyrosinkinasedomäne des ALK-Rezeptors stabilisiert (Bresler et al. 2011) und somit verhindert, dass dieser seine aktivierte Konfiguration einnimmt. Letztere These stimmt am ehesten mit den hier erbrachten Ergebnissen überein, aus welchen zwar deutlich eine Aktivierung der R1275-Mutante ab einem gewissen Schwellenwert an ALK-Rezeptoren hervorgeht, wobei diese Rezeptoren jedoch insgesamt eine vergleichsweise geringe Phosphorylierung aufweisen.

4.1.4 Y1604F-ALK: mutierte endogene Phosphorylierungsdomäne

Die Position Y1604 stellt eine endogene Phosphorylierungsdomäne des humanen ALK-Rezeptors dar, deren Phosphorylierung die Aktivierung der ALK anzeigt. So zeigen beispielsweise ALK^{F1174L} und ALK^{R1275Q} eine konstitutive Phosphorylierung der Position Y1604 (Lambertz et al. 2015). Wie viele andere verwenden Berry et al. (2012) in ihren Versuchen einen gegen ALK^{Y1604} gerichteten Antikörper, um phosphorylierte ALK-Rezeptoren zu detektieren. Bezüglich des pulmonalen Adenokarzinoms wird die Phosphorylierung der Position Y1604 sogar als diagnostischer Biomarker erwogen (Wang et al. 2011).

In der in dieser Arbeit untersuchten ALK^{Y1604F} liegt die Phosphorylierungsdomäne nun in mutierter Form vor. Die Y1604F-ALK wies hinsichtlich Aktivierung und Autophosphorylierung ein nahezu identisches Verhalten zu Wildtyp-ALK auf. Für beide ALK-Subformen gilt der unter 3.1.1 ermittelte Schwellenwert einer GFP-Fluoreszenzintensität von 2. Auch hinsichtlich der mittels FRET gemessenen Autophosphorylierung erzielte Wildtyp-ALK lediglich leicht erhöhte Werte im Vergleich zu ALK^{Y1604F}. Insgesamt betrachtet scheint die Aktivität der ALK^{Y1604F} somit weitestgehend der Aktivität der Wildtyp-ALK zu entsprechen.

Da aufgrund der hier vorliegenden Mutation der Position Y1604 keine Phosphorylierung ebendieser mehr erfolgen kann, ist die Bedeutsamkeit dieser Phosphorylierungsdomäne durch die hier erbrachten Ergebnisse weitestgehend widerlegt. Zumindest wird die Autophosphorylierung der RTK durch den Wegfall der Y1604-Position nicht maßgeblich verändert. Das analoge Verhalten der Wildtyp-ALK zu ALK^{Y1604F} lässt weiterhin darauf schließen, dass im Wildtyp-Rezeptor diese Phosphorylierungsdomäne ebenfalls von keiner größeren Relevanz zu

sein scheint. Denn letztendlich bezeichnet ALK^{Y1604F} nichts anderes als einen Wildtyp-ALK-Rezeptor mit einer ausgeschalteten Y1604-Phosphorylierungsdomäne.

Insofern ist die Bedeutsamkeit dieser Phosphorylierungsdomäne in Bezug auf die gesamte Autophosphorylierung weitestgehend widerlegt. Nichtsdestoweniger stellt die Phosphorylierungsdomäne Y1604 in nicht-mutierter Form einen nützlichen Marker für den Phosphorylierungs-Status des ALK-Rezeptors dar.

4.1.5 I1250T-ALK: „kinasetote“ Mutante

Anhand einer *in silico* Analyse vermuteten Mosse et al. (2008) hinter ALK^{I1250T} ursprünglich eine aktivierende Mutation. Von Schönherr et al. (2011/1a) wurde ALK^{I1250T} jedoch als „kinasetote“ Mutation *in vivo* und *in vitro* beschrieben, in welcher unter keinen Umständen phosphorylierte Tyrosinmoleküle nachgewiesen werden konnten.

Diese Beobachtungen stimmen mit den in dieser Arbeit erhobenen Untersuchungen hinsichtlich der I1250-Mutante überein. Von I1250T-ALK-Zellen wurden keine Cy3-Werte über 1 erreicht, was für eine nicht-relevante Phosphorylierung spricht. In den FRET-Experimenten hinsichtlich ALK^{I1250T} konnte zudem kein signifikantes FRET-Aufkommen detektiert werden, eine nennenswerte Autophosphorylierung ist somit auszuschließen. Ergo liegt bei der I1250T-ALK keine Aktivierung vor.

Erwähnenswert sei an dieser Stelle ebenfalls ein von Schönherr et al. (2011/1a) durchgeführter Versuch, in welchem Zellen der Linie PC12 mit ALK^{I1250T} und Wildtyp-ALK cotransfiziert wurden. Die I1250T-Mutation übte dabei einen dominant-negativen Effekt aus und verminderte die Aktivierung der durch Wildtyp-ALK stimulierten Signalwege. Demzufolge scheint ALK^{I1250T} einen durchschlagenden, inaktivierenden Effekt auf die ALK-Signalisierung auszuüben.

4.2 Zytomorphologie und Rezeptorverteilung der untersuchten ALK-Subformen

4.2.1 Wildtyp, F1174L, R1275Q in SK-N-AS-Zellen: Rezeptorkalisation membranös vs. intrazellulär

Bei der mikroskopischen Betrachtung der mit verschiedenen Konstrukten transfizierten SK-N-AS-Zellen differierten diese hinsichtlich Zytomorphologie und ALK-Rezeptorverteilung. Der deutlichste Unterschied konnte zwischen Wildtyp- und F1174L-Zellen nachgewiesen werden. Die Wildtyp-Zellen zeigten ein flächiges GFP-Signal, hochsuggestiv für eine vorwiegend membranöse ALK-Lokalisation. In den ALK^{F1174L} -SK-N-AS-Zellen hingegen imponierte eine dicht gepackte, schaumige GFP-Fluoreszenz im Zytoplasma. Die ALK^{F1174L} exprimierenden Zellen zeigten Ähnlichkeit zu den ALK^{R1275Q} -SK-N-AS-Zellen, welche jedoch im Vergleich eine etwas aufgelockerte GFP-Fluoreszenz aufwiesen.

Bereits Mazot et al. (2011) erkannten bei mit ALK^{R1275Q} und ALK^{F1174L} transfizierten NIH3T3-Zellen sowie Neuroblastomzellen der Linien CLB-GE und IMR-32 die vor allem intrazelluläre Lokalisation der ALK-Rezeptoren. Die Rezeptoren wurden dabei weitgehend

im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat einbehalten. Ursächlich dafür wurde ein Defekt der N-Glykosylierung erachtet.

Der Verbleib im endoplasmatischen Retikulum ist charakteristisch für fehlgefaltete Proteine (Helenius und Aebi 2004). Die N-Glykosylierung wiederum bildet einen entscheidenden Bestandteil der pro-survival-Signalisierung der ALK (Del Grosso et al. 2011).

Ferner beobachteten Mazot et al. (2011) eine überwiegende Lokalisation der Wildtyp-ALK-Rezeptoren auf der Plasmamembran, wobei auch intrazellulär Wildtyp-ALK exprimiert wurde.

Diese Ergebnisse hinsichtlich Wildtyp-ALK, ALK^{F1174L} sowie ALK^{R1275Q} werden in dieser Arbeit in der Zelllinie SK-N-AS eindeutig reproduziert.

Bezüglich dieser Resultate entdeckten Mazot et al. (2011), dass durch Inaktivierung der Kinasen ALK^{F1174L} und ALK^{R1275Q} die Reifung und Lokalisation der ALK auf der Zelloberfläche wiederhergestellt werden konnte. Dadurch konnte bewiesen werden, dass die konstitutive Aktivierung der ALK zu beeinträchtigter Reifung und intrazellulärem Verbleib führt. Dies begründet, warum bei den hier vorliegenden Ergebnissen die F1174-Mutante das am dichtesten gepackte Zytoplasma besitzt, denn diese wird hier als „aktivierteste Mutante“ eingestuft. Somit weisen die ALK^{F1174L}-Rezeptoren die stärkste konstitutive Aktivierung auf und haben nach den Erkenntnissen von Mazot et al. (2011) folglich die am stärksten beeinträchtigte Reifung mit Verbleib im Golgi-Apparat.

Mazot et al. (2011) stellten zudem die Hypothese auf, dass die ALK^{F1174L}- und ALK^{R1275Q}-Rezeptoren auf der Plasmamembran weitaus stärker phosphoryliert vorliegen als jene im intrazellulären Pool.

Darüber hinaus liegen hinreichende Anhaltspunkte vor, dass der mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziierten Phosphatase PTP1B eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der ALK-Phosphorylierung zukommt, deren Hemmung zu einer drastischen Abnahme der Tyrosin-Phosphorylierung in Wildtyp-, F1174L- und R1275Q-ALK-Zellen führt (Boutterin et al. 2013).

Bei Annahme dieser beschriebenen Mechanismen wäre die in den vorliegenden Untersuchungen beobachtete überschießende Aktivität der F1174-Mutante durch deren relativ geringe Anzahl membranös lokalisierter ALK-Rezeptoren bedingt und nicht durch die intrazellulären Rezeptoren. Die Wildtyp-ALK exprimierenden Zellen, die vergleichsweise eine deutlich ausgeprägtere membranöse Rezeptorlokalisierung aufweisen, müssten folglich aktiver sein als die ALK^{F1174L}-Zellen. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die angenommene Hypothese von Mazot et al. (2011) zwar durchaus anzunehmen ist und die membranösen Rezeptoren im Vergleich stärker phosphoryliert sind. Durch die quantitativ deutlich höhere Rezeptormenge der ALK^{F1174L}-Zellen im Zytoplasma fällt die beschriebene, vergleichsweise stärkere Phosphorylierung jedoch nicht ins Gewicht.

Auch die Aktivität der ALK^{R1275Q} bleibt, trotz ähnlicher Rezeptorverteilung, hinter der von ALK^{F1174L} zurück. Ueda et al. (2016) demonstrierten im Mausversuch, dass ALK^{R1275Q} in Zusammenspiel mit MYCN neuronalen Zellen unter anderem dadurch Malignität verleiht, dass die normale Integrität der Basalmembran gestört wird. Dies bildet einen Erklärungsansatz für die hier im Vergleich zu F1174L-ALK sehr geringe Aktivität der R1275-Mutante. Angenommen, MYCN spiele in den hier untersuchten Zellen tatsächlich eine Rolle, könnte es

sein, dass die Integration der ALK^{R1275Q}-Rezeptoren in die Zellmembran aufgrund besagter Störung der Basalmembran beeinträchtigt ist, wodurch die Gesamtaktivität der ALK^{R1275Q} geschmälert werden würde.

4.2.2 Morphologie der ALK^{Y1604F}- und ALK^{I1250T}-Zellen

4.2.2.1 ALK^{Y1604F}: Zytomorphologie und Rezeptorverteilung

Zytomorphologisch betrachtet erscheinen die Y1604F-ALK exprimierenden Zellen breit und flächig, in bemerkenswerter Übereinstimmung mit den Wildtyp-ALK-exprimierenden Zellen. Die GFP-Fluoreszenz der Y1604-ALK-Zellen wirkt schaumig-verwaschen und inhomogen. Die betonte Zellmembran sowie die fehlende Akzentuierung der grünen Fluoreszenz im Zytoplasma lassen auf eine Verteilung der Rezeptormoleküle zu Gunsten der Zellmembran schließen.

Summa summarum ähneln die mit ALK^{Y1604F} transfizierten Zellen den Wildtyp-Zellen. Eine gewisse Gleichförmigkeit fällt bereits unter 3.1.1 und 3.1.2 bezüglich Aktivität und Autophosphorylierung auf.

Somit bilden diese Untersuchungen ein weiteres Indiz für das similäre Verhalten der Y1604F-ALK zur Wildtyp-ALK. Betrachtet man diese Ergebnisse in Zusammenschau mit den unter 4.2.1 dargelegten Theorien zur Rezeptorlokalisierung, so ergibt sich, dass die Y1604-Mutante höchstwahrscheinlich keinen Defekt in der N-Glykosylierung aufweist. Denn die ALK^{Y1604F}-Rezeptoren verbleiben nicht wie ALK^{F1174L} und ALK^{R1275Q} im endoplasmatischen Retikulum, beziehungsweise Golgi-Apparat, sondern sind ähnlich der Wildtyp-ALK vornehmlich auf der Zellmembran lokalisiert. Darin liegt möglicherweise auch die flächig-breite Zytomorphologie von Wildtyp- und Y1604F-ALK-Zellen begründet.

4.2.2.2 ALK^{I1250T}: Zytomorphologie und Rezeptorverteilung

Das GFP-Signal der ALK^{I1250T}-Zellen entspricht letztlich dem der ALK^{F1174L}-Zellen, obgleich es im Vergleich deutlich aufgelockert erscheint. Das Zytoplasma der I1250T-ALK-Zellen wirkt unscharf begrenzt.

Mutmaßlich besteht bei der I1250-Mutante unter Miteinbeziehung vorhergehender Beobachtungen von Mazot et al. (2011) ebenfalls ein Defekt in der N-Glykosylierung. Denn anhand der mikroskopischen Aufnahmen ist der Großteil der GFP-markierten ALK^{I1250T}-Rezeptoren im Zytoplasma zu verorten.

Die Annahme, dass möglicherweise nahezu gar keine ALK^{I1250T}-Rezeptoren auf der Zellmembran lokalisiert sind, würde nach der oben genannten Hypothese von Mazot et al. (2011) zudem die bereits beschriebene, geringe Aktivität und Autophosphorylierung dieser ALK-Mutante begründen.

4.2.3 „Übereinander wachsen“ und Verzweigung – ALK-Einfluss?

4.2.3.1 Adhäsives Wachstum

Bei allen untersuchten ALK-Subformen konnte ein adhäsives Wachstum der Zellen an beziehungsweise übereinander beobachtet werden. Ob die anaplastische Lymphom Kinase hierauf einen Einfluss ausübt, ist dabei fraglich.

Einerseits Luciani et al. (2013) erbrachten den Nachweis, dass Exendin-4, welches sonst in der Therapie des Diabetes mellitus zur Anwendung kommt, das adhäsive Wachstum von SK-N-AS-Zellen stimuliert.

Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der normalerweise im Neuroblastom interagierenden Tyrosinkinasen focal adhesion kinase (FAK) und vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGF-3) zu einer Verminderung der zellulären Verbundenheit in SK-N-AS-Zellen führt (Stewart et al. 2015).

Bestünde eine Wechselbeziehung zwischen ALK und dem adhäsiven Wachstum, so wäre zudem eine Steigerung dessen bei der „aktiviertesten“ Mutante ALK^{F1174L} und gegensätzlich eine Minderung der zellulären Verbundenheit bei ALK^{I1250T} zu erwarten. Das An- sowie „Übereinander wachsen“ der hier betrachteten Neuroblastomzellen scheint somit mutmaßlich nicht durch den ALK-Rezeptor bedingt.

4.2.3.2 Neuritenauswuchs

Als zusätzlichen Aspekt konnten, ebenfalls unabhängig von dem eingebrachten ALK-Konstrukt, bei sämtlichen transfizierten SK-N-AS-Zellen Zytoplasmabrücken beobachtet werden, welche als Neuriten aufzufassen sind.

Motegi et al. (2004) postulierten, dass durch die Aktivierung der ALK der Neuriten-Auswuchs in der humanen Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH induziert wird. Dieser Ansatz ist insofern nicht auf die Ergebnisse dieser Arbeit übertragbar, als auch bei der „kinasetoten“ und somit ALK-inaktiven I1250-Mutante der Auswuchs von Neuriten erkennbar ist.

Weiterhin spielt das humane Protein Transcriptional Elongation Regulator 1, kurz TCERG1 eine Rolle hinsichtlich des Wachstums von Neuriten und deren Verzweigung. Es beeinflusst über die Transkription und das alternative Splicing die Dynamik des Zytoskeletts. Wurde TCERG1 in der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y depletiert, resultierte neben reduziertem Auswuchs von Neuriten ebenfalls ein hemmender Effekt auf deren Verzweigung und die Komplexität der Verzweigung (Munoz-Cobo et al. 2016).

Die molekularen Mechanismen TCERG1-vermittelter Effekte auf Neuronen sind jedoch bis dato unbekannt (Munoz-Cobo et al. 2016). Insofern wirft sich an dieser Stelle die interessante Frage auf, ob bezüglich TCERG1 und ALK möglicherweise eine wechselseitige Beeinflussung besteht.

4.3 ALK-Signalisierung

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Pathscan die Signalmoleküle der transfizierten Zellen hinsichtlich ihrer Aktivierung untersucht mit der Intention, daraus die aktiven Signalwege in den zellulären Modellen des Neuroblastomkrebs nachzuvollziehen.

Um innerhalb dieser Arbeit einen adäquaten Umfang zu wahren, werden im Folgenden nicht alle mittels Pathscan untersuchten Moleküle behandelt.

In den Pathscan-Versuchen ergaben sich bei allen transfizierten SK-N-AS-Zellen die größten Aktivitäten für AMPK α , Stat3, Akt und Bad. Bemerkenswerterweise gab es hierbei nur geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen ALK-Subformen Wildtyp, F1174L und I1250T. Bei F1174L- und Wildtyp-ALK-Zellen lag zudem das Target S6 Ribosomal Protein vermehrt in phosphorylierter Form vor. Hinsichtlich ERK1/2 und mTOR konnte stetig eine basale, innerhalb der ALK-Formen divergierende Grundaktivität festgestellt werden. Weiterhin zeigte sich bezüglich der I1250-Mutante eine vergleichsweise deutlich erhöhte Aktivität des Signalmoleküls PARP.

Zudem ergaben die Untersuchungen eine führende Position der ALK^{F1174L} hinsichtlich sämtlicher Targets. Ein entgegengesetztes Verhalten war bei der I1250-Mutante zu beobachten. Die Aktivität der Wildtyp-ALK-Zellen bewegte sich meist zwischen diesen beiden Mutanten.

Die nicht von der Transfektion affizierten, aber mit den transfizierten Zellen im selben Medium wachsenden Zellen wurden ebenfalls untersucht und zeigten im Vergleich zu vollständig unbehandelten SK-N-AS-Zellen gesteigerte Aktivitäten für sämtliche Targets außer PRAS40, welches führende Aktivität in den untransfizierten SK-N-AS-Zellen aufwies. Dies führte zu dem Schluss, dass die transfizierten, ALK-exprimierenden Zellen die Zellen in deren Umgebung beeinflussen. Zudem wurde dabei oben beschriebenes Muster der Gesamtaktivität beibehalten: Die „Umgebungs-Zellen“ von ALK^{F1174L}-Zellen zeigten die höchsten Aktivitäten, gefolgt von den „Umgebungs-Zellen“ der Wildtyp-ALK-Zellen und ALK^{I1250T}-Zellen.

Nun folgend werden diese Ergebnisse im Kontext mit den in der Literatur erwogenen ALK-Signalwegen diskutiert.

4.3.1 Aktivierte Signalmoleküle im Pathscan: nachgeschaltete Signalwege

Wie eingangs vorgestellt, werden in der Literatur die drei Kaskaden AKT/PI3K, JAK/STAT und RAS/MAPK als nachgeschaltete Signalwege der ALK favorisiert. Die Autophosphorylierung der ALK soll zur Aktivierung dieser Signalwege führen (Yao et al. 2013).

Chiarle et al. (2008) und Roskoski (2013) postulierten zudem, dass die proliferativen Effekte der Neuroblastomzellen vor allem durch den Ras/ERK-Signalweg hervorgerufen werden. Zellüberleben und phänotypische Veränderungen der Zellen hingegen sollen eher durch den JAK/STAT- und PI3K/Akt-Signalweg bedingt sein.

4.3.1.1 AMPK α – Regulator des neuronalen Energiestoffwechsels

Bereits Chai et al. (2010) war es gelungen, mittels Western-Blot-Verfahren die Phosphorylierung der AMP-aktivierte Proteinkinase α , kurz AMPK α , in SK-N-AS-Zellen nachzuweisen.

In den hier vorliegenden Versuchen wiesen die jeweils Wildtyp-ALK, ALK^{F1174L} oder ALK^{I1250T} exprimierenden SK-N-AS-Zellen allesamt hohe Phosphorylierungsraten der AMPK α auf.

Diese gilt als Schlüsselenzym des neuronalen Energiestoffwechsels (Amato und Man 2011), deren Aktivität abhängig vom jeweiligen AMP/ATP-Verhältnis der Zelle ist (Hardie et al. 1998, Kemp et al. 1999). Ergo steigt die AMPK-Aktivität mit sinkendem ATP-Spiegel (Inoki et al. 2003).

Für die Höhe der AMPK α -Enzymaktivität zeichnete sich in den beiden Versuchen keine klare Tendenz für eine der untersuchten Komponenten ab, es bestand schlichtweg in allen untersuchten Zellen eine deutlich erhöhte Aktivität mit arbiträren Schwankungen.

