

Modulation der zellulären Strahlenantwort beim
Neuroblastom durch die Neurotrophin Rezeptoren
TrkA/NTRK1 und TrkB/NTRK2

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat
Der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Christina Olivia Haßiepen
aus Aachen

Essen, Juni 2021

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie der inneren Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Schramm

2. Gutachter: Prof. Dr. Georg Iliakis

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Dominik Boos

Tag der mündlichen Prüfung: 15. September.2021

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub

universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/74836

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20221011-081457-0



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0) genutzt werden.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
EINLEITUNG	7
1 NEUROTROPHIN-REZEPTOREN	7
1.1 AUFBAU VON NEUROTROPHIN-REZEPTOREN UND NEUROTROPHINEN	7
1.2 NEUROTROPHINE	9
1.2.1 NGF, der Ligand des Neurotrophin-Rezeptor TrkA	9
1.2.2 BDNF, der Ligand des Neurotrophin-Rezeptor TrkB	9
1.3 TRK-SIGNALWEGE	10
1.3.1 PLC- γ 1 Signalweg	11
1.3.2 Ras - Signalweg	12
1.3.3 PI3K-Signalweg	13
1.4 NEUROTROPHIN-REZEPTOREN WÄHREND DER ENTWICKLUNG	13
1.5 NEUROTROPHIN-REZEPTOREN IN DER ONKOLOGIE	15
1.6 NEUROTROPHIN-REZEPTOREN IN NEUROBLASTOMEN	16
2 NEUROBLASTOM	19
2.1 ALLGEMEIN	19
2.2 GENETISCHE PRÄDISPOSITIONEN	19
2.3 SPORADISCHE NEUROBLASTOME	20
2.4 THERAPIE	22
3 STRAHLENTHERAPIE	23
3.1 ANSÄTZE VON STRAHLENTHERAPIE	23
3.2 PHYSIKALISCHE EFFEKTE VON IONISIERENDER STRAHLUNG	24
3.3 BIOLOGISCHE EFFEKTE	25
3.3.1 Zellzyklus	26
MATERIAL & METHODEN	28
4 MATERIAL	28
4.1 CHEMIKALIEN	28
4.2 PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN	30
4.3 WESTERN-BLOT GELE	31

4.4	KOMMERZIELLE KITS	32
4.5	ANTIKÖRPER	32
4.6	RT-PCR PRIMER	33
4.7	SI-RNAS	34
4.8	GERÄTE	34
4.9	VERBRAUCHSMATERIALIEN	35
4.10	SOFTWARE	35
4.11	MODELLSYSTEME	36
4.11.1	Zellkulturmodelle	36
5	METHODEN	37
5.1	ZELLKULTUR	37
5.1.1	Kultivierung der Zellen	37
5.1.2	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	37
5.1.3	Zellzahlbestimmung	38
5.2	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	38
5.2.1	Protein-Isolation	38
5.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test	38
5.2.3	Western-Blot	39
5.2.4	Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung	40
5.2.5	Bestimmung der RNA-Konzentration	40
5.2.6	komplementäre DNA (cDNA) Synthese	41
5.2.7	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	41
5.3	FUNKTIONELLE TESTS	42
5.3.1	Kurzzeitüberlebens-Test MTT	42
5.3.2	Koloniebildungs-Test	42
5.3.3	Messung des mitotischen Index (MI)	43
5.3.4	RNA-Interferenz durch siRNA	44
	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	45
	ERGEBNISSE	46
6	AUSWIRKUNGEN DER TRKA-ÜBEREXPRESSION IN NEUROBLASTOM-MODELLEN	46
6.1	CHARAKTERISIERUNG TRKA ÜBEREXPRIMIERENDER NEUROBLASTOMZELLEN	46
6.2	AUSWIRKUNGEN VON TRKA-ÜBEREXPRESSION AUF DEN ZELLZYKLUS UNTER BESTRAHLUNG	48
6.3	EINFLUSS VON TRKA-ÜBEREXPRESSION AUF DAS ÜBERLEBEN UNTER BESTRAHLUNG	53

6.4	UNTERSUCHUNG DER FÜR DEN G2/M CHECKPOINT RELEVANTEN SIGNALWEGE UNTER BESTRAHLUNG	55
6.5	EINFLUSS VON MUTATIONEN IM ATR/ATM-SIGNALWEG AUF DEN ZELLYKLUS PHÄNOTYP	57
6.6	EINFLUSS VON TRKA-ÜBEREXPRESSION AUF DIE EXPRESSION UND AKTIVIERUNG DES ATM/ATR-SIGNALWEGS UNTER BESTRAHLUNG	59
6.7	EINFLUSS VON WEITEREN TYROSIN-REZEPTOR-KINASEN AUF DEN G2/M-KONTROLLPUNKT	63
7	AUSWIRKUNGEN DER TRKB-ÜBEREXPRESSION IN NEUROBLASTOM-MODELLEN	64
7.1	CHARAKTERISIERUNG-TRKB ÜBEREXPRIMIERENDER NEUROBLASTOMZELLEN	64
7.2	EINFLUSS VON TRKB-ÜBEREXPRESSION AUF DIE MORPHOLOGIE NACH BESTRAHLUNG	66
7.3	EINFLUSS VON TRKB-ÜBEREXPRESSION AUF DAS KURZZEIT- UND LANGZEITÜBERLEBEN	69
7.4	EINFLUSS DER INHIBITION KANONISCHER SIGNALWEGE AUF DIE TRKB-ABHÄNGIGE PROLIFERATION	74
7.5	EINFLUSS VON TRKB-ÜBEREXPRESSION AUF DIE EPITHELIALE-MESENCHYMALE-TRANSITION	78
7.6	AUSWIRKUNG DER siRNA-VERMITTELTEN HERUNTERREGULATION VON ZEB1 AUF DIE ZELLPROLIFERATION UNTER BESTRAHLUNG	79
<u>DISKUSSION & AUSBLICK</u>		81
8	DISKUSSION	81
8.1	TRKA-AKTIVIERUNG FÜHRT ZU EINEM G2/M-KONTROLLPUNKT DEFECT	81
8.2	TRKA-AKTIVIERUNG FÜHRT ZU ERHÖHTEM KURZZEITÜBERLEBEN	82
8.3	TRKA-AKTIVIERUNG FÜHRT ZUR INHIBIERUNG DES ATM/ATR-SIGNALWEGS	83
8.4	G2/M-KONTROLLPUNKT DEFECT IST KEIN TYROSIN-KINASE-REZEPTOR PHÄNOTYP	85
8.5	TRKB FÜHRT ZU EINEM GESTEIGERTEN ÜBERLEBEN UNTER BESTRAHLUNG	85
8.6	INHIBITION DES PI3K-SIGNALWEGS REDUZIERT TRKB-VERMITTELTE STRAHLENRESISTENZ	86
8.7	MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNG UND INDUKTION VON EMT-PROTEINEN NACH TRKB-AKTIVIERUNG	87
9	AUSBLICK	88
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>		89
<u>ABSTRACT</u>		91
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>		92
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>		95
<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>		111
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>		111

DANKSAGUNG **113**

LEBENS LAUF **115**

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG **115**

Einleitung

1 Neurotrophin-Rezeptoren

Die Neurotrophin Rezeptoren (NTRK) Familie ist ein wichtiger Bestandteil der Entwicklung und Aufrechterhaltung des zentralen und peripheren Nervensystems. Sie umfasst drei Rezeptoren, Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A (TrkA/NTRK1), Tropomyosin-Rezeptor-Kinase B (TrkB/NTRK2) und Tropomyosin-Rezeptor-Kinase C (TrkC/NTRK3). Diese liegen auf den Chromosomen 1q23.1 (TrkA), 9q21.33 (TrkB) und 15q25.3 (TrkC). Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) bindet an TrkA. Der vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (BDNF) und die Neurotrophine-4/5 (NT-4/5) aktivieren TrkB und Neurotrophin-3 (NT-3) interagiert mit TrkC. Zudem bindet der Pan-Neurotrophin-Rezeptor p75 (p75^{NTR}) mit niedriger Affinität an die Neurotrophine und Pro-Neurotrophine, welche die Vorstufen von Neurotrophinen darstellen. p75^{NTR} ist Teil der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptor-Familie (Kaplan and Miller 2000; Huang and Reichardt 2001; Bibel and Barde 2000).

1.1 Aufbau von Neurotrophin-Rezeptoren und Neurotrophinen

Die Neurotrophin-Rezeptoren haben einen grundsätzlich ähnlichen Aufbau. Sie verfügen über eine extrazelluläre Domäne, welche aus drei Tandem-Leucin-reichen Motiven besteht und von zwei Cystein-Clustern am N-Terminus und zwei Immunglobulin-artigen (Ig2) Domänen in der membran-proximalen Region flankiert werden. Über die zweite Ig2-Domäne interagieren die Rezeptoren mit ihren Liganden (Urfer et al. 1998). Die Ligand-Rezeptor-Grenzfläche besteht aus einem konservierten Bindungsmotiv, welche bei allen Neurotrophinen auftritt. Diese Bindungsstelle ist spezifisch für die Wechselwirkung zwischen den Rezeptoren und den Liganden. Intrazellulär liegt die Juxta-Membrandomäne, an der die Tyrosinkinase-Domäne gekoppelt ist. Mutationen in der Juxta-Membrandomäne der Rezeptoren beeinflusst die Aktivierungsfähigkeit. In der cytoplasmatischen-Domäne befinden sich 10 konservierte Tyrosine. Von diesen befinden sich drei in der sogenannten Aktivierungsschleife der Tyrosinkinase-Domäne und fungieren als Brücke für die

Phosphorylierung weiterer Tyrosine (Cunningham and Greene 1998; Kaplan and Miller 2000; Pawson and Nash 2000).

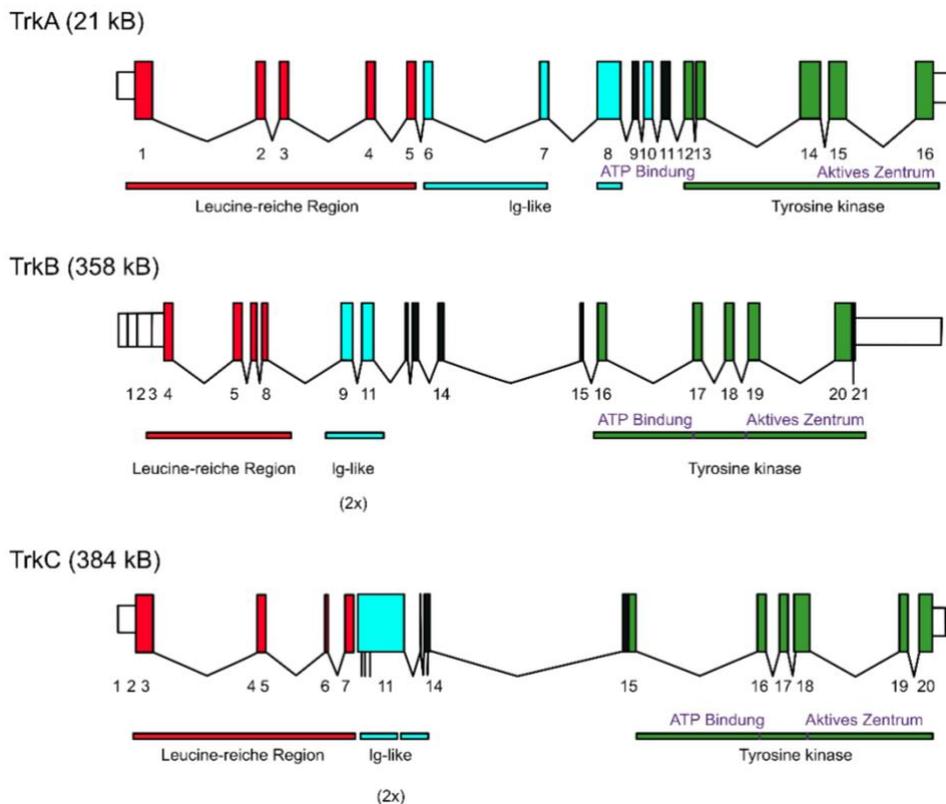


Abbildung 1: Schematische Darstellung der genomischen Strukturen von TrkA, TrkB und TrkC

Größe jedes Gens in Klammern Kästen angegeben: Boxen: Exons; Striche: Introns; Rot: Leucin-reiche Domäne; Türkis: Ig-ähnliche-Domäne; Grün: Tyrosinkinase Domäne. Verändert nach Modifiziert nach (Penault-Llorca et al. 2019).

Es gibt verschiedene Spleißvarianten der Trk Rezeptoren. Von TrkA sind bisher drei Spleißvarianten bekannt. TrkA II ist die am häufigsten vorkommende Isoform, Exon 9 wird in dieser Variante herausgeschnitten. TrkA I kommt seltener vor, hat jedoch eine stärkere Bindung zu NT-3. TrkA III ist eine Spleißvariante, bei der Exon 6, 7 und 9 fehlen, wodurch die Bindungsstelle des Liganden NGF verloren geht und der Rezeptor konstitutiv aktiv wird (Tacconelli et al. 2005; Tacconelli et al. 2004).

TrkB hat ebenfalls zwei Isoformen, welche ctrkB-short und ctrkB-long benannt wurden. Bei der kurzen Variante wird das Exon 9 herausgeschnitten, wodurch es zu einer ineffizienteren oder schwächer Bindung an NT-4/5 und NT-3 kommt. ctrkB-long beinhaltet Exon9 und stellt die am häufigsten exprimierte Variante dar (Strohmaier et al. 1996).

TrkC hat verschiedene Isoformen, K1, K2 etc. (Lamballe et al. 1993). Diese zeichnen sich durch ein Fehlen der inner- oder extrazellulären Domäne aus (Gunn-Moore et al. 1997).

1.2 Neurotrophine

Neurotrophine sind Liganden der Trk-Rezeptoren. Es gibt vier verschiedene Neurotrophine, NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5. Diese sind dimere Moleküle, die ungefähr 50% Sequenzidentität aufweisen, wobei insgesamt eine hohe Sequenzkonservierung in der gesamten Neurotrophin-Familie besteht. Es konnte nachgewiesen werden, dass sie nicht nur Homodimere bilden, sondern auch Heterodimere, wodurch sie an Hybrid-Bindungsstellen der Trk-Rezeptoren binden können (Robinson et al. 1995).

1.2.1 NGF, der Ligand des Neurotrophin-Rezeptor TrkA

Der aus 118 Aminosäure bestehende NGF bindet an den Neurotrophin-Rezeptor TrkA. Das kodierende Gen liegt auf dem Chromosomenabschnitt 1p13.2. In aktiver Form bildet NGF meist ein homodimeres Molekül. Dabei bildet es eine Hantelförmige Struktur. Vier Schleifenregionen tragen hierbei zur Rezeptorspezifität bei. Eine Anhäufung von positiv geladenen Aminosäuren in den Seitenketten führt zudem zu einer hohen Bindungsaffinität für TrkA (Hetman and Xia 2000; Wang et al. 2014).

1.2.2 BDNF, der Ligand des Neurotrophin-Rezeptor TrkB

Das BDNF Gen liegt auf Chromosom 11 und hat neun Promotorregionen, welche die Expression von verschiedenen BDNF Transkripten steuern. Diese kodieren jeweils für dasselbe BDNF Protein (Pruunsild et al. 2007; Aid et al. 2007). Die Transkription wird durch Ca^{2+} -Ionen aktiviert und reguliert (Ghosh et al. 1994; Zafra et al. 1991). Ca^{2+} initiiert die Bindung von Transkriptionsfaktoren, wie AMP-Antwortelement-Bindungsprotein (CREB) und dem Ca^{2+} -Reaktionsfaktor (CaRF) an die Promotorregionen (Tao et al. 1998; Tao et al. 2002). Zudem können epigenetische Veränderungen der Chromatinstruktur die Transkription zusätzlich regulieren (Zhou et al. 2006; Kumar et al. 2005). BDNF wird hauptsächlich in Neuronen und Gliazellen exprimiert, jedoch kommt es auch in Dendriten durch Transport und Translation vor. BDNF bindet mit einer hohen Affinität an den Rezeptor TrkB.

1.3 Trk-Signalwege

Die Neurotrophin-Bindung an Trk-Rezeptoren führt zu homologen Dimerisierung (Jing et al. 1992). Es kommt jedoch auch zur Dimerisierung mit p75^{NTR}, wodurch die Affinität und Spezifität der Trk-Rezeptoraktivierung reguliert wird (Huang and Reichardt 2003). Im Allgemeinen führt dies zur Phosphorylierung der Tyrosinkinasen. Dabei kommt es zu einer Kaskade, in der zuerst die Tyrosine in der Aktivierungsschleife aktiviert werden und das Signal an die anderen Tyrosine weitergeben. Dies hat eine Konformationsänderung bzw. eine Öffnung und Transphosphorylierung zur Folge. So wird der Zugang von Substraten zur Kinase ermöglicht. Phosphotyrosinreste an Trk-Rezeptoren fungieren anschließend als Andockstellen für Adaptermoleküle (Friedman and Greene 1999; Obermeier et al. 1994; Stephens et al. 1994). Dies schafft Bindestellen für Adapterproteine der intrazellulären Signalkaskaden des *Rat sarcoma* (Ras) Proteinkinase-Wegs (van Groningen et al.), des Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K)-Signalwegs und des Phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) -Signalwegs (Penault-Llorca et al. 2019; Nakagawara 2001; Amatu et al. 2016; Kaplan and Miller 2000; Pawson and Nash 2000).

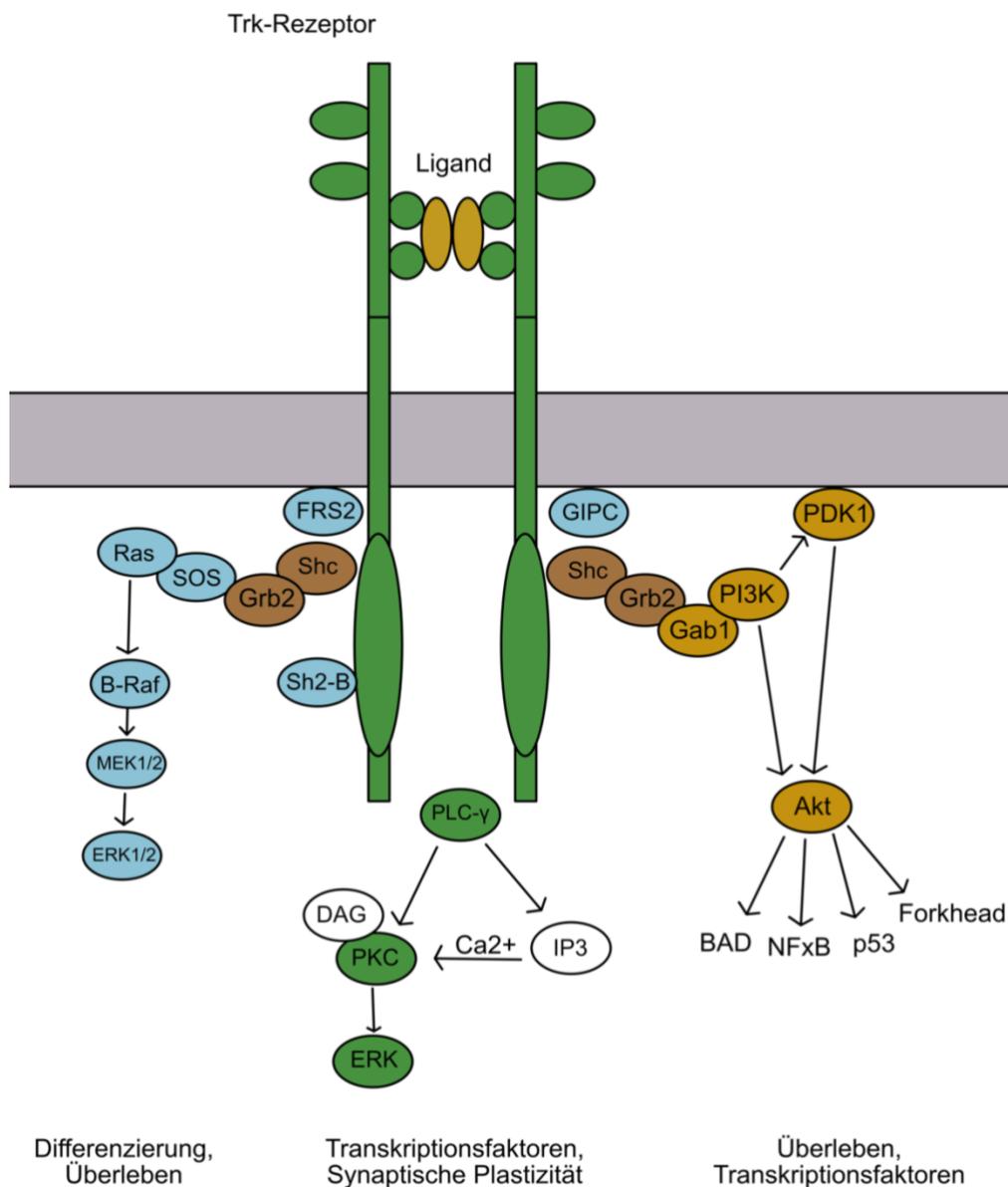


Abbildung 2: Signaltransduktion der Neurotrophinrezeptoren

Trk-Rezeptoren sind Rezeptor-Tyrosinkinasen, die sich durch ihre spezifischen Liganden aktivieren lassen und zu Dimeren zusammenschließen. Drei Hauptsignalwege werden dadurch aktiviert: der PI3K- der PLC-γ- und der MAP-Kinase-Signalweg. Kennzeichnung grün: Kinasen; hellviolett: Phospholipase C-γ (PLC-γ); grau: GTP-Austauschfaktoren; blau: GTPasen; gelb: Phosphatasen; weiß: Botenstoffe; hellbraun: Transkriptionsfaktoren; schwarz: Proteine des mitochondrialen Apoptose Signalweges. Modifiziert nach (Chao 2003; Huang and Reichardt 2001).

