

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg Essen**

Aus der Klinik für Kinderheilkunde III
Pädiatrische Hämatologie/Onkologie, Kardiologie und Pulmologie
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

**Der niedrigaffine Neurotrophinrezeptor p75NTR reduziert
die Tumorigenität des Neuroblastoms *in vitro* und *in vivo***

**Inaugural Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen**

**Vorgelegt von
Falk Manuel Christopher Pentek
aus Essen**

2013

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. H. Schulte

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. L. Klein-Hitpass

Tag der mündlichen Prüfung: 17. September 2013

Meinen Eltern.

In den folgenden Original-Veröffentlichungen sind Teile dieser Arbeit enthalten.

Es sei darauf hingewiesen, dass aus Gründen der Übersichtlichkeit nur dann eine Zitierung dieser Arbeiten erfolgt, wenn aus bestimmten Gründen der Bezug besonders hervorgehoben werden soll, nicht aber, wenn diese Texte in sinngemäßer oder abgewandelter, d.h. auch übersetzter Form Eingang in diese Arbeit gefunden haben.

Johannes H. Schulte, **Falk Pentek**, Wolfgang Hartmann, Alexander Schramm, Nicolaus Friedrichs, Ingrid Øra, Jan Koster, Rogier Versteeg, Jutta Kirfel, Reinhard Buettner, Angelika Eggert. *The Low-Affinity Neurotrophin Receptor, P75NTR, is Upregulated in Ganglioneuroblastoma / Ganglioneuroma and Reduces Tumorigenicity of Neuroblastoma Cells in Vivo.* Int J Cancer. 2009 May 15;124(10):2488-94.

Falk Pentek, Stefanie Schlierf, Anna Bohrer, Melanie Baumann, Alexander Schramm, Angelika Eggert und Johannes H. Schulte. Der Rezeptor p75NTR reduziert die Fähigkeit von Neuroblastomzellen, Tumoren auszulösen. *GenomXPress* 2009; 1.09: 15-16

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1. Einleitung	8
1.1. Neuroblastische Tumoren	8
1.1.1. Epidemiologie	8
1.1.2. Klinik und Diagnostik	9
1.1.3. Staging	11
1.1.4. Tumor Histologie	12
1.1.5. Biologie	12
MYCN Amplifikation	12
DNA-Gehalt	12
Trisomie 17q	13
Deletion 1p	13
Allelverlust 11q	13
Expression von Neurotrophinrezeptoren	13
Expression von bekannten Tumorgenen	14
1.1.6. Risikostratifizierung	14
1.1.7. Therapie und Prognose	15
1.1.8. Genetisches Modell der Neuroblastomentwicklung	16
1.2. Die Stammzelltheorie bei Tumoren	18
1.3. Der Neurotrophinrezeptor p75 (p75NTR)	19
1.3.1 Aufbau des p75NTR	19
1.3.2. Korezeptoren und Liganden von p75NTR	20
TrkA	20
Sortilin und pro-NGF	21
Nogo- und Lingo-Rezeptor	21
P75NTR ohne Co-Rezeptor	21
1.3.3. Aktivierte Signalwege und –kaskaden	22
1.3.4. Nerve Growth Factor (NGF)	23
1.3.5. Physiologische und pathophysiologische Funktionen von p75NTR	24
p75NTR im Neuroblastom	24

1.4. Ziele der aktuellen Studie	26
Wie wird p75NTR in primären Neuroblastomen exprimiert?	26
Exprimieren Neuroblastomzelllinien p75NTR <i>in vitro</i> ?	26
Wie verändert sich die Zellbiologie durch Expression von p75NTR?	26
Hat die Expression von p75NTR Einfluss auf die Tumorigenität von Neuroblastomzellen?	26
Gibt es Hinweise auf p75NTR-positive Neuroblastomstammzellen?	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Material	27
2.1.1. Zellkultur	27
2.1.2. Selektionsantibiotika	27
2.1.3. Verbrauchsmaterialien	27
2.1.4. Chemikalien	28
2.1.5. Enzyme	29
2.1.6. Verwendete Antikörper	29
2.1.7. Verwendete Lösungen und Puffer	29
2.1.8. Verwendete Kits	30
2.1.9. Verwendete Geräte	30
2.1.10. Verwendete Zellen und Zelllinien	31
2.2. Methoden	33
2.2.1. Zellkultur	33
2.2.2. Passagierung von Zellen	33
2.2.3. Kryokonservierung	33
2.2.4. Auftauen	34
2.2.5. Mykoplasmentest	34
2.2.6. MTT Proliferationsassay	34
2.2.7. RNA-Isolierung	34
2.2.8. Reverse Transkription	35
2.2.9. Semiquantitative PCR	35
2.2.10. Restriktionsverdau von Plasmiden	36
2.2.11. Gelelektrophorese	36
2.2.12. Vermehrung von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i> durch Transformation	37
2.2.13. Präparation von DNA aus <i>E coli</i>	38
2.2.14. Anlegen von Glycerinstocks	38
2.2.15. Elektroporation von Plasmid-DNA	39
2.2.16. Zelldurchflusszytometrie	39
2.2.17. Zellzyklusanalyse	39

2.2.18. BrdU-Assay	40
2.2.19. Annexin-V-Assay	40
2.2.20. Herstellung von Zellextrakten für Western Blot	40
2.2.21. Proteinbestimmung nach Bradford	41
2.2.22. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.2.23. Western Blot	41
2.2.24. Immunhistochemie	42
2.2.25. <i>In vivo</i> Versuche an Nacktmäusen	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Expression des p75NTR Proteins in primären Neuroblastomen	44
3.2. Expression der p75NTR mRNA in primären Neuroblastomen	46
3.3. Expression von p75NTR in Neuroblastom-Zelllinien	47
3.4. Auswirkung der ektope p75NTR-Expression auf SY5Y-Neuroblastomzellen	47
3.5. Tumorigenität p75NTR-transfizierter Neuroblastomzellen <i>in vivo</i>	51
4. Diskussion	52
4.1. Die p75NTR-Expression korreliert mit dem Differenzierungsgrad primärer Neuroblastome	52
4.2. Etablierte Neuroblastomzelllinien exprimieren kein p75NTR	53
4.3. Die ektope Expression von p75NTR führt zur Abnahme von Zellviabilität und Induktion von Apoptose	54
4.4. <i>In vivo</i> führt die ektope Überexpression von p75NTR zu einem Verlust der Tumorigenität von SY5Y-Zellen	54
4.5. Die mögliche Rolle von p75NTR für die Neuroblastom-Pathogenese und in Neuroblastom-Stammzellen	55
5. Zusammenfassung	58
Literaturverzeichnis	59
Abkürzungsverzeichnis	66
Verzeichnis der Tabellen	68
Verzeichnis der Abbildungen	68
Danksagung	70
Anhang	71
Lebenslauf	75

1. Einleitung

1.1. Neuroblastische Tumoren

Virchow beschrieb erstmals 1863 das Neuroblastom als Geschwulst der Nebenniere (Virchow R, 1865). Den Begriff „Neuroblastom“ führte Wright 1910 ein (Wright J, 1920). Die „neuroblastischen Tumoren“ definierte Shimada 1984 als Zusammenfassung des malignen Neuroblastoms selbst und seiner weniger aggressiven Derivate, dem Ganglioneurom und Ganglioneuroblastom (Shimada H, 1984). Das Neuroblastom leitet sich als embryonaler Tumor von primitiven Zellen des postganglionären, sympathischen Nervensystem ab (Maris M, 2006). Von der Neuralleiste ausgehend migrieren diese Zellen während der frühen kindlichen Entwicklung. Entsprechend vielseitig sind die Orte der primären Manifestation: ungefähr die Hälfte aller Neuroblastome entstehen im Nebennierenmark, die andere Hälfte verteilt sich auf die paraspinalen, sympathischen Ganglien der Brust, des Abdomens oder des Beckens (Brodeur GM, 2003). Bemerkenswert ist die Heterogenität des klinischen Auftretens von spontan ausdifferenzierenden oder regredierenden bis hin zu schnell progredienten und metastasierenden Tumoren mit letalem Ausgang. Die unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten der Heilung sind dabei abhängig vom Alter bei Diagnose, Ausbreitung und Biologie des Tumors (Maris M, 2007).

1.1.1. Epidemiologie

Neben Hirntumoren und Leukämien ist das Neuroblastom die dritthäufigste Tumorerkrankung des Kindesalters. Es bedingt mehr als 7% aller malignen Tumoren bei Patienten unter 15 Jahren und ist die Ursache für 15% aller pädiatrisch-onkologischen Todesfälle (Maris M, 2006 und 2007). Es wird am häufigsten im Säuglingsalter, d.h. vor Vollendung des ersten Lebensjahrs diagnostiziert (Gurney JG, 1996). Bei beobachteten Kindern bis zum fünfzehnten Lebensjahr in den USA trat der Großteil von 81,5% vor dem vollendeten fünften Lebensjahr auf, 98% vor dem zehnten Lebensjahr. Es gibt keinen signifikanten Unterschied des Auftretens zwischen den Geschlechtern. Ein krankheitsspezifisches Fünfjahresüberleben kann mit 58% beziffert werden (Grovas A, 1997). Die Prävalenz beträgt 1:7000 Lebendgeborene, die Inzidenz liegt bei 1,4 Erkrankungen auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren (Pizzo PA, 2005). Fälle familiärer Vererbung sind für lediglich 1% bis 2% der Erkrankten beschrieben. Diese werden relativ früh diagnostiziert und zeigen häufig multiple Primärtumoren (Maris M, 2006). Als erste Keimbahnmutation für familiäre Neuroblastomerkrankungen konnten Veränderungen im „Paired-like-homeobox-2B-Gen“ (*PHOX2B*) gezeigt werden (Trochet D, 2004). Vor kurzem wurde außerdem erkannt, dass

Mutationen der anaplastischen-Lymphom-Kinase (ALK) eine sehr häufige Keimbahnveränderung bei hereditären Neuroblastom darstellen (Mossé YP, 2008). 5% der Neuroblastompatienten sind dem Stadium 4S zuzuordnen: Der Tumor bildet sich bei ihnen komplett wieder zurück, selbst wenn er zuvor bereits metastasiert war (D'Angio GJ, 1971).

1.1.2. Klinik und Diagnostik

Das Neuroblastom kann aufgrund seines Ursprungs überall im Bereich des sympathischen Nervensystems auftreten. Anzeichen und Symptome der Erkrankung sind in Folge dessen sehr vielfältig und unspezifisch, abhängig von Sitz und Größe des Primärtumors und etwaigen Metastasen oder paraneoplastischen Erscheinungen.

Ungefähr 40% weisen einen lokalisierten Tumor im Nebennierenmark oder entlang des Grenzstrangs auf. Die Diagnose entsteht dann eher zufällig bei Ultraschalluntersuchungen des Abdomens oder Röntgenaufnahmen des Thorax. Paraspinale Tumoren können durch Einengungen der Foramina intervertebralia die durch sie ziehenden Nervenwurzeln und sogar das Rückenmark selbst verdrängen und somit zu typisch neurologischen Symptomen wie motorischer Schwäche, Schmerzen oder Sensibilitätsausfall führen. Auch das Horner-Syndrom mit Miosis, Ptosis und Enopthalmus ist ein neurologisches Erscheinungsbild, das im Kindesalter an die Diagnose eines Neuroblastoms denken lassen muss. Statistisch weisen bis zu 5% von Kindern mit diagnostiziertem Neuroblastom auch neurologische Symptome auf (De Bernardi B, 2005; Maris M, 2007).

Paraneoplastische Syndrome können durch wässrige Diarrhöen als Folge von übermäßiger VIP-Sekretion (vasoaktives intestinales Peptid) oder durch ein Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom mit der Trias schneller Augenbewegungen, Ataxie und Muskelzuckungen auffällig werden. 70-80% der Patienten mit paraneoplastischen Erscheinungsbildern haben neurologische Spätschädigungen zu erwarten (Kaplan S, 1980; Mitchell WG, 2002).

Ungefähr die Hälfte aller Neuroblastompatienten zeigen Anzeichen für Metastasierungen. Das Neuroblastom zeigt eine bisher unerklärliche Tendenz zur Metastasierung in die knöchernen Orbita, klinisch erkennbar durch periorbitale Brillenhämatome. Metastasierungen in Knochen können zu Knochenschmerzen, Hinken oder Überempfindlichkeit führen (Quinn JJ, 1979).

Respiratorische Probleme kann es durch, im Verhältnis zu der Gesamtkörpergröße des Säuglings, sehr große Lebermetastasen geben (D'Angio GJ, 1971).

Die initiale Diagnostik stützt sich auf palpatorische Zufallsbefunde und auf Bildgebung. Dabei wird das CT bevorzugt bei Tumoren des Abdomens, Beckens oder Mediastinums eingesetzt, das MRT bei paraspinalen Prozessen mit eventuellen Durchbrüchen zum Rückenmark. Für die Szintigraphie bietet MIBG als ¹²³I-Isotop einen hoch spezifischen Mar-

ker. Die Sensitivität und Spezifität der Positronen-Emissions-Tomographie (Peterson S, 2003) werden zurzeit im Vergleich zur Szintigraphie untersucht.

Laborklinisch liegen zunächst meist nur erhöhte Katecholaminabbauprodukte im Urin und eventuelle Blutbildverschiebungen, vor allem Anämie und Thrombozytopenie, vor.

Zur histologischen Diagnosesicherung ist eine Biopsie unabdingbar. Diese sollte vornehmlich dem Primärtumor entnommen werden. Im Rahmen des Stagings ist des Weiteren eine Knochenmarkpunktion von mindestens vier verschiedenen Stellen erforderlich (Maris M, 2007).

Stadium	Definition
Stadium 1	Lokalisierter Tumor, nach durchgeführter R0 oder R1-Operation, ipsilaterale Lymphknoten mikroskopisch nicht befallen
Stadium 2A	Lokalisierter Tumor, nach durchgeführter R2-Operation, ipsilaterale Lymphknoten mikroskopisch nicht befallen
Stadium 2 B	Lokalisierter Tumor, nach durchgeführter Operation, ipsilaterale Lymphknoten mikroskopisch befallen
Stadium 3	Lokalisierter Tumor, nicht operierbarer, der über die Mittellinie hinweg infiltriert oder lokalisierter Tumor, mit beidseitig befallenen Lymphknoten
Stadium 4	Jeder Tumor mit Metastasierungen in entfernte Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut oder andere Organe
Stadium 4s	Lokalisierter Tumor, in Säuglingen vor Vollendung des ersten Lebensjahrs mit Metastasierungen in Haut, Leber oder Knochenmark und <10% malignen Zellen

Tab. 1: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach dem International Neuroblastoma Staging System (INSS). Angepasst nach (Brodeur GM, 1993; Maris M, 2007).

1.1.3. Staging

Das International Neuroblastoma Staging System (INSS) war lange Zeit das meistgenutzte Instrument in Europa und Nordamerika, um Erkrankungsgrade des Neuroblastoms einzuteilen (Tabelle 1). Es ging als Adaption aus der Evans-Klassifikation hervor. Weil sich aber die chirurgischen Ansätze und operativen Möglichkeiten in fast jedem Krankenhaus unterscheiden und daher die Stadieneinteilung mit dieser Klassifikation sehr variabel blieb, erarbeitete die International Neuroblastoma Risk Group (INRG) der Society of Paediatric Oncology ein neues Staging-System, bei dem die Ausbreitung der Krankheit prä-chirurgisch durch bildgebende Verfahren beschrieben wird (Tabelle 2 und Tabelle 3). Bei der Definition des Stadiums 4s wurde ein Diagnosezeitpunkt innerhalb der ersten 18 Lebensmonate neu festgelegt (Monclair T, 2009).

Stadium	Definition
Stadium L1	Auf eine Körperregion beschränkter Tumor, ohne Infiltration vitaler Strukturen nach radiologischen Risikofaktoren
Stadium L2	Lokalisierter Tumor, mit Infiltration nach radiologischen Risikofaktoren
Stadium M	Metastasierter Primärbefall (ausgenommen Stadium MS)
Stadium MS	Metastasierter Primärbefall von Haut, Leber und Knochenmark bei Kindern bis zum 18. Lebensmonat

Tab. 2: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach der International Neuroblastoma Risk Group (INRG). Angepasst nach (Monclair T, 2009).

Radiologische Risikofaktoren bei der Diagnose eines Neuroblastoms
Zwei Körperregionen per continuitatem befallen (z. B. Hals/Thorax, Thorax/Abdomen, Abdomen/Becken).
Tumordinfiltration von A. carotis, A. vertebralis oder V. jugularis interna.
Tumordinfiltration der Schädelbasis. Verdrängung der Trachea durch Tumorgewebe.
Tumordinfiltration von Plexusnerven und/oder A./V. subclavia.
Tumordinfiltration von Aorta, V. cava und/oder ihren Hauptabgängen. Verdrängung der Trachea oder Hauptbronchien durch Tumorgewebe.
Infiltration der Costo-Vertebral-Gelenke zwischen T9 und T12.
Infiltration der Leberpforte und/oder des hepatoduodenalen Bands.
Infiltration der A. mesenterica superior, eines/beider Nierenstiele oder Iliakalgefäße.
Infiltration des N. ischiadicus am Beckenausgang.
Intraspinale Manifestation mit Verlegung >1/3 des Spinalkanals oder des gesamten leptomeningealen Raumes durch Tumor sowie ein radiologisch-pathologischer Befund des Rückenmarks.
Infiltration von Perikard, Zwerchfell, Leber, Niere, Duodenal-Pankreas-Region und/oder Mesenterium

Tab. 3: Radiologische Risikofaktoren bei der Diagnose eines Neuroblastoms nach der International Neuroblastoma Risk Group (INRG). Angepasst nach (Monclair T, 2009).

1.1.4. Tumor Histologie

Morphologisch sind Neuroblastome undifferenzierte „kleine, blaue und rundzellige“ Tumore. Abgestuft davon gibt es etwas mehr differenzierte Ganglioneuroblastome und sehr gut differenzierte Ganglioneurome (Brodeur GM, 2003).

1984 stellte Shimada mit einer Klassifikation einen Bezug zwischen Histopathologie und klinischem Verhalten auf. Dabei bezieht sich die Einstufung des Tumors auf den Differenzierungsgrad der Neuroblasten („undifferentiated“, „poorly differentiated“ oder „differentiating“), den Schwann-Zell-Anteil, den Mitose-Karyorrhexis-Index (Anzahl der mitotischen und apoptotischen Zellen pro 5000 Zellen) und das Alter bei Diagnosestellung. Heute wird die Neuroblastompathologie nach dem International Neuroblastoma Pathology Classification System (INPC), einer Modifizierung des ursprünglichen Shimada-Systems, eingeteilt (Maris M, 2007; Shimada H, 1984 und 1999).

1.1.5. Biologie

Bisher sind eine Vielzahl genetischer Aberrationen im Neuroblastom beschrieben worden, doch ist bisher kein eindeutiges Muster zu erkennen, das die verschiedenen chromosomalen Veränderungen im Zusammenhang erklären könnte.

MYCN Amplifikation

M. Schwab beschrieb 1983 als Erster das Onkogen MYCN, das in 22% aller Neuroblastome amplifiziert ist (Schwab M, 1983). Als Amplifikation bezeichnet man die Vervielfältigung eines einzelnen Genabschnitts innerhalb einer Zelle über das normale Maß hinaus. Das zugehörige Allel für MYCN liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p24). Die Amplifikation von MYCN korreliert stark, sowohl mit höheren Stadien und schlechterem Überleben, als auch mit raschem Tumorwachstum und einer schlechteren Prognose in niedrigeren Stadien (Brodeur GM, 1984; Seeger RC, 1985). Dazu neigen nicht-MYCN-amplifizierende Tumoren interessanterweise auch in fortgeschrittenerem Krankheitsverlauf nicht mehr. Warum MYCN-Amplifikation mit einem aggressiveren Phänotyp assoziiert ist, ist weiterhin unsicher. Funktionell bildet MYCN ein Heterodimer mit MAX und aktiviert als Proteinkomplex dann die Transkription verschiedener Gene. Auf die Aktivierung der wenigen bekannten Zielgene von MYCN folgt ein rascheres Durchlaufen der G1-Phase, der G0-Arrest ist nicht möglich (Brodeur GM, 2003).

DNA-Gehalt

Obwohl die meisten Tumoren diploide Karyotypen aufweisen, weisen Patienten mit niedrigeren Stadien häufig einen triploiden Karyotyp auf. A. T. Look konnte für Säuglinge unter

ein bis zwei Lebensjahren aus der Messung des bloßen DNA-Gehalts in der Zelldurchflusszytometrie eine gewisse prognostische Aussage ableiten, leider verliert diese Messung danach an Aussagekraft, weil spezifische genetische Veränderungen nicht berücksichtigt werden (Brodeur GM, 2003; Look AT, 1984 und 1991).

Trisomie 17q

Diese Abnormalität kommt in mehr als 50% aller Neuroblastome vor. Der Zugewinn von 17q22 scheint besonders häufig durch unbalancierte Translokationen hervorgerufen zu werden und einen nicht näher bekannten Selektionsvorteil für die Tumorzellen mit sich zu bringen. Diese genetische Alteration ist mit aggressiveren Neuroblastomen assoziiert (Bown N 2001; Brodeur GM, 2003; Maris M, 2007).

Deletion 1p

Die Deletion des kurzen Arms von Chromosom 1 ist die häufigste Deletion im Neuroblastom. Diese genetische Veränderung wird häufig im Zusammenhang mit aggressiveren Stufen und MYCN-Amplifikation gefunden. Das genaue Zielgen ist nicht bekannt. Sehr wahrscheinlich bringt der Allelverlust von 1p36 ein erhöhtes Rezidivrisiko durch den Verlust bislang nicht näher bekannter Tumorsuppressorgene mit sich (Brodeur GM, March 2003; Maris J.M., 1995; Maris M, 2007).

Allelverlust 11q

Mit dem Nachweis von Allelverlusten in 11q in 35-45% gehört diese genetische Alteration zu einer der häufigsten im Neuroblastom. Sie scheint direkt mit der Deletion von 14q assoziiert zu sein, korreliert aber invers mit 1p-Deletion und MYCN-Amplifikation. Dennoch gilt der Verlust als ein Hochrisikomarker, da der Nachweis eines 11q-Allelverlustes bei nicht-MYCN-amplifizierten Tumoren die Prognose verschlechtert (Attiyeh EF, 2005; Brodeur GM, 2003; Maris M, 2007).

Expression von Neurotrophinrezeptoren

Die Neurotrophinrezeptoren TrkA, TrkB und TrkC und ihre Liganden NGF, BDNF und Neurotrophin 3 sind wichtige Regulatoren für das Überleben, das Wachstum und die Differenzierung von Nervenzellen (Maris M, 2007).