Amato und Man (2011) berichten zudem von einer wichtigen Rolle der AMPK α in der neuronalen Entwicklung, in welcher Neuroblastomzellen letztendlich einzuordnen sind. Überdies fungiert AMPK α als Sensor für den Energiebedarf der Zelle und passt sie den metabolischen Gegebenheiten an (Canto und Auwerx 2010). Beide dieser Aspekte erklären die bereits in untransfizierten SK-N-AS-Zellen leicht erhöhte Aktivität der AMPK α .

Insgesamt ist die hier detektierte, hohe AMPK α -Aktivität letztlich als endogenes Merkmal der SK-N-AS-Zellen einzuordnen und für die differenzierte Betrachtung der verschiedenen ALK-Subformen weitestgehend unerheblich.

4.3.1.2 Akt – der PI3K/Akt-Signalweg

Wie bereits erwähnt, bilden Thr308 und Ser473 die entscheidenden Reste für die Tyrosinphosphorylierung der Akt (Partovian et al. 2008). Jedoch zeigten Opel et al. (2007), dass die prognostische Signifikanz des Monitorings der Position Thr308 oder beider Phosphorylierungsstellen gleichzeitig weitaus höher liegt als das der Position Ser473.

Bei demzufolge gemeinsamer Betrachtung der Positionen Thr308 und Ser473 liegt das Akt-Signalmolekül insgesamt mit einer bemerkenswert hohen Phosphorylierungsrate vor. Am höchsten ist die Akt-Aktivität bei ALK^{F1174L}-Zellen, gefolgt von Wildtyp-ALK- und ALK^{I1250T}-Zellen. Den größten Anteil an der Gesamtaktivität besitzt Akt(Thr308) jedoch bei den Wildtyp-ALK-Zellen. Auch in untransfizierten Zellen konnte eine gewisse Menge an phospho-Akt nachgewiesen werden, die jedoch in Wildtyp- und F1174L-ALK-Zellen deutlich höher ausfiel. Auch die „Umgebungs-Zellen“ von Wildtyp-ALK- und ALK^{F1174L}-Zellen zeigten nennenswert höhere Phosphorylierungsraten für Akt als die untransfizierten Zellen. Ferner wurde Akt bereits in phosphorylierter und somit aktivierter Form in den humanen Neuroblastomzelllinien SK-N-SH, SH-SY5Y, SK-N-BE, SH-EP und IMR-32 detektiert (Opel et al. 2007).

Insgesamt ist eine tragende Rolle des Akt/PI3K-Signalwegs in den hier untersuchten Zellen anzunehmen. Wie aus Abb. 190 hervorgeht, werden durch Akt, auch genannt Proteinkinase B (PKB) (Guerreiro et al. 2006), zahlreiche Moleküle direkt oder indirekt aktiviert oder inhibiert.

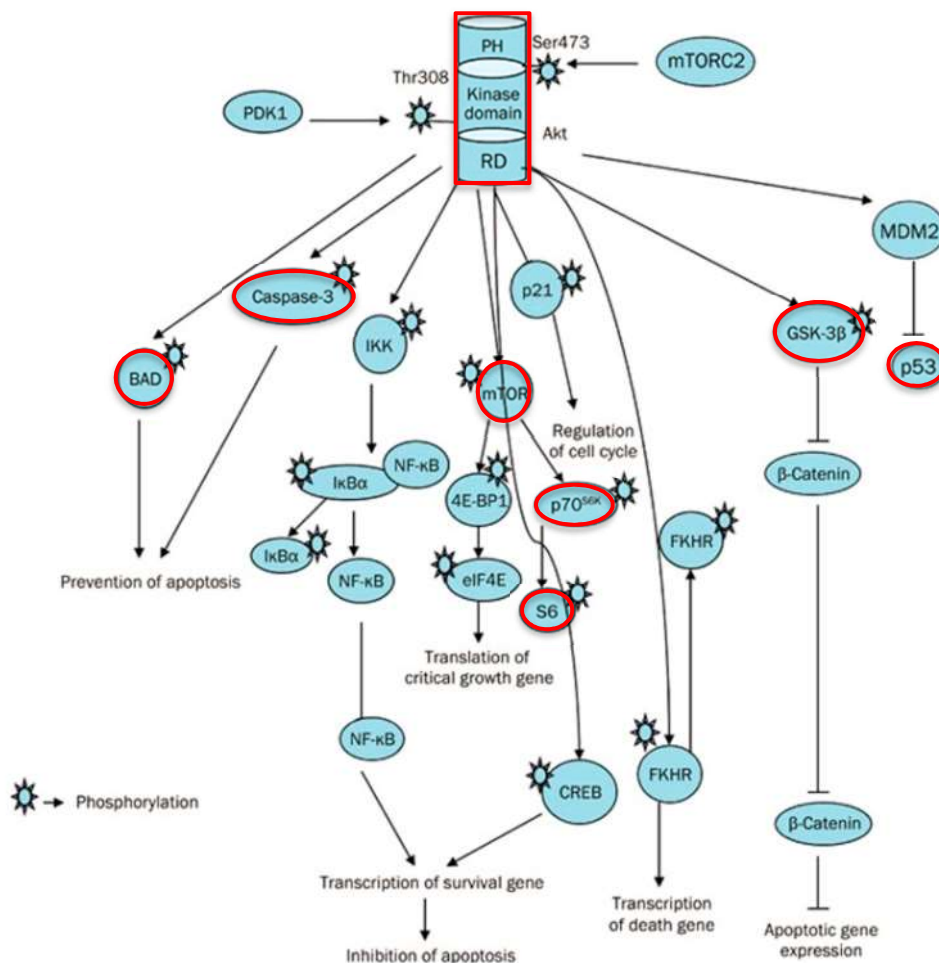


Abb. 190: © 2012 CPS and SIMM, entnommen aus Pal und Mandal (2012) mit Genehmigung der Nature Publishing Group und modifiziert: Akt-Signalisierung

Dargestellt sind die Signalwege der Akt. Verschiedene Moleküle werden aktiviert (Pfeil) oder inhibiert (stumpfe Enden). Die hier phosphorylierte Akt reguliert neben der Apoptose durch Phosphorylierung verschiedener Substrate noch weitere Vorgänge auf zellulärer Ebene (Pal und Mandal 2012). Die rot markierten Moleküle wurden in dieser Arbeit in den Pathscan-Versuchen hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht.

Die Serin/Threonin-Kinase Akt wird von Phosphatidylcholine 38-OH (PI3K), einer von Wachstumsfaktoren stimulierten Kinase, in die Plasmamembran eingebracht und aktiviert (Megison et al. 2013). Eine Aktivierung kann zudem durch IGF-1, den insulin-like growth factor 1 erfolgen (Hawley et al. 2014). In Neuroblastomzellen ist derzeit noch nicht abschließend geklärt, ob ALK Akt direkt oder über PI3K aktiviert (Roskoski 2013).

Durch Aktivierung von Akt und deren nachgeschalteten Signalmolekülen wird ein antiapoptotisches Signal generiert (Minoo 2012). Osajima-Hakomori et al. (2005) konnten zudem experimentell belegen, dass die Suppression aktivierter ALK zur Apoptose führt, unter anderem durch die reduzierte Phosphorylierung von Akt. Somit wird angenommen, dass aktivierte ALK die Phosphorylierung von Akt bedingt.

Generell wird das Vorkommen aktivierter Akt mit einem schlechtem Outcome beim Neuroblastom vergesellschaftet (Opel et al. 2007). Es existieren bereits verschiedene Ansätze bezüglich eines therapeutischen Angreifens auf der Ebene des Akt-Signalwegs. So schlugen Mohlin et al. (2015) vor, in aggressiven Neuroblastomen an PI3K und mTORC2, einem im Folgenden genauer beschriebenen Komplex in der Akt-Signalkaskade, therapeutisch anzugreifen. Auch die Kombination von Crizotinib mit Inhibitoren von PI3K, Akt und mTOR wird als Therapieansatz mutierter Neuroblastome erwogen (Moore et al. 2014).

Ferner wurde durch Segerstrom et al. (2011) gezeigt, dass durch niedermolekulare Inhibitoren die Akt-Phosphorylierung vermindert werden konnte. Dies führte wiederum zu einer Reduktion des Zellüberlebens *in vitro* sowie des Tumorwachstums *in vivo*. Insgesamt könnte die Modulation des Akt-Signalwegs in Zukunft ein bedeutendes Target der Chemotherapie des Neuroblastoms darstellen (Megison et al. 2013).

Nun werden die im Pathscan untersuchten Moleküle des Akt-Signalwegs detaillierter beleuchtet.

4.3.1.2.1 AMPK α als mTORC1-Inhibitor

Der Regulator des zellulären Energiestoffwechsels AMPK α wurde bereits unter 4.3.1.1 beschrieben. Darüber hinaus besteht eine wechselseitige Beeinflussung von AMPK α und Akt.

AMPK greift einerseits in die Akt-Signalkaskade ein, indem es TSC2 aktiviert (Hahn-Windgassen et al. 2005). TSC2 ist wiederum ein negativer Regulator des PI3K/Akt-Signalwegs (Keppler-Noreuil et al. 2016) und wird in der Akt-Signalkaskade normalerweise durch Akt inhibiert (Hahn-Windgassen et al. 2005). AMPK hemmt somit, über einige Zwischenschritte, mTORC1 (Gwinn et al. 2008), dessen bedeutende Funktion im Akt-Signalweg im Weiteren noch erläutert wird.

Andererseits ist Akt ein negativer Regulator der AMPK. Akt moduliert über einen Anstieg des ATP-Levels den Energiehaushalt der Zellen (Hahn-Windgassen et al. 2005). Wie bereits beschrieben, sinkt die AMPK-Aktivität bei steigendem ATP-Spiegel (Hardie et al. 1998, Kemp et al. 1999). Demzufolge bedingt der Akt-vermittelte ATP-Anstieg eine Inhibition der AMPK-Aktivität und dadurch wiederum zugleich eine Stimulierung der Akt-Signalkaskade selbst (Hahn-Windgassen et al. 2005).

In den hier erhobenen Ergebnissen liegt sowohl eine hohe AMPK α -Aktivität wie auch eine erhebliche Menge an phosphorylierten Akt-Molekülen vor. Aufgrund der Tatsache, dass Akt über die Bereitstellung von ATP zur Dephosphorylierung von AMPK α führt, wäre folglich, ohne die hohe Akt-Aktivität, eine noch wesentlich größere Menge phospho-AMPK α zu erwarten. Diese inhibiert wiederum über Zwischenschritte den der Akt nachgeschalteten mTORC1-Komplex, welcher im Anschluss erörtert wird.

4.3.1.2.2 mTOR

Eines der nachgeschalteten Signalmoleküle der Akt bildet mTOR, das *mammalian target of rapamycin* (Dan et al. 2014). Dieses lag in den Pathscan-Experimenten eher gering phosphoryliert vor, die höchste Aktivität bestand bei der F1174-Mutante.

mTOR kommt in zwei strukturell verschiedenen Komplexen vor, mTORC1 und mTORC2 (Dan et al. 2014). mTORC1 enthält neben mTOR unter anderem Raptor, G β L und PRAS40 (Zoncu et al. 2011), mTORC2 beinhaltet mTOR, mLST8, Rictor und mSIN1 (Zoncu et al. 2011, Cybulski und Hall 2009).

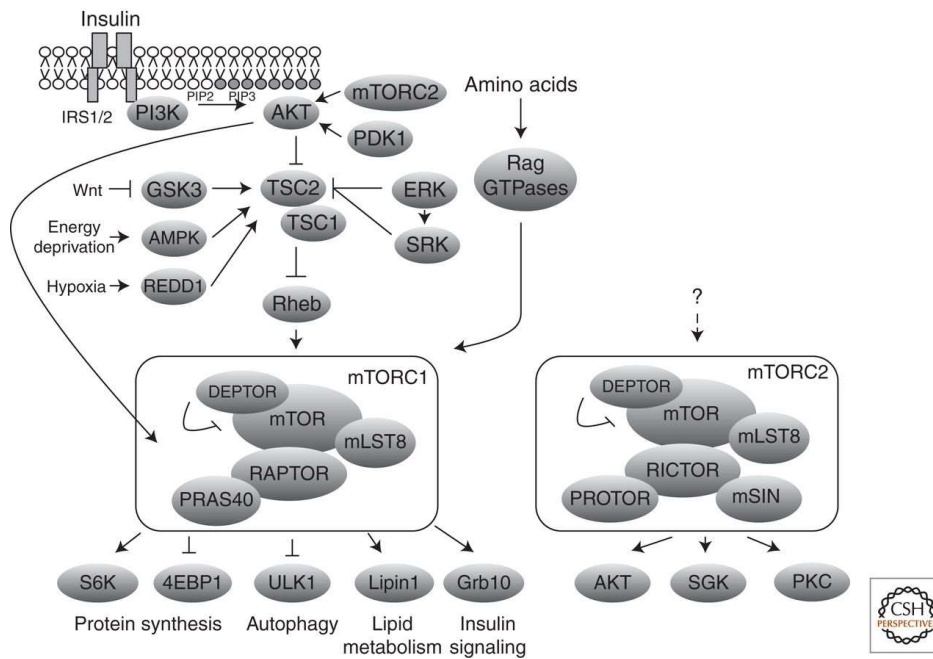


Abb. 191: Dargestellt ist der mTOR-Signalweg. Die mTOR Kinase kommt in zwei Komplexen vor, in mTORC1 und mTORC2. Über verschiedene Zwischenschritte aktiviert Akt den mTORC1-Komplex. Die aktivierenden Mechanismen des mTORC2-Komplexes sind noch nicht vollständig geklärt. mTORC1 kontrolliert das Zellwachstum. mTORC2 phosphoryliert unter anderem Akt (Hung et al. 2012). GβL, ein Teil des mTORC1-Komplexes, ist hier nicht abgebildet.

Abb. 191: © 2012 Cold Spring Harbor Laboratory Press, entnommen aus Hung et al. (2012) mit Genehmigung der Cold Spring Harbour Laboratory Press: mTOR-Signalisierung

mTORC2 phosphoryliert Akt an der Position Ser473 (Sarbasov et al. 2005) und vermittelt darüber Zellwachstum und –überleben. Studien haben ergeben, dass die mTORC2-Aktivität für einige Krebsarten essentiell ist, in vielen normalen Zellen hingegen weniger Bedeutung hat (Sparks und Guertin 2010). Wie aus Abb. 191 zu entnehmen ist, ist mTORC2 jedoch kein bekanntes nachgeschaltetes Signalmolekül in der Akt-Phosphorylierungskaskade. Vielmehr besteht eine Phosphorylierung von mTORC2 in Richtung Akt.

mTORC1 kontrolliert das autonome Zellwachstum im Kontext mit der Verfügbarkeit von Nährstoffen (Sparks und Guertin 2010) in “normalen” Zellen und in Krebszellen (Rahman und Haugh 2017). Beeinflusst wird dabei die Translation durch die Phosphorylierung und damit Aktivierung von S6 Kinase 1 (S6K1) (Hahn-Windgassen et al. 2005), welche im Folgenden als „p70S6 Kinase“ noch genauer thematisiert wird.

Die in den Pathscan-Experimenten gemessene, geringe Phosphorylierungsrate von mTOR lässt auf eine relativ geringe Aktivität beider Komplexe schließen. Demzufolge ist auszuschließen, dass ein Großteil der Akt-Phosphorylierung durch mTORC2 bedingt ist. Da, wie bereits erwähnt, AMPKα über Zwischenschritte den mTORC1-Komplex inhibiert, könnte die hohe AMPKα-Aktivität ebenso zu dem niedrigen mTOR-Phosphorylierungslevel geführt haben. Dass bei den ALK^{F1174L}-Zellen die größte mTOR-Aktivität zu verzeichnen ist bedeutet im Umkehrschluss, dass die Akt-Aktivität in diesen Zellen vergleichsweise deutlich höher liegt. Diese Beobachtung stimmt mit dem sonstig erhobenen Verhalten der F1174-Mutante überein.

4.3.1.2.2.1 PRAS40

Wie aus Abb. 191 hervorgeht, stellt PRAS40 einen weiteren Einflussfaktor auf die mTOR-Phosphorylierung dar. Liegt PRAS40 in nicht-phosphorylierter Form vor, ist es ein Inhibitor des mTORC1-Komplexes (Sancak et al. 2007, Thedieck et al. 2007, Vander Haar et al. 2007, Wang et al. 2007). Kommt es zur Phosphorylierung von PRAS40, so dissoziiert dies vom mTORC1-Komplex, was wiederum zu einer verstärkten Aktivierung von mTOR führt (Chong 2016).

Wie die ausgeschriebene Bezeichnung von PRAS40 als *proline-rich Akt substrate of 40 kDa* (Xiong et al. 2014) verrät, ist es ein Substrat der Akt und wird von dieser phosphoryliert (Dan et al. 2014). Akt aktiviert demnach den mTORC1-Komplex durch die Phosphorylierung von PRAS40 (Hung et al. 2012).

Kongruent zu der vorhergehenden Beobachtung der größten mTOR-Aktivität liegt auch bei PRAS40 das Maximum bei den ALK^{F1174L}-Zellen, in welchen PRAS40 5% der Gesamtaktivität ausmacht. Diese Zusammenschau impliziert abermals die im Vergleich höhere Aktivität der Akt-Signalkaskade hinsichtlich der F1174-Mutante.

Beim Überblick über beide Pathscan-Versuche fällt indessen auf, dass in untransfizierten SK-N-AS-Zellen eine hohe endogene Aktivität für PRAS40 zu verzeichnen ist. Somit ist zwischen den transfizierten, als GFP-positiv sortierten Zellen zwar ein Vergleich hinsichtlich der PRAS40-Aktivität möglich, eine alleinig durch ALK via Akt hervorgerufene PRAS40-Phosphorylierung ist anhand der vorliegenden Ergebnisse jedoch eher nicht zu erwägen.

Zudem ist auch an dieser Stelle ist zu berücksichtigen, dass AMPK α die Phosphorylierung der mTORC1-Moleküle inhibiert und ohne die hohen AMPK α -Aktivität höhere Phosphorylierungsraten von PRAS40 zu erwarten wären.

4.3.1.2.3 p70S6 Kinase, S6 Ribosomal Protein

Nachgeschaltete Substrate des mTORC1-Komplexes bilden p70S6K und 4E-BP1 (Sparks und Guertin 2010, Klingebiel et al. 2017), wobei die p70S6 Kinase hier im Rahmen des Pathscan untersucht wurde. Die aktivierte p70S6 Kinase phosphoryliert Ribosomal Protein S6, ein S6 Protein der 40S-ribosomalen Untereinheit (O'Reilly et al. 2006). Dieses wird hier als *S6 Ribosomal Protein* bezeichnet und wurde ebenfalls untersucht.

Es bestehen neben der Akt-Signalkaskade jedoch noch diverse andere Wege, durch welche Ribosomal Protein S6, nachfolgend als RPS6 abgekürzt, aktiviert werden kann (Biever et al. 2015), auf welche in dieser Arbeit jedoch nicht im Einzelnen eingegangen werden soll. Insgesamt sind die molekularen Mechanismen, die der RPS6-Phosphorylierung zu Grunde liegen ohnehin nur zu einem geringen Teil ergründet (Meyuhas 2015).

Aus Abb. 190 geht hervor, dass die Aktivierung von RPS6 im Weiteren zu einer Beeinflussung der Proteinsynthese der Zellen führt. Die genaue Funktion des RPS6 ist jedoch umstritten. Eine der ersten Hypothesen dachte RPS6 eine Rolle in der Initiierung der Translation zu, da *in vitro* eine Korrelation zwischen phosphoryliertem RPS6 und gesteigerter Translation nachgewiesen werden konnte (Thomas 1982). Aktuellere Untersuchungen beschreiben jedoch einen dämpfenden Einfluss des phosphorylierten RPS6 auf die Proteinsynthese (Biever et al. 2015).

In den hier vorliegenden Ergebnissen liegt bezüglich p70S6 Kinase bereits in untransfizierten SK-N-AS-Zellen eine relativ hohe Aktivität vor. Bei den transfizierten Zellen beträgt der Anteil dieser Kinase an der Gesamtaktivität durchweg etwa 3%. Eine überschießende Aktivität der p70S6 Kinase ist angesichts der hier untersuchten, relativ basalen mTOR-Aktivität zumal nicht zu erwarten.

Das der p70S6 Kinase nachgeschaltete RPS6 weist vergleichsweise unterschiedliche Anteile an der Gesamtaktivität der jeweilig transfizierten Zellen auf. Bei den ALK^{F1174L}-Zellen beträgt der Anteil nahezu 8%, bei Wildtyp-ALK-Zellen 6% und bei ALK^{I1250T}-Zellen fast 4%.

Diese im Vergleich zu p70S6 Kinase variierenden und teils bemerkenswert höheren Werte lassen hier eine Beeinflussung des RPS6 durch andere Signalwege hochwahrscheinlich erscheinen. Denn das Level der Phosphorylierung der p70S6 Kinase steht in positiver Korrelation zu dessen Kapazität, RPS6 zu aktivieren (Turck et al. 1998, Mahfouz et al. 2006, Browning und Bailey-Serres 2015). Folglich wären angesichts der beobachteten RPS6-Aktivitäten unter Ausschluss anderer Signalwege höhere Phosphorylierungsraten hinsichtlich p70S6 Kinase zu erwarten.