1.3.1 PLC-γ1 Signalweg

Der PLC γ 1-Signalweg spielt in vielen und sehr unterschiedlichen Prozessen im Körper eine Rolle. Unter anderen wird er durch die Phosphorylierung von TrkA an Y785 aktiviert. Analoge Stellen sind ebenfalls an TrkB und TrkC zu finden (Kaplan and Miller

2000). Daraufhin startet die Signalkaskade, wodurch aktives PLC- γ 1 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat hydrolysiert und daraus Inositol-tris-phosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) (Bower et al.) gebildet werden. Zum einen bedingt IP3 die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus internen Speichern, welches wiederum zur Aktivierung von Enzymen wie der Ca²⁺-Proteinkinase C (PKC) und der Familie der Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CaM-Kinasen) führt. Zum andern stimuliert DAG die DAG-PKC-Isoformen, wodurch PKC wiederum extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1 (Erk1) und extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 2 (Erk2) aktiviert und es letztendlich zu einem NGF-geförderten Neuriten-Wachstum kommt (Corbit et al. 1999).

1.3.2 Ras - Signalweg

Der Ras-Signalweg ist ein Schalter zwischen Proliferation und Differenzierung, sowie neuronalem Überleben. Zur Aktivierung des Signalwegs kommt es durch die Phosphorylierung des Trk-Tyrosinrests Y490, wodurch das Adapterprotein Shc an die Rekrutierungsstelle für die Bindung der Polypyrimidin-Trakt-Bindungsprotein (PTB)-Domäne bindet. Wachstumsfaktor-Rezeptor-Bindungsprotein 2 (Grb2), Ras und *son of sevenless* (SOS) können dadurch als Austauschfaktor rekrutiert werden (Nimnual et al. 1998). Durch diese Komplexbildung wird Ras vorübergehend aktiviert (Spencer et al. 2002b; Spencer et al. 2002a). Das aktivierte Ras ist die Verbindung zu verschiedenen nachgeschalteten Signalwegen, wie dem PI3K-, *rapidly accelerated fibrosarcoma* (Raf)-, p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen (p38MAP)-Kinase-Signalweg (Vanhaesebroeck et al. 2001; Xing et al. 1998) und dem *rapidly accelerated fibrosarcoma* (Raf)/ mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK)-Signalweg (Xing et al. 1996).

Der Raf-Signalweg aktiviert CREB und andere Transkriptionsfaktoren (Xing et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass CREB's zum Überleben von Kleinhirn, Körnerzellen und von sympathischen Neuronen führt (Bonni et al. 1999; Riccio et al. 1999).

Der p38MAPK Signalweg wiederum aktiviert eine Vielzahl an Signalwegen und ist in zahlreichen biologischen Prozessen involviert, wie zum Beispiel im Zellzyklus, Zelltod, Entwicklung, Zelldifferenzierung, Seneszenz und der Tumorentstehung (Zarubin and Han 2005).

1.3.3 PI3K-Signalweg

Die Produktion von P3-phosphorylierten Phosphoinositiden fördert das Überleben vieler Populationen von Neuronen und hat eine entscheidende Rolle in der Vesikel-Bewegung (Cantley 2002; Brunet et al. 2001). Die heterodimere PI3-Kinase wird durch zwei Wege aktiviert (Vanhaesebroeck et al. 2001): Einerseits durch Ras-abhängige Aktivierung, welcher der Hauptweg des Neurotrophin-vermittelten Zellüberlebens ist (Vaillant et al. 1999), andererseits wird der PI3K-Signalweg in manchen Zellen auch durch die drei Adapter Proteine Shc, Grb2 und Grb2-assoziiertes-Bindungsprotein 1 (Gab1) aktiviert. Hierbei fungiert Gab1 als Bindestelle für PI3K (Harada et al. 2001). Auch die Tyrosinphosphatase *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2* (SHP2) fungiert in manchen Zellen als Link (Liu and Rohrschneider 2002). Zudem wurde nachgewiesen, dass die Trk-Signalübertragung zur Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats-1 führt, welches wiederum PI3-Kinasen der Klasse I rekrutiert und aktiviert (Yamada et al. 1997). Die Aktivierung von PI3K führt zur Rekrutierung von verschiedenen Proteinen, welche eine Pleckstrin-Homologe-Domäne aufweisen. Eins davon ist die Phosphatidylinositid-abhängige Proteinkinase (PDK-1). Diese wird durch PI3K aktiviert, wodurch die Proteinkinase B (Akt) aktiviert wird.

Aktiviertes Akt interagiert mit verschiedenen Proteinen, darunter sind *Forkhead family transcription factor* (FRK 's) , *Bcl-2-antagonist of cell death* (BAD), *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), p53 und Glykogensynthasekinase 3 β (GSK-3 β)(Segal 2003; Datta et al. 1999; Yuan and Yankner 2000). BAD ist Teil der Anti-apoptotischen Signalkaskade (Datta et al. 2000). NF- κ B ist in das neurale Überleben involviert (Middleton et al. 2000). GSK 3- β hemmt Apoptose in kultivierten Neuronen (Hetman et al. 2000). Der Transkriptionsfaktor FKHL1 ist im Abbau von 14-3-3 beteiligt, welches Teil der Zellzyklus Regulation ist (Wilde et al. 1999; Brunet et al. 2002; Brunet et al. 1999) und p53 ist ein Tumorsuppressorgen und hat Einfluss auf die Apoptose (Datta et al. 1999; Mello and Attardi 2018).

1.4 Neurotrophin-Rezeptoren während der Entwicklung

Neurotrophin Rezeptoren wurden zum ersten Mal 1991 als Teil der neuronalen Entwicklung identifiziert (Klein et al. 1991; Kaplan et al. 1991), obwohl der Ligand NGF bereits 1966 gefunden wurde (Levi-Montalcini 1987). Es konnte in den folgenden Jahren gezeigt werden, dass der Neurotrophin-Signalweg einen Einfluss auf das

Überleben von Neuronen und die Regulierung der neuralen Entwicklung hat (Thoenen 1995).

Die TrkA-Expression ist für die Entwicklung peripherer sympathischer Neuronen sowohl pränatal, als auch postnatal wichtig (Cohen 1960). TrkA wird im sich entwickelnden und im adulten Nervensystem exprimiert, wo es die Differenzierung und das Überleben von Neuronen steuert (Indo 2014). Zudem spielt TrkA eine Rolle bei der Vermittlung von Schmerzen, Juckreiz und Entzündungen, sowie bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von cholinergen, sympathischen und sensorischen Neuronen (Singer et al. 1999).

TrkB hingegen fördert durch Bindung an BDNF die Plastizität und das Überleben neuronaler Zellen (Tejeda and Diaz-Guerra 2017). Beim Menschen ist die TrkB-Expression im präfrontalen Kortex, in der Amygdala und im Okzipital Lappen am höchsten (Su et al. 2004). Verlust von BDNF oder TrkB führt zu einer geringeren Großhirnrinde durch eine geringere Anzahl und Größe von Neuronen (Xu et al. 2000; Minichiello et al. 1999). Aufgrund seiner Funktion ist eine veränderte TrkB-Expression mit Zentralnervensystem (ZNS)-Pathologien verbunden.

Die durch Neurotrophin vermittelte Aktivierung der Trk-Rezeptoren fördert hauptsächlich Wachstum, Differenzierung und Überleben von Neuronen. Die Bindung von Neurotrophinen an ihren alternativen Rezeptor p75^{NTR} führt hauptsächlich zur Aktivierung der JNK-Signalkaskaden, die Zellzyklusarrest und die Apoptose einleiten (Cocco et al. 2018).

Neurotrophine steuern die Entwicklung spezifischer Subpopulationen sensorischer Neuronen. Sensorische Neuronen der dorsalen Wurzelganglien (DRGs) weisen spezifische Projektionsmuster sowohl im Rückenmark als auch in der Peripherie auf und übertragen auch spezifische sensorische Modalitäten (Ernsberger 2009b).

NGF ist notwendig für das Überleben im Wesentlichen aller kleinen Neuronen mit nicht-myelinisierten oder dünn-myelinisierten Axonen und für die adrenerge Differenzierung der sympathischen Neuronen. Zudem konnte es auch bei Wachstumsprozessen wie Axonen Verlängerung gefunden werden (Levi-Montalcini et al. 1954). BDNF beeinflusst die Entwicklung von Mechanorezeptoren, die an Merkel-Zellen enden, während NT-4 für das Überleben einer Unterklasse der Haarfollikel-Rezeptoren verantwortlich ist (Stucky et al. 1998). NT-3 unterstützt das Überleben vieler DRG-Neuronen zu Beginn der Entwicklung (Ernsberger 2009a).

1.5 Neurotrophin-Rezeptoren in der Onkologie

In verschiedenen Krankheiten konnte eine Beteiligung von Neurotrophin-Rezeptoren nachgewiesen werden, wie z.B. Alzheimer (Allen et al. 1999; Ferrer et al. 1999) und anderen neuronalen Dysfunktionen wie Parkinson (Fenner et al. 2014; Jin 2020), Depressionen und Schizophrenie (Krishnan and Nestler 2010; Ernst et al. 2009; Weickert et al. 2005). Zudem wurden Neurotrophin-Rezeptoren 1982 zum ersten Mal als Onkogen klassifiziert (Pulciani et al. 1982), da gezeigt werden konnte, dass die Trk-Rezeptorfamilie durch Mutationen oder Fusionen zu einer treibenden Kraft für maligne Erkrankungen in erwachsenen und in pädiatrischen Fällen wird.

Zum einen konnten somatische TRK-Mutationen in verschiedenen Tumorarten identifiziert werden. Darunter befinden sich Darm- und Lungenkrebs (großzelliges Neuroendokrines Karzinom und Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) (Harada et al. 2011) (Marchetti et al. 2008), sowie Melanome (Miranda et al. 2014) und akute myeloische Leukämie (Tomasson et al. 2008). Außerdem konnte bei einer Vielzahl an Krebsarten eine Überexpression von Trk nachgewiesen werden, darunter Brust-, Haut- (z. B. Basalzellkarzinom) und Lungenkrebs sowie Neuroblastom, Zylindrom und weitere Tumorarten (Lagadec et al. 2009; Lange and Lo 2018; Rajan et al. 2011; Eggert et al. 2002).

Trk-Fusionen wurden bereits vor langem als Onkogene identifiziert. Dabei wurden Fusionen mit TRKA, TRKB und TRKC in verschiedenen Tumortypen gefunden (Vaishnavi et al. 2015).

Die Fusion führt zu Chimären TRK, welche durch intrachromosomale oder interchromosomale Überlagerungen zustande kommen. Da die Kinasedomäne am 3' Ende mit einer Oligomerisierungs-Domäne am 5' Ende fusionieren wie z.B. den Coiled-Coil-Domänen, den Zinkfinger-Domänen oder den WD40-Wiederholungen (Schram et al. 2017; Martin-Zanca et al. 1989), kommt es entweder zu einer Überexpression oder einer konstitutiven Aktivität der Kinasefunktion. Dieser umgelagerte Zustand führt zur spontanen, Liganden-unabhängigen Dimerisierung und anschließender Aktivierung der Signaltransduktion (Arevalo et al. 2000). TRK-Fusionen konnten in verschiedenen Krebsarten wie in kolorektalen und papillären Schilddrüsenkarzinomen (Amatu et al. 2016) nachgewiesen werden. In manchen kommen sie so häufig vor (>90%), dass sie als Marker genutzt werden können wie z.B. in *mammary analogue secretory carcinoma* (MASC) (Drilon et al. 2016). In Tumoren wie Neuroblastom oder Lungenkarzinom wurden ebenfalls TRK-Fusionen,

jedoch mit einer geringeren Frequenz (<1%) gefunden (Amatu et al. 2016). Neben den Trk-Rezeptoren spielen auch Neurotrophine eine Rolle bei der Tumor Entstehung. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Neurotrophine das Tumorwachstum fördern. In mehreren Glioblastom-Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass NGF die Proliferation stimuliert sowie einen *Feedback-loop* aktiviert, der die Sekretion von NGF fördert (Singer et al. 1999). Auch in nicht-neuronalen Tumoren konnte für NGF eine wachstumsfördernde Wirkung nachgewiesen werden, z.B. bei malignen Veränderungen des Pankreas (Zhu et al. 1999), der Prostata (Weeraratna et al. 2000), der Lunge (Ricci et al. 2001), der Eierstöcke (Davidson et al. 2004) und der medullären Schilddrüse (McGregor et al. 1999).

1.6 Neurotrophin-Rezeptoren in Neuroblastomen

Es konnte gezeigt werden, dass Neurotrophin-Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Prognose von Neuroblastomen spielen (Brodeur 2003; Brodeur et al. 2009; Brodeur et al. 1997; Thiele et al. 2009).

Neuroblastome können in zwei Untergruppen unterteilt werden in Hinblick auf den genetischen Hintergrund und die Prognose. Die erste Untergruppe weist eine hohe Expression von TrkA auf und oft numerische chromosomale Aberrationen, wie Hyperdiploidie oder Triploidie. Es konnten nur selten segmentale chromosomale Abnormitäten (SCAs) gefunden werden. Allgemein weist diese Untergruppe gute Prognosen auf, welche mit einem niedrigen Alter und einem geringem Internationales Neuroblastoma Einstufungs System (INSS)-Grad verbunden sind. Die Einstufung ist abhängig von der Ausbreitung des Tumors im Körper wie z.B. Größe des Tumors, Beteiligung von Lymphknoten, sowie vorhanden sein von Metastasen. Ein geringer Grad bedeutet daher wenig Ausbreitung (Mosse et al. 2007; Schleiermacher et al. 2012; Brodeur 2003). Zudem gehört die Neuroblastom Untergruppe 1 zu den wenigen Tumoren, bei denen spontane Regression beobachtet wurde, was eine Abnahme der Größe oder das Verschwinden des Tumors und der Metastasen ohne therapeutische Intervention definiert (Challis and Stam 1990; Everson 1964; Cole and Everson 1956; Papac 1998) (Kogner et al. 1993; Nakagawara et al. 1993; Suzuki et al. 1993).

Diese spontane Regression der Tumore wird auf die Überexpression von TrkA zurückgeführt. Die Aktivierung des TrkA Signalwegs durch NGF führt zur Differenzierung von unreifen Neuroblastomen zu differenzierten Ganglioneuroblastomen und anschließend zum Ganglioneurom (Shimada et al. 1999a)

(Shimada et al. 1984; Shimada et al. 2001; Shimada et al. 1999b). In Abwesenheit von NGF wird die Apoptose eingeleitet (Nakagawara et al. 1993; Nakagawara and Brodeur 1997; Goldschneider and Mehlen 2010). Neuroblastom-Gewebe mit einer hohen TrkA-Expression setzt sich zudem hauptsächlich aus zwei Zellarten zusammen: den neuroblastischen Ganglienzellen und den Schwannzellen. Es konnte gezeigt werden, dass Schwannzellen in Gegenwart von TrkA-exprimierenden Neuroblastomzellen in vitro mehr proliferieren und migrieren. Zudem können sie NGF sekretieren, wodurch die Tumorzellen differenzieren (Abb. 3) (Pajtler et al. 2014).

Die zweite Untergruppe von Neuroblastomen weist häufig Überexpression von TrkB und seines Liganden BDNF auf. Zudem sind Neuroblastome in dieser Gruppe oft diploid und besitzen SCAs und Zugewinne des Chromosoms 17q. Diese Gruppe lässt sich in zwei weitere Gruppen unterteilen. Untergruppe 2A zeichnet sich durch Teilverlust von 3p, 4p und/oder 11q aus. Untergruppe 2B verliert häufig 1p und weist MYCN Amplifikationen auf (Abb. 3) (Nakagawara et al. 1994). Allgemein wird die Untergruppe 2 mit höherem Alter, schlechten Prognosen und höheren INSS-Stadien in Verbindung gebracht, besonders im Fall von 2B (Brodeur 2003). Weiter konnte gezeigt werden, dass TrkB-Aktivierung zu autokrinen Signalwegen führt, welche Invasion, Metastasierung, Angiogenese und Chemotherapie-Resistenzen fördern (Jaboin et al. 2002; Nakagawara et al. 1994; Acheson et al. 1995; Matsumoto et al. 1995; Nakamura et al. 2006). Allerdings führt die Abwesenheit von BDNF nicht zu Apoptose (Nikoletopoulou et al. 2010).

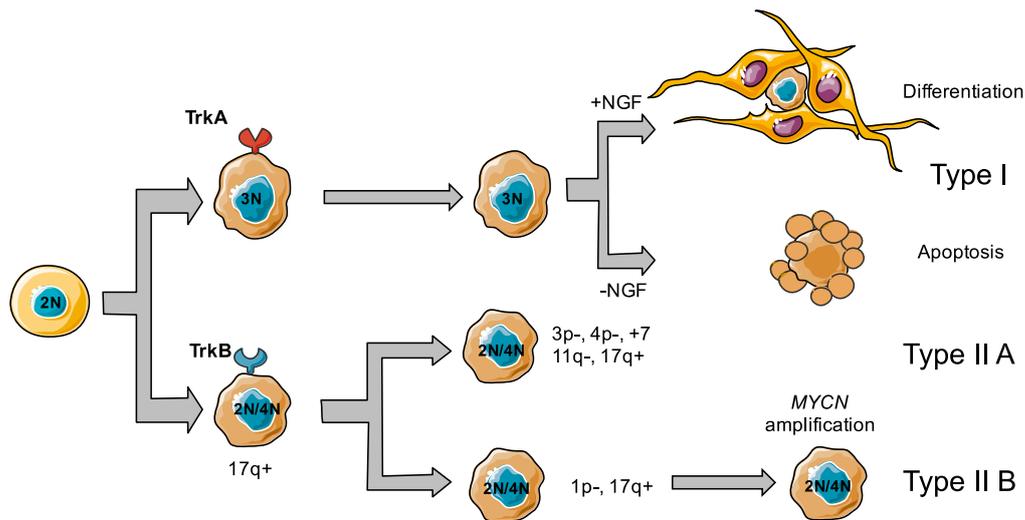


Abbildung 3: Genetisches Modell der Neuroblastomentwicklung

Neuroblastome teilen sich in zwei wichtige Untergruppen auf. Typ-1-Neuroblastome weisen gute klinische Prognosen auf. Sie haben eine hohe Expression des TrkA-Neurotrophinrezeptors und weisen konsistent numerische Chromosomenanomalien auf. Zudem neigen sie dazu, eine spontane Regression (oder Differenzierung) zu erfahren, abhängig von der Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von NGF (Ligand von TrkA) in ihrer Mikroumgebung. Umgekehrt sind Typ-2-Neuroblastome mit klinisch schlechten Prognosen verknüpft und weisen segmentale Chromosomenanomalien (SCAs) auf. Viele dieser Tumoren haben ein Zugewinn des Chromosoms 17q und exprimieren TrkB und BDNF. Sie werden basierend auf zusätzlichen genomischen Veränderungen in zwei Subtypen unterteilt: Typ-2A-Tumoren weisen einen segmentalen Verlust von 3p, 4p und/oder 11q auf, zum Teil tritt auch ein Chromosom-7-Gewinn auf. Typ 2B weisen zusätzlich zu einer 1p-Deletion und dem Zugewinn von 17q eine MYCN-Amplifikation auf. Dieser Subtyp zeichnet sich zudem durch aggressivste und am schnellsten fortschreitende Tumore aus. Modifiziert nach (Brodeur and Bagatell 2014).

Durch diese Erkenntnisse entstand ein neuer Therapie-Ansatz, welcher zum Ziel hat, die Aktivierung von TrkB zu hemmen. Es konnte gezeigt werden, dass der potente Trk-Inhibitor CEP-751 (KT-6587) das Wachstum von TrkB-überexprimierenden SY5Y-abgeleiteten Neuroblastom-Xenotransplantaten in Nacktmäusen hochwirksam inhibierte (Evans et al. 1999; Evans et al. 2001). Eine Phase-I-Studie bei Patienten mit Neuroblastom wurde mit dem verwandten Trk-Inhibitor Lestaurtinib (früher bekannt als CEP-701 und KT-5555) durchgeführt, jedoch sprach nur eine Minderheit dieser Patienten auf die Therapie an. Der Grund dafür ist noch unklar (Minturn et al. 2011). Die Inhibition von TrkB durch AZ64 konnte eine höhere Effizienz in Verbindung mit Chemotherapie und lokaler Bestrahlung zeigen (Iyer et al. 2012).

2 Neuroblastom

2.1 Allgemein

Das Neuroblastom (NB) ist ein maligner Tumor, der sich im sympathischen Nervensystem entwickelt. Es ist der am häufigsten vorkommende solide Tumor mit einem Anteil von 8-10% an allen malignen Erkrankungen im Kindesalter und ist verantwortlich für 15% der Krebstode im Kindesalter (Goodman et al. 1999). Die meisten Neuroblastome werden vor dem fünfzehnten Lebensjahr diagnostiziert. Der Tumor bildet sich meistens an den Nebennieren oder in den paraspinalen Ganglien. Die Überlebensrate liegt bei 50% in der Hoch-Risikogruppe (Maris et al. 2007). Neuroblastome wurden als eine heterogene Tumorart identifiziert, da viele Faktoren bei ihrer Entstehung eine Rolle spielen. Einige dieser Faktoren sind das Alter während der Diagnose, das Stadium der Krankheit während der Diagnose, molekulare genetische und zelluläre Faktoren und das Vorliegen familiärer Prädisposition. Diese Faktoren tragen dazu bei, ob es zu spontaner Regression des Tumors kommt oder ob sich Metastasen und Resistenzen gegen Therapien entwickeln.

2.2 Genetische Prädispositionen

Nur <2% der Neuroblastom-Patienten weisen eine familiäre genetische Prädisposition auf. Hier wurden Mutationen in Signalwegen der Entwicklung des sympathoadrenalen System als Grund identifiziert.

In diesen Fällen sind zu ca. 80% die Gene Anaplastische Lymphomkinase (ALK) (Su et al.) und *Paired-like homeobox 2b* (PHOX2B) (van Limpt et al. 2004) mutiert.