Eine hohe Expression von TrkA korreliert mit besonders jungem Alter der Patienten, niedrigem Stadium und nicht-amplifiziertem MYCN-Status. Zellen mit hoher TrkA-Expression differenzieren bei Zugabe von NGF, bei Fehlen von NGF werden sie apoptotisch (Brodeur GM, 2003; Nakagawara A, 1993). TrkB ist in biologisch schlechten, vorzugsweise MYCN-amplifizierenden Neuroblastomen zu finden. Diese Koexpression könnte einen zusätzli-

chen auto- oder parakrinen Signalweg aktivieren, der Chemotherapieresistenz und forcierte Angiogenese hervorruft (Eggert A, 2000; Nakagawara A, 1994).

Expression von bekannten Tumorgenen

Gene, die von der Karzinogenese adulter Tumoren bekannt sind, sind mit dem Neuroblastom selten assoziiert. Die Inaktivierung von TP53 ist in Primärtumoren unregelmäßig, obwohl sie in Kulturzellen aus Rezidivtumoren gefunden wurde (Carr J, 2006).

1.1.6. Risikostratifizierung

Die Risiko-Stratifizierung ist von klinischen und biologischen Eigenschaften gleichermaßen abhängig. Aus der bisherigen Studienlage hat die US-amerikanische Children's Oncology Group eine Einteilung in drei Risikostadien abgeleitet (Brodeur GM, 2003; Maris M, 2006).

Eigenschaft	Typ1	Typ2	Typ3
MYCN	Normal	Normal	Amplifiziert
DNA-Gehalt	Triploid	Di- oder tetraploid	Di- oder tetraploid
17q	Selten	Häufig	Häufig
11q, 14q LOH	Selten	Häufig	Selten
1p LOH	Selten	Selten	Häufig
TrkA Expression	Hoch	Niedrig	Niedrig
TrkB Expression	Niedrig	Niedrig	Hoch
Alter	<1 Jahr	>1 Jahr	1-5 Jahre
INSS-Stage	1,2,4s	3,4	3,4
5-Jahres-Überleben	95%	40-50%	25%

Tab. 4: Das Spektrum der neuroblastischen Tumoren umfasst mindestens drei biologisch distinkte Erscheinungsformen. Es wird diskutiert, ob und wann diese Formen auch ineinander übergehen können, oder ob es sich um ätiologisch und pathogenetisch verschiedenen Krankheitsformen handelt. Angepasst nach (Brodeur GM, 2003; Maris M, 2006).

Um die erhobenen Daten für die Klinik weltweit besser vergleichbar zu machen, erarbeitete die International Neuroblastoma Risk Group (INRG) ein erstes Klassifikationssystem bei dem das Alter bei Diagnosestellung, das Stadium, die Histopathologie und der MYCN-Status berücksichtigt werden. Dieses System ist noch nicht endgültig definiert, soll aber bald als Standardwerkzeug zur Klassifikation von Neuroblastomen dienen (Maris M, 2007).

1.1.7. Therapie und Prognose

Die Einteilung in drei Risikogruppen findet auch bei der Auswahl der adäquaten Therapie Anwendung. Neben bekannten klinischen Parametern scheinen biologische Eigenschaften großen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit zu haben (Abbildung 1 und 2). Lokalisierte Tumoren haben normalerweise günstige biologische Eigenschaften und können allein durch einen chirurgischen Eingriff geheilt werden. Ein Teil der lokalisierten Tumoren, die sich spontan zurückbilden, bedarf sogar lediglich der Beobachtung mit regelmäßiger Bildgebungskontrolle. Lokale Rezidive können ebenfalls operiert werden, metastasierende Rezidive eines primär lokalisierten Neuroblastoms sind selten und werden mit Chemotherapie behandelt. Die optimale Behandlung lokalisierter Tumoren schlechter Biologie und aggressiveren Wachstums steht in der Diskussion: Auf der einen Seite dürfen große Tumoren mit guten biologischen Eigenschaften nicht überbehandelt werden, auf der anderen Seite brauchen lokalisierte Tumoren mit schlechten biologischen Eigenschaften eine aggressive multimodale Therapie. Die aktuelle deutsche Studie NB2004 unterscheidet daher die Mittlere-Risikogruppe (MRG) und die Hoch-Risikogruppe (HRG). Patienten der MRG werden mit Operation, intensivierter Chemotherapie, Bestrahlung und 13-cis-Retinsäure behandelt. Patienten der HR-Gruppe erhalten zudem eine Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation und zusätzlich ggf. eine Behandlung mit I¹²³-MIBG (Abbildung 3).

Neue Ansätze der Rezidivtherapie sind die Topoisomerase-1-Inhibitoren Topotecan und Irinotecan, die gezielte Deponierung von Radionukleotiden im Tumor, Immuntherapieansätze mit Antikörpern gegen das Gangliosid GD2, Angiogeneseinhibitoren und andere molekular gezielt wirksame Medikamente.

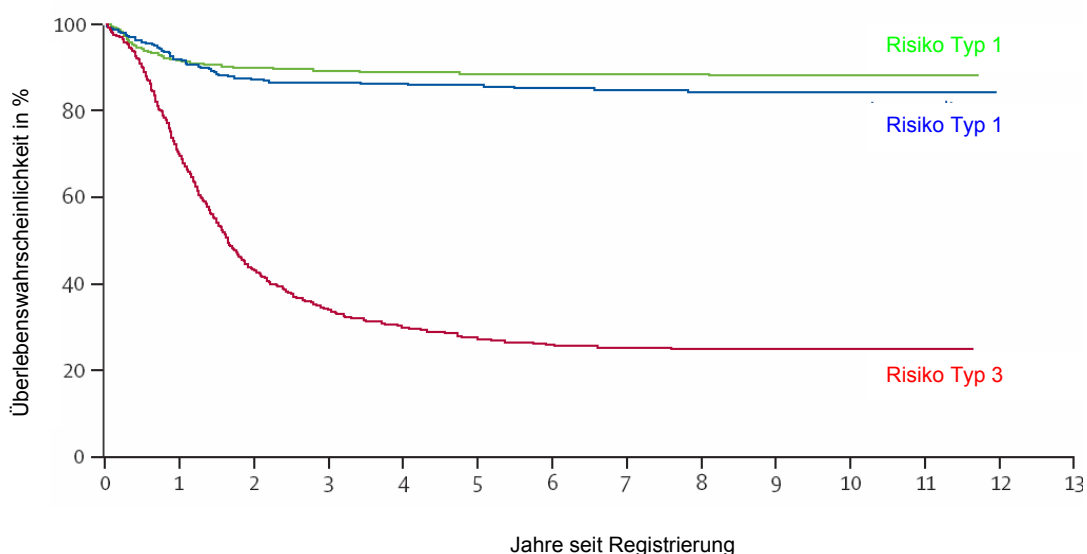


Abb. 1: Kaplan Meier Kurve zum Patientenüberleben bei Neuroblastom-erkrankungen zwischen 1986 und 2001, basierend auf der Einteilung in drei Risikogruppen. Angepasst nach (Maris M, 2007).

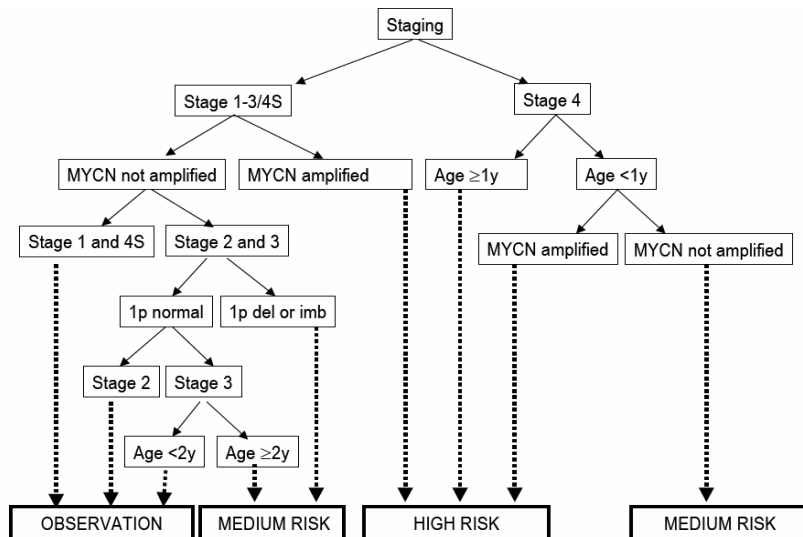
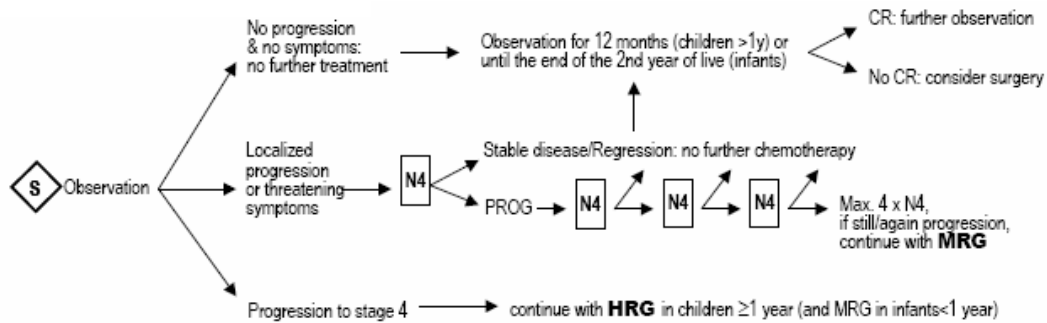
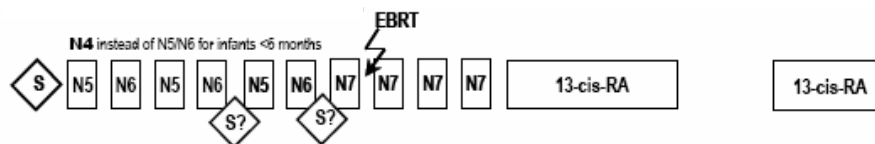


Abb. 2: Klassifikation der Risikogruppen im NB2004-Protokoll. Angepasst nach (Berthold, 2004).

Beobachtungs-Gruppe



Mittlere-Risiko-Gruppe (MRG):



Hoch-Risiko-Gruppe (HRG):

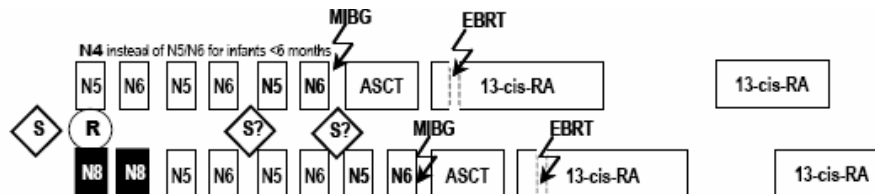


Abb. 3: Überblick der Behandlungsstrategien im NB2004-Protokoll (S=Operation, R=Randomisation, N4/5/6/7/8=Chemotherapy-Blöcke, MIBG= ¹³¹I-MIBG-Behandlung, EBRT= Bestrahlungs-Therapie, 13-cis-RA=13-cis-Retin-Säure). Angepasst nach (Berthold, 2004).

1.1.8. Genetisches Modell der Neuroblastomentwicklung

Es gibt viele Hinweise darauf, dass es mindestens drei verschiedene Arten des Neuroblastoms gibt (Abbildung 4). Der Beginn der Tumorgenese beginnt in einer neuroblastischen Zelle. Das Maß an Differenzierung zur Zeit des auslösenden Ereignisses bestimmt das Muster der Neurotrophin-Rezeptor-Expression. Mit Mutationen in den Genen Phox-2B und ALK ist mittlerweile für viele hereditäre Neuroblastome eine Keimbahn-assoziierte Erklärung gefunden worden (Mossé YP, 2008; Trochet D, 2004). Entsprechende Umwelteinflüsse oder Noxen, die als somatisches Mutationseignis bei entsprechender genetischer Prädisposition das unkontrollierte Tumorwachstum unmittelbar beginnen lassen, sind momentan noch weitgehend unbekannt (Maris M, 2007).

Ungefähr ein Drittel der Tumore ist durch hohe TrkA-Expression gekennzeichnet. Zellen dieses Tumortyps 1 haben Defekte während der Chromosomentrennung erfahren und sind häufig triploid. Klinisch haben die Patienten eine gute Prognose.

Tumoren, die vornehmlich TrkB exprimieren, sind durch genomische Instabilität gekennzeichnet. Als Typ 2-Tumoren weisen ihre Zellen einen 17q-Zugewinn und/oder einen genetischen Verlust an 11q oder 14q auf. Die klinische Prognose kann als mittelmäßig gewertet werden und ist vorab nicht sicher definierbar (Bown N, 2001; Maris JM, 2001; Thompson PM, 2001).

Der 17q-Zugewinn kann das Ergebnis einer unbalancierten Translokation mit 1p sein. Der hierdurch begründete Verlust von 1p-Material geht häufig mit gleichzeitiger MYCN-Amplifikation einher. Das Fünfjahresüberleben sinkt bei dieser als Typ 3 bezeichneten biologisch aggressiven Konstellation auf unter 25% (Caron H, 1996).

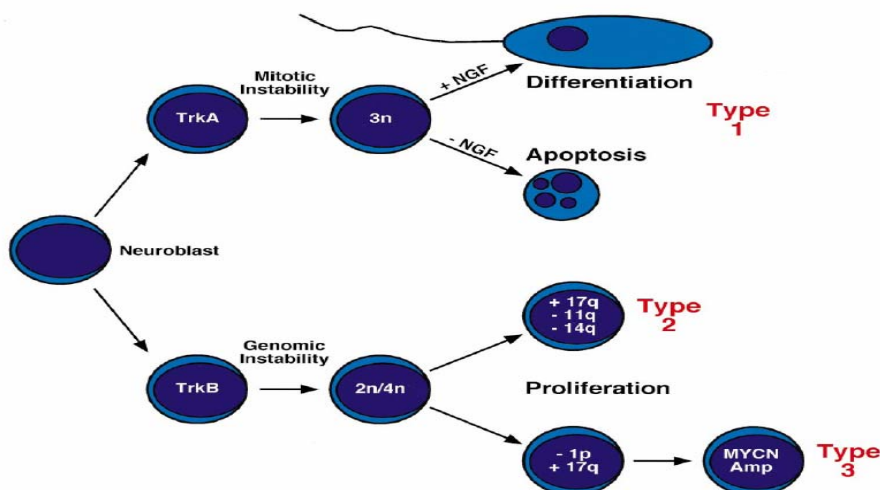


Abbildung 4: Biologisch-genetisches Modell der Entstehung biologisch unterschiedlicher Neuroblastom-Typen aus einer transformierten Vorläuferzelle. In diesem Modell kommt den Trk-Rezeptoren eine wesentliche pathologische Bedeutung zu, während die MYCN-Amplifikation ein relativ spätes Ereignis darstellt. Angepasst nach (Brodeur GM, 2003; Maris M, 2006).

1.2. Die Stammzelltheorie bei Tumoren

Während sich die Forschung lange Zeit auf die Tumorzellen als eine homogene, den Tumor bildende Masse konzentrierte, wird mehr und mehr deutlich, dass neben den eigentlichen Tumorzellen eine Vielzahl verschiedener, nicht-maligner Wirtszellen am Aufbau des Tumors beteiligt sind. Dazu zählen z. B. Zellen der Blutgefäße und einwandernde Zellen des Immunsystems. Aber auch die eigentlichen Tumorzellen stellen nicht eine homogene Population dar, sondern können verschiedene Differenzierungen aufweisen, und unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Der Gesamttumor kann somit als „Organ“ aufgefasst werden, das aus Zellen verschiedener Herkunft und Differenzierung aufgebaut ist, die miteinander interagieren, und kooperativ die „Organstruktur“ des Tumors aufbauen. Eine grundlegende Annahme in dieser neuen Perspektive ist, dass eine Population an Tumorstammzellen existiert, die Pluripotenz besitzen, und sich asymmetrisch teilen können. Während die Hauptmasse der „differenzierteren“, von Tumorstammzellen abgeleiteten Tumorzellen durch konventionelle Tumorbehandlung getroffen wird, können die Stammzellen diese Therapien möglicherweise überleben und so zu Rezidiven führen (Reya T, 2001).

Aus diesem Grund zielt die aktuelle Forschung darauf ab, diese Krebs-Stammzellen zu identifizieren, um neue Therapieansätze entwickeln zu können, die speziell diese Stammzellen treffen (Pardal R, 2003).

Es zeigte sich, dass Tumorstammzellen häufig aus „normalen“, gewebeständigen Stammzellen entstehen. Dies konnte bereits für Hirn-, Brust-, gastrointestinale und einige hämatopoetische Neoplasien nachgewiesen werden (Abbildung 5 und Burkert J, 2006).

Es wird vermutet, dass das Neuroblastom aus pluripotenten Stammzellen der Neuralleiste entsteht. Neuralleistenstammzellen sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors SOX10 und des Neurotrophinrezeptors p75NTR definiert. Es stellt sich daher insbesondere die Frage, ob Tumorstammzellen der Neuroblastome durch die Expression ebendieser Marker definiert werden können.

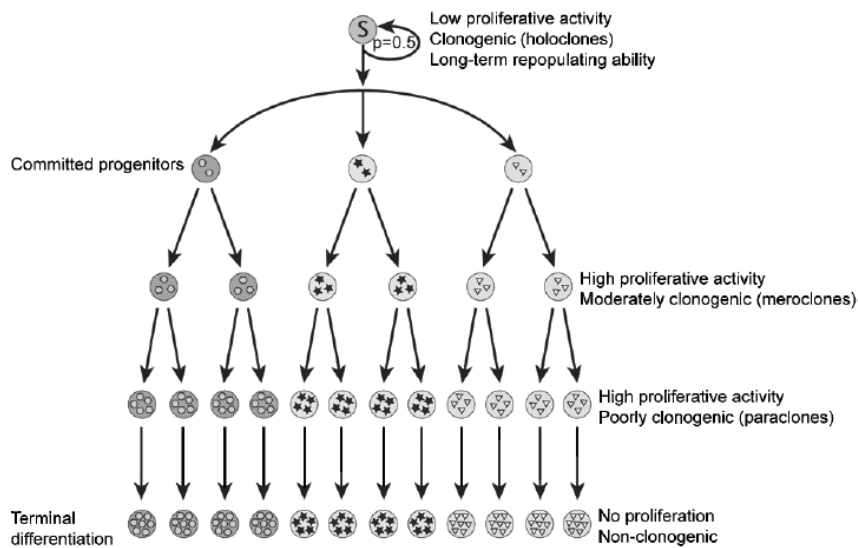


Abb. 5: In den meisten Organsystemen ist eine Zellhierarchie mit wenigen sich selbst erneuernden Stammzellen zu finden. Entarten diese durch bisher unbekannte Umwelteinflüsse kommt es zu unkontrolliertem Wachstum der Subpopulationen, es entsteht ein Tumor. Übernommen aus (Burkert J, 2006).

1.3. Der Neurotrophinrezeptor p75 (p75NTR)

Die Rezeptoren des Nerval Growth Factors (NGF) haben in der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems entscheidende Funktionen. Sie übermitteln mit Hilfe einer Vielzahl von Signalwegen Informationen vom extra- in den intrazellulären Raum. Des Weiteren nehmen sie wohl auch ligandenunabhängige Funktionen wahr.

Für das Neuroblastom sind vor allem der hochaffine NGF-Rezeptor TrkA aus der Familie der Tyrosinkinase und der niedrigaffine p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75NTR) aus der Familie der Tumor Nekrose Faktor Rezeptoren (TNFR) wichtig (Schor NF, 2005).

1.3.1 Aufbau des p75NTR

Das transmembranöse Protein p75NTR besteht aus insgesamt 399 Aminosäuren. Die N-glykosylierte extrazelluläre Domäne beinhaltet vier gleichartig aufgebaute Module mit jeweils sechs Cysteinen - ein Merkmal, das alle Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Familie verbindet (Roux PP, 2002). Die O-glykosylierte transmembranöse Domäne beinhaltet drei miteinander verbundene Proteineinheiten. Bindet NGF an das äußere Rezeptorprotein, kommt es an der Membraninnenseite zur Aktivierung einer γ -Sekretase, die den intrazellulären Anteil abdissoziieren lässt (von Schack D, 2001).

Die 80 Aminosäuren große intrazelluläre Todes-Domäne ist ein weiterer Hinweis auf die Zugehörigkeit zu der TNF-Familie. Cystein 279 liegt darin in palmitoylierter Form und

mehrere Serin- und Threonin-Reste in phosphorylierter Form vor. Gegenstand aktueller Forschungen sind verschiedene Isoformen, die sich durch alternatives Splicen und post-synthetische Proteolyse ergeben (Barker PA, 2004).

Obwohl es einige Merkmale gibt, die p75NTR als Mitglied der TNFR-Familie kennzeichnen, gibt es gleichzeitig auch einige Abweichungen, die p75NTR als „schwarzes Schaf“ dieser Familie ausweisen: Während alle sonstigen TNFR-Familien-Mitglieder trimere Liganden binden, kann p75NTR unter anderem auch das homodimere NGF binden. Außerdem erscheint es ungewöhnlich, dass p75NTR, sobald es dimeres NGF gebunden hat, als Rezeptor selbst nicht mehr dimerisieren kann. Des Weiteren konnte innerhalb der NGF-bindenden-Region des p75NTRs eine Aminosäuresequenz nachgewiesen werden, die sonst typischerweise bei Proteinen der Trk-Neurotrophin-Rezeptor Familie vorhanden ist (Barker PA, 2004; Schor NF, 2005).

Da Studien belegen, dass p75NTR NGF zu etwa gleichen Verhältnissen als Monomer, als Dimer und als Komplex zusammen mit TrkA bindet, beschrieben He und Garcia diese Reihe von Auffälligkeiten als „Promiskuität“ des Rezeptors in Bezug auf die Familien der TNFRs und der Trks (He XL, 2004).

1.3.2. Korezeptoren und Liganden von p75NTR

Die verschiedenen Funktionen von p75NTR sind bisher keineswegs eindeutig aufgeklärt und nachvollzogen. Vielfältige Interaktionen als Co-Rezeptor mit diversen anderen Proteinen wie TrkA, Sortilin und Nogo, die Fähigkeit neben NGF auch den Brain-derived neurotrophic-Faktor (BDNF) und deren Vorläuferproteine pro-NGF und pro-BDNF binden zu können, verschiedene Rezeptor-Isoformen und mehrere angestoßene oder beeinflusste intrazelluläre Signalkaskaden erschweren das Gesamtverständnis dieses Rezeptormoleküls bisher erheblich (Abbildung 6 und Chao MV, 1994; Rodríguez-Tébar A, 1992).

TrkA

Zuerst wurde p75NTR als Co-Rezeptor des TrkA identifiziert. Somit ist auch funktionell bisher am meisten über diese Interaktion bekannt. NGF bindet die beiden NGF-Rezeptoren TrkA und p75NTR einzeln mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-9} M. Werden allerdings beide Rezeptoren gemeinsam gebunden, erhöht sich die Affinität des Moleküls auf 10^{-11} M. Demzufolge wurde dieser TrkA-p75NTR-Komplex als hoch-affiner und p75NTR allein als niedrig-affiner NGF-Rezeptor bezeichnet (Hempstead BL, 2002; Lad SP, 2003).