Abschließend stellt sich die spannende Frage, wie ein derartig hoher RPS6-Phosphorylierungslevel in den transfizierten Zellen zustande kommt und darüber hinaus, wie sich dieses auf Ebene der Proteinsynthese schlussendlich auswirkt.

Da sich die ALK^{F1174L}-Zellen in dieser Arbeit durchweg als „aktivierteste“ und damit „aggressivste“ Zellen abzeichnen, ist spekulativ ein stimulierender Effekt des RPS6 auf die Proteinsynthese anzunehmen. Übereinstimmend dazu zeigt sich in ALK^{I1250T}-Zellen, den „kinasetoten“ Zellen, die geringste RPS6-Aktivität.

4.3.1.2.4 Bad

Bei der Untersuchung der ALK-Subformen Wildtyp, F1174L und I1250T ergaben sich weiterhin reproduzierbare, hohe Aktivitäten für Bad, den Bcl-2-associated death promoter (Zhang et al. 2016). In Wildtyp-ALK- und ALK^{F1174L}-Zellen lag Bad im Vergleich deutlich stärker phosphoryliert vor als in untransfizierten SK-N-AS-Zellen. Innerhalb der transfizierten Zellen zeigten sich für Bad bemerkenswerte Anteile an den jeweiligen Gesamtaktivitäten. Für ALK^{I1250T}-Zellen betrug der Anteil 7,8%, für Wildtyp-ALK-Zellen 7,7% und für ALK^{F1174L}-Zellen 9,5%.

Bad ist ein pro-apoptotisches Protein (Nair et al. 2016). Apoptose beschreibt dabei den genetisch regulierten „Selbstmord“ der Zelle, welchem eine wichtige Rolle hinsichtlich Wachstum und Überleben in vielzelligen Organismen zukommt (Rogers et al. 2017).

Liegt Bad in nicht-phosphorylierter Form vor, bindet es das anti-apoptotische Protein BCL-XL, auch bekannt als BCL-2-like 1, und löst dadurch die Apoptose der Zelle aus (Winter et al. 2014). Bad ist ein Target im Signalweg PI3K/AKT (Feng et al. 2016). Wie aus Abb. 190 hervorgeht wird Bad durch Akt phosphoryliert, womit dem Zelltod entgegengewirkt wird.

Die hier vorliegenden Ergebnisse der ALK^{F1174L}- sowie in den Wildtyp-ALK-Zellen weisen ein gesteigertes, anti-apoptotisches Signal auf, welches dabei hochwahrscheinlich über die ebenfalls gesteigerte Akt-Signalkaskade hervorgerufen wird.

Deutlich ist an diesem Signalmolekül auch der Einfluss der beiden genannten ALK-Formen auf die sie umgebenden, nicht-transfizierten Zellen zu erkennen, da diese „Umgebungs-Zellen“ im Vergleich zu untransfizierten Zellen eine erhöhte Aktivität für Bad aufweisen. Möglicherweise funktioniert die anti-apoptotische Signalisierung über die einzelne Zelle hinaus auch auf ihre Umgebung.

4.3.1.2.5 Caspase-3

Wie unter 3.2.1 beschrieben, wurde Caspase-3 in den Pathscan-Versuchen in gespaltener Form detektiert.

Die zytosolische Cystein-Protease Caspase-3 (El-Assaad et al. 2017) ist eine Effektor-Protease im Rahmen der Apoptose (Rogers et al. 2017). Nach Induktion der Apoptose werden „Initiator“-Caspasen aktiviert, beispielsweise Caspase-2, -8, -9 oder -10, die anschließend durch proteolytische Spaltung „Effektor“-Caspasen aktivieren, zu welchen unter anderem Caspase-3 zählt. Sind die Effektor-Caspasen gespalten, spalten diese wiederum eine Reihe von Substraten und führen auf diesem Weg zur Apoptose (Fischer et al. 2003).

Laut Kurokawa (2009) häufen sich Hinweise, dass der apoptotische Signalweg über verschiedene Stimuli aktiviert werden kann, einschließlich der direkten Phosphorylierung der Caspase. Abhängig von der jeweiligen Kinase und Caspase kann die Phosphorylierung der Caspase entweder zu vermehrter oder verminderter Aktivität führen.

Aus Abb. 190 ist zu entnehmen, dass Caspase-3 durch Akt phosphoryliert und dadurch in seiner pro-apoptotischen Funktion deaktiviert wird. Übereinstimmend dazu wiesen Pal und Mandal (2012) eine erhöhte Caspase-Aktivität der Caspase-3 durch Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs nach.

Da die besagte Spaltung und Aktivierung der Caspase-3 im Pathscan untersucht wurde und nicht die aus Abb. 190 zu entnehmende Phosphorylierung der Caspase-3, sollen die entsprechenden Ergebnisse hier lediglich in Form eines knappen Abschweifens vom Akt-Signalweg Beachtung finden.

4.3.1.2.5.1 Exkurs: Durch proteolytische Spaltung aktivierte Caspase-3 in F1174L-, Wildtyp- und I1250T-ALK Zellen

Für die gespaltene Caspase-3 ergab sich in den Versuchen kaum nennenswertes Fluoreszenzsignal, lediglich bei ALK^{F1174L}- und ALK^{I1250T}-Zellen ergaben sich dezent erhöhte Werte. Bei den Wildtyp-Zellen ist der Anteil der Caspase-3-Aktivität an der Gesamtaktivität von 0,5% zu vernachlässigen.

Somit ist die Aussage zu treffen, dass in ALK^{F1174L}- und ALK^{I1250T}-Zellen zumindest ein geringes pro-apoptotisches Signal vorliegt. Eines der apoptotischen Schlüsselproteine, welches durch die aktivierte Caspase-3 gespalten wird (Fernandes-Alnemri et al. 1994), ist das hier ebenfalls untersuchte PARP.

4.3.1.2.5.1.1 PARP – ein Substrat der Caspase-3

Die Poly (ADP-ribose) Polymerase, kurz PARP, spielt als ADP-ribosyl-Transferase eine Rolle in der DNA-Reparatur (Soriano et al. 2017). Zudem wird PARP eine Rolle in der neuronalen Apoptose zugesprochen (Okuda et al. 2017).

Dazu unterliegt PARP, wie oben bereits ausgeführt, der proteolytischen Spaltung durch Caspase-3. In den Pathscan-Versuchen wurde PARP ebenfalls in gespaltenen Form registriert.

Erwähnenswert im Rahmen der diesbezüglichen Ergebnisse ist eine anteilig hohe PARP-Aktivität in den ALK^{I1250T}-Zellen. Im direkten Vergleich liegen in den ALK^{F1174L}-Zellen jedoch quantitativ mehr gespaltene PARP-Moleküle vor.

Kongruent zu den Ergebnissen für Caspase-3 ergibt sich somit auch hier eine geringe pro-apoptotische Tendenz in den ALK^{F1174L}- und ALK^{I1250T}-Zellen, die jedoch an dieser Stelle nicht weiter thematisiert werden soll.

4.3.1.2.6 GSK3 β

Als nachgeschaltetes Signalmolekül der Akt wird die glycogen synthase kinase 3 β , kurz GSK3 β , durch Akt phosphoryliert und dadurch ihre Kinase-Funktion inhibiert (Jope und Johnson 2004). In einigen Fällen wird die durch Akt Phosphorylierung supprimierte GSK-3-Aktivität bereits als Auslöser maligner Prozesse betrachtet (McCubrey et al. 2014).

Normalerweise phosphoryliert die nicht-inhibierte GSK3 β β -Catenin, welches dadurch dem Abbau unterliegt. Ist GSK3 β durch Phosphorylierung gehemmt, kommt es zu einer Akkumulation von β -Catenin. Dieses wird daraufhin in den Nukleus verlagert und beeinflusst in komplexen Zwischenschritten die Transkription (Shi et al. 2017). Auf diese Weise kann, wie aus Abb. 190 zu entnehmen ist, unter anderem die Expression pro-apoptotischer Gene verhindert und zudem die Proliferation der Zellen gefördert werden (Domoto et al. 2016).

Darüber hinaus stellt GSK3 β in nicht-inhibierter Konfiguration einen Inhibitor der mTOR-Signalisierung dar (Inoki et al. 2006). Wie in Abb. 191 veranschaulicht, inhibiert GSK3 β ähnlich wie AMPK den mTORC1-Komplex.

In den Pathscan-Experimenten wurde GSK3 β in phosphorylierter Form detektiert. Dabei ergab sich keinerlei relevante reproduzierbare Phosphorylierungsrate für GSK3 β . In Wildtyp- und I1250T-ALK-Zellen lag der Anteil der GSK3 β an der Gesamtaktivität unter 1%, in F1174L-ALK-Zellen nur minimal höher.

Ergo scheint die GSK3 β -Signalisierung im Rahmen der Akt-Signalkaskade in den untersuchten Neuroblastom-Subtypen nicht von entscheidender Bedeutung zu sein, weder hinsichtlich anti-apoptotischer Signalisierung noch im Rahmen der mTORC1-Hemmung.

Nichtsdestotrotz schlugen Li et al. (2016) GSK3 β als therapeutisches Target im Rahmen der Neuroblastom-Therapie vor.

4.3.1.2.7 p53

Hinsichtlich p53 wiesen die Pathscan-Ergebnisse der GFP-positiven Zellen lediglich basale Phosphorylierungslevel auf. Der erste Pathscan-Versuch ergab sogar eine gegenüber den untransfizierten SK-N-AS-Zellen verminderte p53-Aktivität in den transfizierten Zellen.

Bereits Nicolai et al. (2015) konnten nachweisen, dass p53 trotz fehlender Mutation im Neuroblastom in einer destabilisierten Form vorliegt. Ergo wären höhere Phosphorylierungsraten ohnehin nicht zu erwarten gewesen.

P53 fungiert physiologisch als Transkriptionsfaktor und beeinflusst den Zellzyklus und die DNA-Reparatur. Zudem ist es befähigt, als Antwort auf mutagene Stimuli die Apoptose einzuleiten (Perri et al. 2016).

Abb. 190 zeigt, dass Akt p53 auf Umwegen inhibiert. Da Akt hier in allen ALK-Subformen eine hohe Aktivität aufweist, wäre wohl tatsächlich eine höhere p53-Aktivität zu erwarten.

Zudem bildet die Inhibition durch Akt eine plausible Erklärung für den p53-Quotienten des ersten Pathscan-Versuchs. Diese Ergebnisse heben somit insgesamt ein weiteres Mal die Relevanz des Akt-Signalwegs in den vorliegenden ALK-Konstrukten hervor.

4.3.1.3 Stat1, Stat3 – der JAK/STAT-Signalweg

In den Pathscan-Versuchen wurde die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 untersucht. Diese sind Signalmoleküle im JAK/STAT-Signalweg. Wie einleitend erwähnt, wird die JAK/STAT-Signalkaskade ebenfalls als entscheidender Signalweg hinsichtlich der ALK-Signalisierung in Betracht gezogen.

Normalerweise wird die JAK/STAT-Signalkaskade aktiviert, indem verschiedene Liganden, beispielsweise Zytokine, Interferone oder Wachstumsfaktoren Rezeptoren der Zelloberfläche binden, die wiederum mit Tyrosinkinase der Janus-Familie, kurz JAKs, assoziiert sind. Die JAKs werden in Folge aktiviert und weisen verstärkte Kinase-Aktivität auf (Brooks et al. 2014).

Die Kinase-aktiven JAKs phosphorylieren zytosolisch vorliegende Transkriptionsfaktoren, die *signal transducers and activators of transcription* kurz STATs. Daraufhin kommt es zu Dimerisierung der STATs und zur Verlagerung der Dimere in den Nukleus, wo sie die Expression verschiedener Gene modulieren (Leonard und O'Shea 1998). Vermutet wird, wie eingangs beschrieben, dass dadurch das Zellüberleben beeinflusst wird.

Gestörte oder dysregulierte JAK-STAT-Signalisierung kann ein malignes Geschehen hervorrufen (Aaronson und Horvath 2002). So wird hier ein Einfluss der ALK auf den JAK/STAT-Signalweg vermutet.

Durch Sattu et al. (2013) wurde bereits die Aktivierung von STAT3 durch aktivierte ALK in verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien CBL-GE, CBL-BAR, CBL-GA und Kelly nachgewiesen, welche unter anderem ALK^{F1174L} und ALK^{R1275Q} exprimierten.

Weiterhin zeigten Zamo et al. (2002), dass die Expression konstitutiv aktivierter ALK die konstitutive Phosphorylierung von Stat3 in transfizierten Zellen induziert. Dieser Nachweis gelang auch in humanen, ALK-exprimierenden ALCL-Lymphomen. Unklar ist jedoch, ob ALK die Phosphorylierung von STAT3 direkt katalysiert oder ob ALK JAK3 aktiviert, welches dann in Folge STAT3 phosphoryliert (Roskoski 2013).

Die in den hier akquirierten Ergebnissen vorliegenden Signalmoleküle STAT1 und STAT3 spiegeln letztlich als entscheidendes Zwischenprodukt die Aktivität des JAK/STAT-Signalwegs in den untersuchten Zellen wider. STAT1 und STAT3 gehören beide zur STAT-Familie. Diese wird aus Transkriptionsfaktoren gebildet, die im Zytosol der Zelle "ruhen" und als Substrate der JAK von dieser aktiviert werden können (Samsonov et al. 2013). STAT1 und STAT3 spielen eine entscheidende Rolle hinsichtlich Apoptose, Proliferation und Differenzierung der Zellen (Mui 1999, Bromberg und Darnell 2000, Kim und Lee 2007).

Dabei spielen STAT1 und STAT3 gegensätzliche Rollen in der Tumorgenese. STAT1 ist ein Tumorsuppressor (Stephanou und Latchman 2003). STAT3 hingegen wird als Onkogen eingestuft und ist in annähernd 70% solider und hämatologischer Tumoren konstitutiv aktiv (Huang et al. 2000, Turkson und Jove 2000, Niu et al. 2002, Horiguchi et al. 2002, Zamo et al. 2002, Corvinus et al. 2005, Kortylewski et al. 2005, Chang et al. 2006).

In den vorliegenden Ergebnissen lagen die beiden STAT-Moleküle in Wildtyp- und F1174L-ALK-Zellen deutlich häufiger phosphoryliert vor als in untransfizierten SK-N-AS-Zellen und I1250T-ALK-Zellen. Beim Vergleich der STAT-Anteile an den jeweiligen Gesamtaktivitäten fällt auf, dass STAT3 sowohl in Wildtyp- und F1174L- als auch in I250T-ALK-Zellen einen größeren Anteil einnimmt als STAT1. Am deutlichsten wird dies anhand der ALK^{I1250T}-Zellen, in welchen STAT3 5% der Gesamtaktivität ausmacht und STAT1 im Gegensatz dazu lediglich 1,5%. Ergo überwiegt die STAT3-Aktivität in sämtlichen hier untersuchten ALK-Subtypen.

Aufgrund dieser Resultate ist eine bedeutende Rolle des JAK/STAT-Signalwegs im Rahmen der ALK-Signalisierung sicher in Betracht zu ziehen, vor allem hinsichtlich Wildtyp- und F1174L-ALK. Diese Beobachtung deckt sich mit den oben beschriebenen Erhebungen von Sattu et al. (2013), die ebenfalls in ALK^{F1174L}-exprimierenden Neuroblastomzelllinien, jedoch nicht in SK-N-AS-Zellen, eine konstitutive Aktivierung von STAT3 nachweisen konnten.

4.3.1.4 ERK1/2 – der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg

In etwa einem Drittel aller humanen Krebsformen ist die Aktivität der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade gesteigert (Roskoski 2012). Wie einleitend beschrieben, wird dieser Signalweg auch hinsichtlich des Neuroblastoms vielfach in Betracht gezogen.

Aktiviertete Rezeptortyrosinkinasen rekrutieren dabei SOS, den *guanine nucleotide exchange factor*. Dieser aktiviert Ras durch den Austausch von GDP zu GTP. Aktiviertes, GTP-besetztes Ras bindet und aktiviert Raf. Raf phosphoryliert und aktiviert MEK, welche anschließend ERK phosphoryliert. Die aktivierte ERK interagiert schließlich mit zahlreichen Substraten sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus. Die Reaktionen der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade werden zudem durch Gerüstproteine der Zelle beeinflusst (Matallanas et al. 2011).

Um in dieser Arbeit die Rolle der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade in den zellulären Modellen zu explorieren, wurden ERK1 und 2 genauer beleuchtet. ERK 1 und 2, die extrazellulär-signal-regulierte Protein Kinases 1 und 2 (ERK1/2) sind zwei verwandte Serin/Threonin-Kinasen (Roskoski 2012). Sie kontrollieren die Zellproliferation und gehören zur Familie der mitogen-aktivierten Protein Kinases (MAPK) (Mebratu und Tesfaigzi 2009).

Die ungewöhnliche Eigenschaft einer MAP-Kinase ist, dass zu deren vollständigen Aktivierung die Phosphorylierung eines Tyrosin- und eines Threoninrests notwendig sind, welche im Protein nur durch eine einzelne Aminosäure getrennt vorliegen. Die Proteinkinase, die diese beiden Phosphorylierungen katalysiert, wird als MAP-Kinase-Kinase bezeichnet und wird im Ras-Signalweg MEK genannt. MEK wiederum wird durch eine MAP-Kinase-Kinase phosphoryliert, und zwar von Raf. Die Aktivierung der Raf-Kinase geschieht durch das Ras-Protein, einer GTP-ase (Alberts et al. 2008).

Die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade kann durch eine Rezeptortyrosinkinase angestoßen werden (Matallanas et al. 2011). Auch ALK wird vielfach als Aktivator dieses Signalwegs im Neuroblastom diskutiert. In dieser Arbeit wurde ERK1/2 als "Effektor" des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs auf zwei verschiedene Weisen untersucht. Einerseits wurden im Pathscan quantitativ die phosphorylierten ERK1/2 Moleküle erfasst, andererseits wurden in einem separaten Versuch mit verschiedenen ALK-Konstrukten transfizierten SK-N-AS-Zellen mit einem ERK1/2-Inhibitor versetzt und deren Verhalten mit nicht-inhibierten Zellen hinsichtlich des Phosphotyrosingehalts verglichen.

Im zweiten Pathscan-Versuch lag der ERK1/2-Anteil an der Gesamtaktivität von Wildtyp-, F1174L- und I1250T-Zellen zwischen 2,5 und 3%. Bei Wildtyp- und F1174L-ALK zeigte sich zudem eine gegenüber untransfizierten und ALK^{I1250T}-Zellen erhöhte ERK1/2-Aktivität. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der ALK-Subtypen zwar eine basale Aktivität des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs, jedoch ist von einer größeren Relevanz der Akt- und STAT-Signalwege auszugehen, da dort die Phosphorylierungsraten im Vergleich durchweg höher liegen.

Kongruent dazu ergab sich kein nennenswerter Effekt des ERK1/2-Inhibitors auf den Gesamtphosphotyrosingehalt der Zellen. Wären ERK1/2 die entscheidenden Effektormoleküle des ALK-Pathomechanismus, so würde die durch den Inhibitor verhinderte Phosphorylierung der ERK-Substrate bei der vergleichenden Betrachtung ins Gewicht fallen. Dies führt hier zum Ausschluss der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade als entscheidenden Signalweg in der ALK-Signalisierung im Neuroblastom.

Anhand der Pathscan-Ergebnisse ist jedoch eine grundlegende Aktivität der ERK1/2 in Wildtyp-, F1174L- und I1250T-ALK-Zellen nicht abzustreiten. Eine Korrelation zwischen ALK-Aktivierung und ERK1/2-Phosphorylierung ist allein daran abzulesen, dass die "aktivierteste" Mutante F1174L die größte Menge an phospho-ERK1/2-Molekülen aufweist.

Bereits Loren et al. (2001) konnten anhand von in-vivo-Modellen der *Drosophila melanogaster* beweisen, dass die ERK-Aktivierung mit ALK in Zusammenhang steht. Auch Motegi et al. (2004) beobachteten eine Aktivierung von ERK1/2 als Folge der Tyrosinphosphorylierung der ALK. Zudem gelang Osajima-Hakomori et al. (2005) der Nachweis, dass durch Suppression aktivierter ALK eine Reduktion der Phosphorylierung von MAP-Kinasen hervorgerufen werden kann. In Übereinstimmung dazu konnten Opel et al. (2007) in einer Vielzahl untersuchter Neuroblastome aktivierte ERK1 und 2 beobachten. Auch in Zebrafisch-Versuchen mit ALK zeigte sich eine Aktivierung des MEK/ERK-Signalwegs (Yao et al. 2013). Weiterhin konnten bei Patienten mit Neuroblastom-Rezidiven häufig aktivierende Mutationen im RAS-MAPK-Signalweg detektiert werden (Eleveld et al. 2015).