Eine aktivierende ALK Keimbahnmutationen führt zu ca. 75% der hereditären Neuroblastom-Fälle. Alk ist eine Rezeptor-Kinase, welche während der Entwicklung des embryonalen und neonatalen Gehirns exprimiert wird. Die Aktivierung des Alk-Rezeptors führt zur Aktivierung des MAPK/ERK-, PI3K-AKT-, PLC γ -, Janus Kinase (JAK)/ *Signal Transducer And Activator Of Transcription* (STAT)-Signalwegs und weiteren Signalwegen. Diese sind Teil der Proliferations- und Differenzierungssignalweiterleitung. Es wurden drei Hauptmutationen im intrazellulären Bereich der Alk-Kinase gefunden: In 30% der Fälle im Bereich von F1174L, in 12% der Fälle im Bereich von F1245C und in 43% der Fälle im Bereich R1275Q. Diese Mutationen verursachen Substitutionen einzelner Aminosäuren in der

Alk-Tyrosinkinase-Domäne (TKD), welche die konstitutive Liganden-unabhängige Aktivierung dieser Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) fördern (Mossé et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008; Chen et al. 2008; George et al. 2008).

Eine inaktivierende PHOX2B Mutation wurde mit 5% der hereditären Fälle in Verbindung gebracht. PHOX2B ist ein Transkriptionsfaktor, welcher den Zellzyklus Austritt und die neuronale Differenzierung unterstützt. Zudem spielt es eine wichtige Rolle in der Differenzierung der Neuralleistenzellen zu vegetativen Neuronen. Im Zusammenhang mit der kongenitalen Megakolon-Krankheit, welche oft mit Neuroblastomen einhergeht, wurden Keimbahnmutationen im PHOX2B als ein Auslöser für NB identifiziert (Aygün 2018; Mosse et al. 2004). Weitere genomische Mutationen wurden mit der Bildung von Neuroblastom in Verbindung gebracht (Pugh et al. 2013). Jedoch konnte keine als Haupttreiber identifiziert werden.

2.3 Sporadische Neuroblastome

Ganz überwiegend tritt die Entstehung von Neuroblastomen sporadisch auf. Dieser Prozess ist für 98% der Neuroblastom-Entwicklung verantwortlich. Es wurden verschiedene Gene gefunden, welche an dieser Entwicklung beteiligt sein könnten, jedoch konnte bisher kein Haupttreiber identifiziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass ALK nicht nur in den familiären, sondern auch in den sporadischen NBs eine Rolle spielt. 6-10% der Neuroblastomen tragen somatische ALK-aktivierende Mutationen und zusätzlich 3-4% ein hohes Level an ALK Amplifikationen (Pugh et al. 2013; Mossé et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008; Chen et al. 2008). Auf der Suche nach einem Treiber-Gen wurde von Schwab 1984 eine hohe MYCN Amplifikation in Neuroblastom festgestellt. Zudem konnte gezeigt werden, dass MYCN, welches auf dem kurzen Arm vom Chromosom 2 liegt, in mehr als ≥ 10 Genkopien in Form von *double minutes* (DMs) und *homogeneously staining regions* (HSRs) vorliegen kann (Breit and Schwab 1989; Schwab et al. 1984; Schwab et al. 1983; Look et al. 1991). MYCN Amplifikationen treten in 22% der sporadischen NB auf (Brodeur 2003). Da Mycn verschiedene Signalwege reguliert wie Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Überleben sowie allgemein der ZNS-Entstehung ist es ein interessanter Faktor für die Neuroblastom-Entstehung. Es wird während der Entwicklung der Neuralleistenzellen exprimiert und wirkt als Transkriptionsfaktor für verschiedene Gene. Ein Nachweis, dass MYCN eins der wichtigsten Onkogene für NB ist, wurde im Mausmodell erbracht. Hier führte eine Überexpression des humanen

MYCN unter Kontrolle des Tyrosin Hydrolase Promotor in murinen Neuralleistenzellen zur Neuroblastom-Entwicklung (Weiss et al. 2000; Weiss et al. 1997). Auch im Zebrafisch-Modell lassen sich durch ektopische MYC-Expression Neuroblastom-Strukturen induzieren (Zhu et al. 2012). Obwohl Mycn als ein Treiber für Neuroblastome identifiziert wurde, ist es schwierig eine gerichtete Therapie zu entwickeln. MYCN ist ein nukleäres Protein ohne spezifische Andockstellen für Inhibitoren. Daher wurde nach anderen Herangehensweisen gesucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass MYCN in Neuroblastomen durch Proteinkinase Aurora-A stabilisiert wird. Dementsprechend wird Aurora-Kinase Inhibition zur Degradation von MYC als therapeutische Option geprüft (Richards et al. 2016). Jedoch wird auch die Möglichkeit der Inhibierung der *downstream-targets* untersucht, um eine Therapie zu entwickeln (Barone et al. 2013).

Ein weiteres Gen, welches als Tumorsuppressor für Neuroblastome identifiziert werden konnte. Ist ATRX, welches in 2,5% der Fälle mutiert vorliegt und in 7% focal deletiert ist (Pugh et al. 2013). ATRX kodiert für eine Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Helicase, die unter physiologischen Bedingungen an Chromatin-Remodellierung, der Wechselwirkungen mit Histon-Varianten und der Zellzyklus Regulation beteiligt ist (Nandakumar et al. 2017). Es konnte nachgewiesen werden, dass ATRX auch in die Telomerase-Aktivität involviert ist. Krebszellen sind bekannt für eine hohe Telomerase-Aktivität. 30% und der NBs zeigten eine erhöhte Telomerase-Aktivität (Hiyama et al. 1995; Coco et al. 2012; Poremba et al. 2000; Ackermann et al. 2018).

Durch die Sequenzierung des ganzen Genoms konnten weitere Gene identifiziert werden, die an der sporadischen Entstehung von NB beteiligt sein könnten. Darunter waren der RAC/ Rhodopsin (Rho)-Signalweg (Molenaar et al. 2012; Pugh et al. 2013), die Chromatin-Remodellierungsgene *AT-rich Interactive Domain-Containing Protein 1A* (ARID1A) und *AT-rich Interactive Domain-Containing Protein 1B* (ARRID1B) (Sausen et al. 2013), ebenso wie *BRCA1 Associated RING Domain 1* (BARD1) (Bosse et al. 2012; Capasso et al. 2009), Lin-28 Homolog B (LIN28B) (Diskin et al. 2012), *LIM Domain Only 1* (LMO1) (Wang et al. 2011), NRAS (0,83% Mutationen in NB), *Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11* (PTPN11) (2,9% Mutationen) und weitere (Pugh et al. 2013). Jedoch wurde keine dieser Signalkaskaden bisher als Haupttreiber von NB identifiziert.

2.4 Therapie

Die meisten Neuroblastom-Patienten werden nach einem Protokoll behandelt, welches in 20 Jahren klinischer Studien entwickelt wurde. Zuerst werden die Patienten in eine der Risikogruppen, niedrig, mittel und hoch, eingeteilt. Dabei wird das INSS/ Internationales Neuroblastoma Risiko Gruppen Einstufungs System (INRGSS)- Stadium, Alter während der Diagnose, histologische Ergebnisse und Biologie und Genetik des Tumors einbezogen. Besonders werden auch allgemeine Erkrankungen und Infektionen in Tumorbereich beachtet und gewichtet, sowie schlussendlich die Ausbreitung durch zum Beispiel Metastasen. Eine besonders wichtige Rolle spielen die *image-defined risk factors* (IDRFs) bei der Festlegung des Behandlungsplans.

Bei Neuroblastom-Patienten mit genetischen Prädispositionen ist oft die beste Methode „Abwarten und Beobachten“ (Acharya et al. 1997; Hero et al. 2008). Diese Methode wird auch bei Säuglingen empfohlen, bei denen Neuroblastome diagnostiziert wurden (Hero et al. 2008). Bei Patienten mit geringem Risiko ist die operative Entfernung des Tumors die Standard-Behandlung, besonders bei Patienten, welche keine MYC-Amplifikation aufweisen (De Bernardi et al. 2008). Chemotherapie wird bei Patienten empfohlen, bei denen keine Resektion des Tumors möglich ist. Auch Leberbeteiligung, Rückenmark-Kompression und eine mögliche Beeinträchtigung der Atemwege können eine operative Entfernung erschweren. Die allgemeine Überlebensrate bei Patienten mit geringem Risiko liegt bei > 95% (Irwin and Park 2015). Der Behandlungsplan für mittlere Risikogruppen sieht Resektion des Tumors und zusätzliche Chemotherapie vor. Bestrahlung wird nur durchgeführt, wenn lebensbedrohliche Komplikationen während der Chemotherapie auftreten oder es zu Tumorprogression kommt. Die Überlebensrate bei mittleren Risikopatienten liegt bei 80-95% (Irwin and Park 2015). Bei Hoch-Risikopatienten wird ein aggressiver multi-modularer Ansatz verfolgt, welcher neoadjuvante Chemotherapie, Resektion des Tumors, adjuvante Chemotherapie, hämatopoetische Stammzelltransplantation und Bestrahlung einbezieht (Laprie et al. 2004). In den letzten Jahren wurde zusätzlich die Anti-GD2 Immuntherapie eingesetzt (Sait and Modak 2017). Dinutuximab ist ein chimärer Anti-GD2-IgG1 Molekül und war der erste Antikörper, der von der *Food and Drug Administration* (FDA) und der Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) für Neuroblastome und für jeden soliden pädiatrischen Tumor zugelassen wurde (Mora 2016). Die Überlebensrate der Hochrisikogruppe hat sich durch diese Behandlung von unter 50% auf 66% erhöht (Sait and Modak 2017). Auch die neue 131I-MIBG-Therapie

wird in den letzten Jahren vermehrt angeboten. Methyliodbenzylguanidin (MIBG) ist den körpereigenen Katecholaminen (Botenstoffe des sympathischen Nervensystems) strukturell ähnlich und wird daher in Katecholamin-produzierenden Tumoren wie dem Neuroblastom intensiv angereichert. Die Verbindung des MIBG mit radioaktivem Iod führt bei der Verabreichung von ^{131}I -MIBG innerhalb des Tumors zu einer hohen Strahlendosis. Diese Behandlung hat den Vorteil, dass die Reichweite der Strahlung (β -Strahlung) deutlich kürzer als bei Photonen-Strahlung ist. Somit wird das umliegende, gesunde Gewebe nur wenig in Mitleidenschaft gezogen. Zudem haben Studien gezeigt, dass 66% der Hochrisikopatienten auf die Therapie reagieren (de Kraker et al. 2008). ^{131}I -MIBG zeigte sogar eine Ansprechrate von 37% bei Wiedererkrankung-Patienten, für die es keine kurativen Therapieoptionen gibt (Matthay et al. 1998).

Zu den bisher genannten werden noch weitere Therapien derzeit klinisch getestet, jedoch ist die Strahlentherapie eine der am häufigsten gewählten Therapien in den Hoch Risikopatienten.

3 Strahlentherapie

Es gibt verschiedene therapeutisch genutzte Strahlenarten wie Protonen, Röntgen oder Gamma-Strahlen. Sie werden genutzt, um malignes Gewebe durch direkte Schädigung der DNA und die Erzeugung von reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu zerstören. ROS stellt daher einen indirekten Weg der DNA-Schädigung dar und löst einen Cluster Effekt aus.

3.1 Ansätze von Strahlentherapie

Strahlentherapie ist neben der Chemotherapie und der operativen Tumorentfernung ein verbreitetes therapeutisches Instrument zur Krebsbehandlung. Die Behandlung wird entweder ausschließlich oder in Kombination mit einer Operation oder einer Chemotherapie bei der Hälfte der Krebspatienten angewendet (Bernier et al. 2004; Huber et al. 2013; Hubenak et al. 2014; Bernier and Poortmans 2016). Allgemein wird ein fraktioniertes Bestrahlungschema bevorzugt. Es werden dazu meistens Dosen von 1,8 bis 2,0 Gy pro Tag fünf Tage pro Woche geplant, um Nebenwirkungen möglichst zu reduzieren und normale Zellen zu schonen, wie zum Beispiel die Haut und die umliegenden Organe (Huber et al. 2013; Hubenak et al. 2014). Zudem hat die

fraktionierte Bestrahlung den Vorteil Tumorzellen zusätzlich zu stressen, da es genug Zeit gibt Sauerstoff in die Tumorzellen zu transportieren. Durch die Bildung von ROS und den Wiedereintritt in den Zellzyklus werden sie zusätzlich für die Effekte der Bestrahlung sensitiviert. Jedoch ist wichtig, die Fraktionen zeitlich so einzugrenzen, dass die Fraktionierung die Repopulation des Tumors während der Therapie minimiert (Bernier et al. 2004; Huber et al. 2013; Good and Harrington 2013).

3.2 Physikalische Effekte von ionisierender Strahlung

Elektromagnetische Strahlen haben die Eigenschaft, die Energie an umliegende Atome weiterzugeben, so dass diese die Energie absorbieren (indirekte Ionisierung). Ionisierende Strahlung (IR) erzeugt auf verschiedene Wegen Doppelstrangbrüchen (DSBs), die in Abhängigkeit von der Funktion der zellulären Reparatur zum Tod der Zelle, zur Karzinogenese oder zu Mutationen führen. In diesem Zusammenhang wird zwischen direkter Einwirkung von Strahlen und indirekter Einwirkung unterschieden. Zum einen wird die DNA direkt von den elektromagnetischen Strahlen getroffen, wodurch es zur biologischen Veränderungen/ DSBs kommt. Hierbei spricht man von direkter Einwirkung von Strahlung. Dies ist der Hauptprozess im Falle von Partikelstrahlung, da sie einen höheren linearen Energie Transfer (LET) aufweisen. Indirekte Einwirkungen von Strahlen, welche den wesentlichen Effekt von elektromagnetischer Strahlung ausmacht, können z.B. Cluster von Ionisationsevents sein, die nachfolgend DSBs verursachen (Abb. 4). Eine solche Akkumulation von DNA-Schäden erhöht die lokale Destabilisierung von Chromatin (Iliakis et al. 2019). Zusätzlich interagiert die Strahlung mit anderen Partikeln wie Wasser und regt diese an, wodurch ROS entstehen (Santivasi and Xia 2014; Surova and Zhivotovsky 2013; Kam and Banati 2013; Feinendegen 2002). Diese hoch reaktiven Teilchen binden an die DNA und führen dadurch zu weiteren Schäden (Ogawa 2016; Luce et al. 2009). Bestrahlung erhöht das ROS Level jedoch nicht nur durch Induktion von Wasser-Radiolyse, sondern auch durch Veränderungen des intrazellulären Metabolismus oder Schäden an den Mitochondrien. Bestrahlung induziert als Spätfolge nach 24 h eine erhöhte Produktion von ROS in den Mitochondrien (Kam and Banati 2013; Tulard et al. 2003). Dabei werden der Respiration Komplex I und III der Elektrontransportkette teilweise deaktiviert (Barjaktarovic et al. 2011; Tulard et al. 2003). Durch Permeabilisierung der Mitochondrien gelangt ROS in den intrazellulären Raum und führt zur Störung der Oxidation/Reduktion-Systeme, was wiederum zu Schäden in der

Zelle inklusive der DNA führt (Feinendegen 2002; Leach et al. 2001; Bentzen 2006; Kam and Banati 2013).

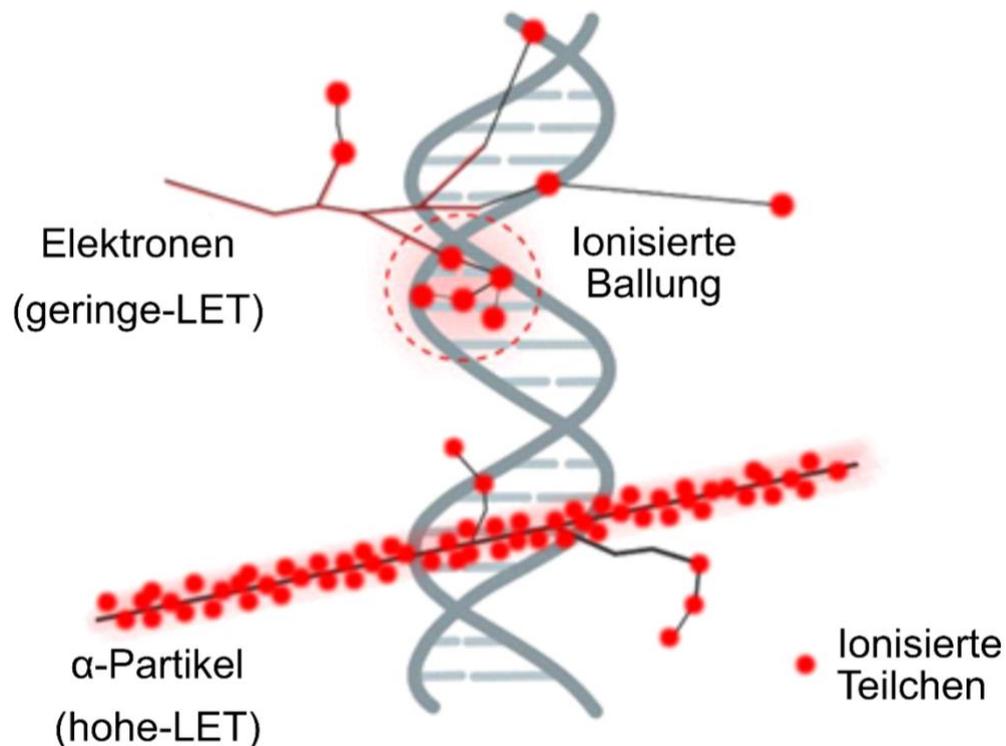


Abbildung 4: Schematische Abbildung der direkten und indirekten Effekte von ionisierender Bestrahlung

Wenn ionisierende Strahlen gleichzeitig beide DNA-Stränge treffen, werden DSBs erzeugt. Dies kann durch direkte IR-Effekte, das heißt durch α -Partikel mit einem hohen-LET entstehen oder durch indirekte IR-Effekte. Bei indirekten Effekte entstehen Schäden durch sogenannte Ionisations-Cluster. Dabei werden Wassermoleküle in der Nähe der DNA ionisiert. Diese haben eine geringere LET. Modifiziert nach (Iliakis et al. 2019).

3.3 Biologische Effekte

Eukaryonten haben auf DNA-Schäden zugeschnittene und hoch organisierte Prozesse entwickelt. Mehrere Signalwege sind in die Aufrechterhaltung der genetischen Integrität nach Bestrahlung involviert. Zusätzlich zu den direkten Folgen wie DSBs wurde gezeigt, dass p53 durch DNA-Schäden aktiviert wird (Fei and El-Deiry 2003; Gudkov and Komarova 2003). p53 ist ein Transkriptionsfaktor und wird bei normaler Funktion als Tumorsuppressor beschrieben. Er erhöht die Expression von verschiedenen Genen, welche zu Autophagie (*DNA Damage Regulated Autophagy Modulator*, *Phosphatase And Tensin Homolog*, TSC1), zu Apoptose (*BCL2 Associated X*, *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced Protein 1*, *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*), zu Zellzyklus-Arrest (p21, 14-3-3) oder zu Seneszenz (p21) führen können.

Dies dient dem Schutz der Zelle und ermöglicht die Entfernung von DNA-Schäden vor der Zellteilung (Surova and Zhivotovsky 2013; Gudkov and Komarova 2003).

3.3.1 Zellzyklus

Um die genetische Integrität nach Bestrahlung zu garantieren, haben eukaryotische Zellen verschiedene Mechanismen entwickelt um Läsionen schnell zu erkennen. Einer dieser Mechanismen ist der *Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)*-/ *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)*-abhängige DNA-Schadens-Signalweg, welcher zur Aktivierung der Zellzyklus Kontrollpunkte führt und verhindert, dass geschädigte Zellen die Mitose vollziehen. Diese schnelle Reaktion der Zellen liefert genug Zeit, entweder Schäden zu reparieren oder wenn nötig den irreversiblen Wachstums-Stopp bzw. permanenten Zellzyklus-Arrest (Seneszenz) einzuleiten. Läsionen durch IR aktivieren die Rekrutierung ATM, ATR (Weiss et al.), *DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)* und Familienmitgliedern der Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase (Parp) Familie zur Schadenstelle (Harper and Elledge 2007; Meek et al. 2008, 09; Falck et al. 2005). DNA-PK reguliert Proteine, welche in die nicht homologe Endverknüpfung (NHEJ) involviert sind. ATM ist hingegen verantwortlich für die homologe Rekombination (HR) und den Zellzyklus-Arrest. HR und NHEJ sind die zwei Haupt-Reparaturmechanismen der Zelle. ATR wird mit seinem Partner *ATR Interacting Protein (ATRIP)* zur Replikationsgabel rekrutiert, um diese zu stoppen oder um als Vermittler bei DSB zu fungieren (Ball et al. 2005). Durch die Phosphorylierung von ATM und ATR kommt es zur Signalweg-Aktivierung und nachfolgender Phosphorylierung von *Checkpoint Kinase 1 (Chk1)* und *Checkpoint Kinase 2 (Chk2)* (Blackford and Jackson 2017). Chk1 und Chk2 phosphorylieren wiederum *Cell Division Cycle 25A/B/C (CDC25A/B/C)* wodurch diese gehemmt werden. CDC25A/B/C aktivieren dadurch den G1- oder G2/M-Kontrollpunkt (Abraham 2001), da die Phosphorylierung durch die Zellzyklus Proteine *Cyclin Dependent Kinase 1 (CDK1)* und *Cyclin Dependent Kinase 2 (CDK2)* geblockt wird und der Zellzyklus somit zum Erliegen kommt. Hierbei ist CDK2 für den G1-Kontrollpunkt und CDK1 für den G2-Kontrollpunkt verantwortlich (Depamphilis et al. 2012). Dadurch wird verhindert, dass Zellen kurz nach der Bestrahlung in die DNA-Replikation oder die Mitose übergehen und als Folge DNA-Schäden in die nächste Generation übernommen werden.