Die komplette Deletion von p75NTR in Knockout-Mäusen zeigte durch Abnahme von Nervenzellgröße und -anzahl im Gehirn und im peripheren Nervensystem und der massiven Dilatation der großen Gefäße, dass p75NTR das Zellüberleben im zentralen und periphe-

ren Nervensystem und auch dem vaskulären System erheblich beeinflusst. Die resultierenden progressiven Neuropathien werden auf eine reduzierte Aktivierung der Trk-Rezeptoren zurückgeführt, wenn p75NTR fehlt (Barker PA, 2004 ; von Schack D, 2001). Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass Interaktionen mit Proteinen der MAGE-Familie (vor allem Necdin und NRAGE) eine Rolle in der Entscheidung zu spielen scheinen, ob p75NTR unabhängig oder mit TrkA zusammen agiert (Kuwako K, 2004).

Sortilin und pro-NGF

Pro-NGF bindet p75NTR mit hoher Affinität und induziert dadurch Apoptose in sympathischen Nervenzellen, Oligodendrozyten und glatten Muskelzellen von Gefäßen (Lee R, 2001). Der Korezeptor Sortilin wird nach neuesten Erkenntnissen für die Bindung von pro-NGF an p75NTR benötigt. Sortilin ist ein transmembranäres Protein aus der Familie der VPS10-Familie, das vor allem während der Entwicklung im zentralen Nervensystem exprimiert wird (Nykjaer A, 2004). Der Untergang von Nervenzellen über den Signalmechanismus pro-NGF-p75NTR-Sortilin konnte in zwei klinischen Studien durch Zugabe von pro-NGF-Antikörpern signifikant vermindert werden (Beattie MS, 2002).

Nogo- und Lingo-Rezeptor

Das Wachstum von Axonen und die Veränderung von synaptischen Verbindungen scheinen von einem Komplex aus p75NTR und Nogo-Rezeptor (NogoR) bzw. Lingo-Rezeptor (LingoR) gesteuert zu werden. Binden die Liganden MAG, OMgP oder Nogo selbst, alleamt Mitglieder der Myelin-based-growth-Inhibitors (MBGI), an diesen Komplex, kommt es über den intrazellulären RhoA-Signalweg und dadurch bedingte Blockade von Veränderungen am Zytoskelett zum Wachstumsstopp des Axons.

Die Bindung von NGF an den NogoR-p75NTR-Komplex bzw. LingoR-p75NTR-Komplex jedoch induziert die Hemmung der RhoA und antagonisiert somit die MBGI-abhängige Wachstumshemmung. Folglich kann man von einer indirekten Förderung der axonalen Aussprossung und synaptischen Plastizität durch NGF-Bindung an diesen Komplex ausgehen (Barker PA, 2004; Dechant G, 2002; Scott AL, 2005; Yamashita T, 2003).

P75NTR ohne Co-Rezeptor

Neben der Interaktion mit TrkA funktioniert p75NTR aber auch singulär und induziert oder verhindert als Mitglied der TNF-Familie Apoptose: In verschiedenen Systemen, ausgehend von verschiedenen Zelltypen, die *in vitro* und *in vivo* getestet wurden, konnte sowohl der singuläre Rezeptor ohne Ligand die Apoptose induzieren oder aufhalten, als auch der Komplex mit NGF vermochte den kontrollierten Zelltod einleiten oder verhindern. Dieses scheinbare Paradoxon, abhängig von Zell-zu-Zell-Variationen und des auslösenden Bin-

dungsmoleküls gänzlich gegensätzliche Signalwege triggern zu können, ist bereits von anderen Mitgliedern der TNFR-Familie bekannt und brachte p75NTR den Namen „dependence receptor“ (Dechant G, 2002; Mehlen P, 2004; Schor NF 2005).

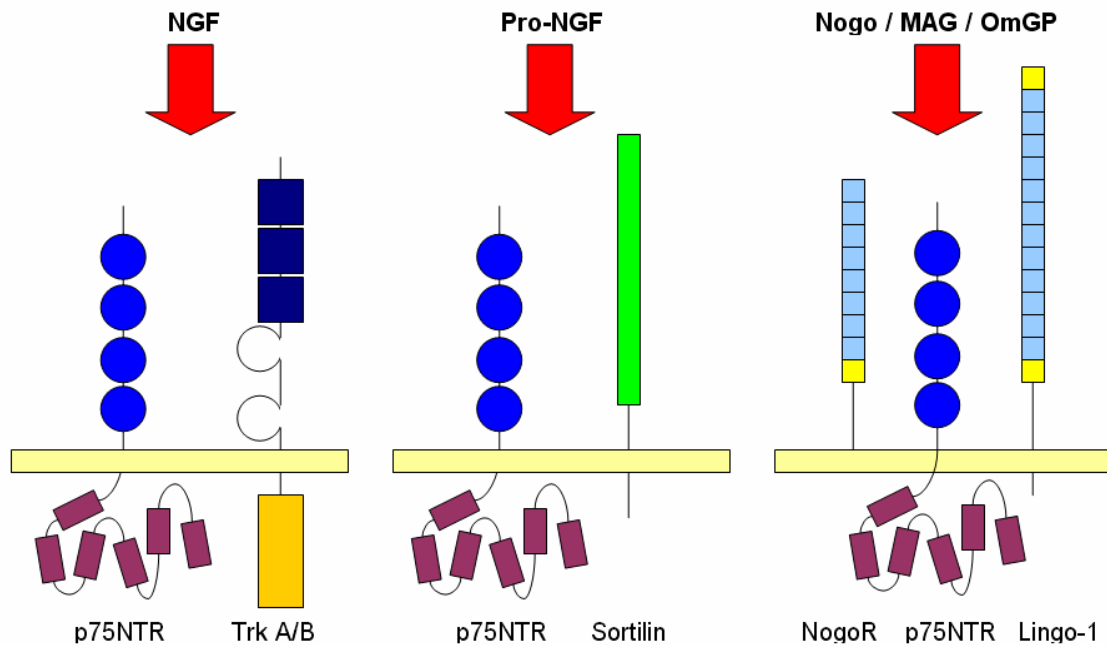


Abb. 6: p75NTR interagiert physiologisch mit TrkA und erhöht so die Möglichkeit auf NGF zu reagieren. Ein zweiter Komplex kann von p75NTR mit Sortilin gebildet werden. Er vermittelt ein proapoptotisches Signal bei Bindung von pro-NGF. Als dritte Möglichkeit kooperiert p75NTR mit NogoR und Lingo-1. Die Bindung von Nogo, MAG oder OmGP resultiert dann in einem Wachstumsstopp der Zelle. Angepasst nach (Barker PA, 2004).

1.3.3. Aktivierte Signalwege und –kaskaden

In seiner Funktion als Kofaktor von anderen Rezeptoren verändert p75NTR zunächst nicht den Signalweg grundsätzlich, sondern erhöht die Affinität des Rezeptors für seinen spezifischen Liganden (NGF für TrkA, pro-NGF für Sortilin, MBGIs für Nogo und Lingo). Trotzdem liegen die intrazellulär ablaufenden Mechanismen, die p75NTR auszulösen vermag, noch viel mehr im Dunklen als die oberflächlichen Interaktionen mit anderen Rezeptormolekülen.

In Zellen die kein TrkA exprimieren, kann p75NTR nach der Bindung von NGF unabhängig verschiedene Signalwege anstoßen. So kann, wie auch von anderen TNF-Proteinen bekannt ist, NF- κ B durch den intrazellulären Anteil von p75NTR aktiviert und in den Zellkern transloziert werden. Diese Aktivierung von NF- κ B und die darauf folgende Induktion

der Nitrooxid-Synthase, scheinen für die anti-apoptotischen Effekte von p75NTR verantwortlich zu sein (Roux PP, 2002).

Die sehr unterschiedlichen proapoptotischen Signalwege, die durch p75NTR angestoßen werden, sind vom genauen Zelltyp und Stimulus abhängig und noch nicht eindeutig aufgeklärt. In kortikalen Oligodendrozyten läuft die durch an p75NTR gebundenes NGF ausgelöste Apoptose über eine Kaskade mit Rac1, MAP-Kinase, JNK, c-Jun und schließlich Caspase 9 ab (Harrington AW, 2002). In Zellen, auf denen künstlich p75NTR überexprimiert wurde, läuft ein JNK-abhängiger Mechanismus ab (Bhakar AL, 2003). Für Nervenzellen des Sympathikus findet man zwei Meinungen. Zum einen wird eine Apoptose-Kaskade über erhöhtes p53 angenommen: So soll eine p75NTR-Aktivierung durch NGF Entzug zu einer Aktivierung von MEKK, JNK, c-Jun, p53 und BAX führen (Aloyz RS, 1998). Anderen Berichten zufolge läuft die durch BDNF induzierte Apoptose von Sympathikus-Zellen c-Jun-unabhängig ab (Palmada M, 2002).

Letztlich scheint der durch p75NTR induzierte Signalweg immer spezifisch und wird letztlich durch die Faktoren Zelltyp, Ligand und Korezeptor definiert (Roux PP, 2002).

Protein-Familie	Mit p75 interagierendes Protein	Funktion
MAGE	NRAGE, Necdin	Zellzyklus-Progression
GTPase	RhoA	Axon-Verlängerung
Trk	TrkA TrkB TrkC	Neurotrophin-Signal Neurotrophin-Signal Neurotrophin-Signal
Andere	NRIF NADE FAP-1 RIP-2	Pro-apoptotisch Pro-apoptotisch Anti-apoptotisch Anti-apoptotisch

Tab. 5: Zusammenfassung von mit p75NTR interagierenden Proteinen. Unterschiedliche Funktionen sind auf die verschiedenen zellulären Hintergründe und gebundenen Liganden zurückzuführen (Roux PP, 2002).

1.3.4. Nerve Growth Factor (NGF)

Der Nerve Growth Factor (NGF) ist ein Protein der Neurotrophin-Familie. Für TrkA ist es der einzige spezifische Ligand, für p75NTR einer von mehreren. NGF liegt physiologisch als Homodimer vor. Die Bindung von NGF sowohl an neuronale als auch an nicht-neuronale Zellen triggert Apoptosevorgänge.

Das Vorläuferprotein, pro-NGF, wird intrazellulär durch Furin und Prokonvertasen, bzw. extrazellulär durch Matrixmetalloproteinasen in die letztendlich aktive Form gespalten. Die erst seit kurzem bekannte Tatsache, dass pro-NGF nicht an TrkA binden kann, p75NTR es jedoch mit einer massiv höheren Affinität bindet als es NGF selbst vermag, führte zu

Spekulationen, ob nicht pro-NGF der eigentlich physiologisch wichtigere Ligand für p75NTR ist. So könnte es auch sein, dass weniger die Verteilung von p75NTR auf den Zellen entscheidend für das Zellüberleben in der Entwicklung ist, sondern vielmehr die Verteilung von Matrixmetalloproteinasen im Gewebe die ausschlaggebende Rolle spielt (Lee R, 2001; Schor NF, 2005).

1.3.5. Physiologische und pathophysiologische Funktionen von p75NTR

Die bedeutende Rolle von p75NTR in physiologischen Entwicklungsvorgängen des Nervensystems mit Gehirnrinde, Kleinhirn, Retina, peripherem motorischem und sensiblem Nervensystem wird zunehmend verstanden. Die anhaltende Expression von p75NTR bei angeborenen Großhirnrindendysplasien (Schor NF, 2005) und der erhebliche Einfluss von p75NTR auf die Purkinje-Zell-Entwicklung im Kleinhirn (Carter AR, 2003) wurde gezeigt. P75NTR-Knockoutmäuse verlieren ihre Innervation für Merkel-Zellen im Laufe der ersten drei postnatalen Monate (Cronk KM, 2002) und zeigen ein reduziertes Maß an Apoptose während der retinalen Entwicklung (Frade JM, 1998 und 1999).

Die fehlerhafte Funktion von p75NTR wurde als wichtiger Pathomechanismus für verschiedene Krankheiten des gesamten Nervensystems beschrieben. *In vitro*-Versuche zur Alzheimerschen Erkrankung zeigen, dass Nervenzellen als neuroprotektiven Mechanismus bei Inkubation mit neurotoxischem β -Amyloid vermehrt p75NTR exprimieren (Zhang Y, 2003). Bei der Pathogenese des fetalen Alkoholsyndroms wird ein Zusammenhang mit vermehrter p75NTR-Expression vermutet (Mooney SM, 2001). Nach Verletzungen von peripheren Nerven bewirkt die Bindung von NGF an vermehrt exprimierte p75NTR ein erhöhtes Maß an Remyelinisierung und axonaler Regeneration (Notterpek L, 2003). Durch p75NTR getriggerte Apoptose einer neuronalen Subpopulation während der Gehirnentwicklung bedingt unter anderem das Prader-Willi-Syndrom (Kuwako K, 2004).

Auch in der Pathogenese von Schlaganfall (Bui NT, 2002; Culmsee C, 2002), Hirnödemen (Peterson S, 2003), amyotropher Lateralsklerose (Copray JC, 2003), neuropathischem Schmerz (Halvorson KG, 2005; Schor NF, 2005), Schizophrenie (Bai O, 2002; Schor NF, 2005) und Alopecia areata (Botchkarev VA, 2003) konnte der Einfluss von p75NTR gezeigt werden.

p75NTR im Neuroblastom

Seit langem ist bekannt, dass TrkA- und TrkC-Expression im Neuroblastom mit einer guten, TrkB-Expression jedoch mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Vor allem die Expression von TrkA bedingt eine günstigere Tumorbilologie durch die Induktion von Differenzierung, Apoptose und Repression der Angiogenese.

Neben der Bedeutung der Trk-Rezeptoren wird auch die Bedeutung des niedrig-affinen Neurotrophin Rezeptors p75NTR untersucht.

Für die Neuroblastomzelllinie SY5Y konnte gezeigt werden, dass die stabile Transfektion von p75NTR in Abwesenheit von NGF Apoptose induziert. Die zusätzliche Expression von TrkA an der Zelloberfläche erniedrigte die Anzahl apoptotischer Zellen wieder (Eggert, A 2000).

Die stabile Expression von p75NTR in der Neuroblastomzelllinie SKNBE hatte eine erhöhte Apoptoserate zur Folge, wobei die Apoptoserate direkt mit der p75NTR-Menge an der Zelloberfläche korreliert war. Unter Serumentzug wurde in diesen Zellen ebenfalls vermehrt der programmierte Zelltod ausgelöst. NGF-Zugabe hingegen verringerte die Apoptoserate. P75NTR spielt also eine wichtige Rolle für die Selektion von p75NTR-positiven Neuroblastomzellen durch die Abhängigkeit von NGF (Bunone G, 1997).

Studien von TrkA- und p75NTR-transfizierten Neuroblastomzellen der Zelllinie IMR-32 ließen unterschiedliche Reaktionen auf NGF-Zugabe erkennen: Bei p75NTR-transfizierten Zellen kam es zu geringer Differenzierung der Zellen. Bei TrkA transfizierten Zellen hingegen waren Differenzierungsmerkmale wie Neuritenauswuchs, verstärkte Neurofilamentausbildung und N-myc-Abnahme zu beobachten. TrkA und p75NTR kotransfizierte Zellen reagierten synergistisch in Bezug auf Induktion der Differenzierung nach Zugabe von NGF und konnten außerdem beim Ausbleiben von NGF-Zugabe die proapoptotische p75NTR-Kaskade anstoßen (Chen J, 2003).

In einer Studie über zehn olfaktorische Neuroblastome konnte gezeigt werden, dass in jedem dieser hoch aggressiven Tumoren Subpopulationen vorlagen, die TrkA und p75NTR exprimieren. Jedoch konnte in diesen Tumoren keine Abhängigkeit von TrkA mit der Prognose aufgezeigt werden (Zhao SP, 2002).

In einer Analyse der p75NTR-Expression in 1150 Tumoren wurde, u.a. auch für eine geringe Zahl von Neuroblastomen und Ganglioneuromen, gezeigt, dass diese Tumoren kein p75NTR exprimieren (Fanburg-Smith JC, 2001).

1.4. Ziele der aktuellen Studie

In dieser Studie soll die Bedeutung des niedrig-affinen-NGF-Rezeptors p75NTR in neuroblastischen Tumoren untersucht werden. Bei humanen Neuroblastom-Primärtumoren soll quantitativ die p75NTR-Expression gemessen werden. Histologisch soll untersucht werden, ob distinkte p75NTR-positive Subpopulationen vorhanden sind, die von pluripotenten Stammzellen der Neuralleiste ausgehend als „Stammzellen“ der Neuroblastome weitergehend charakterisiert werden können. Die Auswirkung der durch p75NTR-Expression veränderten biologischen Eigenschaften auf das Überleben der erkrankten Patienten soll untersucht werden. Ergeben sich durch diese Untersuchungen Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung von p75NTR im Neuroblastom, sollen die biologischen Charakteristika der p75NTR-Expression, so wie sie für die Familienmitglieder der Neurotrophinrezeptoren TrkA, TrkB und TrkC bereits bekannt sind, *in vitro* analysiert werden. Es sollen mehrere bekannte Zelllinien, die als grundlegende Modelle der Neuroblastomforschung genutzt werden auf ihre quantitative p75NTR-Expression untersucht werden. Die durch exogene Expression von p75NTR veränderten Eigenschaften der Zellen sollen in Hinblick auf Tumorigenität, Viabilität und Apoptose analysiert werden. Durch Transplantation dieser Zellen in immundefiziente Nacktmäuse soll der Einfluss von p75NTR auf die Tumorigenität *in vivo* untersucht werden.

Folgende Einzelfragen sollen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

- 1. Wie wird p75NTR in primären Neuroblastomen exprimiert?**
- 2. Exprimieren Neuroblastomzelllinien p75NTR *in vitro*?**
- 3. Wie verändert sich die Zellbiologie durch Expression von p75NTR?**
- 4. Hat die Expression von p75NTR Einfluss auf die Tumorigenität von Neuroblastomzellen?**
- 5. Gibt es Hinweise auf p75NTR-positive Neuroblastomstammzellen?**

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur

RPMI	Gibco
DMEM	Gibco
FCS gold	PAA
Trypsin/EDTA	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Amphotericin B	PAA
Tetracyclin	Invitrogen
DMSO	Fluka
PBS	Gibco

2.1.2. Selektionsantibiotika

Hygromycin	Invitrogen
Blasticidin	Invitrogen
G418	Invitrogen
Spectinomycin	Applichem
Ampicillin	Ratiopharm
Gentamycin	Hexal AG

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Falcon® Gewebekulturflaschen 25cm ² und 75cm ²	Beckton-Dickinson
Pipette 5, 10 und 25ml steril	Costar
Zentrifugen-Röhrchen 15 und 50ml	Corning
Filter Tips 0,1-10, 1-200 und 101-1000µl	Starlab
Pasteur-Pipetten	Brandt
Acuvetten	Beckmann
Cryo-Röhrchen 2ml	Roth
6, 12, 24 und 96 Well-Platten	Greiner Frickenhausen
Eppendorf-Tubes 0,2, 0,65 und 2ml	Eppendorf
Petrischalen 94/16mm	Greiner
Elektroporationsküvetten	PeqLab

FACS-Röhrchen
ChamberSlide 2 und 4Well
Combitips 1,25 und 5ml
Sterilfilter 0,20µm

Greiner Frickenhausen
Nunc
Eppendorf
Sartorius

2.1.4. Chemikalien

Trizol
β-Mercaptoethanol
Chloroform
Isopropanol
Ethanol
5FS-Puffer
DTT 0,1M
MgCl
10xPCR-Puffer
dNTP-Mix 10mM
DNA-Längenmarker 100bp
DNA-Längenmarker 1kbp
WB-BenchMark-Leiter
DNA-PP5-Farbpuffer
Ethidium Bromid
Hoechst-Farbstoff 33258
SOC Medium
Salt Solution für Topoklonierung
Matrigel
BSA
Tris-HCl 10mM
Tris-Base 10mM
Na₂EDTA 1mM
Propidium-Jodid
Trypton
Hefe-Extrakt
NaCl
Natronlauge NaOH 1 und 10M
Salzsäure HCl 1 und 10M
Agarose
Select Agar

Invitrogen
Merck
Riedel de Haën
Fluka
Riedel de Haën
Invitrogen
Sigma
Invitrogen
Invitrogen
myBudget
Fermentas
Fermentas
Invitrogen
Fermentas
Roth
Sigma
Invitrogen
Invitrogen
BD Biosciences
NewEnglandBiolabs
Roth
Roth
Roth
Sigma
BD Biosciences
BD Biosciences
Roth
Roth
Roth
Roth
Invitrogen

MTT	Sigma
Glycerin	Merck
Proteinaseinhibitor-Complete-Mix	Roche
MES	Roth
SDS	Gerbu
LDS	Sigma
Coomasie Blue G250	Sigma
Phenolrot	Sigma
Fast Green	Chroma
NP-40	Sigma
Natriumdesoxycholat	Merck
Milchpulver	Roth
Bradford Reagenz	BioRad
Streptavidin-Biotin-HRP-Komplex	GE Amersham
ECL Plus WB Detection System	GE Amersham

2.1.5. Enzyme

Reverse Transkriptase Superscript2	Invitrogen
Taq-Polymerase	Invitrogen
Restriktionsenzym BSRG I und Cla	NewEnglandBiolabs
RNAse H	TaKaRa

2.1.6. Verwendete Antikörper

Maus-anti-Mensch-IgG p75NTR NGFR (ab3125)	abcam
Goat-anti-Maus-IgG FITC-gelabelt (1030-02)	SouthernBiotech
Polyklonaler Kaninchen-anti-TetR-IgG (ab33249)	abcam
Biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG (E0432)	DakoCytomation
Monoklonaler Maus-anti- β -Aktin-IgG (A5441)	Sigma
Biotinylierter Ziege-anti-Maus-IgG (E0433)	DakoCytomation

2.1.7. Verwendete Lösungen und Puffer

PCR-Ladepuffer	50%Glycerin; 0,25%Bromphenolblau; 0,25%Xylencyanol FF; EDTA (ph 8,0; 1mM);
TAE Puffer	Tris 2M; EDTA (ph8,0; 50mM)
PBS	140mM; KCl 10mM; Na ₂ HPO ₄ 6,4mM; KH ₂ PO ₄ 2mM

RIPA-Puffer	50mM TRIS-HCL, ph 7,4; 1%NP-40; 0,25% Na-Desoxycholat; 150mM NaCl; 1mM EDTA
20x MES-SDS Laufpuffer	MES 50mM; TRIS Base 50mM; SDS 0,1%; EDTA 1mM; aqua deion. ad 1000ml
4x NuPAGE-LDS-Ladepuffer	TRIS-HCl 106mM; TRIS-Base 141mM; Lithium Dodecyl Sulfat 2%; EDTA 0,51mM; Glycerin 10%; Coomassie Blue G250 1% 0,22mM; Phenolrot 1% 0,175mM; aqua deion. ad 10 ml
10x WB-Transferpuffer	Tris Base 30,3g; Glycin 144g; aqua deion. ad 1000ml
PBS-Tween 0,02%	1000ml PBS; 200µl Tween-20
Blockierungslösung	5% Milchpulver; 100ml PBS
Coomassie-Färbelösung	Commassie R-250 0,5%; Methanol 40%; Essigsäure 10%; aqua deion ad 500ml
Fast Green-Färbelösung	Fast Green FCF 0,5%; Methanol 10%; Essigsäure 10%; aqua deion ad 500ml
20x SSC-Puffer	NaCl 3M; Natriumcitrat 0,3M; aqua deion. ad 1000ml
MTT Solubilisierungspuffer	DMSO 100ml; SDS 10%; Eisessig 0,6ml

2.1.8. Verwendete Kits

RNeasy Mini-Kit	Qiagen
Reverse Transkriptase Kit	Invitrogen
HiSpeed Plasmid Mini Kit	Qiagen
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
T-Rex System Core Kit pcDNA 4/TO	Invitrogen
pCR8/GW/Topo TA Cloning Kit	Invitrogen
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
Annexin V Assay	BD Biosciences

2.1.9. Verwendete Geräte

Pipetierhilfe Pipetus	Hirschmann
Pipette Research 0.1-2, 2-20, 20-200 und 100-1000µl	Eppendorf
T-Gradient Thermoblock	Biometra
T-Personal Thermoblock	Biometra
Elektrophoresekammern	Invitrogen
BioDoc Analyse UV-Detektionsgerät	Biometra
Dispensette 10ml	Brand
Coulter Counter	Beckman Coulter

Epics XL FACS	Beckman Coulter
Mikroskop Axiovert25	Zeiss
Fluorezenzmikroskop IM35	Zeiss
pH-Meter	WTW
Autoklav/Dampf Sterilisator 2540EL	Tuttnauer
Feinwaage (max. 420g)	Kern
Feinwaage (max. 110g)	Ohaus
Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop
Zentrifuge Allegra X22R	Beckman Coulter
Biofuge fresco	Kendro Lab.
Zentrifuge Rotixa 50S	Hettich
Zentrifuge 5415C	Eppendorf
Blockthermostat TCR100	Roth
Thermomixer comfort 1.5ml	Eppendorf
RDT basic	IKA Werke
Cytospin3	Shandon
Certomat R/H	Braun Biotech
REA X top Rüttler	Heidolph
Steril GARD Class II Typ A/B3	Baker Company
SL CO ₂ Inkubator	Shel Lab
XCell-SureLock-Gelkammer	Invitrogen
Photometer	Eppendorf
Elektroporator	PeqLab

2.1.10. Verwendete Zellen und Zelllinien

Für die Arbeiten und Analysen im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden humane Neuroblastomzelllinien SY5Y, LAN1, IMR5, Kelly, KCN, BE2C, SK-N-AS, NB69, SH-EP und GIMEN verwendet. Als Neuroblastomzelllinie murinen Ursprungs diente NXS2. Des Weiteren fanden elektroporativ transfizierte SY5Y-Sublinien-Klone #1 und #2 mit stabiler Expression des Neurotrophinrezeptors p75NTR und der retroviral transfizierte SH-EP-Sublinien-Klon #26 mit stabiler Expression eines Tetrazyklin-Repressors Verwendung.