Die hier vorliegenden Ergebnisse und Schlussfolgerungen bezüglich der Relevanz des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs sind im Kontext mit der Literatur somit durchaus als kritisch zu bewerten.

4.3.1.5 Weitere erwogene Signalwege

In diesem Abschnitt sollen weitere in der Literatur genannte Signalwege der ALK-Signalisierung zur vollständigen Darstellung kurz umrissen werden. In den Pathscan-Experimenten wurde davon lediglich die Phosphorylierung der JNK untersucht.

4.3.1.5.1 PLC γ , intrazelluläres Calcium

Bai et al. (1998) stellten Untersuchungen zur ALK-Signalisierung im Non-Hodgkin-Lymphom ALCL an. Dabei konnte eine Rolle der Phospholipase C- γ , kurz PLC γ , in der Übertragung eines mitogenen ALK-Signals nachgewiesen werden. Hinsichtlich des ALK-Rezeptors im Neuroblastom sind in der Literatur keine fundierten Untersuchungen der PLC γ beschrieben.

Jedoch fokussieren sich beispielsweise Satheesh und Busselberg (2015) auf die Beteiligung des intrazellulären Calciums an der Neuroblastom-Entstehung. Dies betrifft im weitesten Sin-

ne auch die Phospholipase C, da diese ein entscheidendes Enzym in der Regulation des Calcium-Haushalts darstellt (Putney und Tomita 2012).

4.3.1.5.2 ShcC

In Neuroblastom-Biopsien konnte das phosphorylierte Docking-Protein ShcC nachgewiesen werden. Dabei wiesen Tumoren von Neuroblastom-Patienten in fortgeschrittenen klinischen Tumorstadien quantitativ mehr phosphoryliertes ShcC auf als Neuroblastome anderer Patienten (Miyake et al. 2002).

Die Proteine der Shc-Familie funktionieren als Adapter-Proteine verschiedenster Rezeptoren, einschließlich der Rezeptortyrosinkinasen und regulieren die Entwicklung neuronaler Zellen (Terui et al. 2005). Osajima-Hakomori et al. (2005) gelang der Nachweis, dass ShcC ein Substrat der aktivierten ALK bildet und die ALK-Aktivierung eine Hyperphosphorylierung der ShcC bedingt.

Den Proteinen der Shc-Familie wird eine Funktion in der Aktivierung des bereits abgehandelten Ras/MAPK-Signalwegs zugesprochen (Bonfini et al. 1996). Dabei wirkt Shc unter anderem im Zusammenspiel mit dem oben erwähnten guanine nucleotide exchange factor SOS (Egan et al. 1993, Rozakis-Adcock et al. 1993, Li et al. 1993). Darüber hinaus wird den Shc-Adapterproteinen eine Rolle in diversen anderen Signalwegen zugesprochen, der genaue Mechanismus der Shc-Signalisierung ist jedoch noch nicht ergründet (Ravichandran 2001). Auch im Hinblick auf die ALK-Signalisierung im Neuroblastom bildet die ShcC-Signalisierung weiterhin eine interessante Thematik.

4.3.1.5.3 JNK-Signalweg

Mit Hilfe der Phosphoproteomik gelang es Chen et al. (2016), die ALK-RAS-JNK-Achse als wichtigen Signalweg in der ALK-Signalisierung im Neuroblastom herauszustellen. Weiterhin wurde durch den Einsatz eines ALK-Inhibitors einerseits und eines JNK-Inhibitors andererseits beide Male Apoptose in den behandelten Zellen induziert. Dadurch konnte die Relevanz des JNK-Signalwegs für das Zellüberleben im Neuroblastom und auch der Zusammenhang der JNK mit der ALK-Signalisierung bewiesen werden.

Ansonsten ist die Funktion, die JNK in malignen Prozessen einnimmt variabel. Je nach Krebsform und biologischen Gegebenheiten spielt die JNK entweder hinsichtlich Zellüberleben oder Apoptose eine Rolle (Cheng et al. 2014). Auf physiologischem Wege wird die JNK *in vivo* durch zellulären Stress oder proinflammatorische Zytokine aktiviert (Fleming et al. 2000).

Die im Pathscan als „SAPK/JK“ untersuchte c-Jun N-terminal kinase (JNK), auch als stress-activated protein kinase (SAPK) bezeichnet, gehört zur Familie der MAP-Kinasen (Page und Doubell 1996). Dementsprechend erfolgt ihre Aktivierung durch vorgeschaltete JNK-Kinasen (Raivich und Behrens 2006). Die JNK-Kinasen MKK4 und MKK7 aktivieren die JNK dabei synergistisch (Fleming et al. 2000).

Die Ras-Proteine, eine Klasse kleiner GTPase-Proteine, wurden bereits im Rahmen der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade dargestellt. Sie vermitteln Signale oberflächlicher Rezeptoren zum Nucleus (Goodsell 1999). Die nachgeschalteten Komponenten des Ras-JNK-Signalwegs wurden durch Chen et al. (2016) ebenfalls untersucht. Dabei zeigte sich eine Korrelation zwi-

schen Phosphorylierungs-Level der Signalmoleküle und dem Zellüberleben von Neuroblastomzellen. Die Phosphorylierungen der JNK an Position Thr183 und Tyr185 reflektieren dabei deren Aktivität (Fleming et al. 2000). Diese beiden Phosphorylierungsstellen wurden auch in den Pathscan-Versuchen detektiert.

Wenn JNK durch Phosphorylierung aktiviert vorliegt, phosphoryliert diese c-Jun und reguliert dadurch den Transkriptionsfaktor AP-1 (Karin 1995). Denn AP-1 entsteht unter anderem durch Dimerisierung von Proteinen der Jun- und Fos-Familie (Raivich und Behrens 2006).

Zudem weisen SK-N-AS-Zellen eine basale JNK-Aktivierung auf (Cheng et al. 2014). Diese findet sich auch in den Ergebnissen der Pathscan-Versuche. Lediglich in den ALK^{F1174L}-Zellen konnte dabei eine gegenüber untransfizierten Zellen gesteigerte Aktivität von SAPK/JNK verzeichnet werden. Abermals auffällig sind hier die Phosphorylierungs-Level der „Umgebungszellen“ hinsichtlich SAPK/JNK. Bei den Wildtyp-ALK-Zellen konnte aufgrund von Messungenauigkeiten keine verlässliche Aussage getroffen werden. In den ALK^{I1250T}-Zellen betrug die Menge phosphorylierter JNK-Moleküle etwa die Hälfte der Menge in den ALK^{F1174L}-Zellen. Bezüglich des JNK-Anteils an der Gesamtaktivität lagen die F1174-Mutante mit 2,4% und die I1250-Mutante mit 2,3% jedoch dicht beieinander.

Insgesamt betrachtet sind die Phosphorylierungsraten der JNK relativ gering, es ist somit, anhand der hier erhobenen Ergebnisse, nicht von einer tragenden Rolle des JNK-Signalwegs in der ALK-Signalisierung auszugehen.

4.3.1.5.4 SRC-Kinasen, Shf, LGR5, SHH

Abgesehen von all diesen angenommenen Signalwegen bestehen noch weitere Hypothesen zur Pathogenese des Neuroblastoms. So beobachteten beispielsweise Palacios-Moreno et al. (2015), dass die Stimulation von ALK in verschiedenen Neuroblastomzelllinien zur Aktivierung der SRC-Kinasen FYN und LYN führt. SRC-Kinasen sind membran-assoziierte Tyrosinkinasen (Thomas und Brugge 1997), welche bei Aktivierung durch diverse membranständige Rezeptoren über verschiedene Mechanismen Zellüberleben und -teilung, sowie Zellmigration und -invasion beeinflussen (Guarino 2010).

Takagi et al. (2013) vermuteten hingegen eine Interaktion des Adaptorproteins Shf, des“Src homology 2 domain containing F”, mit der anaplastischen Lymphomkinase als pathogenetischen Mechanismus im Neuroblastom.

Vieira et al. (2015) beschreiben eine hohe Expression des leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptors 5, kurz LGR5, im Neuroblastom, wo es durch Modifikation des Wnt-Signalwegs zu verstärkter Proliferation führen und zugleich die Signalmoleküle MEK und ERK regulieren soll.

Im Non-Hodgkin-Lymphom ALCL wird zudem bei ALK-positiven Formen der sogenannte *sonic hedgehog* (SHH)-Signalweg als der ALK nachgeschaltete Kaskade beschrieben (Singh et al. 2009), welcher an dieser Stelle jedoch nicht vertieft werden soll.

4.3.2 Verschiedene ALK-Rezeptoren - verschiedene Signalwege?

Mit den Pathscan-Versuchen sollte ermittelt werden, wie die Signalmoleküle sich in den verschiedenen ALK-Subformen Wildtyp, F1174L und I1250T verhalten.

Es stellte sich heraus, dass die F1174-Mutante gegenüber den anderen Subformen grundsätzlich die höchste Aktivität hinsichtlich aller Signalmoleküle aufwies. Die zweithöchste Aktivität fiel meist den Zellen mit Wildtyp-ALK zu und die geringsten Phosphorylierungsraten konnten fast ausschließlich bei der I1250-Mutante verzeichnet werden. Dieses Muster zeichnete sich auch bei der vielfach erwähnten Beeinflussung der „Umgebungs-Zellen“ ab.

Allem voran ist jedoch bemerkenswert, dass in den drei untersuchten ALK-Formen die gleichen Signalwege aktiviert sind: der Akt-Signalweg und mit etwas geringerer Aktivität die JAK/STAT-Kaskade. Ergo scheint die ALK-Form keinen Einfluss auf den nachgeschalteten Signalweg zu haben, sondern lediglich darauf, wie stark dieser aktiviert wird. Mutationen im ALK-Molekül führen somit nicht zu einem Unterschied im nachgeschalteten Signalweg, sondern beeinflussen lediglich die Phosphorylierung des Rezeptors selbst und damit dessen Aktivität.

Als bestätigenden Aspekt dieser Beobachtung registrierten Duijkers et al. (2011), dass zwischen vier ALK-mutierten und acht Wildtyp-ALK-Neuroblastom-Zelllinien kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der phosphorylierten Akt-Zwischenprodukte bestand.

An dieser Stelle ist demnach davon auszugehen, dass möglicherweise in allen ALK-Rezeptoren die gleichen Signalwege nachgeschaltet sind und die variable Malignität der Neuroblastome ausschließlich durch die ALK-Autophosphorylierung, beziehungsweise -Aktivierung bedingt ist.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, mehr über Aktivierung und Signalisierung des ALK-Rezeptors zu erfahren. Dazu wurden ALK-Wildtyp und die Mutanten F1174L, R1275Q, Y1604F und I1250T hinsichtlich distinktiver Eigenschaften in Zellkulturen untersucht. Zusätzlich wurde deren Zytomorphologie beleuchtet.

Hinsichtlich der Aktivierung der ALK zeichnete sich ein Schwellenwert für Wildtyp, F1174L, R1275Q und Y1604F ab. Ab diesem Schwellenwert, der einen ALK-Rezeptorgehalt widerspiegelt, sind die Zellen aktiv. Es ähnelten sich dabei Wildtyp und Y1604F einerseits und F1174L und R1275Q andererseits. Die hier erbrachten Ergebnisse legen nahe, dass die Aktivität der verschiedenen ALK-Rezeptoren durch ein komplexes Zusammenspiel von Expressionslevel und Mutationsstatus zustande kommt.

In der Literatur hatte es vorher bereits Spekulationen über ein kritisches Expressionslevel der Wildtyp-ALK gegeben, ebenso wie vermutet wurde, die Aktivität der verschiedenen ALK-Typen hänge nur von deren exprimierter Menge ab. In dieser Arbeit wurde der vorbeschriebene Schwellenwert der Wildtyp-ALK nun an eine reproduzierbare, objektivierbare Zahl gekoppelt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch für ALK^{F1174L}, ALK^{R1275Q} und ALK^{Y1604F} ein zuverlässiger Schwellenwert besteht und dass dieses Phänomen bei ALK^{I1250T} hingegen nicht existiert. Im Rahmen der Neuroblastomtherapie könnte sich der Schwellenwert als nützlich erweisen. Wäre es möglich, die Zahl der Rezeptoren durch Therapiemaßnahmen unter den Schwellenwert zu reduzieren, wäre eine Verzögerung des Tumorwachstums denkbar.

Weiter wurde in den hier vorliegenden Untersuchungen erhoben, dass die Zellen ab dem Schwellenwert nicht alle aktiv sind, sondern sich eine „Auffächerung“ ergibt, in welcher einige Zellen sehr hohe Aktivitäten erreichen und andere dagegen auch bei quantitativ hohen ALK-Expressionslevels inaktiv bleiben. Dies würde *in vivo* angewandt bedeuten, dass möglicherweise mehrere verschiedene Therapien gleichzeitig auf das Neuroblastom wirken müssten, um Zellen verschiedener Aktivität zum Zyklusarrest zu bringen.

Auch das generell mögliche Ausmaß der Aktivierung der verschiedenen ALK-Formen wurde exploriert, indem der Gesamtposphotyrosingehalt der Zellen verglichen wurde. Dabei ergab sich ALK^{F1174L} in Übereinstimmung mit der Literatur als aggressivste, „aktivierteste“ Mutante. Gefolgt wurde diese von Wildtyp- und Y1604F-ALK. Im Vergleich dazu erreichte die R-Mutante kein besonders hohes Aktivitätsniveau, was die Frage aufwirft, wie ein Tumorwachstum ALK^{R1275Q}-positiver Neuroblastome überhaupt möglich ist. Bei ALK^{I1250T} war, in Übereinstimmung mit einem einzigen dazu existenten Beleg, keinerlei nennenswerte Aktivität messbar.

Diese Ergebnisse ermöglichen eine hierarchische Anordnung der ALK-Aktivitäten:

1. F1174L
2. Wildtyp und Y1604F
3. R1275Q
4. I1250T

Wobei hierbei deutlich gemacht werden muss, dass R1275Q bereits ab einem Viertel der Rezeptormenge von Wildtyp und Y1604F seinen aktiven Zustand erreicht.

Um besagte Aktivitäten im Zusammenhang mit der tatsächlichen ALK-Rezeptortyrosinkinase-Aktivität bewerten zu können, erfolgten FRET-Untersuchungen. Mit diesen konnte das Ausmaß der Autophosphorylierung der Rezeptoren gemessen werden. Dabei ergab sich für F1174L die stärkste Autophosphorylierung. Wildtyp und Y1604F lagen etwa gleichauf, gefolgt von R1275Q. Bei I1250T war hingegen keine signifikante Autophosphorylierung zu verzeichnen. Die FRET-Ergebnisse konnten somit vollständig zu den zuvor gemessenen Gesamtphosphorylierungen der einzelnen ALK-Typen korreliert werden, was abermals die Annahme unterstreicht, dass die Aktivität der Neuroblastomzellen durch den ALK-Rezeptor bestimmt wird.

Zusätzlich wurde die Zytomorphologie untersucht, was eher ungeplant im Rahmen der mikroskopischen Durchsicht geschah. Dadurch konnte in dieser Arbeit erstmals die Zytomorphologie von ALK^{Y1604F}- und ALK^{I1250T}-Zellen beschrieben werden. Dabei bestand bei ALK^{Y1604F}-Zellen bemerkenswerte Ähnlichkeit zu Wildtyp-ALK-Zellen in Form einer membranösen Rezeptorlokalisierung und flächig-aufsitzenden Zellen.

Die ALK^{I1250T}-Zellen ähnelten den ALK^{F1174L}-Zellen, was in Zusammenschau mit der diesbezüglichen Literatur auf einen Defekt der N-Glykosylierung der I1250T-ALK schließen lässt.

Zudem gelang es in dieser Arbeit, bereits bestehende Beobachtungen der Zytomorphologie von ALK^{F1174L} und ALK^{R1275Q} in CLB-GE- und IMR-32-Zellen ergänzend in SK-N-AS-Zellen zu reproduzieren.

In Bezug auf die ALK-Signalisierung wurden die Aktivitäten verschiedener Signalmoleküle in ALK^{F1174L}-, Wildtyp-ALK- und ALK^{I1250T}-Zellen gegenübergestellt. Dabei schienen alle ALK-Konstrukte die gleichen nachgeschalteten Signalwege zu beschreiten, denn für die hochaktiven Signalmoleküle bestanden in allen Zellen gleiche Tendenzen. Dennoch waren diese Targets in den F1174L-Zellen quantitativ stärker phosphoryliert als in Wildtyp- und I1250T-Zellen. Die Anordnung entsprach insgesamt der oben beschriebenen „Aktivitäts-Hierarchie“.

Diese Anordnung war auch in den „Umgebungs“-Zellen wiederzuerkennen, die mittels FACS als GFP-negativ aus den jeweilig transfizierten Kulturen gewonnen werden konnten. Es imponierte eine sichtbare Abweichung dieser Zellen von den untransfizierten SK-N-AS-Zellen im besagten Muster. Dies führte zu der Vorstellung, dass die „Umgebungs“-Zellen durch die ALK-exprimierenden Zellen hinsichtlich der phosphorylierten Signalmoleküle beeinflusst werden.

In den transfizierten Zellen fiel bezüglich der Phosphorylierung vorerst die AMPK α ins Auge, welche am ehesten als metabolisches Instrument der Zellen eingestuft wurde und nur im weiteren Sinne als Signalmolekül.

Ansonsten verhielt sich die Phosphorylierung der Signalmoleküle vorrangig zu Gunsten des Akt-Signalwegs. Dieser scheint den entscheidenden Signalweg in der ALK-Signalisierung darzustellen.

Auch die STAT-Moleküle wiesen relativ hohe Aktivitäten auf, was eine zusätzliche, aber nachrangige Relevanz des JAK/STAT-Signalwegs neben der Akt-Kaskade erwägen ließ.

Der in der Literatur zur ALK-Signalisierung vielfach in Betracht gezogene Ras/Raf/MEK/ERK-Weg zeigte in den Versuchen eine eher basale Aktivität, verkörpert durch

die ERK1/2-Phosphorylierung. Somit lässt sich eine vergleichsweise geringe Relevanz der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade vermuten.

Zur Verifizierung dessen wurden alle vorliegenden ALK-Subtypen mit einem ERK-Inhibitor in nachgewiesener wirksamer Konzentration versetzt und im Anschluss deren Gesamtphosphorylierung, sprich Gesamtaktivität, betrachtet. Dabei zeigten sich keinerlei Unterschiede der „ERK1/2-defizienten“ Zellen gegenüber nicht-inhibierten Zellen. Ergo hat die Ausschaltung von ERK1/2 keinen Effekt auf die Gesamtaktivität, ein weiteres Indiz für die relative Unerheblichkeit des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs.

Insgesamt kann anhand der Ergebnisse somit auch für die ALK-Signalisierung eine Rangfolge erstellt werden, um die Relevanz der Signalkaskaden widerzuspiegeln:

1. Akt-Signalweg
2. JAK/STAT-Signalweg
3. Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade

Eine Verifizierung dieser Ergebnisse im Rahmen sensitiverer Versuchsmethoden ist anzustreben mit dem Ziel, die Eingrenzung eines therapeutischen Targets in der Neuroblastom-Therapie weiter voranzutreiben.