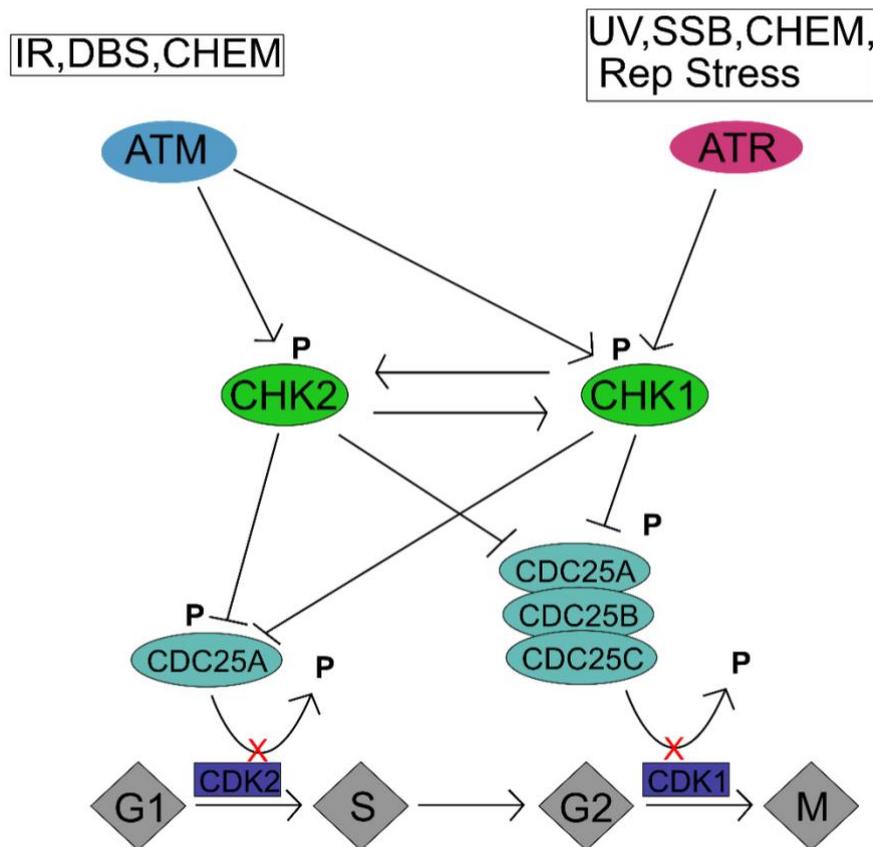


Abbildung 5: Schematische Darstellung des DNA-Schadens-Signalwegs

ATM wird als Reaktion auf ionisierende Strahlung (IR), welche Doppelstrang-DNA-Brüche (DSBs) verursacht, aktiviert. ATR wird durch ein breiteres Spektrum an genotoxischen Stimulanzen wie UV, Replikationsstress und Chemikalien aktiviert, die zu Einzelstrang-DNA-Brüchen (SSB) führen. Darüber hinaus kann ATM auch ATR aktivieren. Darauf folgt die Phosphorylierung von Chk2 und Chk1, welche miteinander interagieren können. Diese wiederum haben einen Einfluss auf die CDC25-Proteine, welche durch Dephosphorylierung der CDK-Proteine den Zellzyklus regulieren. Modifizierte Abbildung (Aleem and Arceci 2015).

Material & Methoden

4 Material

4.1 Chemikalien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien

Produkt	Firma
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Roth
Aqua ad iniectabilia	B. Braun
BDNF (Recombinant Human Brain-Derived Neurotrophic Factor)	PromoKine
Blasticidine	Invitrogen
BSA (Bovine Serum Albumin) (Albumin Fraktion V 200g)	Roth
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Crystal Violet	AppliChem
DAPI	Roth
DMSO	Sigma Aldrich
ECL Prime	GE Healthcare
Ethanol	Sigma Aldrich
Ethidiumbromid	Roth
FACS Clean, FACS Flow, FACS Rinse	BD Biosciences
FCS	Gibco
G418	Roth
GoTaq®, GoTaq® 5x Puffer	Promega
Glycine	Sigma Aldrich
G-5 (5% Glucose-Lösung)	Braun
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III	MerckMillipore/Sigma
Hygromycin B	Invitrogen
Isofluran	Abbvie
Isopropanol	Sigma Aldrich

Isotone	Beckman Coulter
KU-55933	Selleckchem
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche
LOXO 101	Selleckchem
LY 294 002	Sigma
Methanol	Fluka (Riedel-de Haen)
NaOH	Roth
NGF (Nervenwachstums Faktor)	R&D Systems
NP-40	Fluka
O'GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher
Opti-MEM™	Gibco
Paraformaldehyd 37%	ChemCruz
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Gibco
PD 98059	CALBIOCHEM
Penicillin/Streptomycin	Gibco
PhosSTOP	Roche
Ponseau S	Serva
Precision Plus Protein™ Standards – Kaleidoscope	Bio Rad
PI (Propidium Iodid)	Roth
RNase A	Roth
RPMI 1640	Gibco
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Gerbu
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Serva
Tetrazyklin	Sigma Aldrich
TransIT-TKO®	Mirus
Triton x-100	Merck Millipore
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Gibco
VE821	Selleckchem

4.2 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 2: Liste der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien

Puffer	Zusammensetzung
Blockierlösung (Western-Blot)	5 %ige BSA-Lösung in TBS-T
Kolonie-Färbelösung	1 % Crystal violet in 70% Ethanol
Einfriermedium	FCS + 10% (w/v) DMSO
FACS- Puffer	1 x PBS + 2 % (v/v) FCS + 2mM EDTA
Laemmli-Puffer (5x)	1 % Bromphenolblau + 10 % Glycin + 2 % SDS + 50mM Tris-HCL (pH 6,8) + 10 % 2- Mercaptoethanol
Laufpuffer (10x)	250 mM Tris + 1,92 M Glycin + 1 % SDS in 1l H ₂ O
MTT- Lösung	0,6 mM MTT in PBS
PBS (10x)	136 mM NaCl + 2,68 mM KCL + 8,09 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O + 1,47 mM KH ₂ PO ₄
PI – Lösung	1 mg/ml Propidium-Iodid in H ₂ O
RNAse A - Lösung	10 mg/ml RNAse A in H ₂ O
Ponceau S	1 % Ponceau S in 5 %iger Essigsäure
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCL + 150 mM NaCl + 0,5 % Natriumdesoxycholat + 1 % NP-40 + 0,1 % SDS- Lösung (10%) Ad 100 ml H ₂ O pH 8,0 pro 10 ml RIPA 1 Tablette Complete Protease- Inhibitor Cocktail (Trochet et al.) + 1 Tablette PhosSTOP (Trochet et al.)

	aliquotiert und bei -20°C gelagert
RPMI complete	RPMI1640 versetzt mit 10 % FCS
Solubilisierungslösung	10 % Triton X + 90 % Isopropanol + 0,8 % HCl (37%)
TBS-(10x)	0,5 M Tris-HCL + 1,5 M NaCl, pH 7,5 (HCl)
Transferpuffer (1x)	10% Laufpuffer (10x) + 70 % H ₂ O + 20 % Ethanol abs.

4.3 Western-Blot Gele

Tabelle 3: Trenngel

Gelkonzentration	8 %	10 %	17 %
Aqua dest [ml]	4,6	4	2,3
Acrylamid (30%) [ml]	2,7	3,3	5
SDS Puffer [µl]	100	100	100
Unteres 4x TrisCl [ml]	2,5	2,5	2,5
Ammoniumpersulfat (10%) [µl]	100	100	100
TEMED [µl]	6	4	4

Tabelle 4: Sammelgel

Gelkonzentration	4 %
Aqua dest [ml]	1,4
Acrylamid (30%) [ml]	0,33
Oberes 4x TrisCl [ml]	0,25
SDS Puffer [µl]	20
Ammoniumpersulfat (10%) [µl]	20
TEMED [µl]	2
Gekaufte Gele:	
4–15% Mini-PROTEAN™ TGX Stain-Free™ Protein Gels, 10-15 well	BioRad

4.4 Kommerzielle Kits

Tabelle 5: Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
Amersham™ ECL Prime Western-Blotting Detection Reagenz	GE Healthcare
Antigen Unmasking Solution, Citric Acid Based	Vector Laboratories
Countess™ Cell Counting Chamber Slide	Invitrogen
DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (mit Nickel), 3,3'-diaminobenzidine	Vector Laboratories
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche Molecular Systems, Inc
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Luminol und Peroxide Buffer)	Thermo Fisher
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche
Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit, for 40 blots	BioRad
TRiFECTa™ Tm RNAi Kit	IDT

4.5 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

Epitop	Herkunft	Firma	Verdünnung
β-Actin	Maus	Sigma-Aldrich	1:2000
ATM	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
p-ATM Ser1981	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
ATR	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
p-ATR Ser1989	Kaninchen	CellSignaling	1:1000

TrkA	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
TrkB	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
p-TrkA/B Tyr785/Tyr816	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
Chk1	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
p-Chk1 Ser317	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
p-Chk1 Ser296	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
Chk2	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
p-Chk2 Th68	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
CDC25A	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
p-CDC25A Thr506	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
CDC25B	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
p-CDC25B Ser323	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
CDC25C	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
p-CDC25C Ser216	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
H3pS10	Kaninchen	Abcam	1:5000
Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen	Ziege	Invitrogen	1:300
Snail	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
Vimentin	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
ZEB1	Kaninchen	CellSignaling	1:1000
Anti-Kaninchen	-	Thermo Fisher	1:2000
Anti-Maus	-	Thermo Fisher	1:2000

4.6 RT-PCR Primer

Tabelle 7: Realtime PCR - Primer

Gen	Spezies	Sequenz(5'-3')
β-Actin	Human	acagagcctcgctttg
		ccttgacatgccggag
Gapdh	Human	ccacccatggcaaattccatggca
		tctagacggcaggtcaggtccacc
TrkA	Human	tcgaaaatcagcagcacc
		gccacaaatctcagtcag
TrkB	Human	gccgtcaagacactgaaaga
		cgccgtagaacttcacgata

4.7 si-RNAs

Tabelle 8: si-RNA

Gen	Sequenz(5'-3')
ZEB1 #1	guuggagaauaaucagccaauctt aagauuggcuugauuuauucuccaaac
ZEB1 #2	gaucuuucacuaaccaaagcaacagg ccuguugcuuugguagugaaagaucaa
ZEB1 #3	caucauaccucugauacuauuautt aaauaauguaucaagagguaugaugac

4.8 Geräte

Tabelle 9: Geräte

Gerät	Hersteller
Allegra X-22R Centrifuge	Beckman Coulter
BD FACS Celesta with HTS module	BD Bioscience
C1000® Thermal Cycler	BioRad
Centrifuge 5415C	Eppendorf
Centrifuge 5415D	Eppendorf
ChemiSmart Imaging System	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH
Countess Automated Cell Counter	Invitrogen
Gallios Flow Cytometer	Beckman Coulter
LightCycler® 480 System	Roche Molecular Systems, Inc.
Microplate Reader Model 380	BioRad
Axio Observer Z1 fluorescence microscope mit Apotome	Zeiss
NanoDrop lite spectrophotometer	Thermo Fisher
Excella E24 Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific
RS320 X-ray irradiator	X-Strahl
Trans-Blot® Turbo™	BioRad
X-ray machine	GE Healthcare

4.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
10 cm Zellkulturschale	Greiner BioOne
Combitips Advanced	Eppendorf
Cryoröhrchen	Roth
Einweg Skalpelle	Braun
FACS Röhrchen	Falcon
Filter Tip (10µl, 200µl 1000µl)	TipOne
Parafilm	Pechinery
Pasteurpipetten	Brand
PCR-Tubes	Axygen
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner BioOne
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Spritze (2 ml, 5 ml, 10 ml)	
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner BioOne
Zellkulturplatten (6-Well, 12-Well, 24-Well, 48-Well, 96-Well)	Greiner Bio One, Starlab

4.10 Software

Affinity

FlowJO

GraphPad Prism

ImageJ/Fiji

Microsoft Office

Power Point

Word

Excel

4.11 Modellsysteme

4.11.1 Zellkulturmodelle

Tabelle 11: Zellkulturmodelle

Zelllinie	Spezies	Eigenschaft
A549	Human	Lungenkarzinom
H1975	Human	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
Kelly	Human	Neuroblastom, MYCN-amplifiziert
SKNAS	Human	Neuroblastom
SY5Y	Human	Neuroblastom

Die Zelllinien Kelly, SKNAS und SY5Y wurden mit zwei Vektoren transfiziert, zum einen dem pT-Rex-DEST30-Vektor, in den eine humane TrkA cDNA kloniert wurde (Invitrogen, Carlsbad, CA), und zum anderen dem Vektor pcDNA6/TR (Invitrogen), welcher das Tetracyclin-Repressor-Gen trägt (generiert durch Dr. S. Lindner, UK-Essen). Durch diese Vektor Kombination war es möglich die TrkA Expression durch die Behandlung der Zellen mit Tetracyclin (TET) zu aktivieren (Emdal et al. 2015).

Außerdem wurde die Zelllinie SY5Y mit dem pT-Rex-DEST30-Vektor, in den eine humane TrkB cDNA kloniert wurde (Invitrogen, Carlsbad, CA) und mit dem Vektor pcDNA6/TR (Invitrogen), welcher das Tetracyclin-Repressor-Gen trägt (generiert durch Dr. S. Lindner, UK-Essen), transfiziert. Dadurch ist in diesen Zellen die TrkB-Expression ebenfalls durch TET induzierbar.

Des Weiteren wurde die SY5Y Zelllinie mit einem pLNCX Vektor, in den eine TrkB cDNA kloniert wurde, transfiziert, wodurch eine stabile TrkB-Expression in den Zellen erzeugt wurde. Als Kontroll-Zelllinie diente der Leervektor pLNCX ohne TrkA/TrkB cDNA (Schulte et al. 2005).

Tabelle 11: Zellen und Derivate

Abkürzung	Zelllinien	Induziert/stabil	Expression
-TR	SY5Y, SKNAS, Kelly	Induziert durch TET	Leervektor
-TRA	SY5Y, SKNAS, Kelly	Induziert durch TET	TrkA
-TRB	SY5Y	Induziert durch TET	TrkB
-pLNCX	SY5Y	stabil	Leervektor
-TrkB	SY5Y	stabil	TrkB

5 Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinien wurden unter sterilen Konditionen in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI 1640 mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin in T-75 Flaschen kultiviert. Abhängig von der Transfektion wurden die Zellen zusätzlich mit Antibiotikum selektiert. Zellen, welche einen für den Tetracyclin-Repressor kodierenden Vektor trugen (TR-), wurden mit 7,5 µg/ml Blasticidin kultiviert. Zellen, welche einen Leervektor (pLNCX) oder einen Vektor mit TrkA/TrkB cDNA aufwiesen, wurden zusätzlich oder ausschließlich mit G418 250 µg/ml gehalten (siehe 3.10.1). Zum Passagieren wurde in einer Laminar Flow Werkbank das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 ml Phosphat Puffer Saline (PBS) gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und durch 1 ml 0,05% Trypsin ersetzt. Nach 5 min. bei 37°C lösen sich die Zellen durch die proteolytische Aktivität des Trypsins von der Flasche. Die Zugabe von 5 ml Medium mit FCS führt zum Abstoppen der Reaktion. 1-3 ml dieser Lösung wurden abhängig von der Zelllinie zur Weiterkultivierung der Zelle verwendet, wobei der Rest für Versuche zur Verfügung stand.

5.1.2 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden trypsinisiert und die Zellsuspension anschließend in Medium in einem 15 ml Reaktionsgefäß bei 400 x g 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in 900 µl FCS und 100 µl DMSO resuspendiert (1:10 Verhältnis). Anschließend wurde die Suspension in ein Kryo-Röhrchen überführt und bei -80°C in einem Kryoeinfriergefäß für einen Tag gelagert. Danach wurden die Zellen bei -80°C in einem Kühlschrank oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryo-Röhrchen ca. 5 min. im 37°C warmen Wasserbad erwärmt und anschließend in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 400 x g 5 min. zentrifugiert. Das Einfriermedium wurde abgenommen und die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert und in eine T75-Flasche mit Mediumlösung gegeben. Diese Platten wurden schlussendlich im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt.

5.1.3 Zellzahlbestimmung

Zellzahlbestimmung wurden mittels des *Countess Automated Cell Counter* vorgenommen. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde erneut abgesaugt und durch 1 ml 0,05% Trypsin ersetzt. Nach 5 min. bei 37°C lösen sich die Zellen von der Flasche. Die Zugabe von 5 ml Medium mit FCS führt zum Abstoppen der Reaktion. 10 µl wurden aus dieser Lösung in eine 96-well Platte pipettiert und mit 10 µl Trypanblau gemischt. Dies wurde anschließend in die Zählkammer gegeben und in den *Countess Automated Cell Counter* eingesetzt. Die Zugabe von Trypanblau färbt tote Zellen an. Der Farbstoff dringt durch beschädigte Zellmembranen in das Zellinnere ein. Der Zellzähler unterscheidet anhand der Extinktions-Änderungen zwischen den toten und lebenden Zellen.

5.2 Proteinchemische Methoden

5.2.1 Protein-Isolation

Um die Proteinzusammensetzung zu ermitteln, wurden die Proteine aus den Zellen isoliert. Zur Isolation wurden die Platten auf Eis gelegt und das Medium abgenommen. Dieser Vorgang wurde nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und 20-100 µl Radioimmunpräzipitationsassaypuffer (RIPA)-Puffer (siehe Tabelle 3.2) auf die Zellen gegeben (abhängig von der Anzahl der Zellen). Die Zellen konnten mit Hilfe eines Schabers von den Platten gelöst werden. Das Zelllysat wurde daraufhin gemischt, 10 min auf Eis gelagert und anschließend erneut gemischt, wodurch die Zellmembran aufgebrochen wurde. Durch die Zentrifugation bei 18600 x g für 15 min. wurden zellulärer Trümmer von der Proteinlösung getrennt. Der Überstand mit den Proteinen wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

5.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher) durchgeführt. Zunächst wurde eine Standardreihe erstellt, bei der verschiedene bekannte Proteinkonzentrationen photometrisch vermessen wurden. Mit Hilfe dieser Messwerte ließ sich eine Referenzgerade erstellen. Mit dieser Geraden

wurde es möglich, anhand der Daten einer photometrischen Messung auf den Proteingehalt einer Probe zu schließen. Für die photometrische Messung wurden aus jeder Probe 5 µl Proteinlysate in 196,1 µl BCA Reagenz A (Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) und 3,9 µl Reagenz B (4% Kupfersulfat) gegeben und 30 min. bei 37°C inkubiert. Die photometrische Messung der Proben erfolgte anschließend mit Hilfe eines Biorad Plattenlesers, welcher die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 565 nm misst. Die Auswertung erfolgte mittels Excel.

5.2.3 Western-Blot

Der Nachweis von spezifischen Proteinen wurde mittels Western-Blot durchgeführt. Vor der Probenauftragung wurden gleiche Proteinmengen in jeder Probe durch Zugabe von H₂O eingestellt. Zusätzlich wurden 3 µl 6x Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 2) hinzugefügt. Zugabe von Bromphenolblau zum Laemmli-Puffer ermöglicht die Lokalisierung der Lauffront im Gel. Durch 5-minütige Erwärmung auf 95°C wurden die Wasserstoffbrücken gelöst. Mittels Gel-Elektrophorese wurde die Probe mit dem Proteingemisch der Größe und Ladung nach aufgetrennt. Hierfür wurden 6-15%ige SDS-Gele benutzt, wobei die größeren Proteine (70 kDa-250 kDa) in 6%-igen Gelen (siehe Tabelle 3,4) aufgetrennt wurden und die kleineren Proteine (15 kDa-70 kDa) in 17%-igen Gelen (siehe Tabelle 3,4). Es wurden zudem Gradientengele (4-15%) verwendet, um aus einer Probe besser große sowie auch kleine Proteine aufzutrennen. Die Gele wurden 15 min. bei 100 V und anschließend 45 min. bei 120 V in Laufpuffer (siehe Tabelle 2) in einer Gelkammer laufen gelassen. Durch elektrischen Transfer wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran in Transferpuffer (Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit) in einer Transferkammer (Trans-Blot® Turbo™) übertragen. Der Transfer dauerte abhängig von der Größe der Proteine 7-9 min. bei 10 mA. Die Membran wurde zugeschnitten und dreimal in TBS-T (siehe Tabelle 2) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h mit 5% BSA in TBS-T, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Blockieren wurde die Membran erneut mit TBS-T gewaschen und über Nacht bei 4°C in einem 50 ml-Reaktionsgefäß rotierend inkubiert. Dies enthielt Antikörper-Lösungen bestehend aus 1% BSA in 5 ml TBS-T und einer Verdünnung von 1:1000 des jeweiligen Antikörpers. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut zweimal mit TBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in TBS-T bei Raumtemperatur auf die Membran in einer

bewegten Schale pipettiert und 1 h inkubiert. Anschließend wurde erneut mit TBS-T gewaschen und die Membran für 30-120 s in Detektionslösung inkubiert, wobei es zu einer Chemilumineszenzreaktion mit der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP) kommt. Anschließend wurde die Membran im Detektionsgerät digital erfasst und mittels der Software ImageJ/Fiji quantifiziert (<https://fiji.sc/>).

5.2.4 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung

Um die RNA-Expression zu untersuchen, dazu wurde das *High Pure RNA Isolation Kit* verwendet und RNA aus verschiedenen Zelllinien isoliert. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten auf Eis inkubiert, das Medium abgenommen und 500 µl Trizol in jedes Well gegeben. Durch die Zugabe von Trizol wurden die Zellen lysiert und das Lysat in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation von 5 min. bei RT wurden 100 µl Chloroform zugefügt, wodurch sich zwei Phasen bildeten. Diese Phasen wurden vermischt. Nach einer Inkubation für 3 min. bei Raumtemperatur wurde 15 min. zentrifugiert (12000 x g, 4°C). Es bildeten sich drei Phasen aus. Die beiden unteren Phasen beinhalteten die Proteine bzw. die DNA. In der oberen durchsichtigen Phase befand sich die RNA. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 500 µl Isopropanol bei Raumtemperatur zugegeben. Es wurde durch Invertieren vermischt und 10 min. inkubiert. Durch eine anschließende 10-minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C wurden die ausgefällte RNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75% Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Ethanol gewaschen und daraufhin bei 7500 x g 5 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 50-100 µl DEPC -H₂O gelöst.

5.2.5 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration der RNA erfolgte durch eine photometrische Untersuchung von 1 µl einer Probe mit Hilfe eines NanoDrop® ND-1000. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Diese Absorption ist proportional zu ihrer Konzentration. Daher ist es möglich, die RNA-Konzentration durch die Messung des absorbierten Lichtes bei 260 nm zu berechnen. Zusätzlich lassen sich durch die Messung der Absorption bei 280 nm Rückschlüsse auf die

Reinheit der Nukleinsäure ziehen, da die aromatischen Aminosäurereste von Proteinen in diesem Bereich ihr Absorptionsmaximum haben.