SY5Y-, SH-EP-, NB69-, GIMEN-, SK-N-AS-, KCN-, IMR5 und Kelly-Zellen wurden von Garrett M. Brodeur, Children's Hospital of Philadelphia, USA, zur Verfügung gestellt. Der SH-EP-TR Klon #26 wurde von Dr. Frank Westermann, DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt.

BE2C- und LAN1-Zellen wurden von Prof. Dr. Lothar Schweigerer, Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

NXS2-Zellen wurden von Prof. Dr. Holger Lode, Universitätsklinikum Greifswald, zur Verfügung gestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen (Laminar-flow) statt. Sämtliche Tumorzelllinien wurden bei 37°C, 80% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Partialdruck von 5% kultiviert. Grundlage für Kulturmedium war bei sämtlichen humanen Neuroblastomzelllinien RPMI, bei der murinen Neuroblastomzelllinie NXS2 DMEM. Jeweils zugegeben wurde 10% FCS (fetales Kälberserum), 100µg/ml Penicillin/Streptomycin und 250µg/ml Amphotericin B. Zur Selektion wurden verschiedene Antibiotika in zelltypspezifischen Konzentrationen verwendet (Tabelle 6). Eine T75 Flasche wurde mit 18ml Medium, eine T25 Flasche mit 9ml Medium gefüllt. Ein Wechsel des Mediums fand alle 2-3 Tage oder nach spezifischem pH-abhängigem Farbumschlag des Mediums statt.

Zellen	Selektionsantibiotikum	Konzentration
Stabil p75NTR- transfiziert	Hygromycin	200µg/ml
Tetracyclinrepressor-transfiziert	Blasticidin	7,5µg/ml
Tetracyclinrepressor Und pDest30-transfiziert	Blasticidin und Geneticin (G418)	5µg/ml und 500µg/ml

Tab. 6: In der Zellkultur verwendete Selektionsantibiotika mit Konzentrationsangaben.

2.2.2. Passagierung von Zellen

Eine Teilung bzw. das Splitten der Zellen wurde bei Erreichen einer 80%iger Konfluenz in den Flaschen vorgenommen. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und 3ml (T75 Flasche) oder 2ml (T25 Flasche) 0,2%iges Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde der Lysevorgang mit Mediumzugabe abgestoppt. Danach wurden die Zellen 5 Minuten bei 800U zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1-5ml frischem Medium resuspendiert und die gewünschte Zellmenge ausplattiert.

2.2.3. Kryokonservierung

Die Zellen wurden trypsiniert, pelletiert und dann in 1,7 ml FCS mit 10% DMSO aufgenommen. Anschließend wurden sie bei -80°C eingefroren.

2.2.4. Auftauen

Das im 37°C warmen Wasserbad aufgetaute Material wurde zu 10ml vorgelegtem Medium pipettiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert und in vorgelegtem Medium resuspendiert.

2.2.5. Mykoplasmentest

Regelmäßig wurden die Zellen für mehrere Tage in Medium ohne Antibiotikazusätze kultiviert. Der anschließend zugegebene interkalierende Farbstoff Hoechst 33258 zeigte fluoreszenzmikroskopisch etwaige Mykoplasmenkontaminationen.

2.2.6. MTT Proliferationsassay

Der MTT Proliferationsassay dient der Quantifizierung und Viabilitätsmessung von Zellen unter Einfluss verschiedener Faktoren (im Rahmen dieser Studie vor allem Selektionsantibiotika). Zur Durchführung wurden zu den in 96-Well-Mikrotiterplatten kultivierten 10.000 Zellen nach der Behandlung mit exogenen Faktoren pro Well 20µl MTT-Lösung hinzupipettiert (6mg/ml MTT in PBS). Nach Inkubation von 4 Stunden bei 37°C folgte ein Waschschritt mit 100µl Solubilisierungslösung. Die mitochondriale Reduktion des gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem violetten Formazan Salz wurde mittels Photometer bei 570nm quantifiziert.

2.2.7. RNA-Isolierung

Zunächst wurden die Zellen mit 500µl Trizol über 5 Minuten bei RT lysiert. Anschließend wurde bei 13.000 U und 25°C für 15 Minuten zentrifugiert und dem Überstand 250µl Chloroform zugegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die hydrophile RNA mittels Zugabe von Isopropanol aus der oberen, wässrigen Phase isoliert. Es folgte die weitere Aufreinigung mittels Zentrifugationen mit 13.000 U bei 4°C für 10 Minuten und Zugabe von 500µl 80%igem Ethanol. Das in 100µl Aqua aufgenommene RNA-Pellet wurde mit 500µl RLT-Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen), 430µl Ethanol absoluta und 5µl Mercaptoethanol gemischt. Eine Chromatographie RNeasy-Säule wurde anschließend mittels Zentrifugation (15 Sekunden bei 8000 U) mit 700µl dieser Mischung geladen, mit RW1-Puffer und RPE-Puffer gewaschen (beide RNeasy-Kit, Qiagen) und eine Minute bei 8000 U wieder trocken zentrifugiert. Die Elution der RNA mit 50µl RNase-free-water erfolgte mit selbiger Zentrifugation. Für die folgende Herstellung von cDNA oder die Amplifizierung spezifischer RNA-Regionen wurde die Konzentration der gereinigten RNA am NanoDrop Photometer quantifiziert.

2.2.8. Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription wird cDNA aus zuvor aufgereinigter mRNA synthetisiert. Der cDNA fehlen im Vergleich zu normaler genomischer DNA die Intronabschnitte.

Es wurden zunächst maximal 3µg gereinigter RNA in 6µl aqua, 1µl 0,1M dNTPs und 3µl Random-Primer gemischt und die mRNA 5 Minuten lang bei 65°C denaturiert. Anschließend wurde zu gleichen Teilen ein Mastermix (5µl 5-Puffer, 5µl 25mM MgCl₂, 2,5µl 0,1mM DTT, 1,25µl RNase out und 1,25µl Superscript II Reverse Transkriptase, System von Invitrogen) zugegeben. In einer PCR-Maschine wurde die Probe für 10 Minuten bei 25°C zum „Annealing“, für 50 Minuten bei 42°C zur cDNA-Synthese und 15 Minuten bei 70°C zur Inaktivierung der Enzyme erhitzt. RNA-Reste in der Probe wurden durch 1µl RNase H bei 37°C in 30 Minuten verdaut.

2.2.9. Semiquantitative PCR

Zur Amplifizierung eines bestimmten Stücks wurden 100ng cDNA oder genomischer Plasmid-DNA auf Eis mit 2µl 10xPCR-Puffer, 0,57µl 10mM dNTP-Mix, 1µl Testprimer sense, 1µl Testprimer rev. (alle Primer 1pM), 0,13µl Taq Polymerase und 12,30µl H₂O ad injectionem versetzt. Zur relativen Quantifizierung der vorhandenen cDNA im Verhältnis zur Glycerin-Aldehyd-Dehydrogenase (GAPDH) erfolgte zudem die Zugabe von 1µl Gap DH sense Primer und 1µl Gap DH rev. Primer.

In der PCR-Maschine erfolgte zunächst für 5 Minuten bei 94°C die Denaturierung der Doppelstränge. Dann lief die dreißigfache Wiederholung der folgenden drei Schritte ab: 30 Sekunden bei 94°C Denaturierung der Amplifikate, 30 Sekunden Annealing-Temperatur des spezifischen Primers (Tabelle 7) und 60 Sekunden bei 72°C zur Synthese der komplementären cDNA. Abschließend erfolgte ein 10minütiger Schritt bei 72°C zur Elongation um eine Adenosin-Base pro cDNA-Strang.

Amplifikat	Sequenz	Annealing-Temperatur
P75NTR aus SY5Y-cDNA	sen.: TCG TGG AGA GTC TGT GCA GT rev.: TGG ACA GGA AGT GTG GTC AG	59,4°C
P75NTR aus pTet-splice	sen.: GCCACCATG GGG GCA GGT GCC ACC rev.: TCA CAC CGG GGA TGT GGC	63,5°C
GAPDH	sen. CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA rev.: TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC	64,4°C
Tet-Repressor1	sen.: CGC CTT AGC CAT TGA GAT GT rev.: TGA TCA ATT CAA GGC GGA AT	53,2°C
Tet-Repressor2	sen.: CGC CCA GAA GCT AGG TGT AG rev.: TCT GCA CCT TGG TGA TCA AA	55,3°C

Tab. 7: Primer-Sequenzen und Annealing-Temperaturen für semiquantitative PCR.

2.2.10. Restriktionsverdau von Plasmiden

Eine zu schneidende Plasmid-Menge wurde mit adäquaten Restriktionsenzym-Einheiten (Tabelle 8, eine Unit Enzym schneidet 1µg cDNA in einer Stunde) und 20% enzymabhängigem Puffer versehen. Die enzymatische Aktivität bei 37°C wurde nach einer Stunde beendet (10 Minuten, 60°C). Mittels anschließender Gelelektrophorese wurden gereinigte Plasmide oder der richtige Einbau eines cDNA-Stücks in einem Plasmid nachgewiesen.

Plasmid	Restriktionsenzym	Puffer
TetR	EcoR1 BamH1	NEB3 und BSA NEB3 und BSA
GFP und p75 in pDest 30	BSRG I	NEB4 und BSA
P75 in pTet	Cla I	NEB4

Tab. 8: Restriktionsenzyme und Puffer für Verdaureaktionen.

2.2.11. Gelelektrophorese

1,5g oder 2g Agarosepulver wurde mit 100ml 1xTAE gemischt, vier Minuten aufgekocht und in eine Kammer mit 40 oder 20 Taschen gegossen. Die cDNA-Proben wurden mit 2µl DNA-PP5x-Farbpuffer und zu jeweils 15µl in die Taschen aufgetragen. Vergleichende DNA-Längenmarker (Fa. Fermentas) wurden stets mitgeführt. An die Elektrophoresekammer wurden 120 V Spannung und 150 Watt Stromstärke für 60 Minuten angelegt. Die DNA wurde mit interkalierendem Ethidiumbromid angefärbt. Das Ergebnis wurde unter UV-Licht betrachtet, fotografiert und digital gespeichert.

2.2.12. Vermehrung von Plasmid-DNA in *E.coli* durch Transformation

10µl kompetente *Escherichia coli* – Bakterien (DH-5-α oder 5-HT-Kulturen von Invitrogen) und 100ng des zu vermehrenden Plasmids wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien einem einminütigen und 42°C-warmen Hitzeschock ausgesetzt. Nach einer weiteren Minute auf Eis wurde dem Ansatz 200µl SOC-Medium zugegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf einer mit Selektionsantibiotika versehene Agarplatten ausgestrichen (Tabelle 9). Nach 12-24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurden einzelne Klone von der Platte abgenommen und nach dem Protokoll für DNA-Präparation weiterverarbeitet.

Antibiotika	Konzentration	Plasmid
Ampicillin	200µg/ml	pT-Rex-Dest30 pTet-splice
Spectinomycin	100µg/ml	pCR8/GW/Topo
Kanamycin	40µg/ml	SOX10 Plasmid

Tab. 9: Verwendete Selektionsantibiotika und ihre Konzentrationen in Agarplatten.

2.2.13. Präparation von DNA aus *E.coli*

Es wurde das HiSpeed Plasmid Mini- (<1000ng/µl) und Maxi-Kit (>1000ng/µl) der Firma Qiagen zur Aufreinigung von Plasmid-DNA verwendet. Von einer Agarplatte oder einem Glycerinstock wurden transfizierte *E.coli* in mit Selektionsantibiotika versehenes Luria-Broth-Medium überführt. Nach Inkubation für 12 Stunden bei 37°C auf einer Rüttelplatte wurden die zellulären Bestandteile mit 3000 U für 5 Minuten, respektive mit 4500 U für 15 Minuten zentrifugiert. Auf das Pellet wurden 300µl/10ml des P1-RNase-Puffers und 300µl/10ml P2-Lysepuffer (beides Qiagen) gegeben. Nach Durchmischung und 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 300µl/10ml P3-Puffer (Qiagen) zum Ausfällen der Proteinbestandteile hinzugesetzt. Bei der Minipräparation erfolgte die Entfernung der Proteine nach Inkubation für 10 Minuten bei -20°C mittels Zentrifugation für 5 Minuten bei 10.000 U. Zur Elution der DNA in der Minipräparation schlossen sich die Fällung mit 70 Vol-% Isopropanol und eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 U an. Das DNA-Pellet wurde mit 500µl Ethanol-70%ig aufgereinigt, 10 Minuten bei RT getrocknet und in 20µl Aqua aufgenommen.

Bei der Maxipräparation nutzten wir eine Qiafilter-Spritze zur Proteinabtrennung. An einem mit 10ml QBT-Puffer equilibriertem HiSpeed-Maxi-Röhrchen wurde anschließend die Plasmid-DNA abgeschieden, mit 60ml QC-Puffer gewaschen und mit 15ml QF-Puffer wieder eluiert (alles Qiagen). Nach Fällung mittels 10,5ml 70% Isopropanol über 5 Minuten wurde die DNA im QIAprecipitator-Maxi-Filter mit 2ml Ethanol-70% aufgereinigt, getrocknet und abschließend mit 1,5ml TE-Puffer eluiert.

Sowohl nach Maxi- als auch nach Minipräparation wurden Proteinreste mittels Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt. 100µl DNA-Probe wurden dazu zweimal mit 100µl Phenol-Chloroform-Lösung (Firma Roti) jeweils für 5 Minuten bei Raumtemperatur aus der oberen, hydrophilen Phase geschüttelt. Im nächsten Schritt wurde die obere Phase mit 200µl Ethanol abs. und 10µl 3M Natriumacetat versehen und 30 Minuten bei -80°C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 30 Minuten bei 13.000 U und 4°C wurde das Pellet mit 300 µl Ethanol 80% gewaschen, getrocknet und in 20µl Aqua aufgenommen.

Abschließend erfolgte die Quantifizierung der DNA am Nanodrop-Messgerät.

2.2.14. Anlegen von Glycerinstocks

500µl LB-Medium mit Plasmid-transfizierten *E.coli* wurde mit 700µl Glycerin-86%ig vermischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.15. Elektroporation von Plasmid-DNA

5×10^6 Neuroblastomzellen wurden in 700 μ l Medium mit 20% FCS aufgenommen, unter sterilen Bedingungen in Elektroporationsküvetten pipettiert, mit 10 μ g der zu transfizierenden Plasmid-DNA versetzt und auf Eis inkubiert. Die Zellwände wurden mit je zwei Pulsen unipolaren Stroms (Spannung 200 Volt, Intervall eine Sekunde und Pulslänge 99msec.) durchlässig gemacht, um das Plasmid aufnehmen zu können. Es erfolgte die umgehende Resuspension in entsprechendem Medium und 24 Stunden Inkubationszeit, bevor plasmidspezifisches Selektionsantibiotikum zugegeben wurde.

2.2.16. Zelldurchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einer Laserquelle vorbeigeführt. Dieser Laser regt Fluorochrome an und das von den Fluorochromen emittierte Lichtsignal wird dann mit einem Detektor (Phospho Multiplier Tube, PMT) gemessen und ausgewertet.

Je Zelllinie wurden zweimal 5×10^5 Zellen in 2ml PBS aufgenommen und bei 800 U 5 Minuten zentrifugiert. Zu den in 1 ml PBS resuspendierten Zellen wurde 5 μ l des spezifischen Erstantikörpers gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1ml PBS wurden 5 μ l des zweiten, FITC-gekoppelten Antikörpers zugesetzt und 15 Min. bei RT im Dunklen inkubiert, woran sich erneut zwei Waschschriffe anschlossen. In der Negativkontrolle wurde ausschließlich der Zweit-Antikörper eingesetzt. Zur Messung wurde das Durchflusszytometer Epics4L (Beckman Coulter) genutzt. Zur Auswertung wurde die Software Expo32 (Beckman Coulter) verwendet.

2.2.17. Zellzyklusanalyse

Die Zellteilung jeder Zelle zeigt einen zyklischen Ablauf. In der M-Phase werden die DNA, der Zellkern und die Zellorganellen auf zwei Tochterzellen verteilt. In der G1-Phase wächst die Zelle und es liegt ein vollständiger Satz Ein-Chromatid-Chromosomen vor. In der S-Phase wird die chromosomale DNA redupliziert und Histone produziert. In der G2-Phase liegt ein kompletter Satz Zwei-Chromatid-Chromosomen vor, eine erneute Zellteilung wird vorbereitet. Die G0-Phase bezeichnet den Ruhezustand ausdifferenzierter Zellen, die sich nicht mehr teilen und dauerhaft im G1-Stadium verweilen.

Durch Verlust oder übermäßige Produktion von Onkogenen ist dieser Zellzyklus in Tumorzellen häufig verändert und läuft unkontrolliert ab.

Mit Trypsin aus einer T75-Flasche gelöste Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und 30 Minuten in 70%-igem Eisethanol fixiert. Um das Verklumpen der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen dabei regelmäßig vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden die Zel-

len erneut dreimal in PBS gewaschen und mit 5µg Ribonuklease behandelt, um Messfehler durch RNA zu minimieren. Die DNA wurde mit 10µg Propidiumjodid angefärbt und im Durchflußzytometer gemessen.

2.2.18. BrdU-Assay

Über die Messung des Einbaus von Brom-Desoxy-Uridin (BrdU) kann die DNA Synthese und damit die Zellproliferation exakt quantifiziert werden. Dazu wurden die Zellen zunächst über 24 Stunden mit BrdU kultiviert. Nach Auswaschung überschüssigen BrdUs mit PBS wurden die Zellen für 30 Minuten in 70% Ethanol/HCl fixiert und permeabilisiert. Nach 90 Minuten Inkubation mit einem BrdU-spezifischen, Peroxidase-gekoppelten Antikörper und einer erneuten Waschung erfolgte die kolorimetrische Auswertung des in der DNA eingebauten BrdUs.

2.2.19. Annexin-V-Assay

Es wurde ein Annexin-V-Assay der Firma BD genutzt, um bei adhärent gewachsenen Zellen die frühe und späte Apoptose zu quantifizieren.

Zunächst wurde der Kulturüberstand in 15ml Falcon überführt und auf Eis gekühlt gelagert. Danach wurden die adhären Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Waschlösung wurde anschließend jeweils der Überstandslösung hinzugefügt. Nach Zugabe von 10µl Lysat wurde das Lösen der Zellen mikroskopisch beobachtet und durch Zugabe von 5ml Medium mit 10% FCS-Serum wieder abgestoppt. Die gelösten Zellen wurde ebenfalls der Überstandslösung zugeführt und danach fünf Minuten bei 1000 U und 4°C zentrifugiert. Nach einem zweiten Reinigungsschritt mit 1ml Binding Puffer und 1% BSA, erneutem Abzentrifugieren und Aufnahme der Zellen in 100µl Binding Puffer mit 1% BSA wurde auf Eis 5µl Annexin V und 5µl 7AAD zupipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis und im Dunkeln wurde in jedes Röhrchen 900µl Binding Puffer +1% BSA pipettiert und die Annexin-V-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Zur Kontrolle wurde bei erstmaliger Messung jeweils ein Ansatz nur mit Annexin V, nur mit 7AAD und ohne Zusätze mitgeführt.

2.2.20. Herstellung von Zellextrakten für Western Blot

Der Western Blot ist eine Nachweismethode für Proteine durch Bindung spezifischer Antikörper auf einer Membran.