6 Literaturverzeichnis

- Aaronson D S, Horvath C M (2002): A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296 (5573), 1653–1655
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of the cell*. 5. Auflage; Garland Science, New York 2008
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 4. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2012
- Allouche M (2007): ALK is a novel dependence receptor: potential implications in development and cancer. *Cell Cycle* 6 (13), 1533–1538
- Amato S, Man H-Y (2011): Bioenergy sensing in the brain: the role of AMP-activated protein kinase in neuronal metabolism, development and neurological diseases. *Cell Cycle* 10 (20), 3452–3460
- Attiyeh E F, London W B, Mosse Y P, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady P W, Seeger R C, Look A T, Shimada H (2005): Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 353 (21), 2243–2253
- Ardini E, Magnaghi P, Orsini P, Galvani A, Menichincheri M (2010): Anaplastic Lymphoma Kinase: role in specific tumours, and development of small molecule inhibitors for cancer therapy. *Cancer Lett* 299 (2), 81–94
- Ardini E, Galvani A (2012): ALK Inhibitors, a Pharmaceutical Perspective. *Front Oncol* 2, 17
- Aubry A, Galiacy S, Ceccato L, Marchand C, Tricoire C, Lopez F, Bremner R, Racaud-Sultan C, Monsarrat B, Malecaze F (2015): Peptides derived from the dependence receptor ALK are proapoptotic for ALK-positive tumors. *Cell Death Dis* 6, e1736
- Aveic S, Pantile M, Seydel A, Esposito M R, Zanon C, Li G, Tonini G P (2016): Combating autophagy is a strategy to increase cytotoxic effects of novel ALK inhibitor entrectinib in neuroblastoma cells. *Oncotarget* 7 (5), 5646–5663
- Azarova A M, Gautam G, George R E (2011): Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 21 (4), 267–275
- Bachetti T, Di Paolo D, Di Lascio S, Mirisola V, Brignole C, Bellotti M, Caffa I, Ferraris C, Fiore M, Fornasari D (2010): PHOX2B-mediated regulation of ALK expression: in vitro identification of a functional relationship between two genes involved in neuroblastoma. *PLoS One* 5 (10). DOI: 10.1371/journal.pone.0013108
- Bai R Y, Dieter P, Peschel C, Morris S W, Duyster J (1998): Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity. *Mol Cell Biol* 18 (12), 6951–6961
- Bai R Y, Ouyang T, Miething C, Morris S W, Peschel C, Duyster J (2000): Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood* 96 (13), 4319–4327
- Barone G, Anderson J, Pearson A D J, Petrie K, Chesler L (2013): New strategies in neuroblastoma: Therapeutic targeting of MYCN and ALK. *Clin Cancer Res* 19 (21), 5814–5821

- Barreca A, Lasorsa E, Riera L, Machiorlatti R, Piva R, Ponzoni M, Kwee I, Bertoni F, Piccaluga P P, Pileri S A (2011): Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *J Mol Endocrinol* 47 (1), R11-23
- Bastiaens P I, Jovin T M (1996): Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C beta I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (16), 8407–8412
- Bastiaens P I H, Jovin T M: FRET microscopy. In: Celis J E (Hrsg.): *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. 3. Auflage; Academic Press, San Diego 1998, 136–146
- Bastiaens P I, Squire A (1999): Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol* 9 (2), 48–52
- Bastiaens P I, Majoul I V, Verveer P J, Soling H D, Jovin T M (1996): Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. *EMBO J* 15 (16), 4246–4253
- Bellini A, Bernard V, Leroy Q, Rio Frio T, Pierron G, Combaret V, Lapouble E, Clement N, Rubie H, Thebaud E (2015): Deep Sequencing Reveals Occurrence of Subclonal ALK Mutations in Neuroblastoma at Diagnosis. *Clinical Cancer Res* 21 (21), 4913–4921
- Berlanga P, Canete A, Castel V (2017): Advances in emerging drugs for the treatment of neuroblastoma. *Expert Opin Emerg Drugs* 22 (1), 63–75
- Bernas T, Zarebski M, Dobrucki J W, Cook P R (2004): Minimizing photobleaching during confocal microscopy of fluorescent probes bound to chromatin: role of anoxia and photon flux. *J Microsc* 215 (Pt 3), 281–296
- Berry T, Luther W, Bhatnagar N, Jamin Y, Poon E, Sanda T, Pei D, Sharma B, Vetharoy W R, Hallsworth A (2012): The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell* 22 (1), 117–130
- Bevan N, Rees S: Pharmaceutical applications of gfp and rcfp. In: Chalfie M, Kain S R (Hrsg): *Green fluorescent protein properties, applications and protocols*. 2. Auflage; John Wiley and Sons, Inc., Hoboken 2006, 305-338
- Biever A, Valjent E, Puighermanal E (2015): Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function. *Front Mol Neurosci* 8, 75
- Blume-Jensen P, Hunter T. (2001): Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411 (6835), 355–365
- boeMonclair T, Brodeur G M, Ambros P F, Brisse H J, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London W B, Matthay K K, Nuchtern J G (2009): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27 (2), 298–303
- Boeva V, Jouannet S, Daveau R, Combaret V, Pierre-Eugene C, Cazes A, Louis-Brennetot C, Schleiermacher G, Ferrand S, Pierron G (2013): Breakpoint features of genomic rearrangements in neuroblastoma with unbalanced translocations and chromothripsis. *PLoS One* (8), e72182
- Bonfini L, Migliaccio E, Pelicci G, Lanfrancone L, Pelicci P G (1996): Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem Sci* 21 (7), 257–261
- Boutterin M C, Mazot P, Faure C, Doly S, Gervasi N, Tremblay M L, Vigny M (2013): Control of ALK (wild type and mutated forms) phosphorylation: specific role of the phosphatase PTP1B. *Cell Signal* 25 (6), 1505–1513

- Bresler S C, Wood A C, Haglund E A, Courtright J, Belcastro L T, Plegaria J S, Cole K, Toporovskaya Y, Zhao H, Carpenter E L (2011): Differential inhibitor sensitivity of anaplastic lymphoma kinase variants found in neuroblastoma. *Sci Transl Med* 3 (108), 108ra114
- Bresler S C, Weiser D A, Huwe P J, Park J H, Krytska K, Ryles H, Laudenslager M, Rappaport E F, Wood A C, McGrady P W (2014): ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell* 26 (5), 682–694. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.09.019
- Brodeur G M (2003): Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3 (3), 203–216
- Brodeur G M, Seeger R C, Schwab M, Varmus H E, Bishop J M (1984): Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224 (4653), 1121–1124
- Bromberg J, Darnell J E Jr (2000): The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19 (21), 2468–2473
- Brooks A J, Dai W, O'Mara M L, Abankwa D, Chhabra Y, Pelekanos R A, Gardon O, Tunny K A, Blucher K M, Morton C J (2014): Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science* 344 (6185), 1249783
- Browning K S, Bailey-Serres J (2015): Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. *Arabidopsis Book* 13, e0176
- Buddecke E: *Molekulare Medizin Eine systematische Einführung* . ecomed, Landsberg/Lech 2002
- Bühler A J: *Molecular mechanisms regulating phospholipase C- γ_2 activity*. Naturwissenschaftl. Diss. Ulm 2013
- Canto C, Auwerx J. (2010): AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci* 67 (20), 3407–3423
- Carpenter E L, Haglund E A, Mace E M, Deng D, Martinez D, Wood A C, Chow A K, Weiser D A, Belcastro L T, Winter C (2012): Antibody targeting of anaplastic lymphoma kinase induces cytotoxicity of human neuroblastoma. *Oncogene* 31 (46), 4859–4867
- Carpenter E L, Mosse Y P (2012): Targeting ALK in neuroblastoma--preclinical and clinical advancements. *Nat Rev Clin Oncol* 9 (7), 391–399
- Cazes A, Louis-Brennetot C, Mazot P, Dingli F, Lombard B, Boeva V, Daveau R, Cappo J, Combaret V, Schleiermacher G (2013): Characterization of rearrangements involving the ALK gene reveals a novel truncated form associated with tumor aggressiveness in neuroblastoma. *Cancer Res* 73 (1), 195–204
- Cell Signaling: <https://www.cellsignal.com/products/antibody-arrays/intracellular-signaling-array-kit-fluorescent-readout/7744?N=102309&fromPage=plp>, Zugriff am 15.03.17
- Center for advanced microscopy, Northwestern University: <https://cam.facilities.northwestern.edu/588-2/z-stack/>, Zugriff am 24.03.17
- Chai H, Luo A Z, Weerasinghe P, Brown R E (2010): Sorafenib downregulates ERK/Akt and STAT3 survival pathways and induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line. *Int J Clin Exp Pathol* 3 (4), 408–415
- Chan F K, Siegel R M, Zacharias D, Swofford R, Holmes K L, Tsien R Y, Lenardo M J (2001): Fluorescence resonance energy transfer analysis of cell surface receptor interactions

and signaling using spectral variants of the green fluorescent protein. *Cytometry* 44 (4), 361–368

Chan J K, Cheuk W, Shimizu M (2001): Anaplastic lymphoma kinase expression in inflammatory pseudotumors. *Am J Surg Pathol* 25 (6), 761–768

Chand D, Yamazaki Y, Ruuth K, Schönherr C, Martinsson T, Kogner P, Attiyeh E F, Maris J, Morozova O, Marra M A (2013): Cell culture and *Drosophila* model systems define three classes of anaplastic lymphoma kinase mutations in neuroblastoma. *Dis Model Mech* 6 (2), 373–382

Chang K-C, Wu M-H, Jones D, Chen F-F, Tseng Y-L (2006): Activation of STAT3 in thymic epithelial tumours correlates with tumour type and clinical behaviour. *J Pathol* 210 (2), 224–233

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 (46), 75968–75980

Chen L, Humphreys A, Turnbull L, Bellini A, Schleiermacher G, Salwen H, Cohn S L, Bown N, Tweddle D A (2016): Identification of different ALK mutations in a pair of neuroblastoma cell lines established at diagnosis and relapse. *Oncotarget* 7 (52), 87301–87311

Chen S, Zhou C, Ma X, Gong L (2014): Abnormality of anaplastic lymphoma kinase gene and its expression in pediatric neuroblastoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 43 (8), 541–545

Chen Y, Takita J, Choi Y L, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T (2008): Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455 (7215), 971–974

Cheng J, Fan Y-H, Xu X, Zhang H, Dou J, Tang Y, Zhong X, Rojas Y, Yu Y, Zhao Y (2014): A small-molecule inhibitor of UBE2N induces neuroblastoma cell death via activation of p53 and JNK pathways. *Cell Death Dis* 5, e1079

Cheung N-K V, Zhang J, Lu C, Parker M, Bahrami A, Tickoo S K, Heguy A, Pappo A S, Federico S, Dalton J (2012): Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA* 307 (10), 1062–1071

Chiarle R, Simmons W J, Cai H, Dhall G, Zamo A, Raz R, Karras J G, Levy D E, Inghirami G (2005): Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nature Med* 11 (6), 623–629

Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G (2008): The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 8 (1), 11–23

Chong Z Z (2016): Targeting PRAS40 for multiple diseases. *Drug Discov Today* 21 (8), 1222–1231

Cohn S L, Pearson A D J, London W B, Monclair T, Ambros P F, Brodeur G M, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D (2009): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27 (2), 289–297

Combaret V, Iacono I, Bellini A, Brejon S, Bernard V, Marabelle A, Coze C, Pierron G, Lapouble E, Schleiermacher G (2015): Detection of tumor ALK status in neuroblastoma patients using peripheral blood. *Cancer Med* 4 (4), 540–550

Corvinus F M, Orth C, Moriggl R, Tsareva S A, Wagner S, Pfitzner E B, Baus D, Kaufmann R, Huber L A, Zatloukal K (2005): Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia* 7 (6), 545–555

- Courty J, Dauchel M C, Caruelle D, Perderiset M, Barritault D (1991): Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* **180** (1), 145–151
- Cybulski, N; Hall, M N (2009): TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem Sci* **34** (12), 620–627
- Dan H C, Ebbs A, Pasparakis M, van Dyke T, Basseres D S, Baldwin A S (2014): Akt-dependent activation of mTORC1 complex involves phosphorylation of mTOR (mammalian target of rapamycin) by IkkappaB kinase alpha (IKKalpha). *J Biol Chem* **289** (36), 25227–25240
- Day R N: Visible fluorescent proteins for FRET-FLIM, In: Periasamy A, Clegg R M (Hrsg.): *FLIM microscopy in biology and medicine*. CRC Press, Boca Raton 2010, 65-89
- de Brouwer S, de Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout E M, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebeeck J, van Maerken T (2010): Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res* **16** (17), 4353–4362
- Debruyne D N, Bhatnagar N, Sharma B, Luther W, Moore N F, Cheung N-K, Gray N S, George R E (2016): ALK inhibitor resistance in ALK(F1174L)-driven neuroblastoma is associated with AXL activation and induction of EMT. *Oncogene* **35** (28), 3681–3691
- Del Grosso F, Mariano M de, Passoni L, Luksch R, Tonini G P, Longo L (2011): Inhibition of N-linked glycosylation impairs ALK phosphorylation and disrupts pro-survival signaling in neuroblastoma cell lines. *BMC Cancer* **11**, 525. DOI: 10.1186/1471-2407-11-525.
- Demtröder W: *Experimentalphysik 2 Elektrizität und Optik*. 6. Auflage; Springer, Berlin Heidelberg 2013
- Deng X, Wang J, Zhang J, Sim T, Kim N D, Sasaki T, Luther W 2nd, George R E, Janne P A, Gray N S (2011): Discovery of 3,5-Diamino-1,2,4-triazole Ureas as Potent Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitors. *ACS Med Chem Lett* **2** (5), 379–384
- Deuel, T F (2013): Anaplastic lymphoma kinase: "Ligand Independent Activation" mediated by the PTN/RPTPbeta/zeta signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* **1834** (10), 2219–2223
- Di Paolo D, Yang D, Pastorino F, Emionite L, Cilli M, Daga A, Destafanis E, Di Fiore A, Piaggio F, Brignole C (2015): New therapeutic strategies in neuroblastoma: combined targeting of a novel tyrosine kinase inhibitor and liposomal siRNAs against ALK. *Oncotarget* **6** (30), 28774–28789
- Domoto T, Pyko I V, Furuta T, Miyashita K, Uehara M, Shimasaki T, Nakada M, Minamoto T (2016): Glycogen synthase kinase-3beta is a pivotal mediator of cancer invasion and resistance to therapy. *Cancer Sci* **107** (10), 1363–1372
- DuBois S G, Kalika Y, Lukens J N, Brodeur G M, Seeger R C, Atkinson J B, Haase G M, Black C T, Perez C, Shimada H (1999): Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *J Pediatr Hematol Oncol* **21** (3), 181–189
- Duijkers F A M, Gaal J, Meijerink J P P, Admiraal P, Pieters R, Krijger R R de, van Noesel M M (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** (5), 409–417
- Egan S E, Giddings B W, Brooks M W, Buday L, Sizeland A M, Weinberg R A (1993): Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* **363** (6424), 45–51

- El-Assaad A, Dawy Z, Nemer G, Kobeissy F (2017): Novel Bioinformatics-Based Approach for Proteomic Biomarkers Prediction of Calpain-2 & Caspase-3 Protease Fragmentation: Application to betaII-Spectrin Protein. *Sci Rep* 7, 41039. DOI: 10.1038/srep41039
- Eleveld T F, Oldridge D A, Bernard V, Koster J, Daage L C, Diskin S J, Schild L, Bentahar N B, Bellini A, Chicard M (2015): Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. *Nat Genet* 47 (8), 864–871
- Englund C, Loren C E, Grabbe C, Varshney G K, Deleuil F, Hallberg B, Palmer R H (2003): Jeb signals through the Alk receptor tyrosine kinase to drive visceral muscle fusion. *Nature* 425 (6957), 512–516
- Epstein L F, Chen H, Emkey R, Whittington D A (2012): The R1275Q neuroblastoma mutant and certain ATP-competitive inhibitors stabilize alternative activation loop conformations of anaplastic lymphoma kinase. *J Biol Chem* 287 (44), 37447–37457
- Esposito M R, Aveic S, Seydel A, Tonini G P (2017): Neuroblastoma treatment in the post-genomic era. *J Biomed Sci* 24 (1), 14. DOI: 10.1186/s12929-017-0319-y
- Evans, A E; D'Angio, G J; Randolph, J (1971): A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A. *Cancer* 27 (2), 374–378
- Felgner P L, Gadek T R, Holm M, Roman R, Chan H W, Wenz M, Northrop J P, Ringold G M, Danielsen M (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (21), 7413–7417
- Felgner J H, Kumar R, Sridhar C N, Wheeler C J, Tsai Y J, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner P L (1994): Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 269 (4), 2550–2561
- Feng X, Jiang J, Shi S, Xie H, Zhou L, Zheng S (2016): Knockdown of miR-25 increases the sensitivity of liver cancer stem cells to TRAIL-induced apoptosis via PTEN/PI3K/Akt/Bad signaling pathway. *Int J Oncol* 49 (6), 2600–2610
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri E S (1994): CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 269 (49), 30761–30764
- Fischer U, Janicke R U, Schulze-Osthoff K (2003): Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10 (1), 76–100
- Fleming Y, Armstrong C G, Morrice N, Paterson A, Goedert M, Cohen P (2000): Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J* 352 Pt 1, 145–154
- Förster T (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 437 (1-2), 55–75
- Förster T (1949): Versuche zum zwischenmolekularen Übergang von Elektronenanregungsenergie. *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie* 53(2), 93-99
- Fransson S, Hansson M, Ruuth K, Djos A, Berbegall A, Javanmardi N, Abrahamsson J, Palmer R H, Noguera R, Hallberg B (2015): Intragenic anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangements: translocations as a novel mechanism of ALK activation in neuroblastoma tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 54 (2), 99–109
- Fukada M, Fujikawa A, Chow J P H, Ikematsu S, Sakuma S, Noda M (2006): Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is inactivated by ligand-induced oligomerization. *FEBS Lett* 580 (17), 4051–4056

- George R E, Sanda T, Hanna M, Frohling S, Luther W 2nd, Zhang J, Ahn Y, Zhou W, London W B, McGrady P (2008): Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 455 (7215), 975–978
- Gerritsen H C, Draaijer A, van den Heuvel D J, Agronskaia A V: Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopy, , In: Pawley J (Hrsg.): Handbook of biological confocal microscopy. 3. Auflage; Springer US, New York 2006, 516-534
- Gherardi S, Valli E, Erriquez D, Perini G (2013): MYCN-mediated transcriptional repression in neuroblastoma: the other side of the coin. *Front Oncol* 3, 42. DOI: 10.3389/fonc.2013.00042.
- Gmeinwieser N: Hochortsaufgelöste spektroskopische Untersuchungen an Galliumnitrid. Cu-villier, Göttingen 2006
- Goldsmith K C, Gross M, Peirce S, Luyindula D, Liu X, Vu A, Sliozberg M, Guo R, Zhao H, Reynolds C P (2012): Mitochondrial Bcl-2 family dynamics define therapy response and resistance in neuroblastoma. *Cancer Res* 72 (10), 2565–2577
- Goodman L A, Liu B C, Thiele C J, Schmidt M L, Cohn S L, Yamashiro J M, Pai D S, Ikegaki N, Wada R K (1997): Modulation of N-myc expression alters the invasiveness of neuroblastoma. *Clin Exp Metastasis* 15 (2), 130–139
- Goodsell D S (1999): The molecular perspective: the ras oncogene. *Stem Cells* 17 (4), 235–236
- Griffin C A, Hawkins A L, Dvorak C, Henkle C, Ellingham T, Perlman E J (1999): Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Res* 59 (12), 2776–2780
- Gu Y, Di W L, Kelsell D P, Zicha D (2004): Quantitative fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement with acceptor photobleaching and spectral unmixing. *J Microsc* 215 (Pt 2), 162–173
- Guan J, Umapathy G, Yamazaki Y, Wolfstetter G, Mendoza P, Pfeifer K, Mohammed A, Hugosson F, Zhang H, Hsu A W (2015): FAM150A and FAM150B are activating ligands for anaplastic lymphoma kinase. *Elife* 4, e09811
- Guan J, Tucker E R, Wan H, Chand D, Danielson L S, Ruuth K, El Wakil A, Witek B, Jamin Y, Umapathy G (2016): The ALK inhibitor PF-06463922 is effective as a single agent in neuroblastoma driven by expression of ALK and MYCN. *Dis Model Mech.* 9 (9), 941–952
- Guarino M (2010): Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* 223 (1), 14–26
- Guerreiro A S, Boller D, Shalaby T, Grotzer M A, Arcaro A (2006): Protein kinase B modulates the sensitivity of human neuroblastoma cells to insulin-like growth factor receptor inhibition. *Int J Cancer* 119 (11), 2527–2538
- Gwinn D M, Shackelford D B, Egan D F, Mihaylova M M, Mery A, Vasquez D S, Turk B E, Shaw R J (2008): AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30 (2), 214–226
- Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen C-C, Skeen J E, Sonenberg N, Hay N (2005): Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* 280 (37), 32081–32089
- Hallberg B, Palmer R H (2013): Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer* 13 (10), 685–700

- Hallberg B, Palmer R H (2016): The role of the ALK receptor in cancer biology. *Ann Oncol* 27 Suppl 3, iii4-iii15
- Hardie D G, Carling D, Carlson M (1998): The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67, 821–855
- Hasan M K, Nafady A, Takatori A, Kishida S, Ohira M, Suenaga Y, Hossain S, Akter J, Ogura A, Nakamura Y, Kadomatsu K, Nakagawara A (2013): ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Sci Rep* 3, 3450
- Hawley S A, Ross F A, Gowans G J, Tibarewal P, Leslie N R, Hardie D G (2014): Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK- α 1 down-regulates its activation in tumour cells. *Biochem J* 459 (2), 275–287
- Heldin C H (1995): Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80 (2), 213–223
- Helenius A, Aebi M. (2004): Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019–1049
- Helms V: Principles of computational cell biology From protein complexes to cellular networks. Viley-VCH, Weinheim 2008
- Hering E, Schönfelder G.: Sensoren in Wissenschaft und Technik Funktionsweise und Einsatzgebiete. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden 2012
- Hibbs A, MacDonald G, Garsha K: Practical confocal microscopy, In: Pawley J (Hrsg.): Handbook of biological confocal microscopy. 3. Auflage; Springer US, New York 2006, 650-671
- Hilger R A, Scheulen M E, Strumberg D (2002): The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25 (6), 511–518
- Hoehner J C, Gestblom C, Hedborg F, Sandstedt B, Olsen L, Pahlman S (1996): A developmental model of neuroblastoma: differentiating stroma-poor tumors' progress along an extra-adrenal chromaffin lineage. *Lab Invest* 75 (5), 659–675
- Horiguchi A, Oya M, Shimada T, Uchida A, Marumo K, Murai M (2002): Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in renal cell carcinoma: a study of incidence and its association with pathological features and clinical outcome. *J Urol* 168 (2), 762–765
- Hsiao L L, Jensen R V, Yoshida T, Clark K E, Blumenstock J E, Gullans S R (2002): Correcting for signal saturation errors in the analysis of microarray data. *Biotechniques* 32 (2), 330-2, 334, 336
- Huang D, Kim D-W, Kotsakis A, Deng S, Lira P, Ho S N, Lee N V, Vizcarra P, Cao J Q, Christensen J G (2013): Multiplexed deep sequencing analysis of ALK kinase domain identifies resistance mutations in relapsed patients following crizotinib treatment. *Genomics* 102 (3), 157–162
- Huang M, Page C, Reynolds R K, Lin J (2000): Constitutive activation of stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 79 (1), 67–73
- Hung C-M, Garcia-Haro L, Sparks C A, Guertin D A (2012): mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4 (12). DOI: 10.1101/cshperspect.a008771.
- Infarinato N R, Park J H, Krytska K, Ryles H T, Sano R, Szigety K M, Li Y, Zou H Y, Lee N V, Smeal T (2016): The ALK/ROS1 Inhibitor PF-06463922 Overcomes Primary Resistance to Crizotinib in ALK-Driven Neuroblastoma. *Cancer Discov* 6 (1), 96–107