5.2.6 komplementäre DNA (cDNA) Synthese

Um die Expressionsanalyse der RNA mittels *real-time*-PCR durchführen zu können, wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. 1 µg RNA wurde eingesetzt. Es wurde das *QuantiTect® Reverse Transkription Kit* benutzt. Zunächst wurde die restliche genomische DNA durch Inkubation mit *gDNA Wipeout Buffer* entfernt. Dazu wurde 1 µg der RNA mit 2 µl *gDNA Wipeout Buffer 7x* und *RNase-free Wasser* (12 µl – x µl RNA) eingesetzt und 2 min. bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert und die Reverse-Transkriptions-Reaktions-Komponenten wurden vorbereitet. 1 µl *Quantiscript Reverse Transcriptase*, 4 µl *Quantiscript RT Buffer 5x* und 1 µl *RT Primer Mix* wurden zum RNA-Mix zugegeben und anschließend 15 min bei 42°C inkubiert. Dann wurde die Probe für 3 min. auf 95°C erhitzt, um die *Quantiscript Reverse Transcriptase* zu inaktivieren. Anschließend wurde die cDNA Probe für eine RT-PCR benutzt oder bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

5.2.7 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Quantifizierung der individuellen *messenger RNA* (mRNA) Expressionsstärke wurde mittels einer RT-PCR ermittelt. Pro Ansatz wurden 5 µl SYBR-Green, 1 µg cDNA und jeweils 0,5 µl aus 10 µM des Vorwärts- und Rückwärts-Primers in eine 96-Well Platte pipettiert. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. Zusätzlich wurden Kontrollen ohne cDNA angesetzt. Anschließend durchliefen die Proben das folgende PCR-Programm: 15 min. auf 95°C; 40 x 15 s auf 95°C; 30 s auf 55°C; 30 s auf 72°C; 5 s auf 65°C; 0,5 s auf 95°C. Während des Durchlaufens der verschiedenen Temperaturen wird die cDNA vervielfacht, was auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht. Jedoch wird bei dieser Methode der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zwischen die Doppelstränge eingelagert. Mit Hilfe einer Fluoreszenz-Messung wird eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Stränge möglich. Aufgrund dieser Messung wird durch den Cycle Schwellenwert (Ct-Wert) die Menge der mRNA in den verschiedenen Proben miteinander verglichen. Zur Normalisierung wurde immer die Expression von zwei *Housekeeping*-Genen (β -Actin, GAPDH) gemessen. Dies sind Gene, deren Expression weitestgehend unabhängig von den äußeren Bedingungen und dem Gewebetyp sind, da sie essenziell für die Zelle sind. Durch die Normalisierung

mit der Expression der *Housekeeping*-Gene konnte die relative Menge jeder mRNA quantifiziert werden (Vandesompele et al. 2002).

5.3 Funktionelle Tests

Funktionelle Tests sind Experimente, welche die Möglichkeit bieten, einen bestimmten zellulären Phänotyp oder eine bestimmte Funktion genauer zu untersuchen und ggf. zu quantifizieren.

5.3.1 Kurzzeitüberlebens-Test MTT

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist eine Methode zur Messung der metabolischen Aktivität von Zellen, da dies stark mit der Zell-Viabilität korreliert. Es ist durch diese Messung möglich auf das Kurzzeitüberleben der Zellen zu schließen. Dazu wurden Zellen in einer 96-well Platte ausplattiert. Die Zellzahlen variierten je nach Zelllinie und Behandlung zwischen 2000-2500 Zellen/Well. Die Zellen wurden anschließend 96 h/168 h im Inkubator kultiviert und abhängig von der Fragestellung behandelt. Anschließend wurden 10 µl MTT-Lösung (6 mg/ml) zugegeben und weitere 3 h inkubiert. Die Platten wurden daraufhin bei -20°C eingefroren. Um die gebildeten Kristallstrukturen in den Zellen zu lösen, wurden 100 µl Solubilisations-Lösung in jedes Well gegeben und dies über Nacht bei 40°C bei 100 rpm (Excella E24 Incubator Shaker Series) geschüttelt. Nach 24 h wurden im Plattenleser (Biorad) die Absorption bei einer Wellenlänge von 565 nm gemessen und zusätzlich eine Referenz Wellenlänge von 650 nm bei einer Mixgeschwindigkeit von 5 m/s.

5.3.2 Koloniebildungs-Test

Mit dem Koloniebildungs-Test wird das Langzeitüberleben von Zellen bzw. die Fähigkeit nach Behandlung zu proliferieren und Kolonien auszubilden untersucht (Franken et al. 2006). Dazu werden 100-3000 Zellen pro 6-Well Platte ausgesät. Die ausplattierte Zellzahl wurde der entsprechenden Dosis und der Zelllinie angepasst. Bei der Auswertung wird die Anzahl der Kolonien auf die Anzahl der ausgesäten Zellen normalisiert. 24 h nach der Aussaat wurden die Zellen je nach Fragestellung behandelt und nach 48 h mit verschiedenen Gy Dosen von 0 bis 10 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für weitere 10-14 Tage im Inkubator kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen für 1 h mit 70%

Ethanol fixiert und anschließend mit Crystalviolett gefärbt. Die Kolonien wurden gezählt und anschließend wurde die *Plating efficiency* (PE) sowie die *Surviving fraction* (SF) nachfolgender Formeln bestimmt.

$$PE = \frac{\text{Anzahl gebildeter Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen}} \times 100\%$$

$$SF = \frac{PE \text{ der behandelten Probe}}{PE \text{ der Kontrolle}} \times 100\%$$

5.3.3 Messung des mitotischen Index (Gatta et al.)

Durch den mitotischen Index werden die Zellen beschrieben, welche sich während der Fixierung der Zellen in der Mitose befinden. Dies ist möglich durch die Färbung des phosphorylierten Histon H3 Proteins und einer Propidium Iodid (PI) Färbung. Das Histon H3 Protein ist eins der vier DNA-gebundenen Kernhistone und ist ein hochkonserviertes Protein. Die Mitose führt zu einer Phosphorylierung am Serin 10 des Histons H3 (H3pS10), wodurch es möglich ist, Zellen in der Mitose zu visualisieren. Eine zusätzliche PI Färbung ermöglicht einen Abgleich mit dem Zell-Zyklus anhand der Messung des DNA-Gehalts. Diese Ko-Färbung erlaubt am FACS eine Einschätzung, wie viele Zellen während der Fixierung in der M-Phase waren.

Die Zellen wurden während dieses Versuchs in T-25 Flaschen ohne Filter ausgesät. Die Zellzahl variierte je nach Zelllinie zwischen 150000-300000 Zellen per Flasche. Nach 24 h Inkubation mit geöffneten Deckeln wurden die Flaschen geschlossen und in den Warm-Raum (37°C) transportiert. Dort findet der Versuch bis zum ersten Zentrifugationsschritt statt, um Temperaturschwankungen zu verringern. 48 h nach dem Ausplattieren wurden die Zellen mit Tetracyclin (1 µg/ml) und humanem NGF (100 ng/ml) behandelt (siehe 3.10.1). Nach 24 h werden die Zellen mit verschiedenen Strahlungsdosen (0, 1, oder 4 Gy) auf einer Wärmeplatte bestrahlt. Das Einsammeln der Zellen erfolgte nach 0, 1, 3 und 5 h nach der Bestrahlung. Das Medium wurde nun abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Nachdem das PBS abgenommen wurde, wurden die Zellen trypsiniert. Die Reaktion ist nach 5 min. durch die Zugabe von Medium mit FCS abgestoppt worden und die Zellsuspension konnte in 15 ml Reaktionsröhrchen überführt werden. Diese werden anschließend zentrifugiert (300 x g, 4°C, 5 min.). Das Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden mit 70% EtOH in PBS bei gleichmäßigem Schütteln versetzt. Die Zellsuspension wird über Nacht bei -20°C fixiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (300 x g, 4°C, 10min.) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde gevortext und

währenddessen in 0,25% Triton in PBS (PBS-T) Lösung gelöst und auf Eis 5 min. inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension erneut zentrifugiert (300 x g, 4°C, 5 min.) und der Überstand erneut abgenommen. Hierauf wurden die Zellen durch vorsichtiges hoch- und runter- pipettieren in der Blockier-Lösung gelöst. 30-60 min. wurden die Proben auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Der darauffolgende Zentrifugationsschritt erfolgte ebenfalls bei 300 x g bei 4°C für 5 min. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde in 100 µl der ersten Antikörperlösung (H3pS10 1:5000 in PBS-T) gelöst. Erneute Inkubation für 1,5 h bei RT. Durch die anschließende Zugabe von 1 ml PBS und die Zentrifugation (300 x g, 4°C, 5 min.) wurden die Zellen gewaschen. Die Zellen wurden anschließend 1 h bei RT im Dunklen in 100 µl der zweiten Antikörperlösung (AlexaFluor 488 1:300 in PBS-T) inkubiert. Die Zellen wurden erneut durch Zugabe von 1 ml PBS und anschließender Zentrifugation (300 x g, 4°C, 5 min.) gewaschen. Zu guter Letzt wurden die Zellen in 400 µl PI (4 µg/ml) und RNase (0,62 µg/ml) Lösung in PBS-T resuspendiert. Die Messung erfolgte innerhalb der nächsten zwei Tage mit Hilfe eines Durchflusszytometers (Gallios, Beckman Coulter).

5.3.4 RNA-Interferenz durch siRNA

Die Behandlung mit si-RNAs ermöglicht das Level eines Proteins in der Zelle zu reduzieren. Dies ist möglich, da eine genspezifische si-RNA an die mRNA bindet, wodurch diese nicht translatiert werden kann. Um den Einfluss einer si-RNA auf die Zellproliferation mittels MTT zu testen, wurden 2000 Zellen pro 96-well ausplattiert und 24 h inkubiert. Anschließend wurde der si-RNA Transfektions-Mix aus 25 µl OptiMEM, 1 µl TransIT-TKO und 0,2 µl (10 nM) der verschiedenen si-RNAs pro Well angesetzt. Dieser wurde für 15 min. bei RT inkubiert. Die Zellen wurden für 24 h mit dem Transfektions-Mix behandelt und anschließend wurden die Zellen abhängig von der Fragestellung behandelt und/oder bestrahlt. Nach insgesamt 168 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 3 h mit 10 µl MTT-Lösung im Inkubator behandelt. Die Platten wurden daraufhin bei -20°C eingefroren. Um die sich gebildeten Kristallstrukturen in den Zellen zu lösen wurden 100 µl Solubilisations-Lösung in jedes Well gegeben und dies über Nacht bei 40°C bei 100 rpm (Excella E24 Incubator Shaker Series) geschüttelt. Nach 24 h wurden im Plattenleser (Biorad) die Absorption durch die Wellenlänge von 565 nm gemessen und zusätzlich eine Referenz Wellenlänge von 650 nm bei einer Mixgeschwindigkeit von 5 m/s.

Zielsetzung der Arbeit

Untersuchungen an Patientenproben belegen, dass TrkA-Überexpression in Neuroblastomen mit einer guten Prognose korreliert, wohingegen TrkB-Überexpression mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht wird. Dr. Ines Rudolf und Vivian Boron konnten im Rahmen ihrer Promotion bzw. Bachelorarbeit zeigen, dass TrkA in den Zellzyklus Checkpoint nach Bestrahlung involviert ist. Zellen mit stabiler TrkA-Überexpression wiesen nach NGF-Behandlung einen höheren mitotischen Index auf als Zellen ohne Aktivierung. Dies wurde auf einen inaktivierten G2/M-Kontrollpunkt zurückgeführt. Die Inhibierung der G2/M-Kontrollpunkt Proteine führte zum gleichen Effekt auf den mitotischen Index wie TrkA-Aktivierung, woraus sich schließen ließ, dass TrkA-Aktivierung nach der Bestrahlung in diesen Signalweg involviert ist. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von TrkA- und TrkB-Überexpression auf Neuroblastom Zelllinien (SY5Y, Kelly) unter Bestrahlung zu erforschen. Zum einen sollte die Arbeit von Dr. Ines Rudolf und Vivian Boron fortgesetzt werden. Ein besonderes Augenmerk sollte auf die Fragestellungen gelegt werden, welchen Einfluss TrkA auf den G2/M-Kontrollpunkt hat und welche Signalwege involviert sind. Zum anderen sollte ein Anhaltspunkt für eine gerichtete Therapie für TrkB überexprimierende NB gefunden werden. In diesem Fall sollte besonders der Einfluss von TrkB auf die Strahlenresistenz untersucht werden.

Ergebnisse

6 Auswirkungen der TrkA-Überexpression in Neuroblastom-Modellen

6.1 Charakterisierung TrkA überexprimierender Neuroblastomzellen

Um die potenziellen Auswirkungen von TrkA-Überexpression in vitro zu untersuchen, wurden verschiedene Zellmodelle etabliert. Zum einen wurde die SY5Y-Zelllinie verwendet, bei der es sich um eine genetisch identische Sublinie der SK-N-SH-Zelllinie handelt. Diese wurde aus dem Knochenmark einer vierjährigen weiblichen Neuroblastom-Patientin etabliert. Als zweite Zelllinie wurden Kelly-Zellen eingesetzt, eine humane Neuroblastom-Zelllinie, die eine N-MYC Gen Amplifikation aufweist. Als drittes wurde die SKNAS-Zelllinie verwendet, welche aus einer sechsjährigen weiblichen Neuroblastom-Patientin aus dem Knochenmark-Metastase entnommen und etabliert wurde. Alle Zelllinien wurden mit zwei Vektoren transfiziert, wodurch sie entweder eine TET induzierte Expression eines Leervektors (-TR) oder eine durch TET induzierte TrkA-Expression (-TRA) aufweisen (siehe 3.10.1).

Zuerst wurde das mRNA-Level von TRKA in den Zelllinien überprüft, um sicherzustellen, dass die Zellen die Tetracyclin induzierte Expression von TrkA aufweisen. Dies wurde durch die Isolation von mRNA nach 24 h Behandlung mit TET (2,25 μM) und NGF (3,7 μM) durch RT-PCR nachgewiesen.

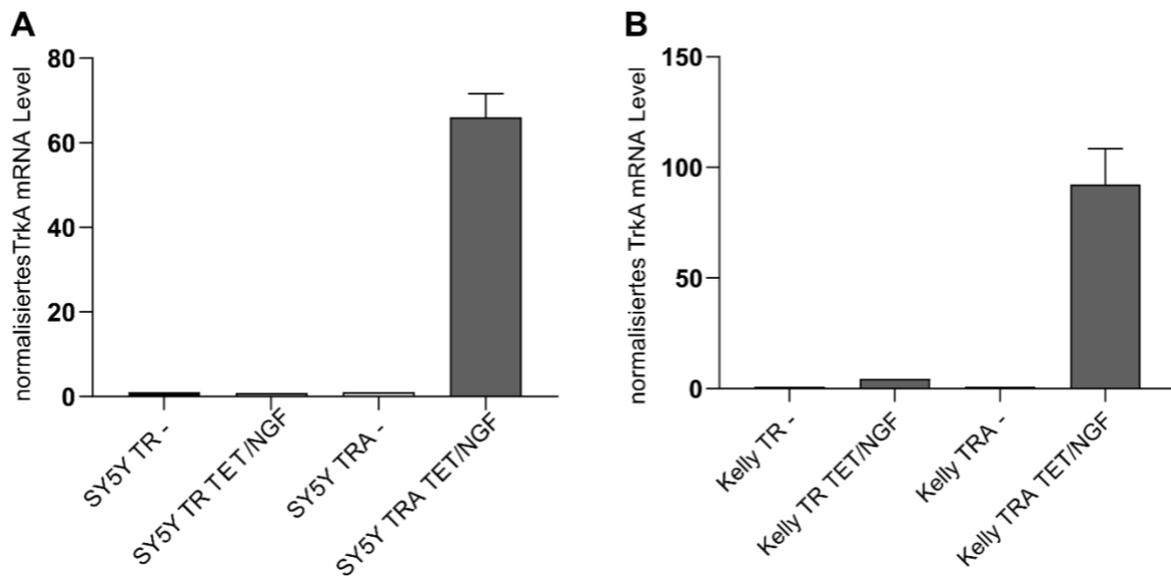


Abbildung 6: mRNA-Level von TRKA mit oder ohne 24 h Behandlung mit TET/NGF im SY5Y- und Kelly-Zellmodell

Das relative TRKA mRNA-Level wurde durch RT-PCR in (A) SY5Y-Zellen und in (B) Kelly-Zellen gemessen. Die Zellen wurden entweder 24 h mit TET und NGF behandelt oder erhielten keine Behandlung (-). Anschließend wurde die mRNA isoliert. Für die SY5Y-Zellen wurden drei Experimente und für die Kelly-Zellen zwei Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M) und NGF (3,709 μ M).

Es konnte nachgewiesen werden, dass beide TRA Zelllinien eine durch TET induzierte Expression von TRKA aufweisen. Diese ist um 60-fach in den TRA SY5Y-Zellen (Abb. 6A) und um 75-fach in den TRA Kelly-Zellen höher im Vergleich zu den TR Kontroll-Zellen (Abb. 6B).

Im nächsten Schritt wurden die Protein-Expression sowie die Aktivierung von TrkA mittels Western Blot Analyse überprüft. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit TET (2,25 μ M) und NGF (3,7 μ M) behandelt und die Protein-Expression sowie die Phosphorylierung von TrkA anhand der Western-Blot-Signale gemessen.

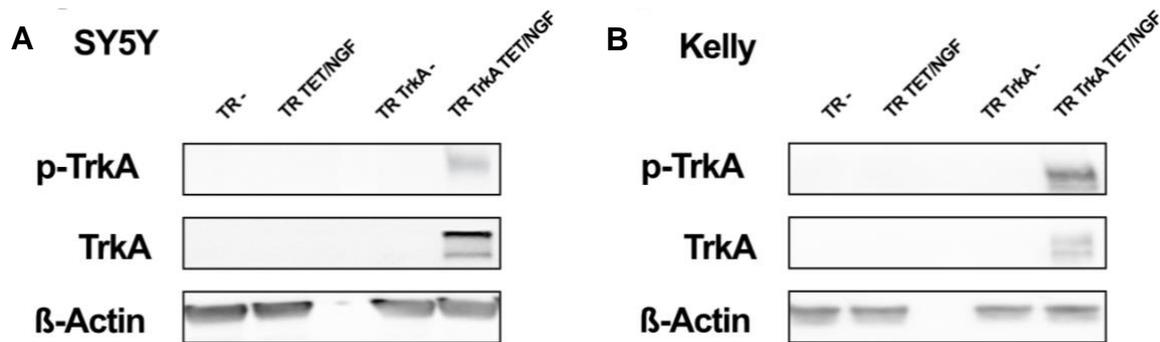


Abbildung 7: TrkA und p-TrkA Protein-Expression nach Behandlung mit oder ohne TET/NGF für 24 h im SY5Y- und Kelly-Zellmodell

Die Protein-Expression von TrkA und p-TrkA wurde durch Western-Blot Analyse in den Zellmodellen (A) SY5Y und (B) Kelly nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen entweder 24 h mit TET und NGF behandelt oder erhielten keine Behandlung (-). Für die SY5Y-Zellen wurden aus zehn Experimenten und für die Kelly-Zellen aus fünf Experimenten ein repräsentativer Western-Blot ausgewählt. β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M) und NGF (3,709 μ M).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen in der Kombinationsbehandlung mit TET/NGF sowohl -Expression als auch TrkA-Aktivierung aufweisen. Die Kontroll-Zellen hingegen hatten kein nachweisbares TrkA oder p-TrkA nach 24 h Behandlung mit TET und NGF (Abb. 7). Somit konnten gezeigt werden, dass in diesen Zellen unter kontrollierten Bedingungen TrkA-Überexpression und Aktivierung getrennt voneinander untersucht werden können.

6.2 Auswirkungen von TrkA-Überexpression auf den Zellzyklus unter Bestrahlung

In vorausgehenden Studien konnte Dr. Ines Rudolf in TrkA-exprimierenden und aktivierten SY5Y-Zellen einen erhöhten MI nach der Bestrahlung mit 1 Gy nachweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine defekter G2/M-Kontrollpunkt, an dem die Zellen normalerweise arretieren, um z.B. Strahlenbedingte DNA-Schäden zu reparieren. Diese Hypothese wurde zunächst im SY5Y-Zellmodell mit induzierbarer TrkA-Expression überprüft. Anschließend wurde untersucht, ob dieser Phänotyp ebenfalls in anderen Neuroblastom-Zelllinien nachgewiesen werden konnte. In diesem Zusammenhang wurde der MI der SY5Y-Zellen und der Kelly-Zellen nach Bestrahlung mit 0 oder 1 Gy mit und ohne Aktivierung von TrkA untersucht.