Die Zellproteine wurden möglichst effektiv aufgereinigt, störende DNA und RNA entfernt und bestmögliche Ionenverhältnisse eingestellt. Nach dreimaliger PBS-Waschung der Zellen einer T75-Flasche wurde 500µl RIPA-Puffer mit 20µl Proteinaseinhibitor zugege-

ben. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis (um Denaturierung, Dephosphorylierung und Proteolyse zu vermeiden) wurde das Lysat in 20 Minuten bei 13.000 U und 4°C zentrifugiert und der Überstand bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.21. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Komplexbildung mit Seitenketten von Proteinen verändert das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blau von 465 zu 595nm. Diese Eigenschaft wurde zur einfachen, raschen und sensitiven Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit Hilfe von Bradford-Reagenz genutzt. Für jede neue Proteinbestimmung wurde zunächst eine Eichkurve mit Hilfe von standardisierten BSA-Konzentrationen (0-10µg/ml) ermittelt. Zur Messung von jeweils 5µl Lysatprobe wurden 795µl PBS und 200µl Bradfordreagenz zugegeben und nach 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur am Photometer gemessen.

2.2.22. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor dem Nachweis spezifischer Proteine im Western Blot wurde das Proteingemisch ein-dimensional nach Molekulargewicht in der SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) aufgetrennt. Das gebundene, anionische Detergens SDS überdeckt durch überschüssige negative Ladung die Eigenladung der Proteine. Ein spezieller Ladepuffer (4x NuPAGE-LDS) mit SDS, Glycerin und Coomassie-Blau wurde verwendet. 4-12% NuPAGE Novex BisTRIS-Polyacrylamid-Fertiggele (Invitrogen) waren im standardisierten Gebrauch. Der Gradient von 4% oben und 12% unten gewährleistete im unteren Molekulargewichtsbereich eine bessere Auftrennung der Proteine. MES-Puffer diente als üblicher Laufpuffer. Die Elektrophorese erfolgte in einer speziellen XCell-SureLock-Gelkammer.

Je 20-50µg Gesamtprotein in 20µl Volumen wurde 5µl 4x NuPAGE-LDS-Ladepuffer zugegeben und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Das Gel wurde mit 25µl denaturierter Probe pro Tasche befüllt. Die Proteine wurden mit 120V, 150mA und 150mW über 90 Minuten aufgetrennt. Ein „BenchMark“-Proteinstandard (Invitrogen) wurde stets mitgeführt.

2.2.23. Western Blot

Als Western Blot bezeichnet man die Übertragung von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran und die anschließende spezifische Antikörpermarkierung. Es wurde die Methode des Nass-Blots gewählt.

Von der Kathode zur Anode des Gelhalters wurden nacheinander ein Schwämmchen, ein Whatmanpapier, das zurechtgeschnittene Gel, die Nitrozellulosemembran, wieder ein Whatmanpapier und wieder ein Schwämmchen gelegt. Die Schwämmchen, Whatman-

Papiere und Nitrozellulosemembran waren zuvor in Transferpuffer eingelegt. Luftblasen zwischen Gel und Membran wurden ausgestrichen. Der Gelhalter wurde in das Blotmodul eingesetzt und die Pufferkammer mit 650ml Transferpuffer aufgefüllt. Die negativ geladenen Proteine wanderten bei 150mA und 40Volt dem Spannungsgradienten folgend innerhalb einer Stunde in die Nitrozellulosemembran.

Der Erfolg der Elektrophorese wurde mit Fast-Green-Färbung der Membran und Coomassie-Färbung des Gels geprüft. Nach Spülen der Membran mit PBS wurde diese in der Blockierungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Membran über Nacht mit Erstantikörper, der durch Blockierungslösung entsprechend verdünnt wurde (TetR: 1:500 / β -Aktin 1:2000) bei 4°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde nach dreimaliger Waschung in PBS-Tween 0,02% der Zweitantikörper (bei TetR anti-Kaninchen / bei β -Aktin anti-Maus) in 1:1000-Verdünnung aufgegeben und bei RT eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreischrittigem Waschgang wurde der Streptavidin-Biotin-HRP-Komplex 1:1000 verdünnt aufgegeben und ebenfalls für eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgte ein erneuter dreischrittiger Waschgang. Die Membran wurde für fünf Minuten in ECL-Plus-Detektions-Lösung (Amersham) eingelegt und anschließend in eine Expositionskassette überführt. In einer Dunkelkammer wurde ein Entwicklungsfilm aufgelegt und für fünf bis zehn Minuten durch die stattfindende Chemielumizenzreaktion belichtet. Abschließend wurde der Film entwickelt. Die Membran wurde anschließend zur eventuellen Wiederverwendung in PBS-Tween 0,02% gewaschen und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.24. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde zur spezifischen Färbung von Proteinen durch Antigen-Antikörper-Reaktion in Gewebeschnitten verwendet. Anwendung fand das Prinzip der Dreischritt-Immunanfärbung.

Die verwendeten 5 μ m dicken Schnitte wurden mit dem Ziel des Wasserentzugs zuerst zweimal fünf Minuten in Xylol, anschließend zweimal fünf Minuten in Isopropanol und danach in einer absteigenden Ethanolreihe (96%-80%-70%) inkubiert. Es folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt in geeistem 3%igen H₂O₂, um unspezifische Peroxidasen im Gewebe zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte 20 Minuten in 20x SSC-Puffer gekocht, um alle Antigenepitope zu demaskieren. Die abgeschüttelten Gewebeschnitte wurden mit 10%igem Ziegen Serum in PBS für eine Stunde geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach erneutem dreimaligem PBS-Waschgang wurde der Erstantikörper Maus-gegen-p75NTR, verdünnt auf 1 bzw. 2 μ g/ml, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.25. *In vivo* Versuche an Nacktmäusen

Um das Potential der Zellen, einen Tumor ausbilden zu können, bestimmen zu können, dient das subkutane Einbringen von definierten Mengen an Tumorzellen in Mäuse und die anschließende Beobachtung des Tumorwachstums als Goldstandarduntersuchung. Für die Untersuchung der Veränderungen der Tumorbildungsrate von SY5Y-Zellen durch stabile p75NTR-Transfektion wurden in der Zellkultur von den drei Zelllinien SY5Y-p75NTR #1, SY5Y-p75NTR#2 und SY5Y-Wildtyp jeweils 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 und $2,5 \times 10^7$ Zellen gezüchtet. Nach der Zellzählung wurden die Zellen in 200 μ l Matrigel aufgenommen und auf Eis gelagert, bis sie den Nacktmäusen unter sterilen Bedingungen subkutan in die Flanke injiziert wurden. Jede Maus erhielt eine Ohrmarke, an der sie in folgenden Untersuchungen identifiziert werden konnte. Das Tumorwachstum wurde durch regelmäßiges Vermessen des Tumors mit der Schieblehre und Wiegen des Mausegewichts kontrolliert. Wurde ein Tumor über 1 cm³ groß, galt dies als Abbruchkriterium und die Maus wurde getötet. Alle anderen Mäuse, die keinen Tumor bildeten, wurden bei Beendigung des Experiments nach 180 Tagen getötet.

3. Ergebnisse

3.1. Expression des p75NTR Proteins in primären Neuroblastomen

Um die Expression von p75NTR im Neuroblastom zu untersuchen, wurden immunhistochemische Präparate einer Kohorte von neuroblastischen Primärtumoren analysiert. Außer Neuroblastomen wurden auch die benigneren und differenzierteren Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome untersucht. Zunächst wurde ein Tissue Microarray mit 93 primären und unbehandelten neuroblastischen Tumoren etabliert. Von diesen Tumoren waren 72 als Neuroblastome und 21 als Ganglioneurom/Ganglioneuroblastome klassifiziert worden. In schlecht differenzierten Neuroblastomen war keine p75NTR Expression erkennbar. Demgegenüber war p75NTR in differenzierenden Neuroblastomzellen (p-Wert: $8,4 \times 10^{-5}$) und den neuroblastischen Tumorzellen der Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome (T-Test, P-Wert: $1,7 \times 10^{-5}$) signifikant erhöht zu finden.

Im Gegensatz zu den p75NTR-negativen Neuroblastomzellen in schlecht differenzierten Tumoren, wurde p75NTR in nicht-malignen Zellen aller Gewebeproben in verschiedenem Maße exprimiert. Beispielsweise fanden sich in perivaskulären Zellen, septalen Stromazellen und in Schwannschen Stromazellen deutlich erhöhte p75NTR-Expressionswerte (Abbildung 7 und 8).

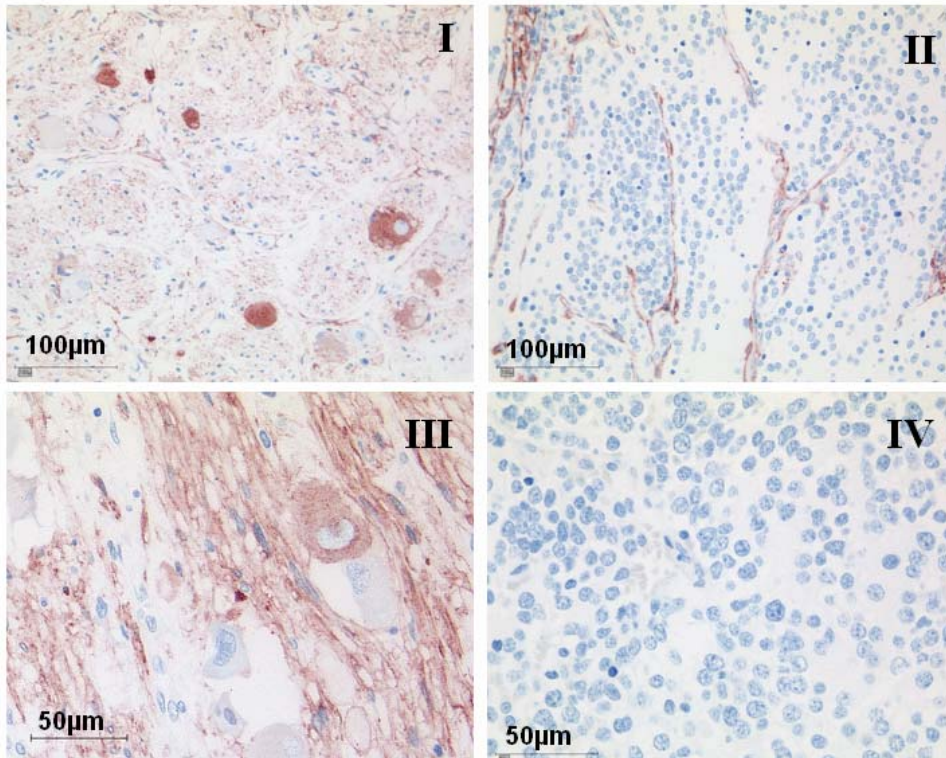


Abb. 7: Immunhistochemische p75NTR-Färbung im Ganglioneuroblastom (I und III) und im schlecht differenzierten Neuroblastom (II und IV). I und II 5-fache und III und IV 40-fache Vergrößerung.

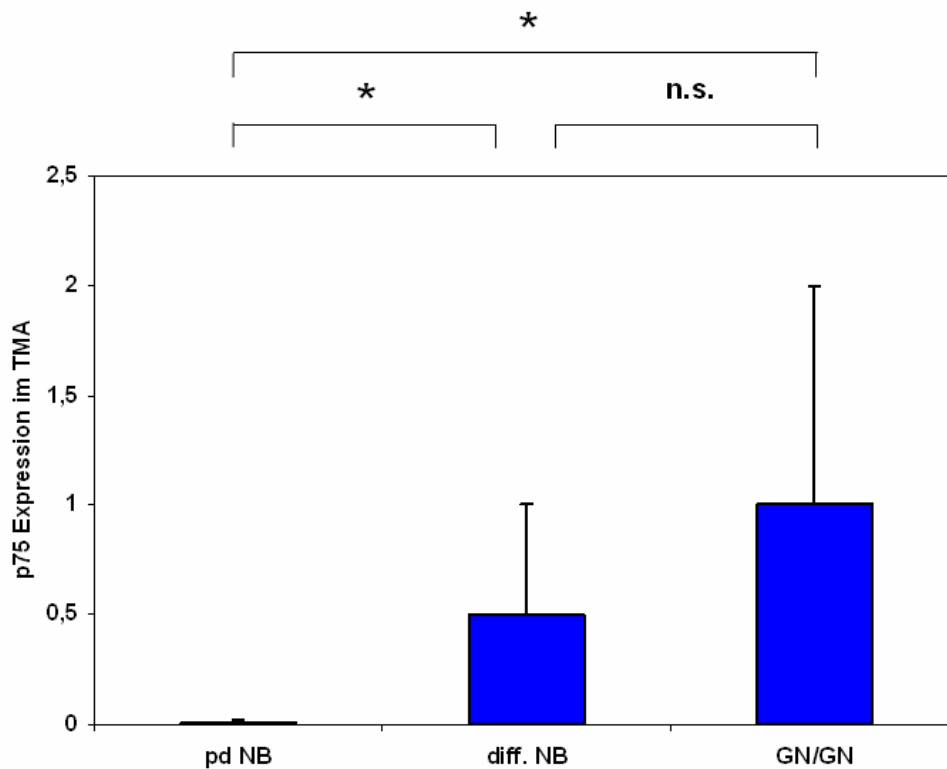


Abb. 8: p75NTR-Expressionshöhe im Tissue-Micro-Array (n=93)

3.2. Expression der p75NTR mRNA in primären Neuroblastomen

Ähnliche Ergebnisse wie im Tissue-Micro-Array wurden auf mRNA-Ebene für eine unabhängige Kohorte mit 110 neuroblastischen Tumoren gefunden. Daten, die zuvor auf Affymetrix Microarrays gemessen wurden, wurden dazu reanalysiert (Abbildung 9). Eine Kaplan-Meier-Analyse dieser Daten zeigte weiter, dass eine hohe p75NTR-mRNA-Expression mit ereignisfreiem Überleben (event free survival) korrelierte (Abbildung 10, T-Test, p-Wert: 0,019).

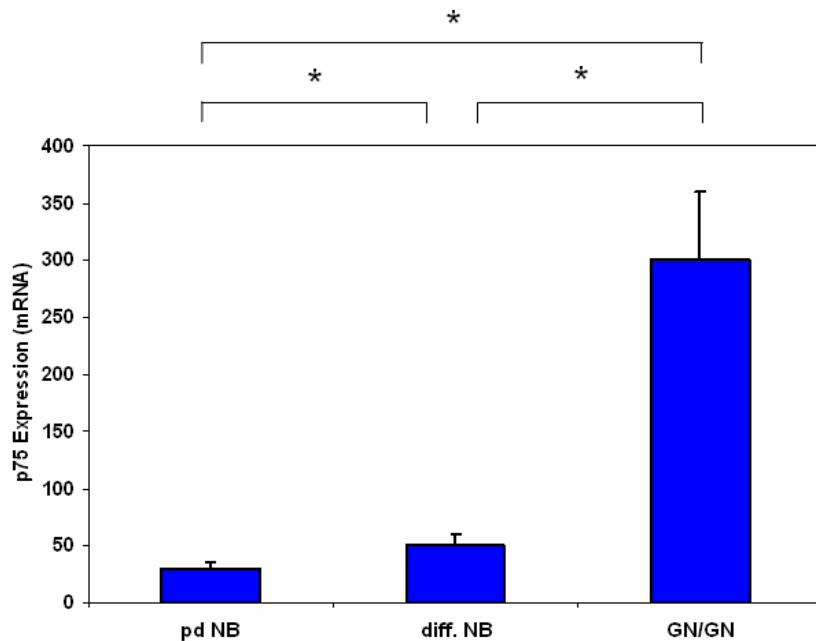


Abb. 9: p75NTR-mRNA-Expressionshöhe im Affymetrix Microarray (n=110).

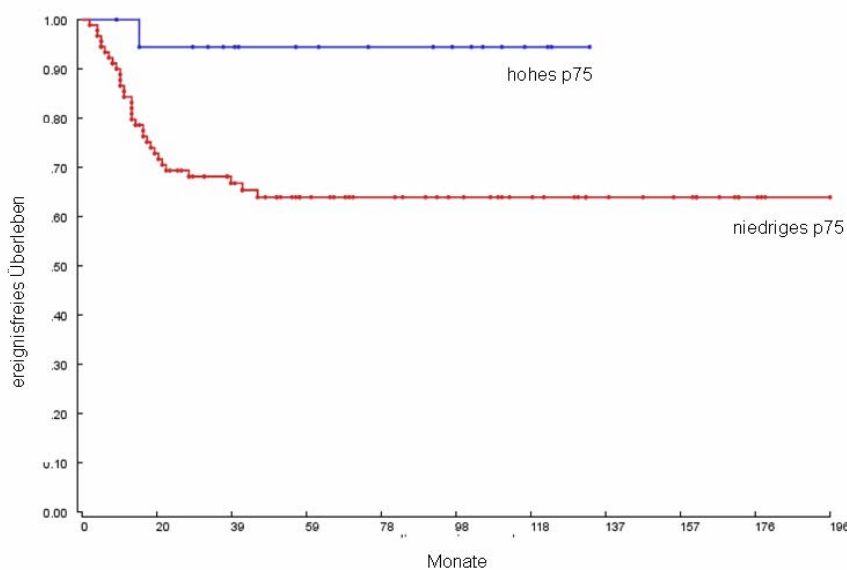


Abb. 10: Kaplan-Meier-Analyse der p75NTR-mRNA-Expressions-Daten (p-Wert: 0,02).

3.3. Expression von p75NTR in Neuroblastom-Zelllinien

Acht etablierte Neuroblastom-Zelllinien wurden auf ihre p75NTR-Proteinexpression mit Zeldurchflusszytometrie analysiert. Vier Zelllinien waren MYCN-amplifiziert (GIMEN, SHEP, SK-N-AS und SY5Y) und vier Zelllinien nicht MYCN-amplifiziert (BE2C, IMR5, KCN und Kelly). Sie leiten sich alle von aggressiven Neuroblastomen hoher Stadien ab und zeigten in der Zellkultur typische morphologische Merkmale undifferenzierter Zellen.

In keiner der Zelllinien war eine p75NTR Expression auf Proteinebene nachweisbar (Abbildung 11).

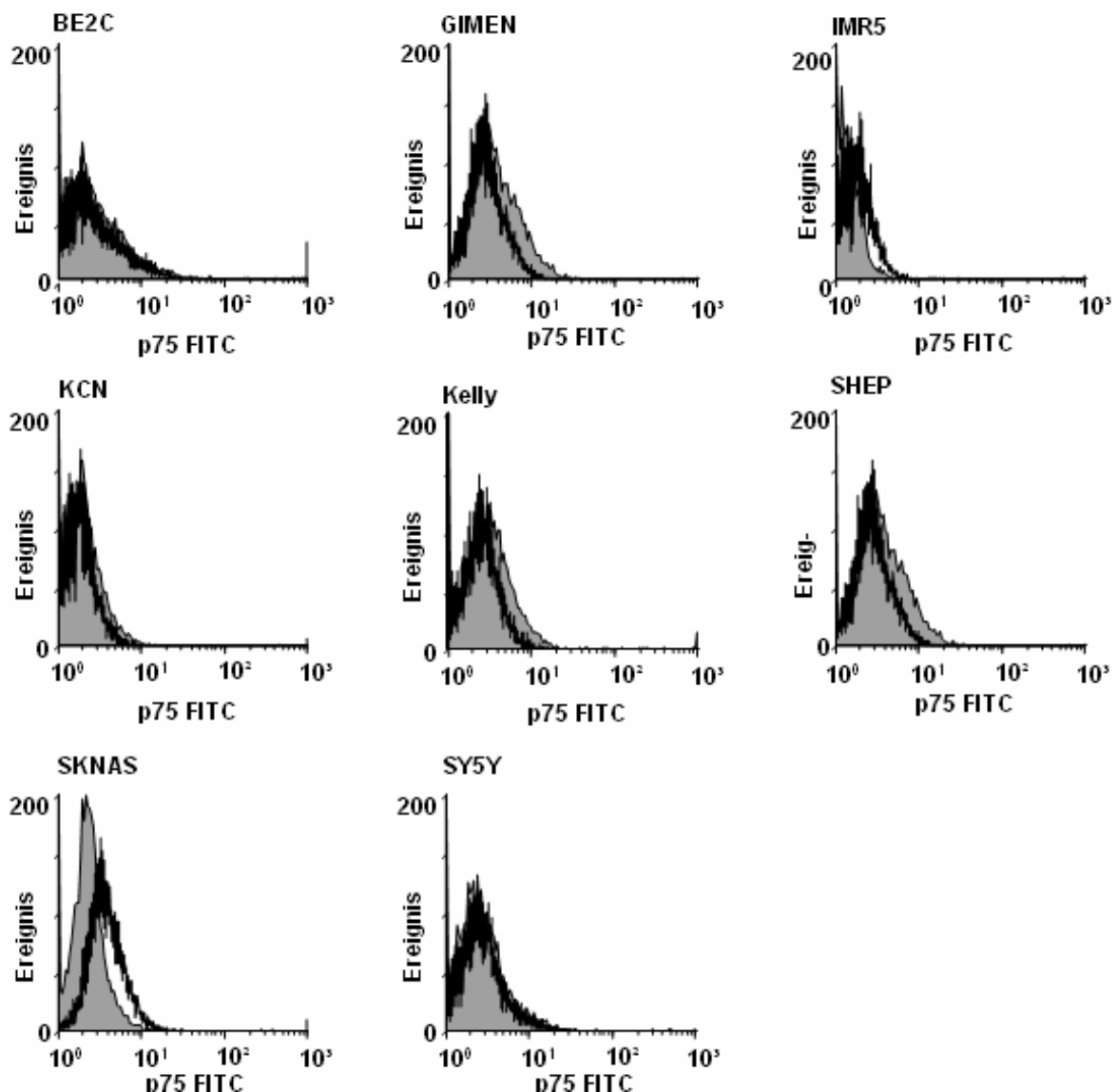


Abb. 11: p75NTR-Proteinexpression war in keiner von acht etablierten Neuroblastom-Zelllinien nachweisbar.

3.4. Auswirkung der ektopen p75NTR-Expression auf SY5Y-Neuroblastomzellen

SY5Y-Zellen wurden elektroporativ mit p75NTR-kodierender cDNA transfiziert (2.2.15). Als vergleichende Negativkontrollen wurden die SY5Y-Zellen gleichzeitig elektroporativ mit einem Leervektor transfiziert. Nach der Selektion von zwei Einzelzellklonen wurde die stabile p75NTR-Proteinexpression mit Zelldurchflusszytometrie überprüft (Abbildung 12). Das Zellwachstum in Gegenwart und in Abwesenheit von NGF (Nerve Growth Factor) wurde mit einem MTT-Viabilitäts-Assay untersucht. Verglichen mit den Leervektorkontrollen war der Anstieg von viablen Zellen über eine Zeit von 12 Tagen bei p75NTR exprimierenden Zellen signifikant erniedrigt. Die Zugabe von NGF hatte keinen Einfluss auf die Anzahl viabler Zellen, weder in p75NTR-positiven Zellen, noch in Kontrollzellen. (Abbildung 13 und 14).