- Inoki K, Zhu T, Guan K-L (2003): TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115 (5), 577–590
- Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K (2006): TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126 (5), 955–968
- Irwin M S, Park J R (2015): Neuroblastoma: paradigm for precision medicine. *Pediatr Clin North Am* 62 (1), 225–256
- 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 (4), 439–449
- Iyer R, Wehrmann L, Golden R L, Naraparaju K, Croucher J L, MacFarland S P, Guan P, Kolla V, Wei G, Cam N (2016): Entrectinib is a potent inhibitor of Trk-driven neuroblastomas in a xenograft mouse model. *Cancer Lett* 372 (2), 179–186
- Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, Pontual L de, Combaret V, Raynal V, Puisieux A, Schleiermacher G, Pierron G (2008): Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455 (7215), 967–970
- Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D, Vermeulen J, Couturier J, Peuchmaur M, Valent A (2009): Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 27 (7), 1026–1033
- Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Delattre O (2010): Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene* 29 (11), 1566–1579
- Johnson I D: Practical considerations in the selection and application of fluorescent probes, In: Pawley J (Hrsg.): *Handbook of biological confocal microscopy*. 3. Auflage; Springer US, New York 2006, 353–367
- Jope R S, Johnson G V W (2004): The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29 (2), 95–102
- Karin M (1995): The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270 (28), 16483–16486
- Kasprzycka M, Marzec M, Liu X, Zhang Q, Wasik M A (2006): Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (26), 9964–9969
- Kemp B E, Mitchelhill K I, Stapleton D, Mitchell B J, Chen Z P, Witters L A (1999): Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci* 24 (1), 22–25
- Kenworthy A K (2001): Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* 24 (3), 289–296
- Keppler-Noreuil K M, Parker V E R, Darling T N, Martinez-Agosto J A (2016): Somatic overgrowth disorders of the PI3K/AKT/mTOR pathway & therapeutic strategies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 172 (4), 402–421
- Kim H S, Lee M-S (2007): STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal* 19 (3), 454–465
- Kiyonari S, Kadomatsu K. (2015): Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies. *Expert Opin Drug Discov* 10 (1), 53–62
- Knudson A G Jr, Strong L C (1972): Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am J Hum Genet* 24 (5), 514–532

- Kobayashi K, Jakt L M, Nishikawa S-I (2013): Epigenetic regulation of the neuroblastoma genes, *Arid3b* and *Mycn*. *Oncogene* 32 (21), 2640–2648
- Kortylewski M, Jove R, Yu H (2005): Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. *Cancer Metastasis Rev* 24 (2), 315–327
- Kovesdi I, Fairhurst J L, Kretschmer P J, Bohlen P (1990): Heparin-binding neurotrophic factor (HBNF) and MK, members of a new family of homologous, developmentally regulated proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 172 (2), 850–854
- Krytska K, Ryles H T, Sano R, Raman P, Infarinato N R, Hansel T D, Makena M R, Song M M, Reynolds C P, Mosse Y P (2016): Crizotinib Synergizes with Chemotherapy in Preclinical Models of Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 22 (4), 948–960
- Kulesa P M, Lefcort F, Kasemeier-Kulesa J C (2009): The migration of autonomic precursor cells in the embryo. *Auton Neurosci* 151 (1), 3–9
- Kurokawa M, Kornbluth S. (2009): Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 138 (5), 838–854
- Lai S, Czubayko F, Riegel A T, Wellstein A (1992): Structure of the human heparin-binding growth factor gene pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 187 (2), 1113–1122
- Lai S, Schulte A M, Wellstein A, Riegel A T (1995): An additional 5'-upstream exon exists in the human pleiotrophin-encoding gene. *Gene* 153 (2), 301–302
- Lamant L, Pulford K, Bischof D, Morris S W, Mason D Y, Delsol G, Mariame B (2000): Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *Am J Pathol* 156 (5), 1711–1721
- Lambertz I, Kumps C, Claeys S, Lindner S, Beckers A, Janssens E, Carter D R, Cazes A, Cheung B B, Mariano M de (2015): Upregulation of MAPK Negative Feedback Regulators and RET in Mutant ALK Neuroblastoma: Implications for Targeted Treatment. *Clin Cancer Res* 21 (14), 3327–3339
- Lee C C, Jia Y, Li N, Sun X, Ng K, Ambing E, Gao M-Y, Hua S, Chen C, Kim S (2010): Crystal structure of the ALK (anaplastic lymphoma kinase) catalytic domain. *Biochem J* 430 (3), 425–437
- Lee J, Kim H C, Hong J Y, Wang K, Kim S Y, Jang J, Kim S T, Park J O, Lim H Y, Kang W K (2015): Detection of novel and potentially actionable anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangement in colorectal adenocarcinoma by immunohistochemistry screening. *Oncotarget* 6 (27), 24320–24332
- Leonard W J, O'Shea J J (1998): Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16, 293–322
- Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B, Schlessinger J (1993): Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363 (6424), 85–88
- Li Z, Xu Z, Xie Q, Gao W, Xie J, Zhou L (2016): miR-1303 promotes the proliferation of neuroblastoma cell SH-SY5Y by targeting GSK3beta and SFRP1. *Biomed Pharmacother* 83, 508–513
- Liu Z, Thiele C J (2012): ALK and MYCN: when two oncogenes are better than one. *Cancer Cell* 21 (3), 325–326
- Llopis J, Westin S, Ricote M, Wang Z, Cho C Y, Kurokawa R, Mullen T M, Rose D W, Rosenfeld M G, Tsien R Y (2000): Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nu-

- clear hormone receptors can be imaged in live cells and are required for transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (8), 4363–4368
- Lopez-Delisle L, Pierre-Eugene C, Bloch-Gallego E, Birling M-C, Duband J-L, Durand E, Bourgeois T, Matrot B, Sorg T, Huerre M (2014): Hyperactivation of Alk induces neonatal lethality in knock-in AlkF1178L mice. *Oncotarget* 5 (9), 2703–2713
- Loren C E, Scully A, Grabbe C, Edeen P T, Thomas J, McKeown M, Hunter T, Palmer R H (2001): Identification and characterization of DAalk: a novel *Drosophila melanogaster* RTK which drives ERK activation in vivo. *Genes Cells* 6 (6), 531–544
- Lu F, Kishida S, Mu P, Huang P, Cao D, Tsubota S, Kadomatsu K (2015): NeuroD1 promotes neuroblastoma cell growth by inducing the expression of ALK. *Cancer Sci* 106 (4), 390–396
- Luciani P, Deledda C, Benvenuti S, Squecco R, Cellai I, Fibbi B, Marone I M, Giuliani C, Modi G, Francini F (2013): Exendin-4 induces cell adhesion and differentiation and counteracts the invasive potential of human neuroblastoma cells. *PloS One* 8 (8), e71716
- Luksch R, Castellani M R, Collini P, Bernardi B de, Conte M, Gambini C, Gandola L, Garaventa A, Biondi D, Podda M (2016): Neuroblastoma (Peripheral neuroblastic tumours). *Crit Rev Oncol Hematol* 107, 163–181
- Lutz W, Stohr M, Schurmann J, Wenzel A, Lohr A, Schwab M (1996): Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene* 13 (4), 803–812
- Maeda N, Nishiwaki T, Shintani T, Hamanaka H, Noda M (1996): 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Biol Chem* 271 (35), 21446–21452
- Mahfouz M M, Kim S, Delauney A J, Verma D P S (2006): Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* 18 (2), 477–490
- Majoul I, Jia Y, Duden R: Practical fluorescence resonance energy transfer or molecular nanobiopsy of living cells, In: Pawley J (Hrsg.): *Handbook of biological confocal microscopy*. 3. Auflage; Springer US, New York 2006, 788-808
- Manning G, Whyte D B, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002): The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298 (5600), 1912–1934
- Mano H (2012): ALKoma: a cancer subtype with a shared target. *Cancer Discov* 2 (6), 495–502
- Maris J M, Matthay K K (1999): Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 17 (7), 2264–2279
- Maris J M (2010): Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 362 (23), 2202–2211
- Maris J M, Hogarty M D, Bagatell R, Cohn S L (2007): Neuroblastoma. *Lancet* 369 (9579), 2106–2120
- Martinsson T, Eriksson T, Abrahamsson J, Caren H, Hansson M, Kogner P, Kamaraj S, Schönherr C, Weinmar J, Ruuth K (2011): Appearance of the novel activating F1174S ALK mutation in neuroblastoma correlates with aggressive tumor progression and unresponsiveness to therapy. *Cancer Res* 71 (1), 98–105

- Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, Kriegsheim A von, Kolch W (2011): Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer* 2 (3), 232–260
- Mathivet T, Mazot P, Vigny M (2007): In contrast to agonist monoclonal antibodies, both C-terminal truncated form and full length form of Pleiotrophin failed to activate vertebrate ALK (anaplastic lymphoma kinase)? *Cell Signal* 19 (12), 2434–2443
- Matthay K K, Reynolds C P, Seeger R C, Shimada H, Adkins E S, Haas-Kogan D, Gerbing R B, London W B, Villablanca J G (2009): Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* 27 (7), 1007–1013
- Matthay K K, Maris J M, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall C L, Diller L, Weiss W A (2016): Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16078
- Mazot P, Cazes A, Bouterin M C, Figueiredo A, Raynal V, Combaret V, Hallberg B, Palmer R H, Delattre O, Janoueix-Lerosey I (2011): The constitutive activity of the ALK mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking. *Oncogene* 30 (17), 2017–2025
- McCubrey J A, Steelman L S, Bertrand F E, Davis N M, Sokolosky M, Abrams S L, Montalto G, D'Assoro A B, Libra M, Nicoletti F (2014): GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget* 5 (10), 2881–2911
- McDermott U, Iafrate A J, Gray N S, Shioda T, Classon M, Maheswaran S, Zhou W, Choi H G, Smith S L, Dowell L (2008): Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res* 68 (9), 3389–3395
- McDuff F K E, Lim S-V, Dalbay M, Turner S D (2013): Assessment of the transforming potential of novel anaplastic lymphoma kinase point mutants. *Mol Carcinog* 52 (1), 79–83
- McKeage K (2015): Alectinib: a review of its use in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer. *Drugs* 75 (1), 75–82
- Mebratu Y, Tesfaijzi Y. (2009): How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8 (8), 1168–1175
- Megison M L, Gillory L A, Beierle E A (2013): Cell survival signaling in neuroblastoma. *Anticancer Agents Med Chem* 13 (4), 563–575
- Meitar D, Crawford S E, Rademaker A W, Cohn S L (1996): Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 14 (2), 405–414
- Meng K, Rodriguez-Pena A, Dimitrov T, Chen W, Yamin M, Noda M, Deuel T F (2000): Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (6), 2603–2608
- Merenmies J, Rauvala H. (1990): Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain. *J Biol Chem* 265 (28), 16721–16724
- Mesaros E F, Ott G R, Dorsey B D (2014): Anaplastic lymphoma kinase inhibitors as anti-cancer therapeutics: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 24 (4), 417–442
- Meyer N, Penn L Z (2008): Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 8 (12), 976–990
- Meyuhas O (2015): Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research. *Int Rev Cell Mol Biol* 320, 41–73

- Michels E, Vandesompele J, Preter K de, Hoebeeck J, Vermeulen J, Schramm A, Molenaar J J, Menten B, Marques B, Stallings R L (2007): ArrayCGH-based classification of neuroblastoma into genomic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer* 46 (12), 1098–1108
- Minoo P, Wang H-Y (2012): ALK-immunoreactive neoplasms. *Int J Clin Exp Pathol* 5 (5), 397–410
- Miyake I, Hakomori Y, Shinohara A, Gamou T, Saito M, Iwamatsu A, Sakai R (2002): Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 21 (38), 5823–5834
- Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, Matsuda M (2001): Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411 (6841), 1065–1068
- Mohlin S A, Wigerup C, Pahlman S (2011): Neuroblastoma aggressiveness in relation to sympathetic neuronal differentiation stage. *Semin Cancer Biol* 21 (4), 276–282
- Mohlin S, Hamidian A, Stedingk K von, Bridges E, Wigerup C, Bexell D, Pahlman S (2015): PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma. *Cancer Res* 75 (21), 4617–4628
- Molenaar J J, Koster J, Zwijnenburg D A, van Sluis P, Valentijn L J, van der Ploeg I, Hamdi M, van Nes J, Westerman B A, van Arkel J (2012): Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* 483 (7391), 589–593
- Mologni L (2015): Current and future treatment of anaplastic lymphoma kinase-rearranged cancer. *World J Clin Oncol* 6 (5), 104–108
- Montavon G, Jauquier N, Coulon A, Peuchmaur M, Flahaut M, Bourlout K B, Yan P, Delatre O, Sommer L, Joseph J (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 (12), 4452–4466
- Moore N F, Azarova A M, Bhatnagar N, Ross K N, Drake L E, Frumm S, Liu Q S, Christie A L, Sanda T, Chesler L (2014): Molecular rationale for the use of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in combination with crizotinib in ALK-mutated neuroblastoma. *Oncotarget* 5 (18), 8737–8749
- Morris S W, Kirstein M N, Valentine M B, Dittmer K G, Shapiro D N, Saltman D L, Look A T (1994): Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263 (5151), 1281–1284
- Morris S W, Kirstein M N, Valentine M B, Dittmer K, Shapiro D N, Look A T, Saltman D L (1995): Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 267 (5196), 316–317
- Morris S W, Naeve C, Mathew P, James P L, Kirstein M N, Cui X, Witte D P (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 (18), 2175–2188
- Mosse Y P, Laudenslager M, Longo L, Cole K A, Wood A, Attiyeh E F, Laquaglia M J, Sennett R, Lynch J E, Perri, P (2008): Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455 (7215), 930–935
- Motegi A, Fujimoto J, Kotani M, Sakuraba H, Yamamoto T (2004): ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth. *J Cell Sci* 117 (Pt 15), 3319–3329

- Mourali J, Benard A, Lourenco F C, Monnet C, Greenland C, Moog-Lutz C, Racaud-Sultan C, Gonzalez-Dunia D, Vigny, M; Mehlen P (2006): Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 26 (16), 6209–6222
- Mülhardt C: *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. 7. Auflage; Springer, Berlin 2013
- Müller I, Larsson K, Frenzel A, Oliynyk G, Zirath H, Prochownik E V, Westwood N J, Henriksson M A (2014): Targeting of the MYCN protein with small molecule c-MYC inhibitors. *PLoS One* 9 (5), e97285
- Mui A L (1999): The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 55 (12), 1547–1558
- Mulisch M: Probengewinnung zur mikroskopischen Untersuchung und Präparation. In: Mulisch M, Welsch U (Hrsg.): *Romeis Mikroskopische Technik*. 19. Auflage; Springer, Berlin Heidelberg 2015, 63-76
- Munoz-Cobo J P, Sanchez-Hernandez N, Gutierrez S, El Yousfi Y, Montes M, Gallego C, Hernandez-Munain C, Sune C (2016): Transcriptional Elongation Regulator 1 Affects Transcription and Splicing of Genes Associated with Cellular Morphology and Cytoskeleton Dynamics and Is Required for Neurite Outgrowth in Neuroblastoma Cells and Primary Neuronal Cultures. *Mol Neurobiol* DOI: 10.1007/s12035-016-0284-6.
- Murga-Zamalloa, C; Lim, M S (2014): ALK-driven tumors and targeted therapy: focus on crizotinib. *Pharmgenomics Pers Med* 7, 87–94
- Murray P B, Lax I, Reshetnyak A, Ligon G F, Lillquist J S, Natoli E J Jr, Shi X, Folta-Stogniew E, Gunel M, Alvarado D (2015): Heparin is an activating ligand of the orphan receptor tyrosine kinase ALK. *Sci Signal* 8 (360), ra6
- Murugan A K, Xing M (2011): Anaplastic thyroid cancers harbor novel oncogenic mutations of the ALK gene. *Cancer Res* 71 (13), 4403–4411
- Nair M G, Desai K, Prabhu J S, Hari P S, Remacle J, Sridhar T S (2016): beta3 integrin promotes chemoresistance to epirubicin in MDA-MB-231 through repression of the proapoptotic protein, BAD. *Exp Cell Res* 346 (1), 137–145
- Najem S, Langemann D, Appl B, Trochimiuk M, Hundsdoerfer P, Reinshagen K, Eschenburg G (2016): Smac mimetic LCL161 supports neuroblastoma chemotherapy in a drug class-dependent manner and synergistically interacts with ALK inhibitor TAE684 in cells with ALK mutation F1174L. *Oncotarget* 7 (45), 72634–72653
- Navarro S, Amann G, Beiske K, Cullinane C J, d'Amore E S G, Gambini C, Mosseri V, Bernardi B de, Michon J, Peuchmaur M (2006): Prognostic value of International Neuroblastoma Pathology Classification in localized resectable peripheral neuroblastic tumors: a histopathologic study of localized neuroblastoma European Study Group 94.01 Trial and Protocol *J Clin Oncol* 24 (4), 695–699
- Ng T, Squire A, Hansra G, Bornancin F, Prevostel C, Hanby A, Harris W, Barnes D, Schmidt S, Mellor H (1999): Imaging protein kinase Calpha activation in cells. *Science* 283 (5410), 2085–2089
- Nicolai S, Pieraccioli M, Peschiaroli A, Melino G, Raschella G (2015): Neuroblastoma: oncogenic mechanisms and therapeutic exploitation of necroptosis. *Cell Death Dis* 6, e2010

- Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A, Chang A, Kraker A, Jove R, Yu H (2002): Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 21 (46), 7001–7010
- Normand C, Michon J, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G (2011): Les alterations genetiques dans le neuroblastome et leur apport pour la prise en charge therapeutique. *Bull Cancer* 98 (5), 477–488
- Ohki E C, Tilkens M L, Ciccarone V C, Price P J (2001): Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *J Neurosci Methods* 112 (2), 95–99
- Ohori M, Kinoshita T, Okubo M, Sato K, Yamazaki A, Arakawa H, Nishimura S, Inamura N, Nakajima H, Neya M (2005): Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex. *Biochem Biophys Res Commun* 336 (1), 357–363
- Okuda A, Kurokawa S, Takehashi M, Maeda A, Fukuda K, Kubo Y, Nogusa H, Takatani-Nakase T, Okuda S, Ueda K (2017): Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors activate the p53 signaling pathway in neural stem/progenitor cells. *BMC Neurosci* 18 (1), 14
- Opel D, Poremba C, Simon T, Debatin K-M, Fulda S (2007): Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res* 67 (2), 735–745
- O'Reilly K E, Rojo F, She Q-B, Solit D, Mills G B, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin D J, Ludwig D L (2006): mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 66 (3), 1500–1508
- 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 (1), 213–222
- Padovan-Merhar O M, Raman P, Ostrovnya I, Kalletla K, Rubnitz K R, Sanford E M, Ali S M, Miller V A, Mosse Y P, Granger M P (2016): Enrichment of Targetable Mutations in the Relapsed Neuroblastoma Genome. *PLoS Genet* 12 (12), e1006501
- Page C, Doubell A F (1996): Mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cardiac tissues. *Mol Cell Biochem* 157 (1-2), 49–57
- Pal I, Mandal M. (2012): PI3K and Akt as molecular targets for cancer therapy: current clinical outcomes. *Acta Pharmacol Sin* 33 (12), 1441–1458
- Palacios-Moreno J, Foltz L, Guo A, Stokes M P, Kuehn E D, George L, Comb M, Grimes M L (2015): Neuroblastoma tyrosine kinase signaling networks involve FYN and LYN in endosomes and lipid rafts. *PLoS Comput Biol* 11 (4), e1004130
- Palmer R H, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B (2009): Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J* 420 (3), 345–361
- Park J R, Eggert A, Caron H (2008): Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am* 55 (1), 97-120, x
- Park J W, Kim S, Lim K J, Simpson R J, Kim Y S, Bahk Y Y (2006): A proteomic approach for unraveling the oncogenic H-Ras protein networks in NIH/3T3 mouse embryonic fibroblast cells. *Proteomics* 6 (4), 1175–1186
- Parodi F, Passoni L, Massimo L, Luksch R, Gambini C, Rossi E, Zuffardi O, Pistoia V, Pezzolo A (2011): Identification of novel prognostic markers in relapsing localized resectable neuroblastoma. *OMICS* 15 (3), 113–121
- Partovian C, Ju R, Zhuang Z W, Martin K A, Simons M (2008): Syndecan-4 regulates subcellular localization of mTOR Complex2 and Akt activation in a PKCalpha-dependent manner in endothelial cells. *Mol Cell* 32 (1), 140–149