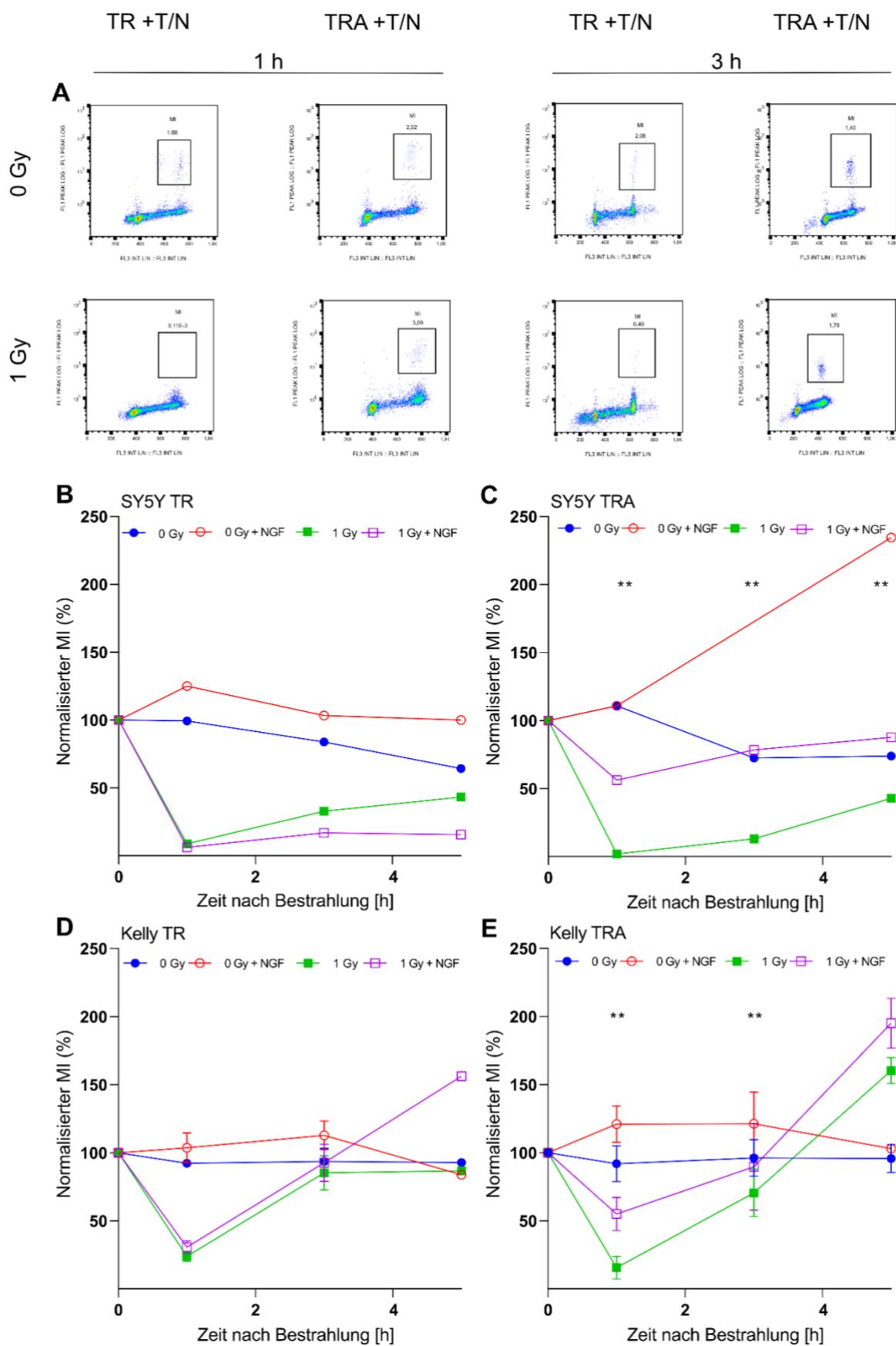


Abbildung 8: Mitotischer Index der SY5Y und Kelly-Zellen nach Bestrahlung mit 0 und 1 Gy

Die Messung des mitotischen Index des SY5Y und Kelly-Zellmodells nach 0 h, 1 h, 3 h und 5 h nach Bestrahlung mit 0 oder 1 Gy wurde durch die H3pS10-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor 24 h mit TET/NGF behandelt oder unbehandelt belassen (-). (A) Repräsentative FACS Analysen der H3pS10-positiven Zellen von SY5Y TR- und TRA-Zellen nach 1 h und 3 h, ohne und mit 1 Gy Bestrahlung. (B) MI der SY5Y TR nach der Bestrahlung mit 0 oder 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Behandlung. (C) MI der SY5Y TRA nach der Bestrahlung mit 0 oder 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Behandlung. (D) MI der Kelly TR nach der Bestrahlung mit 0 oder 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Behandlung. (E) MI der Kelly TR nach der Bestrahlung mit 0 oder 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Behandlung. Für die SY5Y-Zellen wurde ein Experiment und für die Kelly-Zellen vier Experimente zusammengefasst. Normalisiert wurde auf 0 h /0 Gy. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M) und NGF (3,709 μ M). Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (** $p < 0.01$).

Der erhöhte mitotische Index in NGF-aktivierten SY5Y TRA Zellen konnte reproduziert werden (Abb. 8C), ebenso wie der geringe MI in den SY5Y-Zellen ohne TrkA-Expression oder ohne Aktivierung (Abb. 8B). Zudem war es möglich, einen ebenfalls signifikant erhöhten MI in den aktivierten Kelly TRA Zellen 1 h und 3 h nach Bestrahlung zu messen im Vergleich zu den Kelly TRA Zellen ohne Aktivierung (Abb. 8E). Dieser erhöhte MI konnte zudem nicht in Kelly TR Zellen mit und ohne Behandlung mit TET/NGF festgestellt werden (Abb. 8D).

Grundsätzlich wiesen die Kelly-Zellen jedoch eine deutlich schnellere Erholungszeit auf als das SY5Y-Modell, welches in dem erhöhten MI nach 5 h nach Bestrahlung deutlich sichtbar war. Außerdem war der Unterschied zwischen den Kelly TRA aktiviert und inaktiviert etwas geringer im Vergleich zu den TRA SY5Y-Zellen (Abb 8E).

Um sicherzustellen, dass die TrkA-Expression und Aktivierung den erhöhten MI nach der Bestrahlung auslöst, wurden die zwei Zellmodelle mit dem Trk-Inhibitor LOXO 101 für eine Stunde behandelt, anschließend mit 1 Gy bestrahlt und der MI gemessen. Um jedoch sicher zu gehen, dass LOXO 101 in den verwendeten Mengen die TrkA-Aktivierung unterbindet, wurde zunächst das TrkA-Proteinlevel und die TrkA-Phosphorylierung durch einen Western-Blot nachgewiesen.

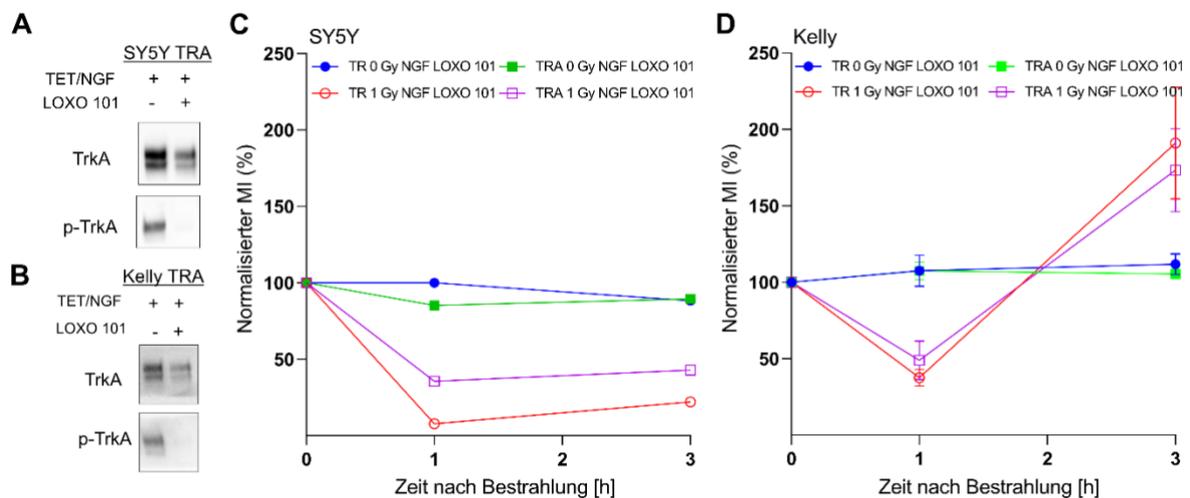


Abbildung 9: Wester Blot Analyse der SY5Y- und Kelly-Zellen nach einstündiger Behandlung mit LOXO 101 und Mitotischer Index nach Bestrahlung mit 0 und 1 Gy und einstündiger Behandlung mit LOXO 101

Die Messung des mitotischen Index des SY5Y und Kelly-Zellmodells nach 0 h, 1 h und 3 h nach Bestrahlung mit 0 oder 1 Gy wurde durch die H3pS10-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor 24 h mit TET/NGF behandelt oder unbehandelt belassen (-). Zudem wurden alle Zellen 1 h mit dem Trk-Inhibitor LOXO 101 behandelt. (A) Repräsentative Protein Analyse von TrkA und p-TrkA in SY5Y-Zellen mit TET/NGF Aktivierung und ohne und mit LOXO 101 Behandlung für 1 h. (B) Repräsentative Protein Analyse von TrkA und p-TrkA in Kelly-Zellen mit TET/NGF Aktivierung und ohne und mit LOXO 101 Behandlung für 1 h. (C) MI des SY5Y Zellmodells nach der Bestrahlung mit 0 oder 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung mit LOXO 101 Behandlung. (D) MI des Kelly-Zellmodells nach der Bestrahlung mit 0 oder 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung mit LOXO 101 Behandlung. Für die SY5Y-Zellen wurde ein Experiment und für die Kelly-Zellen drei Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M), NGF (3,709 μ M) und LOXO 101 (2,33 μ M). β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni’s multiple comparisons test“ durchgeführt (n.s.).

Es konnte gezeigt werden, dass Behandlung mit LOXO 101 zu einer verringerten TrkA-Expression und auch zu einem Verlust der TrkA-Aktivierung in den SY5Y TRA und Kelly TRA Zellen führt (Abb. 9A, B). Die anschließende Messung des MI der Zellen, die 1 h vor der Bestrahlung mit LOXO 101 behandelt wurden, konnte bestätigen, dass die Inhibition der TrkA-Aktivierung zu einer deutlichen Verringerung des mitotischen Index in den aktivierten SY5Y TRA und Kelly TRA Zellen im Vergleich zu nicht inhibierten, aber NGF-aktivierten TRA Zellen führt (Abb. 9C, D). Der MI in den LOXO 101 behandelten SY5Y TRA sank um die Hälfte im Vergleich zu den NGF-aktivierten

SY5Y TRA Zellen (Abb. 9C). Im Kelly-Modell lag der MI der inhibierten TRA Zellen fast bei dem der inhibierten TR Zellen nach Bestrahlung (Abb. 9D).

Auf Grund der bisherigen Daten stellte sich die Frage, ob bei höheren Bestrahlungsdosen der gleiche Effekt gemessen werden könnte. Deswegen wurden die Zellen mit Dosen zwischen 0 und 4 Gy bestrahlt und 1 h nach der Bestrahlung der MI gemessen.

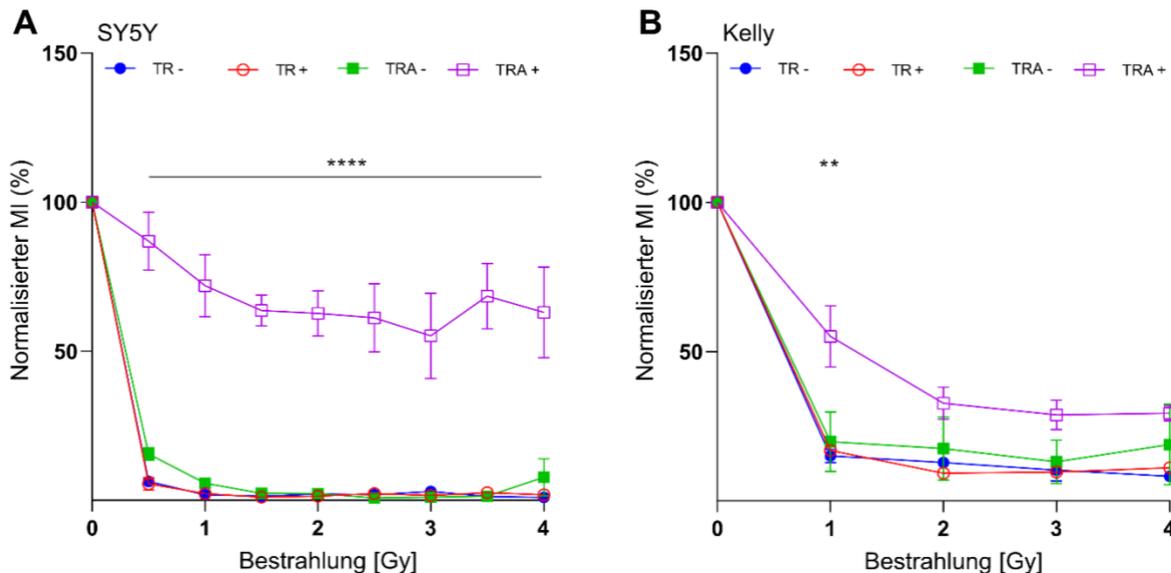


Abbildung 10: Mitotischer Index der SY5Y- und Kelly-Zellen nach Bestrahlung mit 0 bis 4 Gy

Die Messung des mitotischen Index des SY5Y- und Kelly-Zellmodells nach 1 h nach Bestrahlung mit 0 bis 4 Gy wurde durch die H3pS10-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor 24 h mit TET/NGF behandelt oder unbehandelt belassen. (A) MI des SY5Y-Zellmodells nach der Bestrahlung mit 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 und 4 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung. (D) MI des Kelly-Zellmodells nach der Bestrahlung mit 0, 1, 2, 3, und 4 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung. Für die SY5Y-Zellen wurden drei Experimente und für die Kelly-Zellen auch drei Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M) und NGF (3,709 μ M). Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (** $p < 0.01$, **** $p < 0,0001$).

Die Analyse des mitotischen Indexes 1 h nach Bestrahlung mit 0 bis 4 Gy konnte zeigen, dass der erhöhte MI in TrkA-aktivierten Zellen auch bei höheren Strahlendosen nachzuweisen ist. In den aktivierten SY5Y TRA Zellen konnte in den Dosen 0,5 - 4 Gy im Vergleich zu den Kontroll-Zellen ein signifikant höherer MI gemessen werden (Abb. 10A). In aktivierten Kelly TRA Zellen konnte bei 1 Gy ein signifikant höherer MI

gemessen werden, bei höheren Dosen stagnierte der MI um 30%, lag aber immer noch deutlich höher als der MI der Kontroll-Zellen, welcher um 12% lag (Abb. 10B).

6.3 Einfluss von TrkA-Überexpression auf das Überleben unter Bestrahlung

Basierend auf diesen Resultaten stellte sich die Frage, ob die Zellen durch diesen erhöhten MI einen Wachstumsvorteil gegenüber den Kontroll-Zellen erreichen konnten. Um dies zu untersuchen, wurde der Metabolismus der Zellen 96 h nach Bestrahlung im SY5Y- und Kelly-Modell durch einen MTT-Test analysiert. An Hand dessen können Veränderungen in der Zellvitalität und demnach dem Kurzzeitüberleben abgeleitet werden.

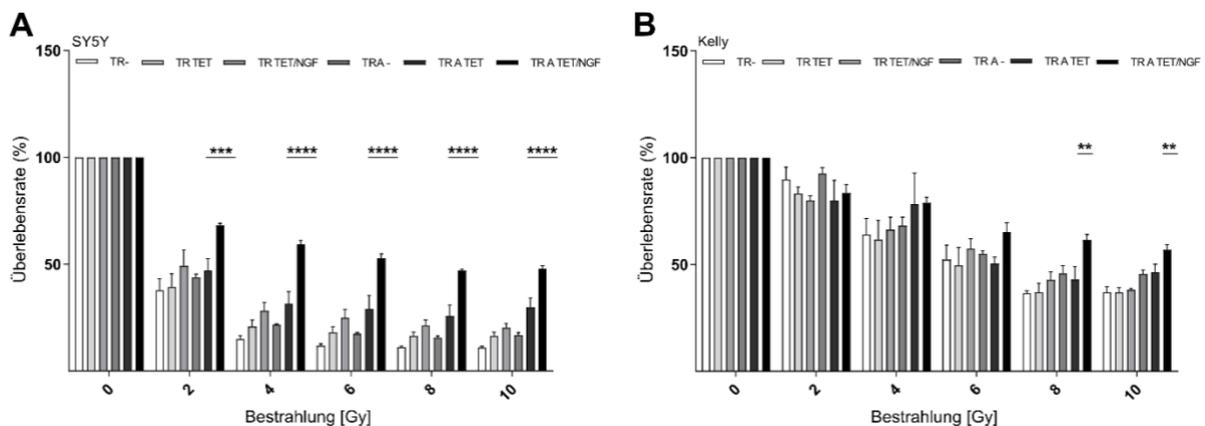


Abbildung 11: Kurzzeitüberleben der SY5Y- und Kelly-Zellen nach Bestrahlung mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy

Das Kurzzeitüberleben wurde durch MTT-Tests gemessen. Die SY5Y- und Kelly-Zellen wurden 24 h vorher mit TET oder TET/NGF behandelt oder unbehandelt belassen, anschließend bestrahlt und nach 96 h mit MTT-Lösung für 3 h behandelt. (A) Überlebensrate der SY5Y-Zellen (B) Überlebensrate der Kelly-Zellen. Für die SY5Y-Zellen wurden drei Experimente und für die Kelly-Zellen ebenfalls drei Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M) und NGF (3,709 μ M). Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (** $p < 0,0$, **** $p < 0,0001$).

Es konnte festgestellt werden, dass im SY5Y Zellmodell, sowie auch im Kelly-Zellmodell TrkA-aktivierte Zellen ein signifikant erhöhtes Kurzzeitüberleben aufweisen. In den aktivierten Kelly TRA-Zellen stieg die Überlebensrate um 10-15% in den höheren Dosen im Vergleich zu den Kelly TR Zellen, welche mit TET und NGF

behandelt wurden (Abb. 11B). In den aktivierten SY5Y TRA Zellen konnte sogar eine um 20% höhere Überlebensrate nachgewiesen werden. Dies bestätigt, dass der erhöhte MI in den TrkA aktivierten Zellen einen direkten Einfluss auf das Überleben der Zellen nach der Bestrahlung hat (Abb. 11A).

Um nachzuvollziehen, ob die erhöhte Zahl an mitotischen Zellen nach der Bestrahlung ebenfalls einen Einfluss auf das Langzeitüberleben hat, wurden Koloniebildungs-Tests durchgeführt. Die Zellen wurden wiederum 24 h vor der Bestrahlung mit TET und NGF behandelt. Die Zellen wurden wiederum 24 h vor der Bestrahlung mit TET und NGF behandelt.

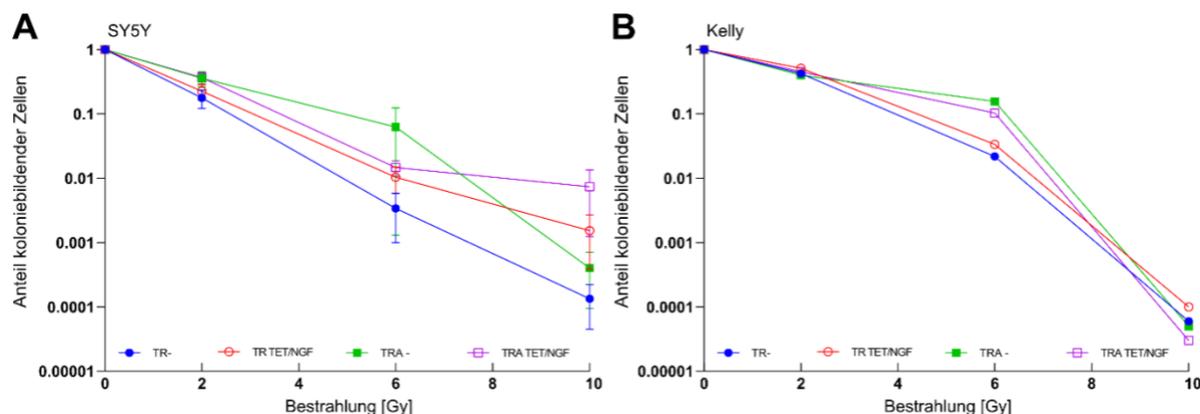


Abbildung 12: Langzeitüberleben der SY5Y- und Kelly-Zellen nach Bestrahlung mit 0, 2, 6 und 10 Gy

Das Langzeitüberleben wurde durch Koloniebildungs-Tests gemessen. Die SY5Y- und Kelly-Zellen wurden 24 h mit TET/NGF behandelt oder unbehandelt belassen, anschließend mit 0, 2, 6 und 10 Gy bestrahlt und nach zwei Wochen die Kolonien gezählt. Es wurden drei Experimente für die SY5Y Zelllinie zusammengefasst und ein Experiment für die Kelly Zelllinie. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M) und NGF (3,709 μ M). Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (n.s.).

Beim Langzeitüberleben konnte keine signifikant höhere Anzahl an Kolonien nachgewiesen werden. Die aktivierten SY5Y TRA Zellen zeigten ein etwas höheres Überleben nach Bestrahlung mit 10 Gy, jedoch unterschied sich bei 2 und 6 Gy Bestrahlung die Anzahl der Kolonien nicht von der aktivierten Kontroll-Zelllinie TR. Die nicht aktivierten SY5Y TRA Zellen hatten ebenfalls mehr Kolonien nach Bestrahlung mit 6 Gy, aber nach 10 Gy Bestrahlung fiel dieser Wert deutlich ab (Abb. 12A). Zudem konnte in den vorläufigen Ergebnissen des Kelly-Zellmodell kein signifikanter Unterschied gemessen werden (n=1). Nach der Bestrahlung mit 6 Gy, nicht jedoch mit 10 Gy, weisen die Kelly TRA Zellen eine leicht erhöhte Anzahl an Kolonien auf im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (Abb. 12B). Allgemein kann kein signifikanter

Unterschied zwischen den Kontroll-Zellen und den TrkA-exprimierenden Zellen für das Überleben nach unter Bestrahlung festgestellt werden.

6.4 Untersuchung der für den G2/M Checkpoint relevanten Signalwege unter Bestrahlung

Basierend auf den bisherigen Resultaten stellte sich die Frage, welche Signalwege involviert sein können. Zuerst wurden Signalwege in Betracht gezogen, welche durch ihre Aktivierung zum G2-Arrest führen. Einer dieser Signalwege ist der ATR/ATM DNA-Schaden-Signalweg, welcher durch Schäden in der DNA durch Bestrahlung aktiviert wird. Eine Beteiligung dieses Signalwegs wurde bereits durch Ergebnisse einer Bachelorarbeit (Vivian Boron, 2016) nahegelegt. Hier wiesen SY5Y Kontroll-Zellen nach ATM- oder ATR-Inhibition einen ebenso erhöhten MI auf wie aktivierte SY5Y TRA nach Bestrahlung mit 1 Gy. Diese Ergebnisse wurden zunächst wiederholt, um sie zu verifizieren. Anschließend wurde dieser Versuch ebenfalls im Kelly-Modell durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden der MI der aktivierten und nicht-aktivierten SY5Y- und Kelly-Zellen nach Bestrahlung mit 0 oder 1 Gy und mit einstündiger Behandlung mit dem ATM-Inhibitor (ATMi) oder dem ATR-Inhibitor (ATRi) untersucht und mit den Werten der nicht inhibierten Zellen verglichen.