Um zu analysieren, ob verminderte Proliferation oder vermehrte Apoptose zu dem erheblichen Unterschied in der Viabilität führten, wurde anschließend die Proliferationsrate im BrdU-Assay und die Apoptoserate im Annexin-V-Assay analysiert. Die im ELISA gemessene BrdU-Aufnahme nach 24 Stunden war in p75NTR-exprimierenden SY5Y-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen moderat vermindert (Abbildung 15). Im Gegensatz dazu war eine deutliche Steigerung der Anzahl apoptotischer Zellen im Annexin-V-Assay zu erkennen (Abbildung 16).

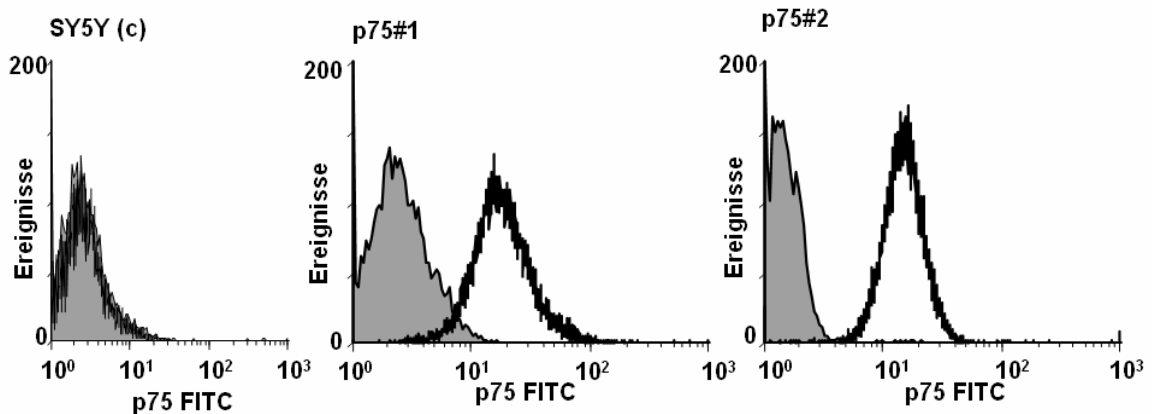


Abb. 12: p75NTR-Expression zweier stabil mit p75NTR-Vektor transfizierten SY5Y-Einzelzellklone im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp.

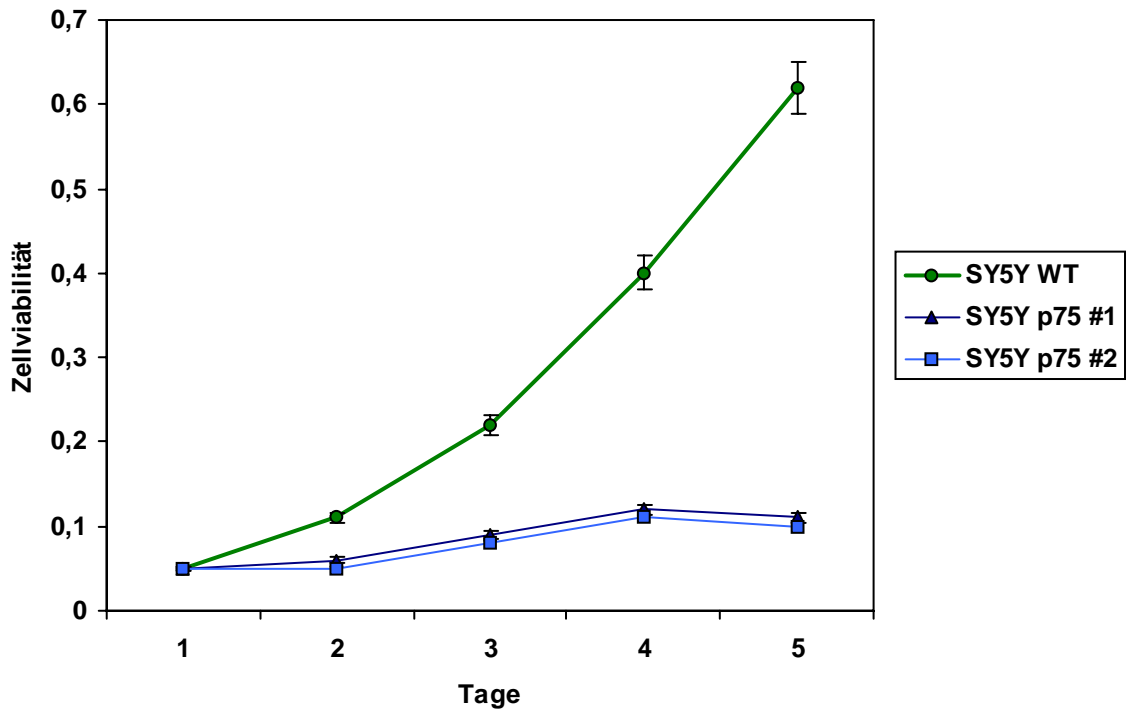


Abb. 13: Abfall der Zellviabilität im MTT-Assay bei zwei stabil p75NTR-exprimierenden SY5Y-Einzelzellklonen im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp.

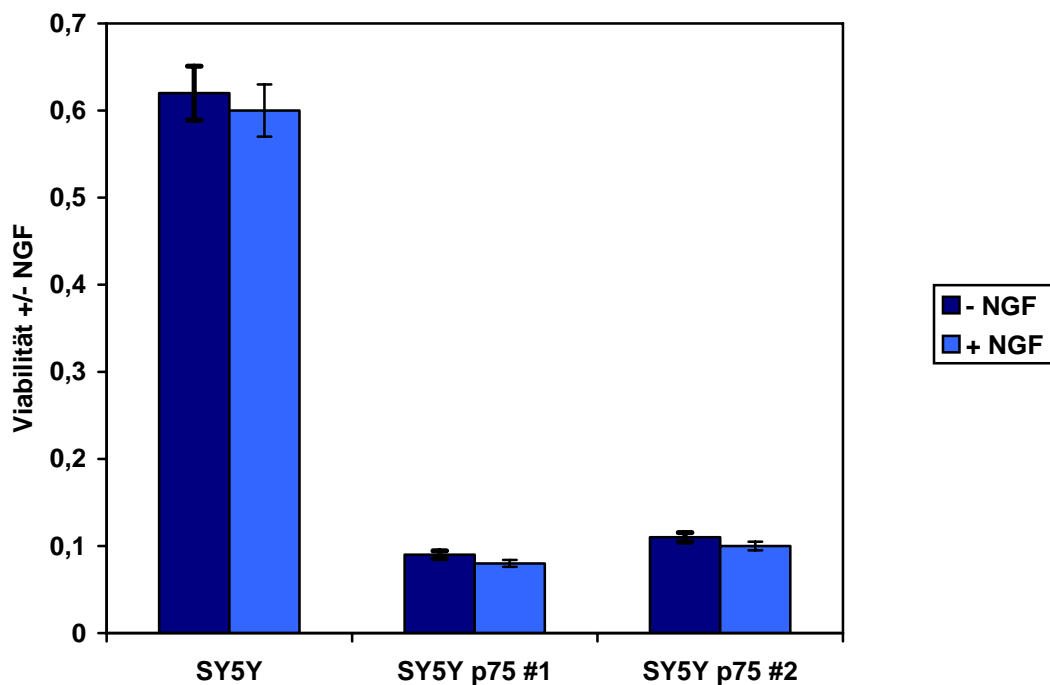


Abb. 14: Der MTT-Assay zeigt einen Viabilitätsverlust bei zwei stabil p75NTR-exprimierenden SY5Y-Einzelzellklonen im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp, exemplarisch am Tag zwölf. Die Ergebnisse werden durch NGF-Zugabe nicht beeinflusst.

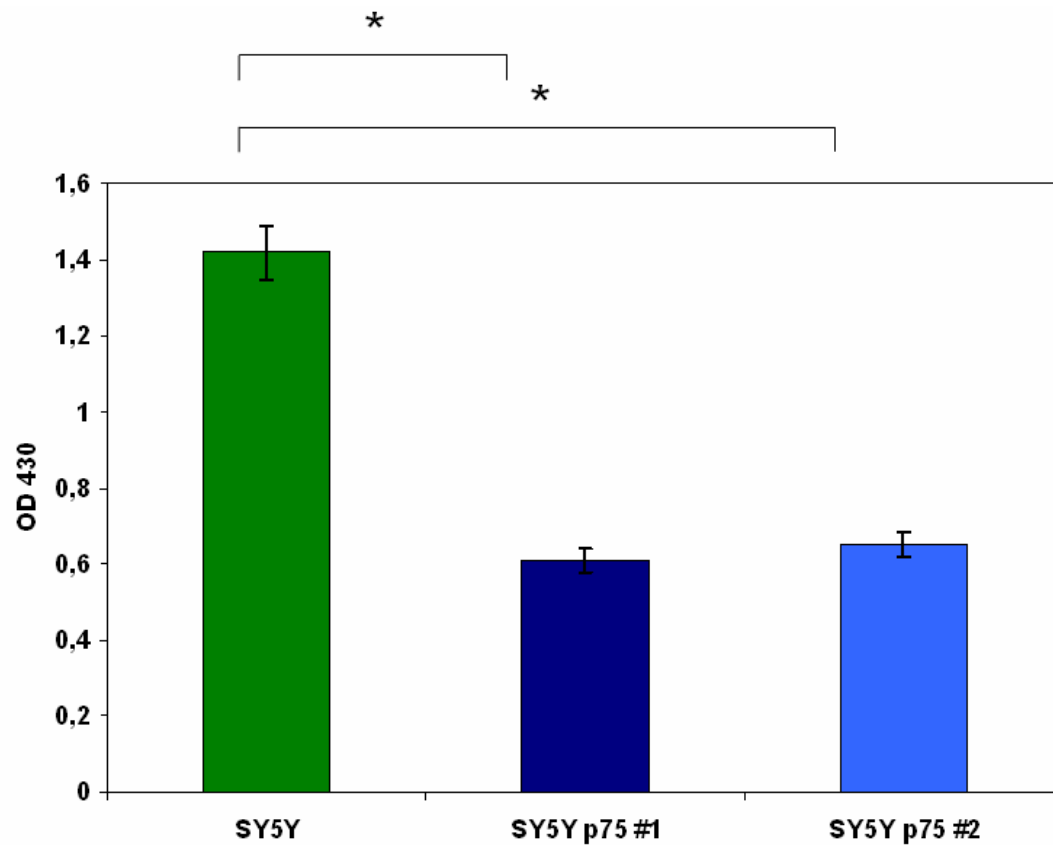


Abb. 15: Abfall der Proliferationsrate im BrdU-Assay bei zwei stabil p75NTR-exprimierenden SY5Y-Einzelzellklonen im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp.

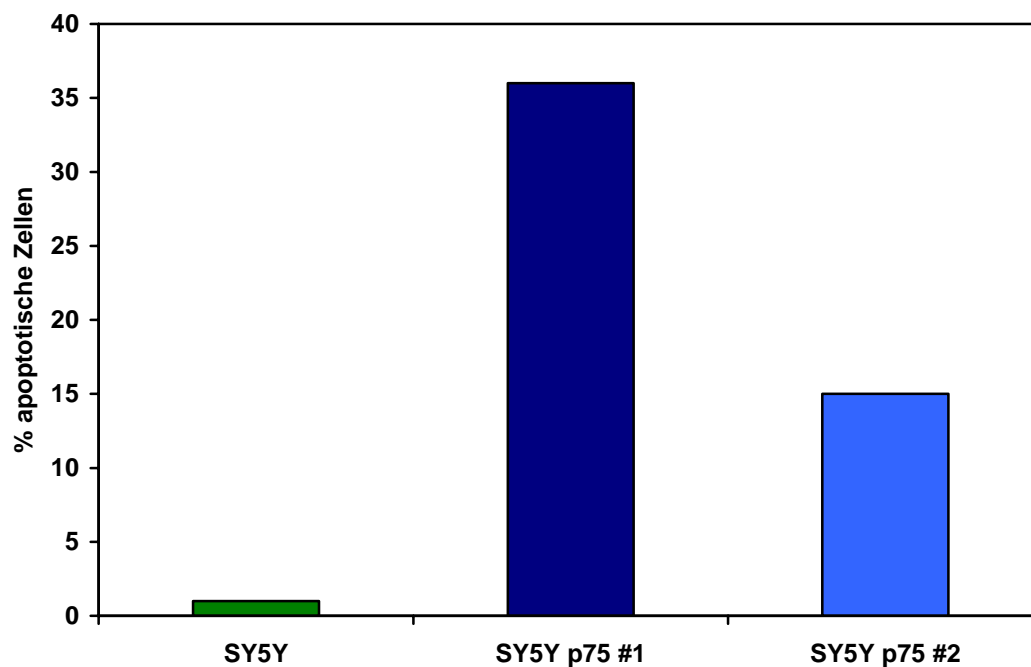


Abb. 16: Anstieg der Apoptoserate im Annexin-V-Apoptose-Assay bei zwei stabil p75NTR-exprimierenden SY5Y-Einzelzellklonen im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp.

3.5. Tumorigenität p75NTR-transfizierter Neuroblastomzellen *in vivo*

Um den Effekt von p75NTR auf neuroblastische Tumoren *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Xenograft Maus Modell etabliert. Es wurden bei jeweils zwei Mäusen 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , oder 1×10^7 SY5Y-Neuroblastom-Zellen subkutan in die Flanken injiziert. Bei den SY5Y-p75NTR #1 und SY5Y-p75NTR#2-Zellen wurden außer den oben genannten Zellzahlen auch noch jeweils zweimal $2,5 \times 10^7$ Zellen injiziert.

In allen Mäusen, denen die Wildtyp SY5Y-Zellen injiziert wurden, konnte Tumorwachstum beobachtet werden. Dabei korrelierte die benötigte Zeit bis zum Erreichen eines Tumorumfanges von 1000mm^3 invers mit der zuvor injizierten Zellzahl. In den Mäusen, die entweder SY5Y-p75NTR#1 oder SY5Y-p75NTR#2 injiziert bekamen, konnte innerhalb von 180 Tagen kein Tumorwachstum erkannt werden. Diese Mäuse wurden am 180. Tag getötet. Auch nekroptisch gewonnene Proben zeigten nach histologischer Aufarbeitung keine Tumorzellen mehr (Tabelle 10 und Abbildung 17).

Zellen	SY5Y-WT	SY5Y-p75NTR#1 und #2
Tag 22	1×10^7	
Tag 25	1×10^7	
Tag 31	1×10^6	
Tag 44	1×10^6 ; 1×10^5 ; 1×10^5	
Tag 67	1×10^4	
Tag 78	1×10^4	
Tag 180		Ges. Kohorte (20Tiere)

Tab. 10: In allen Wildtyp-SY5Y-Mäusen korrelierte die benötigte Zeit bis zum Erreichen eines Tumorumfanges von 1000mm^3 invers mit der zuvor injizierten Zellzahl. In den SY5Y-p75NTR-Mäusen konnte innerhalb von 180 Tagen kein Tumorwachstum erkannt werden.

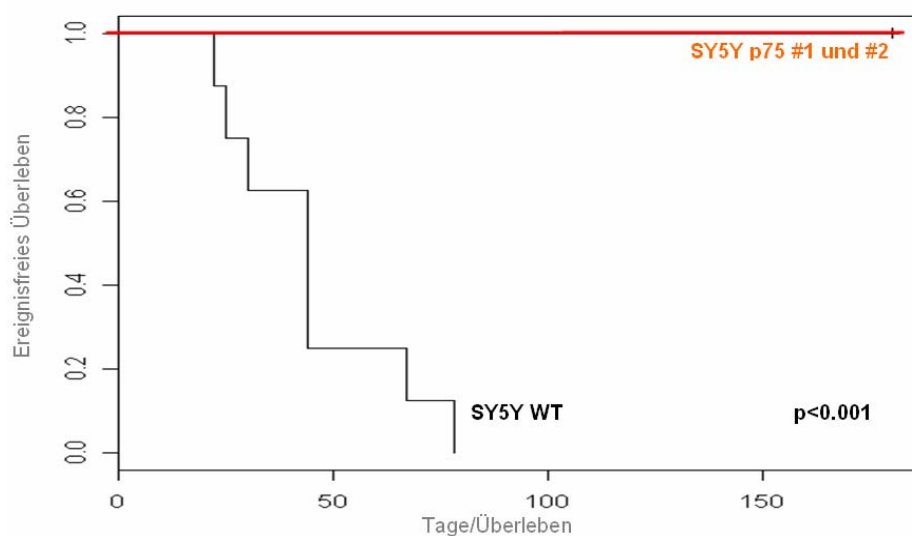


Abb. 17: Verlust der Tumorigenität von zwei stabil p75NTR-exprimierenden SY5Y-Einzelzellklonen (1×10^4 - 1×10^7 Zellen) im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp in der immunsupprimierten Nacktmaus.

4. Diskussion

4.1. Die p75NTR-Expression korreliert mit dem Differenzierungsgrad primärer Neuroblastome

Zunächst sollten die Expressionsverhältnisse von p75NTR in primären Neuroblastomen untersucht werden. Es konnte dazu auf immunhistochemischer Ebene für eine erste Kohorte von 93 primären und unbehandelten neuroblastischen Tumoren gezeigt werden, dass die Expression von p75NTR mit dem Grad an Differenzierung in diesen neuroblastischen Tumoren korreliert. Anhand eines Affymetrix Microarrays wurde dieser Nachweis für eine zweite Kohorte von 110 neuroblastischen Tumoren auf mRNA-Ebene bestätigt.

Zu Beginn der Analysen wurde die p75NTR-Expression in neuroblastischen Primärtumoren, sowohl bei Neuroblastomen als auch bei benignen stromareichen Ganglioneuroblastomen und Ganglioneuromen untersucht. Diese Untersuchung erlaubte Analysen von p75NTR-Expression im gesamten Spektrum der neuroblastischen Differenzierung. Die Färbungen wurden nach standardisierten Verfahren vorgenommen. Eine Erweiterung der Kohorte war bei statistisch eindeutigen Ergebnissen nicht notwendig.

Die Immunohistochemie dieser ersten Kohorte erlaubte die Zuordnung der p75NTR-Expression zu spezifischen Zelltypen innerhalb des Tumors. Dies ist für p75NTR von besonderer Bedeutung, da p75NTR bekannterweise auch stark in Schwann-Zellen exprimiert wird. Auch hier wurde durchweg eine starke p75NTR-Expression im Schwannzellstroma der neuroblastischen Tumoren gefunden. Da Ursprung und Entwicklung des Schwannzellstromas immer noch diskutiert werden und nicht endgültig geklärt sind, wurde die p75NTR Expression von Neuroblastomzellen und Schwannzellstroma streng getrennt beurteilt.

Ebenfalls bekannt ist, dass die funktionelle Rolle von p75NTR erheblich kontextabhängig ist: bei verschiedenen zellulären Hintergründen kann p75NTR deutlich verschiedene Phänotypen induzieren. P75NTR war nicht nur in größerem Maße im Schwannzellstroma exprimiert, sondern auch in neuroblastischen Tumorzellen mit neuronaler Differenzierung. Im Gegensatz dazu waren keine p75NTR-positiven Neuroblasten in primären Neuroblastomen zu entdecken.

Eine bedeutsame Beobachtung an dieser Stelle ist, dass perivaskuläre und septale Stromazellen in verschiedenem Maße p75NTR-positiv gesehen wurden, obwohl die wenig-differenzierten Neuroblastome selbst p75NTR-negativ waren. Diese Beobachtung stimmt mit vorhergehenden überein und könnte ein Hinweis auf bleibende Schwannzellen und deren Vorläuferzellen in den Septen von schlecht-differenzierten Neuroblastomen sein.

Ein kritischer Punkt wären mögliche Untersuchungen zur Expressionshöhe p75NTR-koexprimierter Proteine wie TrkA, TrkB, Sortilin, NogoR und Lingo gewesen. Da allerdings die Expression von p75NTR in primären Neuroblastomzellen im Fokus der aktuellen Studie stand und hier bei diesen Tumoren keine Expression gefunden wurde, wurde im Folgenden die Untersuchung von koexprimierten Proteinen bei den p75NTR-positiven Ganglioneuroblastomen, Ganglioneuromen und Schwann-Zellen zunächst zurückgestellt. Diese aktuellen Ergebnisse werden durch eine vorhergehende Analyse p75NTR-Expression in 1150 Tumoren, u.a. auch in Neuroblastomen und Ganglioneuromen, bestätigt (Fanburg-Smith JC, 2001).

Die Ergebnisse konnten anhand einer zweiten Kohorte mit 110 neuroblastischen Tumoren auf mRNA-Ebene mittels einer Reanalyse von zuvor auf Affymetrix-Microarrays gemessenen Daten reproduziert werden. Es war dabei allerdings nicht möglich, die unterschiedlichen Mengen der p75NTR-Expression der primären Neuroblasten und der Stromazellen zu differenzieren.

Distinkte Subpopulationen einzelner p75NTR-exprimierender Neuralleistenstammzellen konnten in den jeweiligen Tumoren der immunhistochemisch ausgewerteten Kohorte nicht gezeigt werden. Bei der zweiten Kohorte ist eine Aussage diesbezüglich aus methodischen Gründen nicht durchführbar gewesen.

Während hohe p75NTR-Expressionslevel in der zweiten Kohorte signifikant mit einem ereignisfreien Überleben korreliert waren, erreichte die Korrelation in der ersten Kohorte nicht das Signifikanzniveau. Möglicherweise ist dies darin begründet, dass für die meisten stromareichen Tumoren der ersten Kohorte die zugehörigen klinischen Daten fehlten.

4.2. Etablierte Neuroblastomzelllinien exprimieren kein p75NTR

Als zweite Fragestellung sollte die Expression von p75NTR in etablierten Neuroblastomzelllinien untersucht werden. Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen für acht dieser Neuroblastom-Zelllinien, die aus primären und wenig-differenzierten Neuroblastomen gewonnen wurden, konnte keine p75NTR-Expression gezeigt werden, was mit den vorhergehenden Ergebnissen in Einklang steht.

Eine denkbare Erklärung für diesen Befund ist die Tatsache, dass Neuroblastomzelllinien bisher nur aus sehr aggressiven und wenig-differenzierten Tumoren gewonnen werden konnten. Auch hier wäre eine vergleichende Analyse für koexprimierte Proteine, vor allem TrkA und TrkB auf der Zelloberfläche interessant. Man würde dabei, unserer Theorie der Abstammung von malignen Tumoren folgend, eine Expression von TrkB erwarten, TrkA sollte hingegen niedriger exprimiert sein. Ein Zusammenhang zwischen MYCN-Amplifikation und p75NTR Expression konnte nicht gefunden werden, es wurden allerdings auch nur jeweils vier MYCN-amplifizierte und MYCN-negative Zelllinien getestet.