- Passoni L, Longo L, Collini P, Coluccia A M, Bozzi F, Podda M, Gregorio A, Gambini C, Garaventa A, Pistoia V (2009): Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer Res* 69 (18), 7338–7346
- Pathscan Manual: <https://media.cellsignal.com/pdf/7744.pdf>, Zugriff am 01.12.16
- Patterson G H, Knobel S M, Sharif W D, Kain S R, Piston D W (1997): Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 73 (5), 2782–2790
- Perez-Pinera P, Zhang W, Chang Y, Vega J A, Deuel T F (2007): Anaplastic lymphoma kinase is activated through the pleiotrophin/receptor protein-tyrosine phosphatase beta/zeta signaling pathway: an alternative mechanism of receptor tyrosine kinase activation. *J Biol Chem* 282 (39), 28683–28690
- Perri F, Pisconti S, Della Vittoria Scarpati G (2016): P53 mutations and cancer: a tight linkage. *Ann Transl Med* 4 (24), 522
- Powers C, Aigner A, Stoica G E, McDonnell K, Wellstein A (2002): Pleiotrophin signaling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth. *J Biol Chem* 277 (16), 14153–14158
- Pugh T J, Morozova O, Attiyeh E F, Asgharzadeh S, Wei J S, Auclair D, Carter S L, Cibulskis K, Hanna M, Kiezun A (2013): The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* 45 (3), 279–284
- Putney J W, Tomita T (2012): Phospholipase C signaling and calcium influx. *Adv Biol Regul* 52 (1), 152–164
- Raabe E H, Laudenslager M, Winter C, Wasserman N, Cole K, LaQuaglia M, Maris D J, Mosse Y P, Maris J M (2008): Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene* 27 (4), 469–476
- Rahman A, Haugh J M (2017): Kinetic Modeling and Analysis of the Akt/Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Signaling Axis Reveals Cooperative, Feedforward Regulation. *J Biol Chem* 292(7), 2866-2872
- Raivich G, Behrens A (2006): Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Prog Neurobiol* 78 (6), 347–363
- Ravichandran K S (2001): Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 20 (44), 6322–6330.
- Regairaz M, Munier F, Sartelet H, Castaing M, Marty V, Renauleaud C, Doux C, Delbe J, Courty J, Fabre M (2016): Mutation-Independent Activation of the Anaplastic Lymphoma Kinase in Neuroblastoma. *Am J Pathol* 186 (2), 435–445
- Reiff T, Tsarovina K, Majdazari A, Schmidt M, del Pino I, Rohrer H (2010): Neuroblastoma phox2b variants stimulate proliferation and dedifferentiation of immature sympathetic neurons. *J Neurosci* 30 (3), 30 (3), 905–915
- Reiff T, Huber L, Kramer M, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Rohrer H (2011): Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. *Development* 138 (21), 4699–4708
- Renz H, Gierten B: Durchflusszytometrie. In: Gressner A M, Arndt T (Hrsg.): *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2. Auflage; Springer, Berlin Heidelberg 2013, 419
- Reshetnyak A V, Murray P B, Shi X, Mo E S, Mohanty J, Tome F, Bai H, Gunel M, Lax I, Schlessinger J (2015): Augmentor alpha and beta (FAM150) are ligands of the receptor tyro-

sine kinases ALK and LTK: Hierarchy and specificity of ligand-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (52), 15862–15867

Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR (eds). *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975–1995*, National Cancer Institute, SEER Program. Bethesda, MD, 1999: <https://seer.cancer.gov/archive/publications/childhood/childhood-monograph.pdf>, Zugriff am 25.03.17

Robinson D R, Wu Y M, Lin S F (2000): The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19 (49), 5548–5557

Rodrigues F S L M, Yang X, Nikaido M, Liu Q, Kelsh R N (2012): A simple, highly visual in vivo screen for anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *ACS Chem Biol* 7 (12), 1968–1974

Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri E S (2017): Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat Commun* 8, 14128

Roskoski R Jr (2012): ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66 (2), 105–143

Roskoski R Jr (2013): Anaplastic lymphoma kinase (ALK): structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacol Res* 68 (1), 68–94

Rössler J, Taylor M, Georger B, Farace F, Lagodny J, Peschka-Suss R, Niemeyer C M, Vassal G (2008): Angiogenesis as a target in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 44 (12), 1645–1656

Rothenberg A B, Berdon W E, D'Angio G J, Yamashiro D J, Cowles R A (2009): Neuroblastoma-remembering the three physicians who described it a century ago: James Homer Wright, William Pepper, and Robert Hutchison. *Pediatr Radiol* 39 (2), 155–160

Rozakis-Adcock M, Fernley R, Wade J, Pawson T, Bowtell D (1993): The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363 (6424), 83–85

Samsonov A, Zenser N, Zhang F, Zhang H, Fetter J, Malkov D (2013): Tagging of genomic STAT3 and STAT1 with fluorescent proteins and insertion of a luciferase reporter in the cyclin D1 gene provides a modified A549 cell line to screen for selective STAT3 inhibitors. *PLoS One* 8 (7), e68391

Sancak Y, Thoreen C C, Peterson T R, Lindquist R A, Kang S A, Spooner E, Carr S A, Sabatini D M (2007): PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25 (6), 903–915

Sarbassov D D, Guertin D A, Ali S M, Sabatini D M (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307 (5712), 1098–1101

Sariyer I K (2013): Transfection of neuronal cultures. *Methods Mol Biol* 1078, 133–139

Sasaki T, Okuda K, Zheng W, Butrynski J, Capelletti M, Wang L, Gray N S, Wilner K, Christensen J G, Demetri G (2010): The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer Res* 70 (24), 10038–10043

Satheesh N J, Busselberg D (2015): The role of intracellular calcium for the development and treatment of neuroblastoma. *Cancers* 7 (2), 823–848

Sato M, Ozawa T, Inukai K, Asano T, Umezawa Y (2002): Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells. *Nat Biotechnol* 20 (3), 287–294.

- Satoh S, Takatori A, Ogura A, Kohashi K, Souzaki R, Kinoshita Y, Taguchi T, Hossain M S, Ohira M, Nakamura Y (2016): Neuronal leucine-rich repeat 1 negatively regulates anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Sci Rep* 6, 32682
- Sattu K, Hochgrafe F, Wu J, Umapathy G, Schönherr C, Ruuth K, Chand D, Witek B, Fuchs J, Li P-K (2013): Phosphoproteomic analysis of anaplastic lymphoma kinase (ALK) downstream signaling pathways identifies signal transducer and activator of transcription 3 as a functional target of activated ALK in neuroblastoma cells. *FEBS J* 280 (21), 5269–5282
- Sawada T, Todo S, Fujita K, Iino S, Imashuku S, Kusunoki T (1982): Mass screening of neuroblastoma in infancy. *Am J Dis Child* 136 (8), 710–712
- Sawada T, Hirayama M, Nakata T, Takeda T, Takasugi N, Mori T, Maeda K, Koide R, Hanawa Y, Tsunoda A (1984): Mass screening for neuroblastoma in infants in Japan. Interim report of a mass screening study group. *Lancet* 2 (8397), 271–273
- Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Ribeiro A, Klijanienko J, Couturier J, Pierron G, Mosseri V, Valent A, Auger N, Plantaz D (2010): Accumulation of segmental alterations determines progression in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 28 (19), 3122–3130
- Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Delattre O (2014): Recent insights into the biology of neuroblastoma. *Int J Cancer* 135 (10), 2249–2261
- Schönherr C, Ruuth K, Eriksson T, Yamazaki Y, Ottmann C, Combaret V, Vigny M, Kamaraj S, Palmer R H, Hallberg B (2011 a): The neuroblastoma ALK(I1250T) mutation is a kinase-dead RTK in vitro and in vivo. *Transl Oncol* 4 (4), 258–265
- Schönherr C, Ruuth K, Yamazaki Y, Eriksson T, Christensen J, Palmer R H, Hallberg B (2011 b): Activating ALK mutations found in neuroblastoma are inhibited by Crizotinib and NVP-TAE684. *Biochem J* 440 (3), 405–413
- Schönherr C, Ruuth K, Kamaraj S, Wang C-L, Yang H-L, Combaret V, Djos A, Martinsson T, Christensen J G, Palmer R H (2012): Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells. *Oncogene* 31 (50), 5193–5200
- Schulte J H, Bachmann H S, Brockmeyer B, Depreter K, Oberthur A, Ackermann S, Kahlert Y, Pajtler K, Theissen J, Westermann F (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 (15), 17 (15), 5082–5092
- Schulte JH, Lindner S, Bohrer A, Maurer, J, Preter K de, Lefever S, Heukamp L, Schulte S, Molenaar J, Versteeg R (2013 a): MYCN and ALK F1174L are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells. *Oncogene* 32 (8), 1059–1065
- Schulte J H, Schulte S, Heukamp L C, Astrahantseff K, Stephan H, Fischer M, Schramm A, Eggert A (2013 b): Targeted Therapy for Neuroblastoma: ALK Inhibitors. *Klin Padiatr* 225 (6), 303–308
- Seeger R C, Brodeur G M, Sather H, Dalton A, Siegel S E, Wong K Y, Hammond D (1985): Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313 (18), 1111–1116
- Segerstrom L, Baryawno N, Sveinbjornsson B, Wickstrom M, Elfman L, Kogner P, Johnsen J I (2011): Effects of small molecule inhibitors of PI3K/Akt/mTOR signaling on neuroblastoma growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 129 (12), 2958–2965
- Shi X, Tian B, Ma C, Liu L, Zhang N, Na Y, Li J, Lu J, Qiao Y (2017): GSK3beta activity is essential for senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) formation induced by HMGA2 in WI38 cells. *Am J Transl Res* 9 (1), 167–174

- Siaw J T, Wan H, Pfeifer K, Rivera V M, Guan J, Palmer R H, Hallberg B (2016): Brigatinib, an anaplastic lymphoma kinase inhibitor, abrogates activity and growth in ALK-positive neuroblastoma cells, *Drosophila* and mice. *Oncotarget* 7 (20), 29011–29022
- Siewert J R, Rothmund M, Schumpelick V: *Praxis der Viszeralchirurgie Onkologische Chirurgie*. 3. Auflage; Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2010
- Singh R R, Cho-Vega J H, Davuluri Y, Ma S, Kasbidi F, Milito C, Lennon P A, Drakos E, Medeiros L J, Luthra R (2009): Sonic hedgehog signaling pathway is activated in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res* 69 (6), 2550–2558
- Soda M, Choi Y L, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S-I, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H (2007): Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448 (7153), 561–566
- Sopko R, Perrimon N. (2013): Receptor tyrosine kinases in *Drosophila* development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (6). DOI: 10.1101/cshperspect.a009050
- Soriano J, Mora-Espi I, Alea-Reyes M E, Perez-Garcia L, Barrios L, Ibanez E, Nogues C (2017): Cell Death Mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral Human Cell Lines Triggered by Photodynamic Treatments: Apoptosis, Necrosis and Parthanatos. *Sci Rep* 7, 41340
- Sparks C A, Guertin D A (2010): Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. *Oncogene* 29 (26), 3733–3744
- Sridhar S, Al-Moallem B, Kamal H, Terrile M, Stallings R L (2013): New insights into the genetics of neuroblastoma. *Mol Diagn Ther* 17 (2), 63–69
- Stephanou A, Latchman D S (2003): STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *Int J Exp Pathol* 84 (6), 239–244
- Stewart J E, Ma X, Megison M, Nabers H, Cance W G, Kurenova E V, Beierle E A (2015): Inhibition of FAK and VEGFR-3 binding decreases tumorigenicity in neuroblastoma. *Mol Carcinog* 54 (1), 9–23
- Stoica G E, Kuo A, Aigner A, Sunitha I, Souttou B, Malerczyk C, Caughey D J, Wen D, Karavanov A, Riegel A T, Wellstein A (2001): Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem* 276 (20), 16772–16779
- Stoica G E, Kuo A, Powers C, Bowden E T, Sale E B, Riegel A T, Wellstein A (2002): Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem* 277 (39), 35990–35998
- Storhas W, Behrendt U, Rubbeling H, Wiedemann P: *Bioverfahrensentwicklung*. 2. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2013
- Takagi D, Tatsumi Y, Yokochi T, Takatori A, Ohira M, Kamijo T, Kondo S, Fujii Y, Nakagawara A (2013): Novel adaptor protein Shf interacts with ALK receptor and negatively regulates its downstream signals in neuroblastoma. *Cancer Sci* 104 (5), 563–572
- Terui E, Matsunaga T, Yoshida H, Kouchi K, Kuroda H, Hishiki T, Saito T, Yamada S-I, Shirasawa H, Ohnuma N (2005): Shc family expression in neuroblastoma: high expression of shcC is associated with a poor prognosis in advanced neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 11 (9), 3280–3287
- Tezuka K, Takeshita S, Hakeda Y, Kumegawa M, Kikuno R, Hashimoto-Gotoh T (1990): Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 173 (1), 246–251

- Thedieck K, Polak P, Kim M L, Molle K D, Cohen A, Jenó P, Arriemerlou C, Hall M N (2007): PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One* 2 (11), e1217
- Thomas G (1982): The effect of serum, EGF, PGF2 α and insulin on S6 phosphorylation and the initiation of protein and DNA synthesis. *Cell* 30 (1), 235–242
- Thomas S M, Brugge J S (1997): Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513–609
- Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K (2014): Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res* 74 (14), 3790–3801
- Tomomura M, Kadomatsu K, Matsubara S, Muramatsu T (1990): A retinoic acid-responsive gene, MK, found in the teratocarcinoma system. Heterogeneity of the transcript and the nature of the translation product. *J Biol Chem* 265 (18), 10765–10770
- Trubicka J, Szperl M, Grajkowska W, Karkucinska-Wieckowska A, Tarasinska M, Falana K, Dembowska-Baginska B, Lastowska M (2016): Identification of a novel inherited ALK variant M1199L in the WNT type of medulloblastoma. *Folia Neuropathol* 54 (1), 23–30
- Turck F, Kozma S C, Thomas G, Nagy F (1998): A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70s6k function in vivo. *Mol Cell Biol* 18 (4), 2038–2044
- Turkson J, Jove R. (2000): STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 19 (56), 6613–6626
- Ueda T, Nakata Y, Yamasaki N, Oda H, Sentani K, Kanai A, Onishi N, Ikeda K, Sera Y, Honda Z-I (2016): ALK(R1275Q) perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. *Oncogene* 35 (34), 4447–4458
- Uehara K, Matsubara S, Kadomatsu K, Tsutsui J-I, Muramatsu T (1992): Genomic Structure of Human Midkine (MK), a Retinoic Acid-Responsive Growth/Differentiation Factor 1. *J Biochem* 111 (5), 563–567
- Ullrich A, Schlessinger J (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61 (2), 203–212
- van Munster E B, Gadella T W J: Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), In: Rietdorf J (Hrsg.): *Microscopy techniques*. Springer, Berlin Heidelberg 2005, 145-175
- van Munster E B, Kremers G J, Adjobo-Hermans M J W, Gadella T W J Jr (2005): Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching. *J Microsc* 218 (Pt 3), 253–262
- van Roy N, Preter K de, Hoebeeck J, van Maerken T, Pattyn F, Mestdagh P, Vermeulen J, Vandesompele J, Speleman F (2009): The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assessment and targeted therapy. *Genome Med* 1 (7), 74
- Vander Haar E, Lee S-I, Bandhakavi S, Griffin T J, Kim D-H (2007): Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 9 (3), 316–323
- Vandesompele J, Baudis M, Preter K de, van Roy N, Ambros P, Bown N, Brinkschmidt C, Christiansen H, Combaret V, Lastowska M (2005): Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 23 (10), 2280–2299

- Vernersson E, Khoo N K S, Henriksson M L, Roos G, Palmer R H, Hallberg B (2006): Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice. *Gene Expr Patterns* 6 (5), 448–461.
- Versteeg R, George R E (2016): Targeting ALK: The Ten Lives of a Tumor. *Cancer Discov* 6 (1), 20–21
- Vieira G C, Chockalingam S, Melegh Z, Greenhough A, Malik S, Szemes M, Park J H, Kaidi A, Zhou L, Catchpoole D (2015): LGR5 regulates pro-survival MEK/ERK and proliferative Wnt/beta-catenin signalling in neuroblastoma. *Oncotarget* 6 (37), 40053–40067
- Vigers G P, Coue M, McIntosh J R (1988): Fluorescent microtubules break up under illumination. *J Cell Biol* 107 (3), 1011–1024
- Vigny M, Raulais D, Puzenat N, Duprez D, Hartmann M P, Jeanny J C, Courtois Y (1989): Identification of a new heparin-binding protein localized within chick basement membranes. *Eur J Biochem* 186 (3), 733–740
- Vishwamitra D, Li Y, Wilson D, Manshour R, Curry C V, Shi B, Tang X M, Sheehan A M, Wistuba I I, Shi P (2012): MicroRNA 96 is a post-transcriptional suppressor of anaplastic lymphoma kinase expression. *Am J Pathol* 180 (5), 1772–1780
- Vita M, Henriksson M. (2006): The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 16 (4), 318–330
- Vögtle F, Richardt G, Werner N: Dendritische Moleküle Konzepte, Synthesen, Eigenschaften, Anwendungen. B.G. Teubner Verlag, Wiesbaden 2007
- von Schweinitz D, Ure B: Kinderchirurgie Viszerale und allgemeine Chirurgie des Kindesalters. 2. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2013
- Wang L, Harris T E, Roth R A, Lawrence J C Jr (2007): PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem* 282 (27), 20036–20044
- Wang Y, Wang L, Guan S, Cao W, Wang H, Chen Z, Zhao Y, Yu Y, Zhang H, Pang J C (2016): Novel ALK inhibitor AZD3463 inhibits neuroblastoma growth by overcoming crizotinib resistance and inducing apoptosis. *Sci Rep* 6, 19423
- Wang YW, Tu PH, Lin KT, Lin SC, Ko JY, Jou YS (2011): Identification of oncogenic point mutations and hyperphosphorylation of anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Neoplasia* 13 (8), 704–715
- Webb T R, Slavish J, George R E, Look A T, Xue L, Jiang Q, Cui X, Rentrop W B, Morris S W (2009): Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 9 (3), 331–356
- Wegerhoff R: Mikroskopische Verfahren. In: - Mulisch M, Welsch U (Hrsg.): Romeis Mikroskopische Technik - Mulisch M, Welsch U. 19. Auflage; Springer, Berlin Heidelberg 2015, 1-42
- Weiser D, Laudenslager M, Rappaport E, Carpenter E, Attiyeh E F, Diskin S, London W B, Maris J M, Mosse Y P (2011): Stratification of patients with neuroblastoma for targeted ALK inhibitor therapy. *J Clin Oncol* 29 (15 suppl), 9514
- Wellstein A, Toretsky J A (2011): Hunting ALK to feed targeted cancer therapy. *Nat Med* 17 (3), 290–291
- Westermark U K, Wilhelm M, Frenzel A, Henriksson M A (2011): The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 21 (4), 256–266