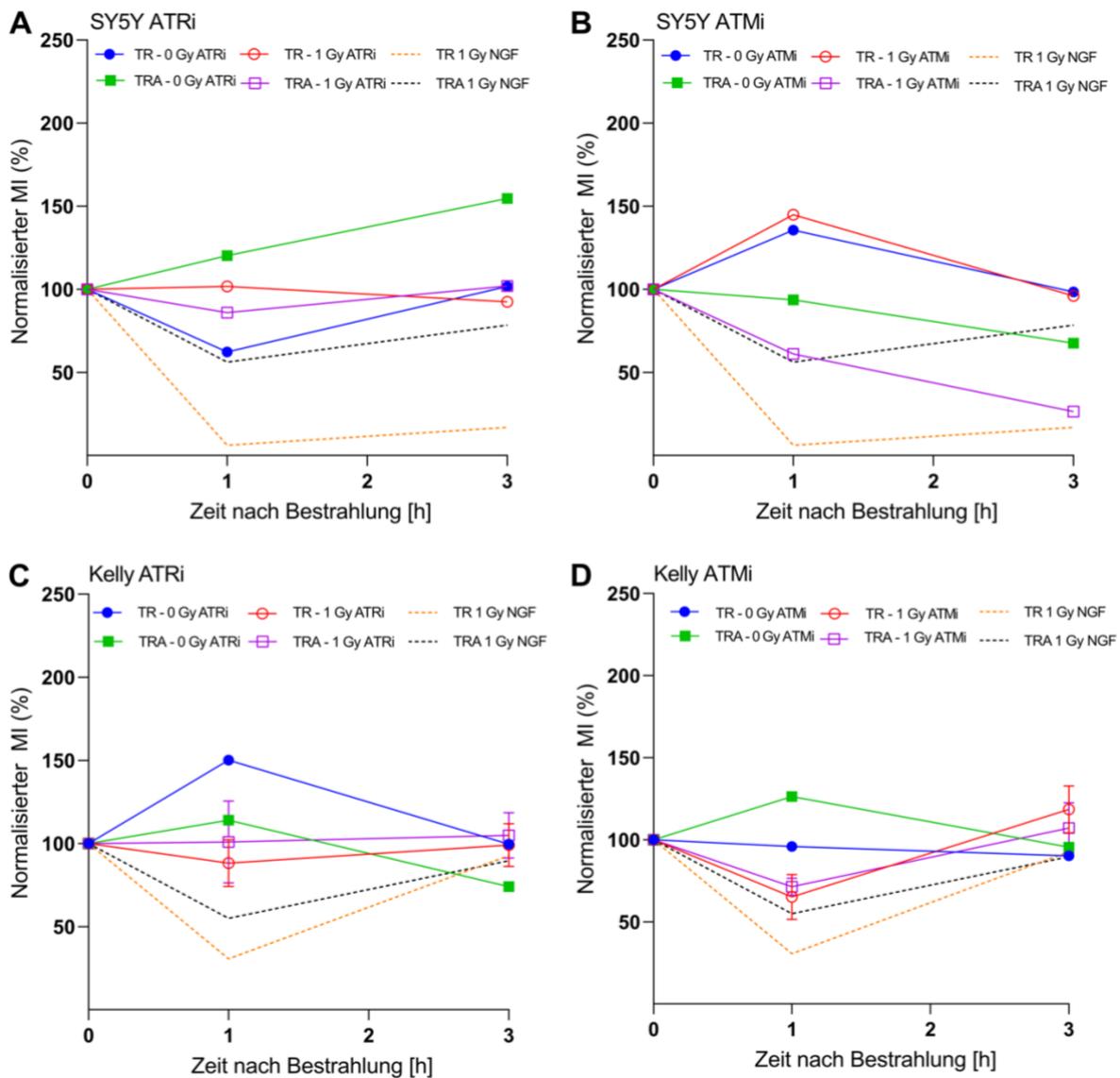


Abbildung 13: Mitotischer Index der SY5Y- und Kelly-Zellen nach Bestrahlung mit 0 und 1 Gy und einstündiger Behandlung mit ATMi und ATRi

Die Messung des mitotischen Index des SY5Y- und Kelly-Zellmodells nach 1 h nach Bestrahlung mit 0 und 1 Gy wurde durch die H3pS10-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor 24 h mit TET/NGF behandelt oder unbehandelt gelassen. Zudem wurden sie entweder mit ATMi (KU55933) oder ATRi (VE-821) für eine Stunde behandelt. Als Kontrolle wurden die Daten ohne ATMi und ATRi Inhibition verwendet (schwarz und gelbe Linien). (A) MI des SY5Y Zellmodells nach der Bestrahlung mit 0 und 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung und mit einstündiger ATRi Behandlung. (B) MI des SY5Y-Zellmodells nach der Bestrahlung mit 0 und 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung und mit einstündiger ATMi Behandlung. (C) MI des Kelly-Zellmodells nach der Bestrahlung mit 0 und 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung und einstündiger ATRi Behandlung. (D) MI des Kelly-Zellmodells nach der Bestrahlung mit 0 und 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung und einstündiger ATMi Behandlung. Für die SY5Y-Zellen wurde ein Experiment und für die Kelly-Zellen drei Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M), NGF (3,709 μ M), ATRi (5 μ M) und ATMi (10 μ M). Die statistische

Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (n.s.).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition von ATR oder ATM zu einem erhöhten MI nach Bestrahlung führt. SY5Y und Kelly-Zellen, welche mit ATRi behandelt und anschließend bestrahlt wurden, zeigten einen MI, der mit den unbestrahlten Kontrollen vergleichbar war (Abb. 13A, C). ATMi behandelte SY5Y TR Zellen wiesen sogar einen deutlichen Anstieg des MI unabhängig von der Bestrahlung auf. SY5Y TRA Zellen zeigten eine abfallende Tendenz trotz der Behandlung mit ATMi (Abb. 13B). In den ATMi behandelten Kelly-Zellen wurden in den bestrahlten Proben TR und TRA eine leichte Reduktion des MI nach 1 h und eine Erholung nach 3 h gemessen (Abb. 13D).

Dieses Ergebnis führte zu der Frage, welchen Einfluss eine ATR- oder ATM-Mutation nach ektopter TrkA-Expression auf Zellzyklus und Checkpoint-Induktion hat.

6.5 Einfluss von Mutationen im ATR/ATM-Signalweg auf den Zellzyklus Phänotyp

Um zu analysieren, ob der ATR/ATM-Signalweg in den TrkA-vermittelten Effekt auf Zellzyklus-Kontrolle hat, wurde der mitotische Index der SKNAS-Zelllinie gemessen, in der zuvor TrkA konditional induzierbar exprimiert wurde. Diese Zelllinie weist eine heterozygote Mutation im ATR Gen auf. Die Zellen wurden, wie in den Versuchen zuvor, 24 h mit TET und NGF behandelt und anschließend mit 0, 1 oder 4 Gy bestrahlt und nach 0 h, 1 h und 3 h analysiert.

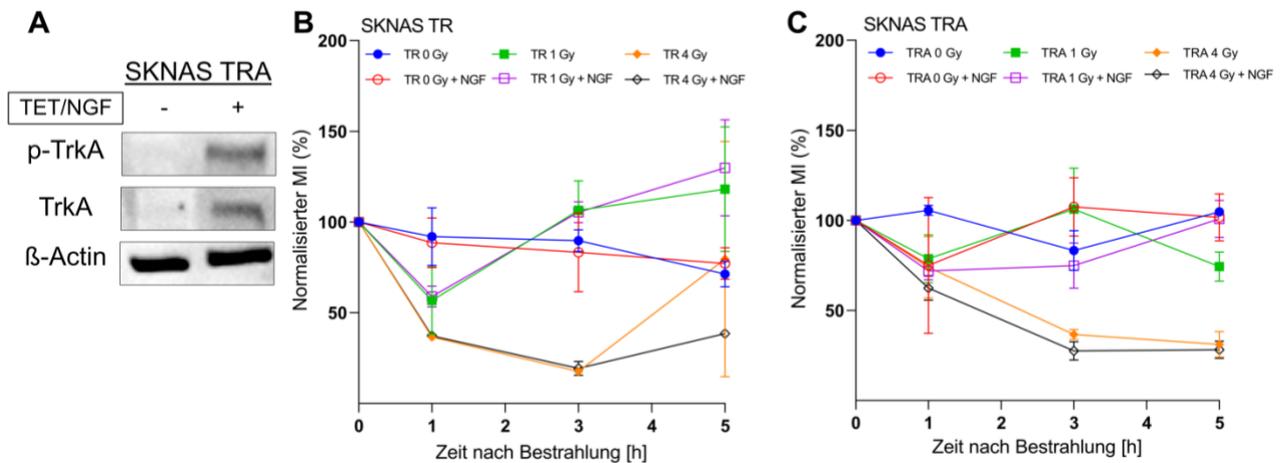


Abbildung 14: Western Blot Analyse der TrkA-Expression und Aktivierung und Mitotischer Index des SKNAS-Zellmodelle nach Bestrahlung mit 0, 1 und 4 Gy

Die Messung des mitotischen Index des SKNAS-Zellmodells nach 0 h, 1 h, 3 h und 5 h nach Bestrahlung mit 0, 1 und 4 Gy wurde durch die H3pS10-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor 24 h mit TET/NGF behandelt oder unbehandelt belassen. (A) Repräsentative Protein-Analyse von TrkA und p-TrkA in SKNAS TRA Zellen mit bzw. ohne TET/NGF Aktivierung. (B) MI der SKNAS TR Zellen nach der Bestrahlung mit 0, 1 und 4 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung. (C) MI der SKNAS TRA Zellen nach der Bestrahlung mit 0, 1 und 4 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung. Für die SKNAS-Zellen wurden vier Experimente zusammengefasst und aus drei Experimenten wurde ein repräsentativer Western Blot ausgewählt. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M) und NGF (3,709 μ M). β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (n.s.).

Es konnte nachgewiesen werden, dass SKNAS TRA Zellen durch die Behandlung mit TET/NGF TrkA exprimieren und TrkA aktiviert wird (Abb. 14A). Zudem konnte kein signifikanter Unterschied in den Zellen mit TrkA-Expression und Aktivierung und den Zellen ohne TrkA-Aktivierung oder ohne TrkA-Expression im SKNAS-Zellmodell in Bezug auf den MI unter Bestrahlung gezeigt werden (Abb. 14C). Die Zellen ohne TET/NGF Behandlung hatten einen etwas höheren MI im Vergleich zu den behandelten Zellen (Abb. 14B). Es war jedoch auch in diesem Zusammenhang interessant zu sehen, ob die Inhibition von ATM oder ATR trotzdem zu einem erhöhten MI nach Bestrahlung führt. Daher wurden die Zellen ebenfalls 1 h vor der Bestrahlung mit ATRi und ATMi behandelt und nach 0 h, 1 h und 3 h analysiert.

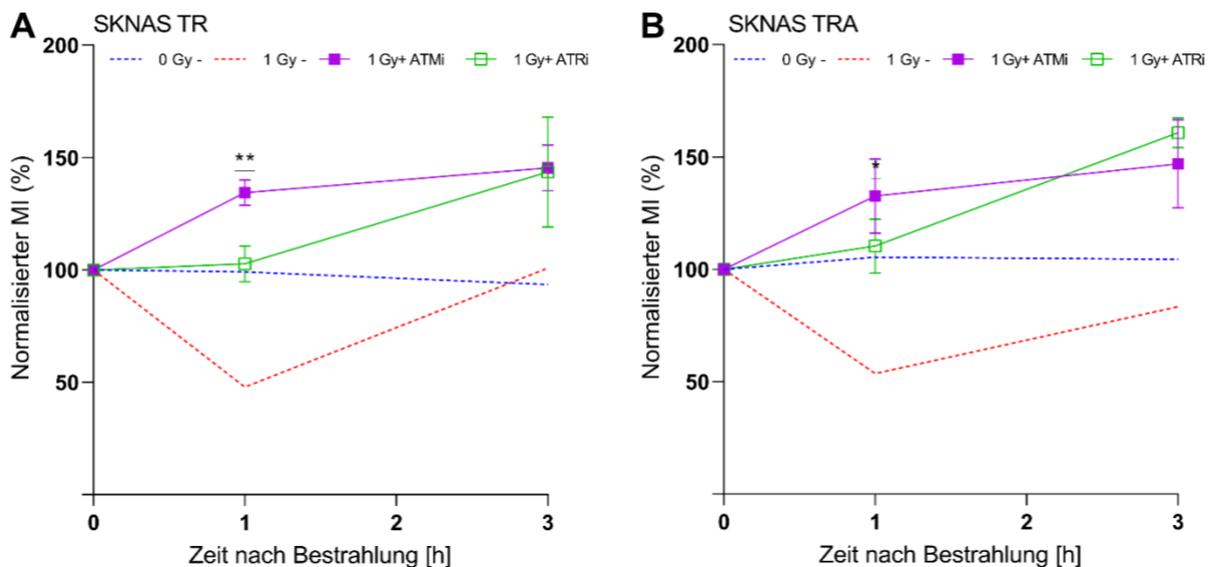


Abbildung 15: Mitotischer Index des SKNAS-Zellmodelle nach Bestrahlung mit 0 und 1 Gy nach Behandlung mit ATMi und ATRi

Die Messung des mitotischen Index des SKNAS-Zellmodells nach 0 h, 1 h und 3 h nach Bestrahlung mit 0 und 1 Gy wurde durch die H3pS10-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor 24 h mit TET/NGF behandelt oder unbehandelt belassen. Zudem wurden die Zellen 1 h mit ATMi oder ATRi behandelt. (A) MI der SKNAS TR Zellen nach der Bestrahlung mit 0 und 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung und mit teils einstündiger ATMi oder ATRi Behandlung. (B) MI der SKNAS TRA Zellen nach der Bestrahlung mit 0 und 1 Gy mit oder ohne TET/NGF Aktivierung und mit teils einstündiger ATMi oder ATRi Behandlung. Für die SKNAS-Zellen wurden drei Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μM), NGF (3,709 μM), ATRi (5 μM) und ATMi (10 μM). Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0,05$ (ATMi TR 1 h); ** $p < 0,01$ ATMi TRA 1 h).

Es konnte somit belegt werden, dass auch bei einer Zelllinie mit ATR-Mutation die Inhibition von ATM und ATR zu einem erhöhten MI führt (Abb. 15). Dies deutet darauf hin, dass in den untersuchten Zellen der G2/M Checkpoint prinzipiell intakt ist und durch Blockade von ATM oder ATR unabhängig von Bestrahlung aufgehoben werden kann.

6.6 Einfluss von TrkA-Überexpression auf die Expression und Aktivierung des ATM/ATR-Signalwegs unter Bestrahlung

Basierend auf den zugrundeliegenden Ergebnissen wurde die Expression und Phosphorylierung von Proteinen im ATM/ATR-Signalweg genauer untersucht. Dazu

wurden die SY5Y- und Kelly-Zellmodelle 24 h mit TET/NGF behandelt und anschließend mit 1 Gy bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen nach 0 h, 1 h und 3 h lysiert. Durch Western-Blot Analyse konnten die Proteine des ATM/ATR-Signalwegs visualisiert werden.

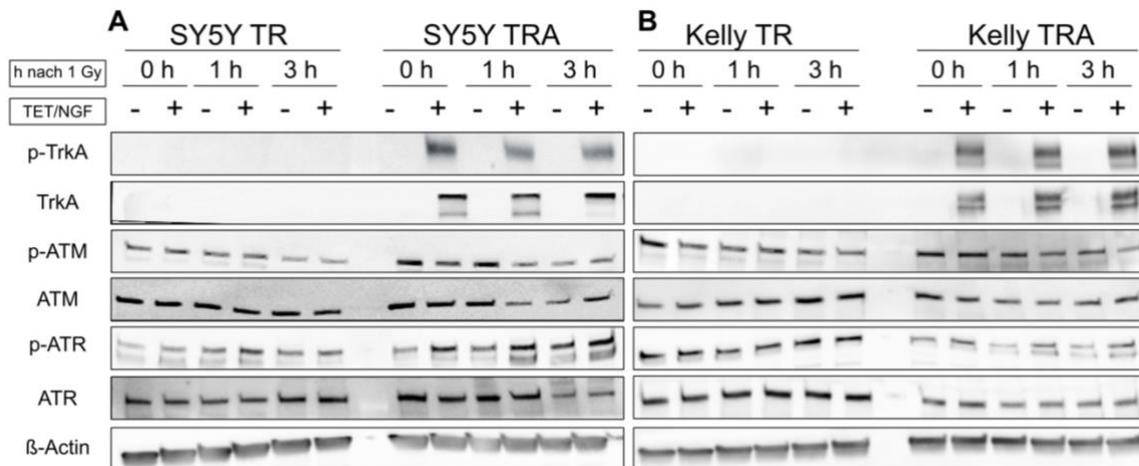


Abbildung 16: TrkA, p-TrkA, ATM, p-ATM, ATR und p-ATR Protein-Expression im SY5Y- und Kelly-Zellmodell nach Bestrahlung mit 1 Gy

Das Protein-Level wurde durch Western-Blot-Analyse in den Zellmodellen (A) SY5Y und (B) Kelly mit und ohne Induktion und Aktivierung von TrkA nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen entweder 24 h mit TET/NGF behandelt oder erhielten keine Behandlung (-). Für die SY5Y-Zellen wurden aus vier Experimenten und für die Kelly-Zellen aus drei Experimenten ein repräsentativer Western-Blot gezeigt. β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M) und NGF (3,709 μ M).

In den SY5Y TR Zellen sowie in den Kelly TR Zellen konnte, wie erwartet, weder TrkA noch p-TrkA nachgewiesen werden. Zudem unterschied sich die Protein-Expression von ATM, ATR, p-ATM und p-ATR nicht signifikant nach TrkA Induktion und Aktivierung. Nur für p-ATM konnte ein etwas geringeres Signal nach 3 h in beiden Zelllinien und nach 0 h in den unbehandelten Kelly TR Zellen nachgewiesen werden. In den TRA Klonen hingegen konnte ein durch TET/NGF induziertes geringeres p-ATM Level nach 0 h, 1 h und 3 h in den SY5Y und 1 h und 3 h bei den Kelly-Zellen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu stieg das p-ATR Signal nach TrkA- Aktivierung durch TET/NGF in den SY5Y- und Kelly-Zellen nach 0 h, 1 h und 3 h an. Die Expression von ATM und ATR waren unabhängig vom TrkA-Status (Abb. 16). Um den Einfluss von TrkA auf die *downstream*-Proteine zu untersuchen wurden diese ebenfalls durch Western-Blots visualisiert und repräsentative Blots ausgewählt.

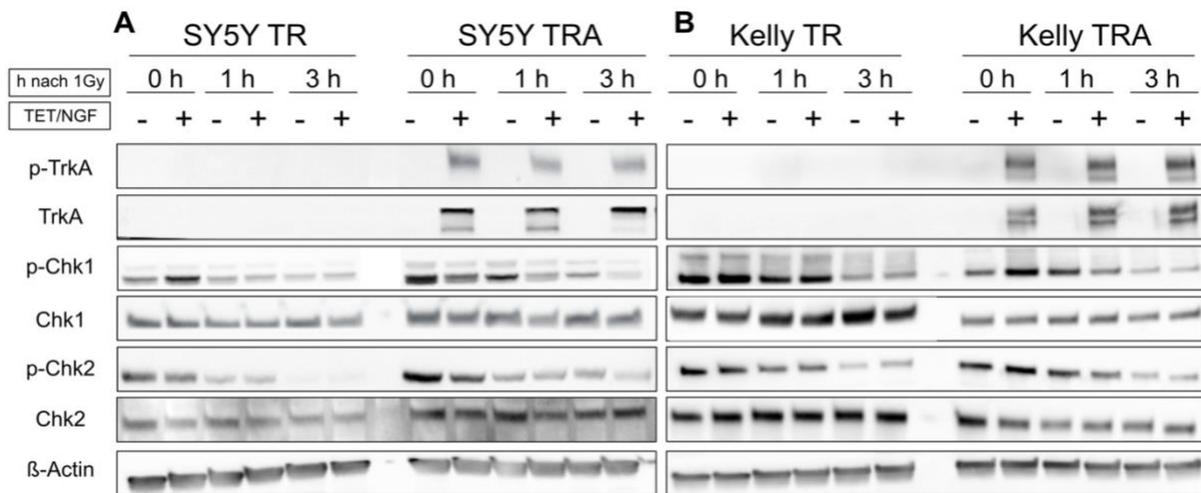


Abbildung 17: TrkA, p-TrkA, Chk1, p-Chk1, Chk2 und p-Chk2 Protein-Level im SY5Y- und Kelly-Zellmodell nach Bestrahlung mit 1 Gy

Protein-Expression wurde durch Western-Blot Analyse in den Zellmodellen (A) SY5Y und (B) Kelly mit und ohne Expression und Aktivierung von TrkA nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen entweder 24 h mit TET/NGF behandelt (+) oder erhielten keine Behandlung (-). Für die SY5Y-Zellen wurden aus vier Experimenten und für die Kelly-Zellen aus drei Experimenten ein repräsentativer Western-Blot ausgewählt. β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M) und NGF (3,709 μ M).

Für die Expression von Chk1 und Chk2 konnte kein Unterschied zwischen TR und TRA Zellen und zwischen aktivierten und inaktivierten Zellen gezeigt werden, weder in SY5Y-Zellmodell noch im Kelly-Zellmodell. Allerdings war die Phosphorylierung von Chk1 an Ser317 in den aktivierten TRA Zellen im SY5Y- und auch im Kelly-Zellmodell deutlich verringert. Zudem zeigte auch Chk2 eine reduzierte Phosphorylierung durch die Aktivierung von TrkA in beiden Zelllinien. Der Effekt war jedoch nicht so ausgeprägt wie für p-Chk1 (Abb. 17). Die Tatsache, dass diese Beobachtungen nicht in den TR Zellen gemacht werden konnten, weist auf einen spezifischen TrkA-vermittelten Effekt hin. Um die weitere Signalkaskade nachvollziehen zu können, wurden die nachgeschalteten Proteine im Signalweg, CDC25A, CDC25B und CDC25C, untersucht.