4.3. Die ektope Expression von p75NTR führt zur Abnahme von Zellviabilität und Induktion von Apoptose

Zur Klärung der Frage nach eventuellen Veränderungen in den zellbiologischen Eigenschaften bei p75NTR-überexprimierenden Zellen wurden SY5Y-Neuroblastomzellen etabliert, die stabil p75NTR exprimierten. Die Ergebnisse der *in-vitro*-Analysen stimmten dabei mit den vorhergehenden Beobachtungen überein und zeigten, dass die ektope p75NTR-Expression zu einer Abnahme der Zellviabilität und Induktion von Apoptose führt. Dieses Ergebnis wurde zuvor bereits von einer anderen Arbeitsgruppe berichtet, die allerdings statt der SY5Y-Zelllinie SK-N-BE-Zellen benutzten (Bunone G, 1997; Chen J, 2003). Zusätzlich zu der eindeutigen Zunahme von Apoptose wurde durch einen ELISA-basierten BrdU-Aufnahme-Assay eine moderate Reduzierung der Zellproliferation gezeigt.

Weitergehende Analysen der Korezeptoren und der p75NTR-induzierten Signalwege sowie die Expression von TrkA, TrkB, Sortilin, Nogo und Lingo sollen im Weiteren untersucht werden, um das Zusammenspiel der Neurotrophinrezeptoren zu klären. Sollte keiner der Korezeptoren auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden können, wäre die weitere Untersuchung der zur Apoptose führenden, intrazellulären Signalwege von besonderem Interesse. Für andere, p75NTR-überexprimierende Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass intrazelluläre Signale JNK-abhängig vermittelt werden. Weitere Kandidatenproteine, die in der Literatur für p75NTR induzierte proapoptotische Signalwege beschrieben wurden sind NF- κ B, Caspase 9, p53 oder c-Jun.

Letztlich wird der durch p75NTR induzierte Signalweg auch bei den p75NTR-transfizierten SY5Y-Zellen relativ spezifisch sein, aber vielleicht einen weiteren Einblick in die Bedeutung für Neuroblastomzellen generell geben können.

4.4. *In vivo* führt die ektope Überexpression von p75NTR zu einem Verlust der Tumorigenität von SY5Y-Zellen

Ob die Überexpression von p75NTR Einfluss auf die Tumorigenität von Neuroblastomzellen hat, sollte durch die Transfektion von Nacktmäusen mit den etablierten p75NTR-SY5Y-Zellen die Tumorigenität dieser Zellen *in vivo* analysiert werden. Die Ergebnisse konnten dabei zum ersten Mal zeigen, dass die ektope Überexpression von p75NTR zu einem Verlust der Tumorigenität von SY5Y-Zellen führte.

Dies scheint mehr ein qualitativer, denn ein quantitativer Effekt zu sein, da es nicht möglich war, diesen Effekt durch Erhöhung der injizierten Tumorzellen zu überwinden: Die benutzten 1×10^4 bis 2.5×10^7 SY5Y-p75NTR-Tumorzellen konnten keinen Tumor induzieren, wohingegen 1×10^4 SY5Y-Kontrollzellen genügten, um einen progredienten Tumor zu induzieren.

Auch nekroptisch konnten keine SY5Y-p75NTR-Tumorzellen mehr nachgewiesen werden. Allerdings sind die Zellen durch stabile p75NTR-Expression wie oben gezeigt initial bereits weniger vital als die Parentalzellen. Daher wäre die Verwendung von Neuroblastomzellen, in denen p75NTR induzierbar exprimiert werden kann, ein sinnvoller nächster Schritt zur Beurteilung der Rolle von p75NTR in Tumorzellen *in vivo*.

4.5. Die mögliche Rolle von p75NTR für die Neuroblastom-Pathogenese und in Neuroblastom-Stammzellen

Die letzte und zusammenfassende Frage der aktuellen Studie sollte klären, ob von den hier gezeigten Experimenten Hinweise auf p75NTR-positive Neuroblastomstammzellen abzuleiten wären.

Für Neuralleistenstammzellen, aus denen sich phylogenetisch auch Neuroblastomzellen entwickeln können, wird ein erhöhtes Expressionsmaß für SOX10, PHOX2B und MASH1 beschrieben (Kim J, 2003). Für die weiteren Entwicklungs- und Differenzierungsschritte dieser Neuroblastomvorläuferzellen wird auch p75NTR als wichtiges Expressionsmerkmal gesehen (Maurer J, 2007). So werden mittlerweile in mehreren onkologischen Arbeiten so genannte „Neuroblastom-Stammzellen“ oder „Tumor-induzierende Zellen“ beschrieben, die vor allem durch eine erhöhte Expression von p75NTR und Nestin charakterisiert werden (Biagiotti T, 2006). Auch aus dem Knochenmark isolierte und anschließend speziell kultivierte Neuroblastomzellen wurden als typische Neuroblastomstammzellen beschrieben. Diese waren sowohl tumorigen in Mäusen als auch p75NTR-exprimierend (Hansford LM, 2007). Diese Beschreibungen legten die Möglichkeit nahe, auch in manifesten Neuroblastomen p75NTR-positive Subpopulationen finden zu können und damit Hinweise auf eventuelle Stammzellen in diesen Tumoren sammeln zu können. Diese Möglichkeit könnte in weiteren Schritten sogar einen onkologisch-pharmazeutischen Ansatzpunkt hervorbringen.

Da die Expression von Trk-Rezeptoren insgesamt bereits für eindeutige Aussagen zu biologischer Dignität und klinischem Verlauf bei einer Neuroblastomerkrankung bekannt ist, wurde die weitere Untersuchung und Charakterisierung dieses niedrigaffinen Neurotrophinrezeptors derselben Familie besonders favorisiert.

Eine erste diskussionswürdige Aussage zu möglichen p75NTR-positiven Neuroblastomstammzellen zeigte sich bei oben beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen von 93 primären und unbehandelten neuroblastischen Tumoren.

p75NTR war in größerem Maße im Schwanzzellstroma und in neuroblastischen Tumorzellen mit neuronaler Differenzierung exprimiert. Im Gegensatz dazu waren keine p75NTR-positiven Neuroblasten in primären Neuroblastomen zu entdecken. Es ist also in

Hinsicht auf eine mögliche p75NTR-Expression in Tumor-Stammzellen an dieser Stelle wichtig hervorzuheben, dass mit zunehmender Tumorzell-Differenzierung die p75NTR-Expression zuzunehmen scheint.

Die Methode des Affymetrix-Microarrays zur Re-Analyse anhand einer zweiten Kohorte mit 110 neuroblastischen Tumoren auf mRNA-Ebene kann keine distinkte Subpopulationen von eventuell vorhandenen, einzelnen p75NTR-exprimierenden Neuralleistenstammzellen in den jeweiligen Tumoren ausmachen. Da in den immunhistochemischen Untersuchungen kein Hinweis auf eine p75NTR-positive Population gefunden werden konnte, legen die Ergebnisse dieser Arbeit zumindest nicht nahe, dass p75NTR ein Marker für Neuroblastomstammzellen ist.

Aus den Analysen der etablierten Neuroblastomzelllinien kann ebenfalls keine verlässliche Aussage zu einer Rolle von p75NTR für Neuroblastom-Stammzellen abgeleitet werden. Es wäre verfrüht zu folgern, dass p75NTR nicht als Stammzellmarker dienen kann oder diesbezüglich keine funktionelle Rolle spielt, weil es in Zelllinien nicht exprimiert ist. Man muss sicher hinterfragen, inwieweit die monoklonalen Zellen in Kultur vom weiteren Vorhandensein einer Stammzelle abhängig sind, oder ob diese Zellreihen nicht ganz überwiegend stammzellunabhängig durch klonale Reproduktion überleben. Auf der anderen Seite muss man die mit p75NTR-Expression einhergehende Apoptose-Sensitivierung und Wachstums-Verzögerung anführen, so dass möglicherweise p75NTR-Expression durch Selektion auf schnellproliferierenden Klonen in der Zellkultur einen Nachteil bietet. Eine mögliche Tumor-stammzelleigene p75NTR-Expression würde somit in kultivierten Zellen undetektiert bleiben.

Bezüglich der Versuche zur veränderten Zellbiologie unter p75NTR-Expression wurde zunächst eine physiologische Erhöhung der Apoptoserate gefunden, die sich aus der bekannten und in der Einleitung beschriebenen Funktion des TFN-alpha bindenden „Todesrezeptors“ erklären lässt. Eine gleichzeitige Reduktion der Proliferationsrate wird hiermit jedoch zum ersten Mal beschrieben. Dabei ist aktuell nicht klar, ob dieser Vorgang auch über die beschriebenen Rezeptormoleküle initiiert wird und über die gleichen intrazellulären Kaskaden vermittelt wird. Um dieses weiterführend zu klären, müssen zahlreiche Anschlussexperimente erfolgen. Bezüglich p75NTR-positiver Neuroblastomstammzellen kann man an dieser Stelle erneut die oben genannte Theorie, nach der mit zunehmender Differenzierung der neuralen Stammzelle die p75NTR-Expression zuzunehmen scheint, durch die beobachtete praktische Umsetzung mittels zweier belegter Mechanismen funktionell unterstreichen.

Zusammenfassend ist eine sichere Aussage bezüglich der Fragestellung nach p75NTR-positiven Stammzellen im Neuroblastom durch die hier vorgelegten Daten nicht zu treffen. Die Immunhistochemie-Ergebnisse lassen es als eher unwahrscheinlich erscheinen, dass

es distinkte p75NTR-positiven Subpopulationen im Neuroblastom gibt. Dass es möglich bleibt, beschreiben andere Autoren. Es wurden p75NTR-positive, von malignen Neuroblastomen abgeleitete Zellformationen mit Stammzellcharakter und erhöhter Potenz der Tumorbildung beschrieben (Hansford LM, 2007; Biagiotti T, 2006). Die jetzigen Ergebnisse zeigen aber, dass es nur unter speziellen Umständen und/oder Umgebungsbedingungen möglich ist, dass die Expression von p75NTR nicht die Tumorigenität in Mäusen aufhebt.

Vor allem in den immunhistochemischen Untersuchungen wurden Hinweise darauf gefunden, dass mit zunehmender Ausdifferenzierung der Tumorgewebe die p75NTR-Expression zuzunehmen scheint.

Um diese Fragestellung auch in Hinsicht auf die Differenzierungsschritte der neuronalen Stammzelle weiter klären zu können, sind weitere Experimente notwendig. Ein viel versprechender Ansatz dazu könnte es sein, alle p75NTR-positiven Zellen aus einem primären Tumor zu isolieren und dann genauer zu charakterisieren. Erfolgreiche Experimente in dieser Richtung wurden kürzlich von zwei Autoren beschrieben (Hauser S, 2011; Marzi I, 2007).

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war, die funktionelle Bedeutung des niedrig-affinen NGF-Rezeptors p75NTR in neuroblastischen Tumoren näher zu untersuchen.

Mit der immunhistochemischen Methode eines Tissue Microarray wurden zunächst 93 primäre, unbehandelte neuroblastische Tumoren analysiert. Eingeschlossen waren hierbei 72 Neuroblastome und 21 Ganglioneuroma/Ganglioneuroblastome. Wenig differenzierte Neuroblastome waren fast ausschließlich p75NTR-negativ, wohingegen p75NTR in differenzierenden Neuroblastomen und den neuroblastischen Tumorzellen der Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome nachgewiesen werden konnte. Auf mRNA-Ebene konnten für eine unabhängige Kohorte mit 110 neuroblastischen Tumoren ähnliche Ergebnisse gezeigt werden. In dieser zweiten Kohorte zeigte eine Kaplan-Meier-Analyse, dass hohe p75NTR mRNA-Expression mit ereignisfreiem Überleben korreliert.

In acht etablierten Neuroblastom-Zelllinien wurde die p75NTR-Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert. In keiner der Zelllinien war p75NTR Expression nachweisbar.

Stabil p75NTR transfizierte SY5Y-Zellen zeigten im MTT-Viabilitätsassay unabhängig von der Anwesenheit des p75NTR-Liganden NGF einen signifikant erniedrigten Anteil von vitalen Zellen nach 12 Tagen im Vergleich zu Kontrollen. Mittels BrdU-Assay und Annexin-V-Assay konnte in stabil p75NTR-exprimierenden Zellen sowohl eine verminderte Proliferationsrate als auch eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden.

Um den Effekt von p75NTR auf neuroblastische Tumoren *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Xenograft Maus-Modell benutzt. In allen Mäusen, denen die parentalen SY5Y-Zellen injiziert wurden, konnte Tumorwachstum beobachtet werden. In den Mäusen, die stabil p75NTR-exprimierende SY5Y-Zellen injiziert bekamen, konnte innerhalb von 180 Tagen kein Tumorwachstum erkannt werden.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass p75NTR-Expression im Verlauf der Entwicklung von der Neuralleistenstammzelle zum Neuroblastom verloren geht, und dass die Re-Expression von p75NTR vor allem in primären neuroblastischen Tumorzellen mit dem Differenzierungsgrad zu einem benigneren Tumortyp korreliert. Funktionell führt die stabile Expression von p75NTR in Neuroblastomzellen zum Verlust der Tumorigenität im Xenograft-Maus-Modell. Die in anderen Tumoren beschriebene Funktion von p75NTR als Stammzellmarker kann anhand der vorliegenden Ergebnisse für das Neuroblastom nicht bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

1. Aloyz RS, Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, Miller FD (1998 Dec): p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol* 143(6), 1691-1703.
2. Attiyeh EF, London WB, Mossé YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, Brodeur GM, Cohn SL, Matthay KK, Maris JM (2005 Nov): Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 353(21), 2243-2253.
3. Bai O, Wei Z, Lu W, Bowen R, Keegan D, Li XM (2002 Jul): Protective effects of atypical antipsychotic drugs on PC12 cells after serum withdrawal. *Neurosci Res* 69(2), 278-283.
4. Barker PA (2004 May): p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 42(4), 529-533.
5. Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, Bresnahan JC, Hempstead BL, Yoon SO (2002 Oct): ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 36(3), 375-386.
6. Berthold F (2004): NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma.
7. Bhakar AL e.a. (2003 Dec): Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J Neurosci* 23(36), 11373-11381.
8. Biagiotti T, D'Amico M., Marzi I, Di Gennaro P, Arcangeli A, Wanke E, Olivetto M. (2006 Feb): Cell renewing in neuroblastoma: electrophysiological and immunocytochemical characterization of stem cells and derivatives. *Stem Cells* 24(2), 443-453.
9. Botchkarev VA (2003 Oct): Neurotrophins and their role in pathogenesis of alopecia areata. *Investig Dermatol Symp Proc* 8(2), 195-198.
10. Bown N, Lastowska M, Cotterill S, O'Neill S, Ellershaw C, Roberts P, Lewis I, Pearson AD (2001 Jan): 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. *Med Pediatr Oncol* 36(1), 14-19.
11. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984 Jun): Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224(4653), 1121-1124.
12. Brodeur GM (March 2003): Neuroblastoma: Biological insights into a clinical Enigma. *Nature Reviews Cancer* 3, 203-214.
13. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F (1993): Revisions of the international criteria

for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11(8), 1466-1477.

14. Bui NT, König HG, Culmsee C, Bauerbach E, Poppe M, Krieglstein J, Prehn JH (2002 May): p75 neurotrophin receptor is required for constitutive and NGF-induced survival signalling in PC12 cells and rat hippocampal neurones. *J Neurochem* 81(3), 594-605.

15. Bunone G, Mariotti A, Compagni A, Morandi E, Della Valle G (1997): Induction of apoptosis by p75 neurotrophin receptor in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 14, 1463-1470.

16. Burkert J, Wright NA, Alison MR (2006 Jul): Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J Pathol* 209(3), 287-297.

17. Caron H, van Sluis P, de Kraker J, Bökkerink J, Egeler M, Laureys G, Slater R, Westerveld A, Voûte PA, Versteeg R (1996 Jan): Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 334(4), 225-230.

18. Carr J, Bell E, Pearson AD, Kees UR, Beris H, Lunec J, Tweddle DA (2006): Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14(ARF) pathway in neuroblastoma cell lines at relapse. *Cancer Res* 66, 2138-2145.

19. Carter AR, Berry EM, Segal RA (2003 Jan): Regional expression of p75NTR contributes to neurotrophin regulation of cerebellar patterning. *Mol Cell Neurosci* 22, 1-13.

20. Chao MV (1994 Nov): The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 25(11).

21. Chen J, Zhe X (2003 Jun): Cotransfection of TrkA and p75(NTR) in neuroblastoma cell line (IMR-32) promotes differentiation and apoptosis of tumor cells. *Chin Med* 116(6), 906-912.

22. Copray JC, Jaarsma D, Küst BM, Bruggeman RW, Mantingh I, Brouwer N, Boddeke HW (2003): Expression of the low affinity neurotrophin receptor p75 in spinal motoneurons in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 116(3), 685-694.

23. Cronk KM, Wilkinson GA, Grimes R, Wheeler EF, Jhaveri S, Fundin BT, Silos-Santiago I, Tessarollo L, Reichardt LF, Rice FL (2002 Aug): Diverse dependencies of developing Merkel innervation on the trkA and both full-length and truncated isoforms of trkC. *Development* 129(15), 3739-3750.

24. Culmsee C, Gerling N, Lehmann M, Nikolova-Karakashian M, Prehn JH, Mattson MP, Krieglstein J (2002): Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor P75. *Neuroscience* 115(4), 1089-1108.

25. D'Angio GJ, Evans AE, Koop CE (1971): Special pattern of widespread Neuroblastoma with favourable prognosis. *Lancet* 297, 1046-1049.
26. De Bernardi B, Balwierz W, Bejent J, Cohn SL, Garrè ML, Iehara T, Plantaz D, Simon T, Angelini P, Cama A, London WB, Kramer K, Katzenstein HM, Tortori-Donati P, Rossi A, D'Angio GJ, Evans AE (2005): Epidural compression in Neuroblastoma: Diagnostic and therapeutic aspects. *Cancer Lett* 228.
27. Dechant G, Barde YA (2002 Nov): The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 5(11), 1131-1136.
28. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Liu XG, Evans AE, Brodeur GM (2000): Expression of neurotrophin receptor TrkA inhibits angiogenesis in Neuroblastoma. *Med Pediatric Oncology* 35, 569-572.
29. Eggert A, Sieverts H, Ikegaki N, Brodeur GM (2000): p75 mediated apoptosis in neuroblastoma cells is inhibited by expression of TrkA. *Medical and Pediatric Oncology* 35, 573-576.
30. Fanburg-Smith JC, Miettinen M (2001 Sep): Low-affinity nerve growth factor receptor (p75) in dermatofibrosarcoma protuberans and other nonneural tumors: a study of 1,150 tumors and fetal and adult normal tissues. *Human Pathology* 32(9), 976-983.
31. Frade JM, Barde YA (1999 Feb): Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* 126(4), 683-690.
32. Frade JM, Barde YA (1998 Jan): Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 20(1), 35-41.
33. Grovas A, Fremgen A, Rauck A, Ruyman FB, Hutchinson CL, Winchester DP, Menck HR (1997 Dec): The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. *Cancer* 80(12), 2321-2332.
34. Gurney JG, Davis S, Severson RK, Fang JY, Ross JA, Robison LL (1996 Aug): Trends in cancer incidence among children in the U.S. *Cancer* 78(3), 532-541.
35. Halvorson KG, Kubota K, Sevcik MA, Lindsay TH, Sotillo JE, Ghilardi JR, Rosol TJ, Boustany L, Shelton DL, Mantyh PW (2005 Oct): A blocking antibody to nerve growth factor attenuates skeletal pain induced by prostate tumor cells growing in bone. *Cancer Res* 65(20), 9426-9435.
36. Hansford LM, McKee A., Zhang L, George RE, Gerstle JT, Thorner PS, Smith KM, Look AT, Yeger H, Miller FD, Irwin MS, Thiele CJ, Kaplan DR (2007 Dec): Neuroblastoma cells isolated from bone marrow metastases contain a naturally enriched tumor-initiating cell. *Cancer Research* 67(23), 11234-11243.

37. Harrington AW, Kim JY, Yoon SO (2002 Jan): Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci* 22(1), 156-166.
38. Hauser S, Widera D, Qunneis F, Müller J, Zander C, Greiner J, Strauss C, Lüningschrör P, Heimann P, Schwarze H, Ebmeyer J, Sudhoff H, Araúzo-Bravo MJ, Greber B, Zaehres H, Schöler H, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B (2011 Nov): Isolation of Novel Multipotent Neural Crest-Derived Stem Cells from Adult Human Inferior Turbinate. *Stem Cells Development*. 21(5):742-56.
39. He XL, Garcia KC (2004 May): Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science*, 833-834.
40. Hempstead BL (2002 Jun): The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* 12(3), 260-267.
41. Kaplan SJ, Holbrook CT, McDaniel HG, Buntain WL, Crist WM (1980 Jan): Vasoactive intestinal peptide secreting tumors of childhood. *Am J Dis Childhood* 134, 21-24.
42. Kim J, Lo L., Dormand E, Anderson DJ (2003 Apr): SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* 38(1), 17-31.
43. Kuwako K, Taniura H, Yoshikawa K (2004 Jan): Necdin-related MAGE proteins differentially interact with the E2F1 transcription factor and the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 279(3), 1703-1712.
44. Lad SP, Peterson DA, Bradshaw RA, Neet KE (2003 Jul): Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor receptors. *J Biol Chem* 278(27), 24808-24817.
45. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001 Nov): Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294(5548), 1945-1948.
46. Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA (1984 Jul): Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 311(4), 231-235.
47. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM (1991 Apr): Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 9(4), 581-591.
48. Maris JM, White PS, Beltinger CP, Sulman EP, Castleberry RP, Shuster JJ, Look AT, Brodeur GM (1995 Oct): Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma. *Cancer Res* 55(20), 4664-4669.
49. Maris JM, Guo C, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM (2001 Jan): Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 36(1), 24-27.

50. Maris M, Matthay KK (2006 March): Molecular Biology of Neuroblastoma. *J of Clinical Oncology* No 7, 2264-2279.
51. Maris M, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007 Jun): Neuroblastoma. *Lancet* 369, 2106-2120.
52. Marzi I, D'Amico M, Biagiotti T, Giunti S, Carbone MV, Fredducci D, Wanke E, Olivetto M (2007 Mar): Purging of the neuroblastoma stem cell compartment and tumor regression on exposure to hypoxia or cytotoxic treatment. *Cancer Research* 67(6), 2402-2407.
53. Maurer J, Fuchs S, Jäger R, Kurz B, Sommer L, Schorle H (2007 Sep): Establishment and controlled differentiation of neural crest stem cell lines using conditional transgenesis. *Differentiation* 75(7).
54. Mehlen P, Bredesen DE (2004 Jan): The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* 9(1), 37-49.
55. Mitchell WG, Davalos-Gonzalez Y, Brumm VL, Aller SK, Burger E, Turkel SB, Borchert MS, Hollar S, Padilla S (2002 Jan): Opsoclonus ataxia caused by childhood Neuroblastoma: developmental and neurologic sequelae. *Pediatrics* 109, 86-98.
56. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson AD (2009 Jan): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report. *Journal of Clinical Oncology* 27(2):298-303.
57. Mooney SM, Miller MW (2001 Aug): Effects of prenatal exposure to ethanol on the expression of bcl-2, bax and caspase 3 in the developing rat cerebral cortex and thalamus. *Brain Res* 911(1), 71-81.
58. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, Laquaglia MJ, Sennett R, Lynch JE, Perri P, Laureys G, Speleman F, Kim C, Hou C, Hakonarson H, Torkamani A, Schork NJ, Brodeur GM, Tonini GP, Rappaport E, Devoto M, Maris JM (2008 Okt): Identification of ALK as the Major Familial Neuroblastoma Predisposition Gene. *Nature* 455, 930-935.
59. Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM (1993 Mar): Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328(12), 847-854.
60. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM (1994 Jan): Expression and function of TrkB and BDNF in human Neuroblastomas. *Mol Cell Biology* 14, 759-767.
61. Notterpek L (2003 May): Neurotrophins in myelination: a new role for a puzzling receptor. *Trends Neurosci* 26(5), 232-234.

62. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM (2004 Feb): Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427(6977), 798-799.
63. Palmada M, Kanwal S, Rutkoski NJ, Gustafson-Brown C, Johnson RS, Wisdom R, Carter BD (2002 Aug): c-jun is essential for sympathetic neuronal death induced by NGF withdrawal but not by p75 activation. *J Cell Biol* 158(3), 453-461.
64. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ (2003 Dec): Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3(12), 895-902.
65. Peterson S, Bogenmann E (2003 Sep): Osmotic swelling induces p75 neurotrophin receptor (p75NTR) expression via nitric oxide. *Biol Chem* 278(36), 33943-33950.
66. Pizzo PA, Poplack DG (2005): *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Lippincott, Williams & Wilkins 5.
67. Quinn JJ, Altmann AJ (1979): The multiple hematologic manifestations of Neuroblastoma. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1, 201-205.
68. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001 Nov): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859), 105-111.
69. Rodríguez-Tébar A, Dechant G, Götz R, Barde YA (1992 Mar): Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* 11(3), 917-922.
70. Roux PP, Barker PA (2002 Jun): Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67(3), 203-233.
71. Schor NF (2005 Oct): The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol* 201-214.
72. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J (1983 Sep): Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305(5931), 245-248.
73. Scott AL, Borisoff JF, Ramer MS (2005 Jan): Deafferentation and neurotrophin-mediated intraspinal sprouting: a central role for the p75 neurotrophin receptor. *Eur J Neurosci* 21(1), 81-92.
74. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D (1985 Oct): Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *New England Journal of Medicine* 313(18), 1111-1116.
75. Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, Marsden HB, Misugi K (1984 Aug): Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 73(2), 405-416.

76. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP (1999): The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86(2), 364-372.
77. Thompson PM, Seifried BA, Kyemba SK, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, Brodeur GM, Stram DO, Seeger RC, Gerbing R, Matthay KK, Matise TC, White PS (2001 Jan): Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 36(1), 28-31.
78. Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, Coze C, Philip N, Frébourg T, Munnich A, Lyonnet S, Delattre O, Amiel J (2004): Germline Mutations of the Paired-Like Homeobox 2B (PHOX2B) Gene in Neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 74, 761-764.
79. Virchow R (1865): Die krankhaften Geschwulste: Hyperplasie der Zirbel und der Nebennieren. Vol 11, 149-150.
80. von Schack D, Casademunt E, Schweigreiter R, Meyer M, Bibel M, Dechant G (2001 Oct): Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nat Neurosci* 4(10), 977-978.
81. Wright J (1920): Neurocytoma or Neuroblastoma, a kind of tumor not generally recognized. *J Exp Med* 12, 556-561.
82. Yamashita T, Tohyama M (2003 May): The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 6(5), 461-467.
83. Zhang Y, Hong Y, Bounhar Y, Blacker M, Roucou X, Tounekti O, Vereker E, Bowers WJ, Federoff HJ, Goodyer CG, LeBlanc A (2003 Aug): p75 neurotrophin receptor protects primary cultures of human neurons against extracellular amyloid beta peptide cytotoxicity. *Neurosci* 23(19), 7385-7394.
84. Zhao SP, Zhou XF (2002 Aug): Co-expression of trkA and p75 neurotrophin receptor in extracranial olfactory neuroblastoma cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28(4).

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BRdU	Brom-desoxy-Uridin
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	complementary DNA
CO ²	Kohlenstoffdioxid
CT	Computer-Tomographie
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> Bakterium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälber Serum
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Peptid
GN	Ganglioneurom
GNB	Ganglioneuroblastom
H ² O ²	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification System
INRG	International Society of Paediatric Oncology Neuroblastoma Group
INSS	International Neuroblastoma Staging System
KMP	Knochenmarkpunktion
LDS	Lithium-Dodecylsulfat
LK	Lymphknoten
LOH	Loss of Heterocycosity
MBGI	Myelin based Growth Inhibitors
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl	Magnesiumchlorid
mg/ml/mM	Milligramm/Milliliter/Millimolar
MIBG	Metaiodbenzylguanidin

Min.	Minute
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
msec	Millisekunde
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MYCN	Myelocytomatosis related Oncogene, Neuroblastoma derived
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NB	Neuroblastom
ng/nl/nM	Nanogramm/Nanoliter/nanomolar
NGF	Nerval Growth Factor
OD	Optische Dichte
P75NTR	p75 Neurotrophinrezeptor
PBS	Phosphate Buffert Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHOX2B	Paired-like-homebox-2B
PNS	peripheres Nervensystem
RIPA-Puffer	Radio-Immunoprecipitations-Assay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium (am Roswell Park Memorial Institute entwickelt)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Sec.	Sekunde
SOC	Super optimal Broth Medium + 20mM Glucose
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq-Polymerase	Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
Trk A/B	Tyrosin Rezeptor Kinase A/B
U	Umdrehungen
µg/µl/µM	Mikrogramm/Mikroliter/Mikromolar
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V.	Vena
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
ZNS	Zentrales Nervensystem

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach dem International Neuroblastoma Staging System (INSS). Angepasst nach (Brodeur GM, 1993; Maris M, 2007).	10
Tab. 2: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach der International Neuroblastoma Risk Group (INRG). Angepasst nach (Monclair T, 2009).	11
Tab. 3: Radiologische Risikofaktoren bei der Diagnose eines Neuroblastoms nach der International Neuroblastoma Risk Group (INRG). Angepasst nach (Monclair T, 2009).	11
Tab. 4: Das Spektrum der neuroblastischen Tumoren umfasst mindestens drei biologisch distinkte Erscheinungsformen. Es wird diskutiert, ob und wann diese Formen auch ineinander übergehen können, oder ob es sich um ätiologisch und pathogenetisch verschiedenen Krankheitsformen handelt. Angepasst nach (Brodeur GM, 2003; Maris M, 2006).	14
Tab. 5: Zusammenfassung von mit p75NTR interagierenden Proteinen. Unterschiedliche Funktionen sind auf die verschiedenen zellulären Hintergründe und gebundenen Liganden zurückzuführen (Roux PP, 2002).	23
Tab. 6: In der Zellkultur verwendete Selektionsantibiotika mit Konzentrationsangaben.	33
Tab. 7: Primer-Sequenzen und Annealing-Temperaturen für semiquantitative PCR.	36
Tab. 8: Restriktionsenzyme und Puffer für Verdaureaktionen.	36
Tab. 9: Verwendete Selektionsantibiotika und ihre Konzentrationen in Agarplatten.	37
Tab. 10: In allen Wildtyp-SY5Y-Mäusen korrelierte die benötigte Zeit bis zum Erreichen eines Tumolvolumens von 1000mm ³ invers mit der zuvor injizierten Zellzahl. In den SY5Y-p75NTR-Mäusen konnte innerhalb von 180 Tagen kein Tumorstadium erkannt werden.	51

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Kaplan Meier Kurve zum Patientenüberleben bei Neuroblastomerkrankungen zwischen 1986 und 2001, basierend auf der Einteilung in drei Risikogruppen. Angepasst nach (Maris M, 2007).	15
Abb. 2: Klass. der Risikogruppen im NB2004-Protokoll. Angepasst nach (Berthold, 2004).	16
Abb. 3: Überblick der Behandlungsstrategien im NB2004-Protokoll (S=Operation, R=Randomisation, N4/5/6/7/8=Chemotherapy-Blöcke, MIBG= ¹³¹ I-MIBG-Behandlung, EBRT= Bestrahlungs-Therapie, 13-cis-RA=13-cis-Retin-Säure). Angepasst nach (Berthold, 2004).	16
Abbildung 4: Biologisch-genetisches Modell der Entstehung biologisch unterschiedlicher Neuroblastom-Typen aus einer transformierten Vorläuferzelle. In diesem Modell kommt den Trk-Rezeptoren eine wesentliche pathologische Bedeutung zu, während die MYCN-Amplifikation ein relativ spätes Ereignis darstellt. Angepasst nach (Brodeur GM, 2003; Maris M, 2006).	17
Abb. 5: In den meisten Organsystemen ist eine Zellhierarchie mit wenigen sich selbst erneuernden Stammzellen zu finden. Entarten diese durch bisher unbekannte Umwelteinflüsse kommt es zu	

unkontrolliertem Wachstum der Subpopulationen, es entsteht ein Tumor. Übernommen aus (Burkert J, 2006).	19
Abb. 6: p75NTR interagiert physiologisch mit TrkA und erhöht so die Möglichkeit auf NGF zu reagieren. Ein zweiter Komplex kann von p75NTR mit Sortilin gebildet werden. Er vermittelt ein proapoptotisches Signal bei Bindung von pro-NGF. Als dritte Möglichkeit kooperiert p75NTR mit NogoR und Lingo-1. Die Bindung von Nogo, MAG oder OmGP resultiert dann in einem Wachstumsstopp der Zelle. Angepasst nach (Barker PA, 2004).	22
Abb. 7: Immunhistochemische p75NTR-Färbung im Ganglioneuroblastom (I und III) und im schlecht differenzierten Neuroblastom (II und IV). I und II 5-fache und III und IV 40-fache Vergrößerung.	45
Abb. 8: p75NTR-Expressionshöhe im Tissue-Micro-Array (n=93)	45
Abb. 9: p75NTR-mRNA-Expressionshöhe im Affymetrix Microarray (n=110).	46
Abb. 10: Kaplan-Meier-Analyse der p75NTR-mRNA-Expressions-Daten (p-Wert: 0,02).	46
Abb. 11: p75NTR-Proteinexpression war in keiner von acht etablierten Neuroblastom-Zelllinien nachweisbar.	47
Abb. 12: p75NTR-Expression zweier stabil mit p75NTR-Vektor transfizierten SY5Y-Einzelzellklone im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp.	48
Abb. 13: Abfall der Zellviabilität im MTT-Assay bei zwei stabil p75NTR-exprimierenden SY5Y-Einzelzellklonen im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp.	49
Abb. 14: Der MTT-Assay zeigt einen Viabilitätsverlust bei zwei stabil p75NTR-exprimierenden SY5Y-Einzelzellklonen im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp exemplarisch an Tag zwölf. Die Ergebnisse werden durch NGF-Zugabe nicht beeinflusst.	49
Abb. 15: Abfall der Proliferationsrate im BrdU-Assay bei zwei stabil p75NTR-exprimierenden SY5Y-Einzelzellklonen im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp.	50
Abb. 16: Anstieg der Apoptoserate im Annexin-V-Apoptose-Assay bei zwei stabil p75NTR-exprimierenden SY5Y-Einzelzellklonen im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp.	50
Abb. 17: Verlust der Tumorigenität von zwei stabil p75NTR-exprimierenden SY5Y-Einzelzellklonen (1×10^4 - 1×10^7 Zellen) im Vergleich zum SY5Y-Wildtyp in der immunsupprimierten Nacktmaus.	51

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, ohne die ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Univ. Prof. Dr. med. Angelika Eggert danke ich für die Möglichkeit der ersten Einblicke in die spannende Welt der experimentellen Forschung durch die Überlassung dieses interessanten Forschungsthemas. Ich danke ihr für die stetige und unterstützende Begleitung meines wissenschaftlichen und klinischen Weges.

Univ. Prof. Dr. med. Johannes H. Schulte danke ich für die vielen tatkräftigen Anleitungen, wissenschaftlichen Diskussionen und die persönliche Förderung bei diesem und anderen Projekten. Aktive Zusammenarbeit und gemeinsame Gespräche hatten für mich immer einen anregenden, lehrreichen und freundschaftlichen Charakter.

PD Dr. rer. nat. Alexander Schramm danke ich für geduldige Unterstützung und ausführliche Erläuterungen zu meinen Forschungsarbeiten. Die korrekte Ausarbeitung der Ergebnisse und konsequente Darstellung der Experimente durfte ich von ihm lernen.

Prof. Dr. med. E. Gulbins aus dem Labor für Molekularbiologie danke ich für die Bereitstellung der Gerätschaften zur Elektroporation.

Danke an alle ehemaligen und derzeitigen Kolleginnen und Kollegen des Labors für pädiatrische Hämatologie und Onkologie, die mir bei allen kleineren und größeren Problemen stets hilfsbereit und motivierend zur Seite standen:

Dr. rer. med. Harald Stephan, Dr. rer. nat. Kathy Astrahantseff, Dr. rer. nat. Steffi Kuhfittig-Kulle, Dr. rer. nat. Anja Fagin, Dr. rer. nat. Theresa Thor, Andrea Drothler, Ellen Mahlow, Anja Rieb, Sabine Dreesmann, Andrea Odersky, Melanie Baumann und Stefanie Freund.

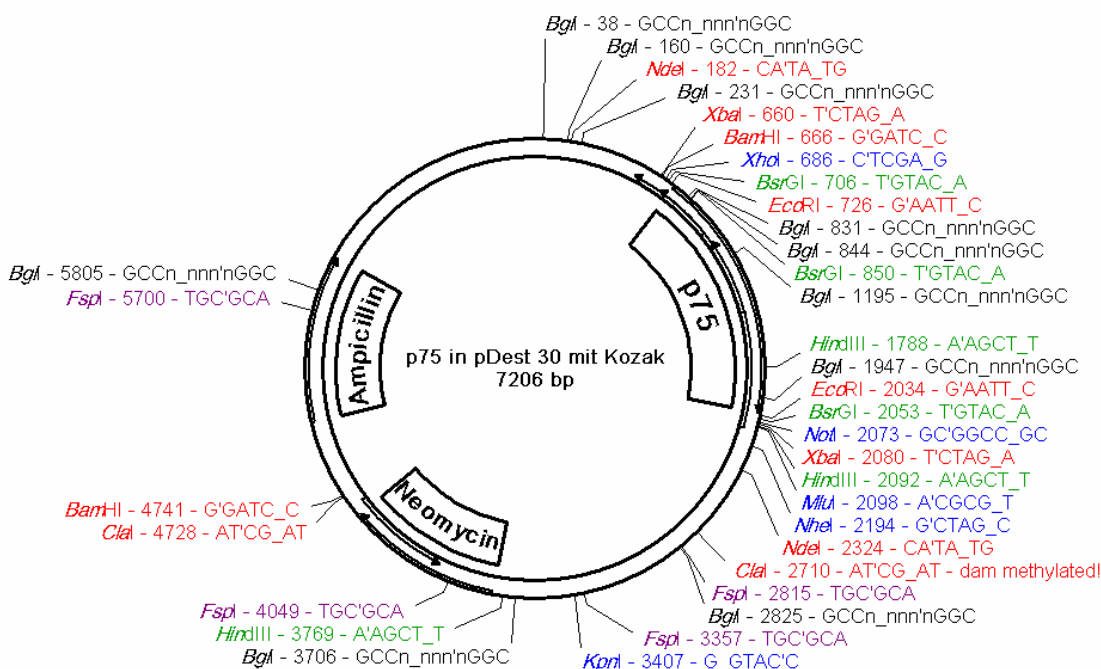
Besonders lange und intensive Labortage gestalteten sich durch die gemeinschaftliche Arbeit mit Anna Bohrer und Stefanie Schulte deutlich angenehmer.

Großer Dank gilt meiner gesamten Familie und meinen Freunden für liebevolle Unterstützung, stetigen Antrieb und immerwährende Akzeptanz, auch wenn meine Laune mal getrübt war!

Anhang

p75NTR in pDest 30 mit Kozak-Sequenz

(7206bp)



Sequenz:

```

ATGCATGTCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC-
GACCCCGGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG-
GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACAT-
CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA-
AATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTA-
CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACAT-
CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAATTGACGT-
CAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAA-
CAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAG-
CAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGAC-
GAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCA-
TAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCCCTACCGGTGA-
TATCCTCGAGCCATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGAATTCCGCCCTTGCCAC-
CATGGGGGCAGGTGCCACCGGCCGCGCCATG-
GACGGGCCGCGCTGCTGCTGTTGCTGCTTCTGGGGGTGTCCCTTGGAGGTGCCAAG-
GAGGCATGCCCCACAGGCCTGTACACACACAGCGGTGAGTGCTGCAAAGCCTG-

```

CAACCTGGGCGAGGGTGTGGCCCAGCCTTGTGGAGCCAACCAGACCGTGTGT-
GAGCCCTGCCTGGACAGCGTGACGTTCTCCGACGTGGTGAGCGCGACCGAGCCGTG-
CAAGCCGTGCACCGAGTGCCTGGGGCTCCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGGAGGCC-
GACGACGCCGTGTGCCGCTGCGCCTACGGCTACTACCAGGATGAGACGACTGGGCGCTGC-
GAGGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGGCCTCGTGTTCTCCTGCCAGGACAAGCA-
GAACACCGTGTGCGAGGAGTGCCCCGACGGCACGTATTCCGACGAGGCCAACCACGTG-
GACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCGCCAGCTCCGCGAGTGCA-
CACGCTGGGCCGACGCCGAGTGCAGGAGATCCCTGGCCGTTGGATTACACGGTCCA-
CACCCCAGAGGGCTCGGACAGCACAGCCCCAGCACCCAGGAGCCTGAGGCACCTCCA-
GAACAAGACCTCATAGCCAGCACGGTGGCAGGTGTGGTGACCACAGTGATGGGCAGCTCC-
CAGCCCGTGGTGACCCGAGGCACCACCGACAACCTCATCCCTGTCTATTGCTC-
CATCCTGGCTGCTGTGGTTGTGGGCCTTGTGGCCTACATAGCCTTCAAGAGGTGGAA-
CAGCTGCAAGCAGAACAAGCAAGGAGCCAACAGCCGGCCAGTGAACCAGACGCCCCAC-
CAGAGGGAGAAAACTCCACAGCGACAGTGGCATCTCCGTGGACAGCCAGAGCCTGCAT-
GACCAGCAGCCCCACACGCAGACAGCCTCGGGCCAGGCCCTCAAGGGTGACGGAGGCCTC-
TACAGCAGCCTGCCCCAGCCAAGCGGGAGGAGGTGGAGAAGCTTCT-
CAACGGCTCTGCGGGGGACACCTGGCGGCACCTGGCGGGCGAGCTGGGCTACCAGCCC-
GAGCACATAGACTCCTTTACCCATGAGGCCTGCCCGTTCCGCGCCCTGCTTG-
CAAGCTGGGCCACCCAGGACAGCGCCACACTGGACGCCCTCCTGGCCGCCCTGCGCCG-
CATCCAGCGAGCCGACCTCGTGGAGAGTCTGTGCAGTGAGTCCACTGCCA-
CATCCCCGGTGTGAAGGGCGAATTCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTT-
GATGGGCGGCCGCTCTAGAGGGCCCAAGCTTACGCGTGATGCGACGTCA-
TAGCTCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTATAAGCTAGGCACTGGCCGTCGTTTTA-
CAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGCTAGCTTGGGATCTTTGTGAAGGAACCT-
TACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAA-
TATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTAGCTGCATATGCTTGCTGCTTGA-
GAGTTTTGCTTACTGAGTATGATTTATGAAAATATTATACACAGGAGCTAGTGATTC-
TAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCACAGTCCCAAGGCTCATTTACAGGCCCTCAGTCCTCA-
CAGTCTGTTTATGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAA-
AACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGT-
TAACTTGTATTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAA-
TAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAT-
CATGTCTGGATCGATCCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGC-
TATTGGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCG-
CAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCAT-
TAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCC-
TAGCGCCCCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCCCCGT-
CAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC-
CAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTTACGTTAGTGGGCCATCGCCCTGATA-
GACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTCCA-

AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCC-
GATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAATATTTAACGCGAATTTTAACAA-
AATATTAACGTTTACAATTTTCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTT-
CACACCGCATAACGCGGATCTGCGCAGCACCATGGCCTGAAATAACCTCTGAAAGAG-
GAACTTGGTTAGGTACCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGT-
TAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCT-
CAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCA-
AAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCC-
TAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCA-
GAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTG-
GAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAGCTTGATTCTTCTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGGCTA-
GAGCCACCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGA-
GAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCCGGCTGCTCT-
GATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACC-
GACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGCGCTGGC-
CACGACGGGCGTTCCCTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGG-
GACTGGCTGCTATTGGGCCAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCT-
CACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCA-
TACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAG-
CACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCAT-
CAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC-
GAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGA-
AATGGCCGCTTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAG-
GACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCT-
GACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTC-
TATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGC-
GACGCCCAACCTGCCATCACGATGGCCGCAATAAAATATCTTTATTTTCATTA-
CATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGAATCGATAGCGATAAGGATCCGCGTATGGTGCACTCT-
CAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCT-
GACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGT-
GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTACCGTTCATCACCGAAACGCGCGA-
GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCT-
TAGACGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTA-
AATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATT-
GAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGG-
CATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTCAAAGTAAAAGATGCTGAAGAT-
CAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGA-
GAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGC-
TATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATA-
CACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGG-

CATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACACTGCGGCCAACT-
 TACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGG-
 GATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC-
 GAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGC-
 GAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG-
 CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG-
 GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG-
 TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA-
 AATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGAC-
 CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATC-
 TAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTTTCGTT-
 CACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGA-
 GATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCACCGCTAC-
 CAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTT-
 CAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTT-
 CAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC-
 CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGT-
 TACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTG-
 GAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGC-
 CACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAG-
 GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTA-
 TAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGT-
 CAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTT-
 TACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCCT-
 GATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCC-
 GAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCA-
 AACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGAGCTTGCAATTCGCGCGTTTTT-
 CAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAACATTTGAATGTATT-
 TAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC-
 TAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTAGTACGAGGCCCTTT-
 CACTCATTAG

- | | |
|-----|---|
| AAA | TATA box |
| CCC | Tetrazyklin-Operator (TetO ²) |
| TTT | attB1 |
| GGG | Kozak-Sequenz |
| ATG | Start- bzw. Stop-Code |
| GGG | p75NTR coding sequence |
| CCC | attB2 |

Lebenslauf

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