- Wiesenhofer B, Humpel C. (2000): Lipid-mediated gene transfer into primary neurons using FuGene: comparison to C6 glioma cells and primary glia. *Exp Neurol* 164 (1), 38–44
- Winter P S, Sarosiek K A, Lin K H, Meggendorfer M, Schnittger S, Letai A, Wood K C (2014): RAS signaling promotes resistance to JAK inhibitors by suppressing BAD-mediated apoptosis. *Sci Signal* 7 (357), ra122
- Wood A C, Laudenslager M, Haglund E A, Attiyeh E F, Pawel B, Courtright J, Plegaria J, Christensen J G, Maris J M, Mosse Y P (2009): Inhibition of ALK mutated neuroblastomas by the selective inhibitor PF-02341066. *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 10008b), 521s
- Wouters F S, Bastiaens P I (1999): Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells. *Curr Biol* 9 (19), 1127–1130
- Wouters F S, Bastiaens P I, Wirtz K W, Jovin T M (1998): FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. *EMBO J* 17 (24), 7179–7189
- Wouters F S, Verveer P J, Bastiaens P I (2001): Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol* 11 (5), 203–211
- Xiong X, Xie R, Zhang H, Gu L, Xie W, Cheng M, Jian Z, Kovacina K, Zhao H (2014): PRAS40 plays a pivotal role in protecting against stroke by linking the Akt and mTOR pathways. *Neurobiol Dis* 66, 43–52
- Xu Y, Fisher G J (2012): Receptor type protein tyrosine phosphatases (RPTPs) - roles in signal transduction and human disease. *J Cell Commun Signal* 6 (3), 125–138
- Yao S, Cheng M, Zhang Q, Wasik M, Kelsh R, Winkler C (2013): Anaplastic lymphoma kinase is required for neurogenesis in the developing central nervous system of zebrafish. *PLoS One* 8 (5), e63757
- Yu A L, Gilman A L, Ozkaynak M F, London W B, Kreissman S G, Chen H X, Smith M, Anderson B, Villablanca J G, Matthay K K (2010): Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* 363 (14), 1324–1334
- Zamo A, Chiarle R, Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosi M, Levy D E, Inghirami G (2002): Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* 21 (7), 1038–1047
- Zhang H, Pao L I, Zhou A, Brace A D, Halenbeck R, Hsu A W, Bray T L, Hestir K, Bosch E, Lee E (2014): Deorphanization of the human leukocyte tyrosine kinase (LTK) receptor by a signaling screen of the extracellular proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (44), 15741–15745
- Zhang H, Xiong Z, Wang J, Zhang S, Lei L, Yang L, Zhang Z (2016): Glucagon-like peptide-1 protects cardiomyocytes from advanced oxidation protein product-induced apoptosis via the PI3K/Akt/Bad signaling pathway. *Mol Med Rep* 13 (2), 1593–1601
- Zhao Z, Verma V, Zhang M (2015): Anaplastic lymphoma kinase: Role in cancer and therapy perspective. *Cancer Biol Ther* 16 (12), 1691–1701
- Zins K, Kovatchki D, Lucas T, Abraham D (2016): PlGF and VEGF-A Regulate Growth of High-Risk MYCN-Single Copy Neuroblastoma Xenografts via Different Mechanisms. *Int J Mol Sci* 17 (10) DOI: 10.3390/ijms17101613.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini D M (2011): mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12 (1), 21–35

Zou H Y, Li Q, Lee J H, Arango M E, McDonnell S R, Yamazaki S, Koudriakova T B, Alton G, Cui J J, Kung P-P (2007): An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* 67 (9), 4408–4417

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Lösungen für Zellkultur	21
Tab. 2: Fixierlösung	21
Tab. 3: Chemikalien für die Transfektion	21
Tab. 4: Puffer und Lösungen für die Immunofluoreszenzfärbung.....	22
Tab. 5: Kulturmedien	22
Tab. 6: Zellinhibitoren.....	22
Tab. 7: Antikörper und Farbstoffe.....	23
Tab. 8: Spezielle Reagenzien und Kits.....	23
Tab. 9: Zubehör	24
Tab. 10: Spezielle Geräte und zugehörige Computersoftware.....	24
Tab. 11: Weitere Computersoftware und Internetadressen	24
Tab. 12: Exemplarische Auszählung für die Ermittlung der Transfektionseffizienz.....	34
Tab. 13: Rangliste der prozentualen Aktivität der Signalmoleküle an der Gesamtaktivität	87
Tab. 14: Übersicht über die wichtigsten Eckdaten der Ergebnisse der untersuchten ALK-Subtypen.....	94

7.2 Formelverzeichnis

Formel 1: Formel zur Berechnung der FRET-Effizienz	30
Formel 2: Ermittlung der Transfektionseffizienz.....	34
Formel 3: Exemplarische Errechnung der Transfektionseffizienz anhand der Mutante F1174L	34
Formel 4: Berechnung der Proteinkonzentration	35

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Donor prebleached	28
Abb. 2 Donor postbleached.....	28
Abb. 3: Acceptor prebleached	28
Abb. 4: Acceptor postbleached	28
Abb. 5: GFP-Fluoreszenzkanal im Weitfeldmikroskop.....	29
Abb. 6: Cy3-Fluoreszenzkanal im Weitfeldmikroskop.....	29
Abb. 7: Wildtyp-ALK-SK-N-AS-Zellen der ersten Versuchsdurchführung	30
Abb. 8: Wildtyp-ALK-SK-N-AS-Zellen der zweiten Versuchsdurchführung	30
Abb. 9: Wildtyp-ALK-SK-N-AS-Zellen der dritten Versuchsdurchführung	30
Abb. 10: Wildtyp-ALK-SK-N-AS-Zellen der vierten Versuchsdurchführung.....	30
Abb. 11: Datenblatt einer FRET-Auswertung.....	31
Abb. 12: Blickfeld 15 aus F1174L-ALK-Zellen.....	33
Abb. 13: Blickfeld 15 aus F1174L-ALK-Zellen nach Bildbearbeitung zur Auszählung der Transfektionseffizienz.....	33
Abb. 14: Overlay von Abb. 12 und Abb. 13	33
Abb. 15: Schema der Auftragung unsortierter Proben auf den Pathscan Array Slide	35

Abb. 16: Fuoresent Readout des Pathscan Array Slides (unsortierte Lysate).....	36
Abb. 17: Pathscan Array Slide mit Orientierungshilfen	37
Abb. 18: FACS-Datenblatt für Wildtyp-ALK-Zellen	38
Abb. 19: FACS-Datenblatt für F1174L-ALK-Zellen.....	39
Abb. 20: Schema der Auftragung sortierter Proben auf den Pathscan Array Slide	39
Abb. 21: Fuoresent Readout des Pathscan Array Slides (sortierte Lysate).....	40
Abb. 22: Streudiagramm: Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen	43
Abb. 23: Vergrößerter Ausschnitt des Streudiagramms für Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen	43
Abb. 24: Kartiertes Streudiagramm für Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen.....	44
Abb. 25: Zwei Wildtyp-ALK exprimierende SK-N-AS-Zellen (GFP-Fluoreszenzkanal)	45
Abb. 26: Zwei Wildtyp-ALK exprimierende SK-N-AS-Zellen (Cy3-Fluoreszenzkanal).....	45
Abb. 27: Streudiagramm für Wildtyp-ALK in NIH/3T3-Zellen.....	45
Abb. 28: Overlay der Streudiagramme für Wildtyp-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen	46
Abb. 29: Vergrößerung des Overlays der Streudiagramme für Wildtyp-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen.....	46
Abb. 30: Streudiagramm: F1174L-ALK in SK-N-AS-Zellen	47
Abb. 31: Vergrößerter Ausschnitt des Overlays der Streudiagramme für F1174L- und Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen.....	47
Abb. 32: Overlay der Streudiagramme für F1174L- und Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen.	48
Abb. 33: Overlay der Streudiagramme für F1174L-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen.	48
Abb. 34: Streudiagramm: R1275Q-ALK in SK-N-AS-Zellen.....	49
Abb. 35: Overlay der Streudiagramme für R1275Q- und Wildtyp-ALK	49
Abb. 36: Overlay der Streudiagramme für R1275Q- und F1174L-ALK.....	49
Abb. 37: Kartiertes Streudiagramm für R1275Q-ALK in SK-N-AS-Zellen mit vergrößertem Ordinatenabschnitt	50
Abb. 38: Vergrößerter Ausschnitt des Streudiagramms für R1275Q-ALK in SK-N-AS-Zellen	50
Abb. 39: Overlay der Streudiagramme für R1275Q-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen	51
Abb. 40: Vergrößerter Ordinatenabschnitt des Overlays der Streudiagramme für R1275Q- ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen.....	51
Abb. 41: Streudiagramm: Y1604F-ALK in SK-N-AS-Zellen.....	52
Abb. 42: Overlay der Streudiagramme für Y1604F- und Wildtyp-ALK in SK-N-AS-Zellen	52
Abb. 43: Vergrößerter Ausschnitt des Streudiagramms für Y1604F-ALK in SK-N-AS-Zellen	53
Abb. 44: Overlay der Streudiagramme für Y1604F- und F1174L-ALK	53
Abb. 45: Overlay der Streudiagramme für Y1604F- und R1275Q-ALK	53
Abb. 46: Overlay der Streudiagramme für Y1604F-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen	54
Abb. 47: Streudiagramm: I1250T-ALK in SK-N-AS-Zellen	54
Abb. 48: Vergrößerter Ausschnitt des Streudiagramms für I1250T-ALK in SK-N-AS-Zellen	55
Abb. 49: Overlay der Streudiagramme für I1250T- und Wildtyp-ALK	56
Abb. 50: Overlay der Streudiagramme für I1250T- und F1174L-ALK	56
Abb. 51: Overlay der Streudiagramme für I1250T- und Y1604F-ALK	56
Abb. 52: Overlay der Streudiagramme für I1250T- und R1275Q-ALK.....	56
Abb. 53: Vergrößerter Ordinatenabschnitt des Overlays der Streudiagramme für I1250T- und Wildtyp-ALK	57
Abb. 54: Vergrößerter Ordinatenabschnitt des Overlays der Streudiagramme für I1250T- und F1174L-ALK.....	57
Abb. 55: Vergrößerter Ordinatenabschnitt des Overlays der Streudiagramme für I1250T- und Y1604F-ALK	57

Abb. 56: Vergrößerter Ordinatenabschnitt des Overlays der Streudiagramme für I1250T- und R1275Q-ALK.....	57
Abb. 57: Overlay der Streudiagramme für I1250T-ALK in SK-N-AS und NIH/3T3-Zellen .	58
Abb. 58: Vergleichender Überblick über alle Streudiagramme.....	58
Abb. 59: Overlay der Streudiagramme aller untersuchten ALK-Subtypen	59
Abb. 60: FRET-Effizienzen der Wildtyp-ALK-Zellen.....	61
Abb. 61: FRET-Effizienzen der F1174L-ALK-Zellen.....	61
Abb. 62: FRET-Effizienzen der Y1604F-ALK-Zellen.....	61
Abb. 63: FRET-Effizienzen der R1275Q-ALK-Zellen.....	61
Abb. 64: Histogramm der gemittelten FRET-Werte der ALK-Subtypen	62
Abb. 65: Korrelation des FRET-Histogramms mit den Streudiagrammen.....	63
Abb. 66: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	65
Abb. 67: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	65
Abb. 68: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	65
Abb. 69: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	65
Abb. 70: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	65
Abb. 71: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	65
Abb. 72: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	65
Abb. 73: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	65
Abb. 74: Wildtyp-ALK-exprimierende SK-N-AS-Zellen.....	66
Abb. 75: Wildtyp-ALK-exprimierende SK-N-AS-Zellen.....	66
Abb. 76: Wildtyp-ALK-exprimierende SK-N-AS-Zellen.....	66
Abb. 77: Vakuolen in Wildtyp-ALK-Zellen	66
Abb. 78: Vakuolen in Wildtyp-ALK-Zellen	66
Abb. 79: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop	67
Abb. 80: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop	67
Abb. 81: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop	67
Abb. 82: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop	67
Abb. 83: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop	67
Abb. 84: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop	67
Abb. 85: GFP-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop	67
Abb. 86: Cy3-Signal einer Wildtyp-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop	67
Abb. 87: Z-Stack einer Wildtyp-ALK-Zelle (GFP-Bild).....	68
Abb. 88: Z-Stack einer Wildtyp-ALK-Zelle (Cy3-Bild).....	68
Abb. 89: GFP-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop.....	69
Abb. 90: Cy3-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop.....	69
Abb. 91: GFP-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop.....	69
Abb. 92: Cy3-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop.....	69
Abb. 93: GFP-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop.....	69
Abb. 94: Cy3-Signal einer F1174L-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop.....	69
Abb. 95: Fluoreszenz-Konglomerat in einer F1174L-ALK-Zelle (GFP-Bild)	69
Abb. 96: Fluoreszenz-Konglomerat in einer F1174L-ALK-Zelle (Cy3-Bild).....	69
Abb. 97: Übereinander wachsende F1174L-ALK-Zellen.....	70
Abb. 98: Übereinander wachsende F1174L-ALK-Zellen.....	70
Abb. 99: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)	70
Abb. 100: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild)	70
Abb. 101: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)	70
Abb. 102: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild)	70
Abb. 103: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)	70
Abb. 104: F1174L-ALK-Zellen im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild)	70
Abb. 105: Z-Stack einer F1174L-ALK-Zelle (GFP-Signal).....	71

Abb. 106: Z-Stack einer F1174L-ALK-Zelle (Cy3-Signal).....	71
Abb. 107: GFP-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	72
Abb. 108: Cy3-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop.....	72
Abb. 109: GFP-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	72
Abb. 110: Cy3-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop.....	72
Abb. 111: GFP-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	72
Abb. 112: Cy3-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop.....	72
Abb. 113: GFP-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	72
Abb. 114: Cy3-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop.....	72
Abb. 115: GFP-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	72
Abb. 116: Cy3-Signal einer R1275Q-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop.....	72
Abb. 117: Perinukleär akkumulierte Fluoreszenz in R1275Q-ALK-Zellen (GFP-Bild)	73
Abb. 118: Perinukleär akkumulierte Fluoreszenz in R1275Q-ALK-Zellen (Cy3-Bild).....	73
Abb. 119: Perinukleär akkumulierte Fluoreszenz in R1275Q-ALK-Zellen (GFP-Bild).....	73
Abb. 120: Perinukleär akkumulierte Fluoreszenz in R1275Q-ALK-Zellen (Cy3-Bild).....	73
Abb. 121: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (GFP-Signal)	73
Abb. 122: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (Cy3-Signal).....	73
Abb. 123: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (GFP-Signal)	73
Abb. 124: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (Cy3-Signal).....	73
Abb. 125: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (GFP-Signal)	73
Abb. 126: Übereinander wachsende R1275Q-Zellen (Cy3-Signal).....	73
Abb. 127: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Kanal).....	74
Abb. 128: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Kanal).....	74
Abb. 129: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Kanal).....	74
Abb. 130: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Kanal).....	74
Abb. 131: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Kanal).....	74
Abb. 132: R1275Q-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Kanal).....	74
Abb. 133: Z-Stack einer R1275Q-ALK-Zelle (GFP-Signal)	75
Abb. 134: Z-Stack einer R1275Q-ALK-Zelle (Cy3-Signal).....	75
Abb. 135: GFP-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	76
Abb. 136: Cy3-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	76
Abb. 137: GFP-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	76
Abb. 138: Cy3-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	76
Abb. 139: GFP-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	76
Abb. 140: Cy3-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	76
Abb. 141: GFP-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	76
Abb. 142: Cy3-Signal einer Y1604F-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop	76
Abb. 143: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)	77
Abb. 144: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild).....	77
Abb. 145: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Bild).....	77
Abb. 146: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild).....	77
Abb. 147: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Bild).....	77
Abb. 148: Y1604F-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild).....	77
Abb. 149: Z-Stack einer Y1604F-ALK-Zelle (GFP-Fluoreszenz)	78
Abb. 150: Z-Stack einer Y1604F-ALK-Zelle (Cy3-Fluoreszenz)	78
Abb. 151: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (GFP-Signal)	79
Abb. 152: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (Cy3P-Signal).....	79
Abb. 153: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (GFP-Signal)	79
Abb. 154: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (Cy3P-Signal).....	79
Abb. 155: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (GFP-Signal)	79
Abb. 156: I1250T-ALK-Zelle im Weitfeldmikroskop (Cy3P-Signal).....	79

Abb. 157: Übereinander wachsende I1250T-ALK-Zellen (GFP-Fluoreszenz).....	80
Abb. 158: Übereinander wachsende I1250T-ALK-Zellen (Cy3-Fluoreszenz).....	80
Abb. 159: Übereinander wachsende I1250T-ALK-Zellen (GFP-Fluoreszenz).....	80
Abb. 160: Übereinander wachsende I1250T-ALK-Zellen (Cy3-Fluoreszenz).....	80
Abb. 161: I1250T-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)	80
Abb. 162: I1250T-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild).....	80
Abb. 163: I1250T-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (GFP-Bild)	80
Abb. 164: I1250T-ALK-Zelle im Konfokalmikroskop (Cy3-Bild).....	80
Abb. 165: Z-Stack einer I1250T-ALK-Zelle (GFP-Kanal).....	81
Abb. 166: Z-Stack einer I1250T-ALK-Zelle (Cy3-Kanal)	81
Abb. 167: Säulendiagramm der Ergebnisse des Pathscan-Versuchs mit unsortierten Lysaten	82
Abb. 168: Diagramm der Quotienten aus den Mutante und untransfizierten Zellen für jedes Signalmolekül.....	83
Abb. 169: Säulendiagramm der Ergebnisse des Pathscan-Versuchs mit sortierten Lysaten: GFP-negative Zellen	84
Abb. 170: Säulendiagramm der Ergebnisse des Pathscan-Versuchs mit sortierten Lysaten: GFP-positive Zellen	85
Abb. 171: Kreisdiagramm der Aktivität der Signalmoleküle in Wildtyp-ALK-Zellen	86
Abb. 172: Kreisdiagramm der Aktivität der Signalmoleküle in F1174L-ALK-Zellen.....	86
Abb. 173: Kreisdiagramm der Aktivität der Signalmoleküle in I1250T-ALK-Zellen	86
Abb. 174: Overlay von unbehandelten Wildtyp-ALK-Zellen(schwarz) und mit ERK-Inhibitor versetzten Wildtyp-ALK-Zellen (gelb).....	89
Abb. 175: Mit ERK-Inhibitor versetzte Wildtyp-ALK-Zellen	89
Abb. 176: Unbehandelte Wildtyp-ALK-Zellen.....	89
Abb. 177: Overlay von unbehandelten F1174L-ALK-Zellen(rot) und mit ERK1/2-Inhibitor versetzten F1174L-ALK-Zellen (gelb)	90
Abb. 178: Mit ERK1/2-Inhibitor versetzte F1174L-ALK-Zellen.....	90
Abb. 179: Unbehandelte F1174L-ALK-Zellen.....	90
Abb. 180: Overlay von unbehandelten R1275Q-ALK-Zellen(blau) und mit ERK1/2-Inhibitor versetzten R1275Q-ALK-Zellen (gelb)	91
Abb. 181: Mit ERK1/2-Inhibitor versetzte R1275Q-ALK-Zellen.....	91
Abb. 182: Unbehandelte R1275Q-ALK-Zellen	91
Abb. 183: Overlay von unbehandelten Y1604F-ALK-Zellen(violett) und mit ERK1/2-Inhibitor versetzten Y1604F-ALK-Zellen (gelb).....	92
Abb. 184: Mit ERK1/2-Inhibitor versetzte Y1604F-ALK-Zellen	92
Abb. 185: Unbehandelte Y1604F-ALK-Zellen.....	92
Abb. 186: Overlay von I1250T-Zellen mit(gelb) und ohne(grün) ERK1/2-Inhibitor.....	92
Abb. 187: Overlay von unbehandelten I1250T-ALK-Zellen(grün) und mit ERK1/2-Inhibitor versetzten I1250T-ALK-Zellen (gelb) mit vergrößertem Ordinatenabschnitt.....	93
Abb. 188: Mit ERK1/2-Inhibitor versetzte I1250T-ALK-Zellen.....	93
Abb. 189: Unbehandelte I1250T-ALK-Zellen.....	93
Abb. 190: © 2012 CPS and SIMM, entnommen aus Pal und Mandal (2012) mit Genehmigung der Nature Publishing Group und modifiziert: Akt-Signalisierung	105
Abb. 191: © 2012 Cold Spring Harbor Laboratory Press, entnommen aus Hung et al. (2012) mit Genehmigung der Cold Spring Harbour Laboratory Press: mTOR-Signalisierung	107

Wiedergegebene Abbildungen:

Abbildung 190: © 2012 CPS and SIMM; Der Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Abbildung 191: © 2012 Cold Spring Harbor Laboratory Press; Der Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Fred Wouters und Dr. Gertrude Bunt für die Ermöglichung dieses Projekts. Besonders die stete und geduldige Vermittlung theoretischer Hintergründe machten meine Zeit im Labor zu einer einmaligen und lehrreichen Erfahrung. Zudem bin ich sehr dankbar für das entgegengebrachte Vertrauen im Umgang mit dem Labor und den Mikroskopen. Vor allem in der passenden Balance zwischen Freiheit zum selbstständigen Arbeiten, aber dennoch Hilfestellung bei jedweder Problematik konnte ich mich voll entfalten. Zur Unterstützung hinsichtlich des praktischen Know-hows sowie der vorbehaltlosen Aufnahme in das Team geht mein herzlicher Dank vor allem an René Ebrecht, sowie an Katrina Don Paul, Craig Don Paul, Dr. Robert Ventzki, Mirja Fülle und Ute Eilers.

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 19. Juli 1988 in Bamberg als Tochter von Jutta Mohr und Joachim Aksak. Nach meiner Grundschulzeit besuchte ich bis 2004 das Gymnasium der Englischen Fräulein Bamberg und anschließend das Dientzenhofer Gymnasium Bamberg, an welchem ich 2008 das Abitur erwarb. Nach einer begonnenen Ausbildung zur medizinisch-technischen Laborassistentin begann ich im April 2010 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Dieses habe ich im November 2016 erfolgreich beendet.