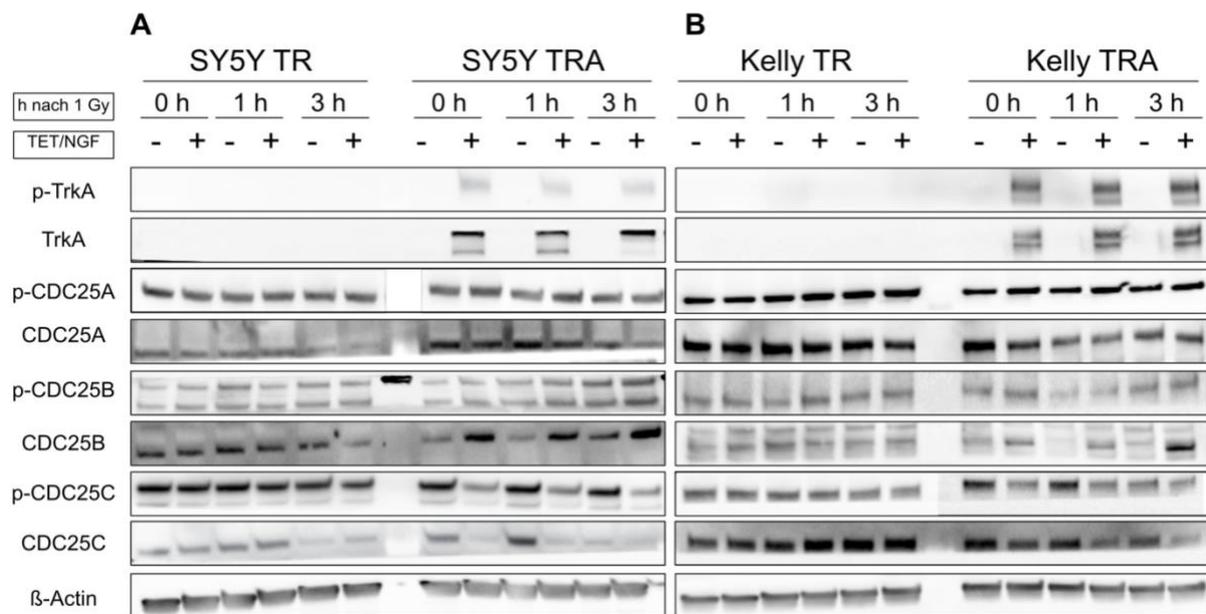


Abbildung 18: TrkA, p-TrkA, CDC25A, p-CDC25A, CDC25B, p-CDC25B, CDC25C und p-CDC25C Protein-Level im SY5Y- und Kelly-Zellmodell nach Bestrahlung mit 1 Gy Protein-Level wurde durch Western-Blot Analyse in den Zellmodellen (A) SY5Y und (B) Kelly nach Behandlung mit oder ohne TET/NGF für 24 h nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen entweder 24 h mit TET/NGF behandelt oder erhielten keine Behandlung (-). Für die SY5Y-Zellen wurden aus vier Experimenten und für die Kelly-Zellen aus drei Experimenten ein repräsentativer Western-Blot gezeigt. β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. Behandlung der Zellen: TET (2,25 μ M) und NGF (3,709 μ M).

In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass eine TrkA-Aktivierung keine Veränderung der CDC25A-Protein-Expression oder Phosphorylierung bewirkt. Allerdings konnte in den nicht durch TET/NGF aktivierten Kelly TRA Zellen eine Reduktion der CDC25A-Expression nach 0 h nach der Bestrahlung nachgewiesen werden. Im Falle von CDC25B hingegen konnte nach TrkA-Aktivierung höheres CDC25B-Expression in beiden Zelllinien gezeigt werden. Die Phosphorylierung von CDC25B wurde jedoch nicht durch TrkA beeinflusst, ebenso wenig wie in den TR - Kontrollen. Zu guter Letzt hat die TrkA-Aktivierung einen Einfluss auf die CDC25C-Phosphorylierung und ebenfalls auf die Expression. Es konnte belegt werden, dass Zellen TrkA-Aktivierung geringere CDC25C Level aufweisen und dass dies in beiden untersuchten Zelllinien auch mit einer geringeren CDC25C-Phosphorylierung einhergeht (Abb. 18).

6.7 Einfluss von weiteren Tyrosin-Rezeptor-Kinasen auf den G2/M-Kontrollpunkt

Um der Frage nachzugehen, ob es sich bei dem TrkA-vermittelten Effekt auf den G2/M-Checkpoint um eine allgemeine Eigenschaft von aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen handelt, wurde untersucht, ob sich auch in anderen Modellen mit RTK-Aktivierung ein erhöhter MI unter Bestrahlung verifizieren lässt. Um dies zu analysieren wurden zwei Zelllinien verwendet, welche eine konstitutive EGFR-Expression aufweisen. Die A549-Zelllinie ist eine Lungentumorzelllinie mit einer EGFR-Überexpression, in der EGFR-Aktivität durch Zugabe des Liganden, EGF, induziert werden kann. Die H1975 Zelllinie, welche ebenfalls aus einem nicht-kleinzelligen Lungentumor etabliert wurde, weist eine hohe EGFR-Expression sowie eine Liganden-unabhängige EGFR-Aktivierung auf.

In beiden Fällen wurden die Zellen mit 0, 1 und 4 Gy bestrahlt und der MI nach 0 h, 1 h und 3 h gemessen.

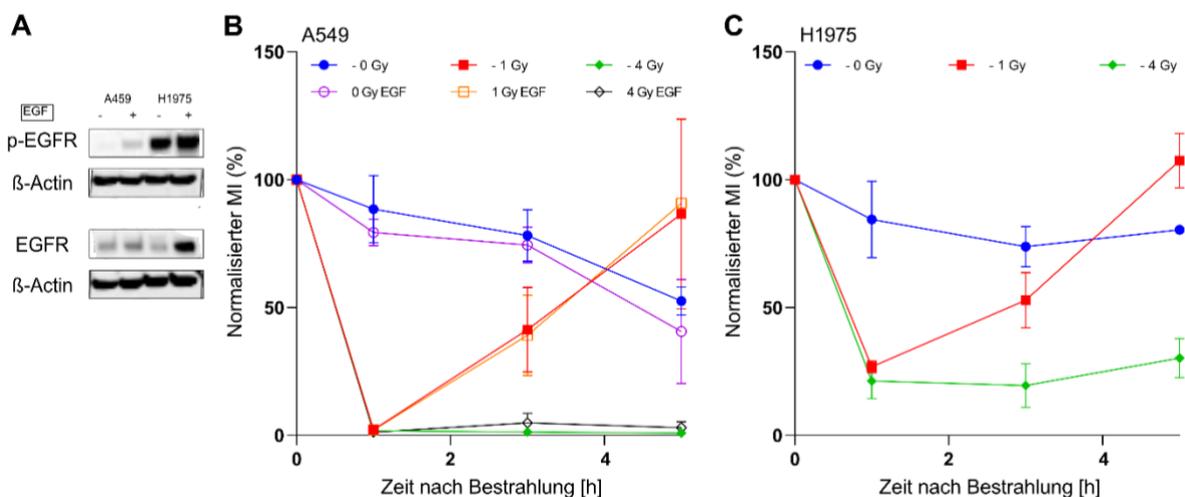


Abbildung 19: Western Blot Analyse von EGFR und p-EGFR und Mitotischer Index der A549- und H1975-Zellmodelle nach Bestrahlung mit 0,1 und 4 Gy

Der mitotische Index von A549- und H1975-Zellen nach 0 h, 1 h, 3 h und 5h nach Bestrahlung mit 0, 1 und 4 Gy wurde durch eine H3pS10-Färbung bestimmt. Die Zellen wurden zuvor 24 h mit EGF behandelt oder unbehandelt belassen. (A) Repräsentative Protein-Analyse von EGFR und p-EGFR in A549 und H1975 Zellen mit bzw. ohne EGFR Aktivierung nach Zugabe von EGF für 24 h. (B) MI der A549 Zellen nach der Bestrahlung mit 0,1 und 4 Gy mit oder ohne EGF Aktivierung. (C) MI der H1975 Zellen nach der Bestrahlung mit 0, 1 und 4 Gy. Für beide Zelltypen wurden drei Experimente zusammengefasst und aus zwei Experimenten wurde ein repräsentativer Western Blot ausgewählt. Behandlung der Zellen: EGF (40,3 µM). β-Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA

Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (n.s).

Zunächst konnte durch den Western Blot veranschaulicht werden, dass die Zelllinie A549 und H1975 EGFR exprimieren. In den H1975 Zellen ist der Rezeptor dauerhaft aktiviert, im Gegensatz zu den A549 Zellen in denen nur durch EGF Behandlung EGFR aktiviert wurde (Abb. 19A). Es konnte gezeigt werden, dass Zellen mit einer EGFR-Überexpression unabhängig von der Aktivierung durch EGF einen deutlich verringerten mitotischen Index nach der Bestrahlung aufweisen. In den A549-Zellen konnte eine Stunde nach Bestrahlung nur einzelne mitotische Zellen nachgewiesen werden. In der H1975 waren die MI-Werte im Vergleich zu den A549-Zellen höher, jedoch war er deutlich reduziert im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Es konnte in beiden Zellen nach fünf Stunden ein MI-Wert gemessen werden, der dem Ausgangswert entsprach (Abb. 19 B, C).

7 Auswirkungen der TrkB-Überexpression in Neuroblastom-Modellen

7.1 Charakterisierung-TrkB überexprimierender Neuroblastomzellen

Um die Auswirkungen von TrkB-Überexpression *in vitro* zu untersuchen, wurden wiederum SY5Y-Zellen genutzt. Zum einen wurde ein konstitutive TrkB überexprimierender Klon (SY5Y TrkB) mit dazugehöriger Leervektor-Kontrolle (SY5Y pLNCX) verwendet. Zum anderen eine durch Tetracyclin-Gabe induzierbar TrkB exprimierende Zelllinie (SY5Y TRB), wobei hier die Kontroll-Zelllinie (SY5Y TR) nur den TET-Repressor (TR) enthielt (siehe 3.10.1).

Zunächst wurde die mRNA-Expression in den entsprechenden Zelllinien mit konstitutiver Expression von TRKB oder durch TET Behandlung induzierbarer Expression von TRKB durch RT-PCR geprüft.

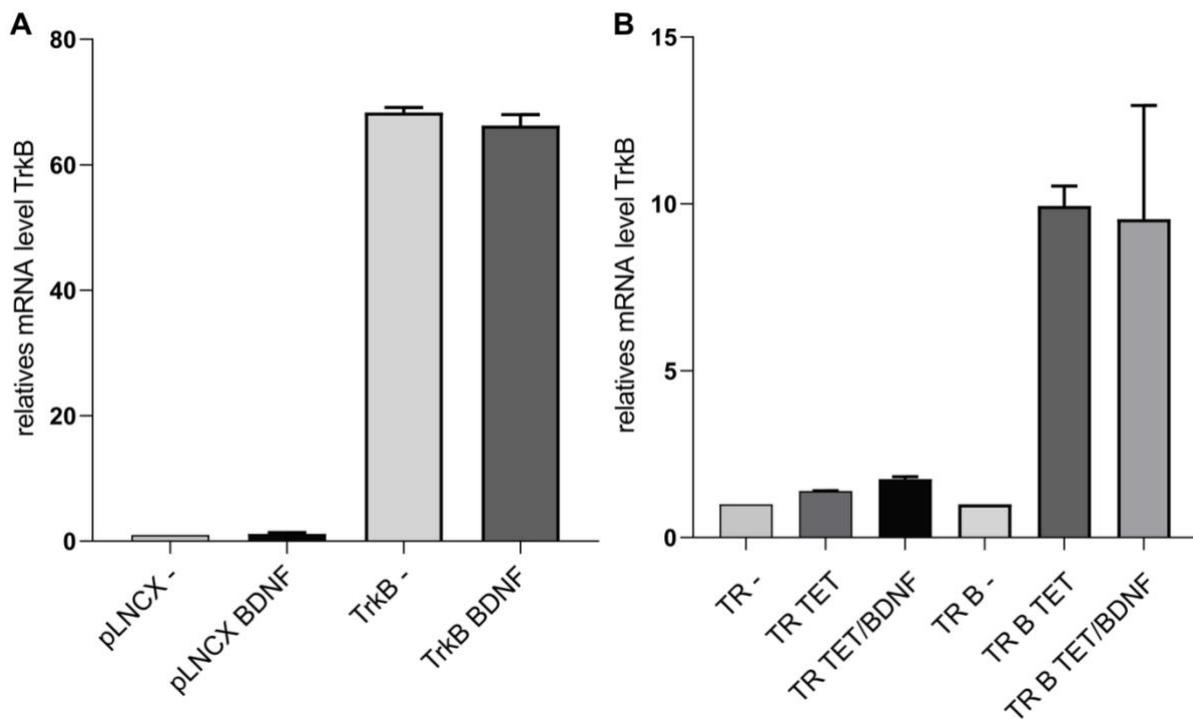


Abbildung 20: Nachweis der TrkB mRNA in SY5Y Zellen mit konstitutiver oder konditionaler TrkB Expression

Das relative TRKB mRNA-Level wurde durch RT-PCR in (A) den konstitutive transfizierten SY5Y (SY5Y TrkB; Vektorkontrolle SY5Y pLNCX) und in (B) den konditionalen SY5Y Zellen (SY5Y TRB; Vektorkontrolle SY5Y TR) gemessen. Die Zellen wurden entweder 24 h mit TET und 3 h mit BDNF behandelt oder erhielten keine Behandlung (-) oder nur 24 h TET. Anschließend wurde die mRNA isoliert. Für die konstitutive SY5Y-Zellen wurden zwei Experimente und für die induzierten SY5Y-Zellen drei Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (45 μ M) und BDNF (3,6 μ M).

Es konnte nachgewiesen werden, dass beide TrkB-transfizierten SY5Y-Sublinien eine signifikant erhöhte TrkB-Expression aufweisen und dass diese nicht durch Zugabe von BDNF modifiziert wird. TrkB Expression ist 65-fach in den konstitutive transfizierten SY5Y-Zellen und um 10-fach in den induzierten SY5Y-Zellen höher im Vergleich zu den TR bzw. den pLNCX Kontroll-Zellen (Abb. 20).

Die Charakterisierung der Zellen hinsichtlich TrkB-Expression und -Aktivierung wurde durch Western-Blot Analyse durchgeführt. Dabei wurden die konstitutive Zelllinien 48 h nach Auspattieren für 3 h mit BDNF behandelt und die induzierbaren Zelllinien 24 h nach Auspattieren für 24 h mit TET behandelt und anschließend 3 h mit BDNF oder die Zellen wurden unbehandelt belassen. Danach wurden die Zellen mittels PBS gewaschen und mit RIPA-Puffer lysiert.

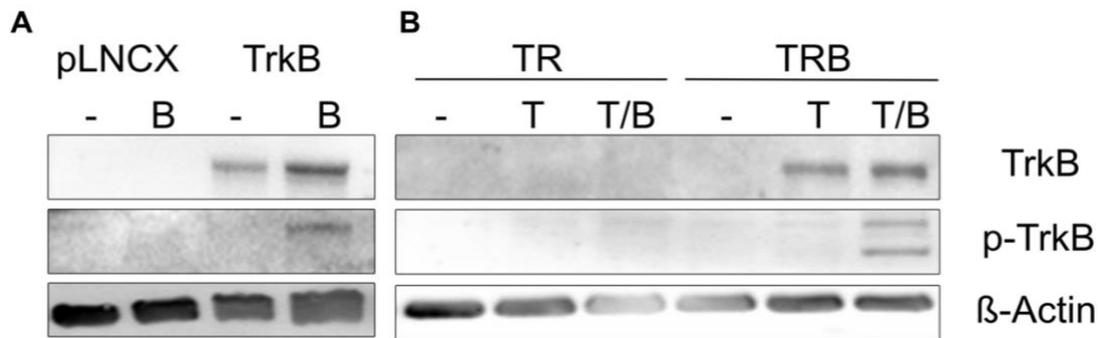


Abbildung 21: Nachweis der TrkB und p-TrkB Proteinen in SY5Y Zellen mit konstitutiver oder konditionaler TrkB Expression

Der Nachweis von TrkB und p-TrkB in SY5Y Zellen mit (A) konstitutiver Expression (SY5Y TrkB; Vektorkontrolle SY5Y-pLNCX) oder (B) induzierter TrkB Expression (SY5Y TRB; Vektorkontrolle SY5Y TR) wurde durch Western-Blot Analyse nachgewiesen. Zellen wurden zuvor mit TET für 24 h und/oder anschließend 3 h BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Für die konstitutiven SY5Y-Zellen wurden aus fünf Experimenten und für die induzierbaren SY5Y-Zellen auch aus fünf Experimenten ein repräsentativer Western-Blot gezeigt. Behandlung der Zellen: TET (45 μ M) und BDNF (3,6 μ M).

Es konnte nachgewiesen werden, dass TrkB in SY5Y TrkB Zellen ohne BDNF Behandlung exprimiert wird. Die TrkB-Expression wird jedoch durch BDNF-Zugabe erhöht und aktiviert TrkB, wodurch p-TrkB nachgewiesen werden konnte. Zudem zeigte die Kontrolle-Zelllinie (SY5Y-pLNCX) keine TrkB-Expression oder p-TrkB. In der induzierbaren Zelllinie SY5Y TRB konnte durch die Behandlung sowohl TrkB-Expression als auch Aktivierung nachgewiesen werden. In den Kontroll-Zellen SY5Y TR hingegen war weder TrkB noch p-TrkB nach 24 h Behandlung mit TET und 3 h mit BDNF detektierbar (Abb. 21). Somit konnte auch für dieses System eine kontrollierbare Expression und Aktivierung der untersuchten Rezeptor-Tyrosin-Kinase TrkB nachgewiesen werden.

7.2 Einfluss von TrkB-Überexpression auf die Morphologie nach Bestrahlung

Um einschätzen zu können, welchen Einfluss die Aktivierung und Überexpression von TrkB auf die Zellen während einer Bestrahlung haben kann, wurden die Zellen zunächst morphologisch untersucht. Dazu wurden die konstitutive TrkB-exprimierenden SY5Y Zellen 3 h mit BDNF behandelt und anschließend mit 0, 2, 6 und 10 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden daraufhin unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung von x 40 betrachtet und fotografiert.

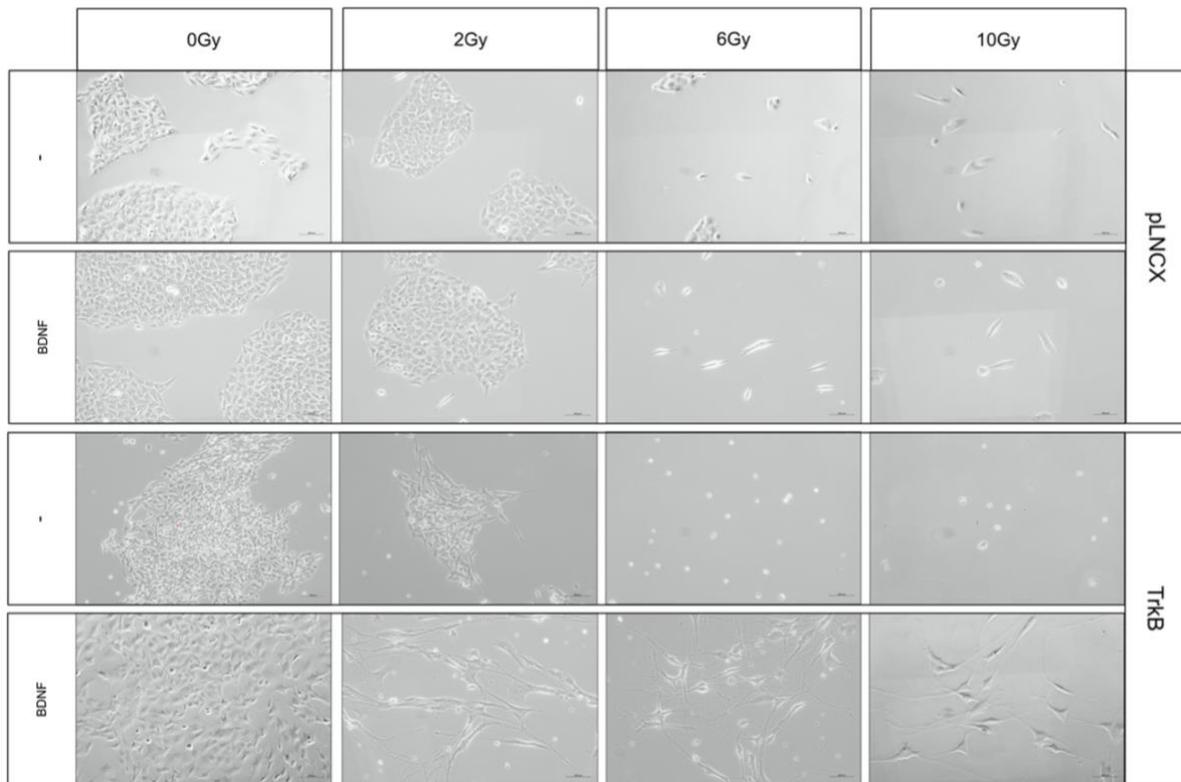


Abbildung 22: Mikroskopie Bilder der SY5Y-Zelllinien mit konstitutiver TrkB Expression nach Bestrahlung mit 0, 2, 6 und 10 Gy

Die konstitutiven Zellen (SY5Y TrkB, Vektorkontrolle pLNCX) wurden zunächst 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit 0, 2, 6 und 10 Gy bestrahlt und nach 24 h mit einer 40-fachen Vergrößerung im Mikroskop aufgenommen. Für die konstitutiven SY5Y-Zellen wurden aus fünf Aufnahmen je ein repräsentatives Bild ausgewählt. Behandlung der Zellen: BDNF (3,6 μ M).

TrkB-exprimierende Zellen hatten gegenüber den Kontrollen (pLNCX) 24 h nach Bestrahlung mit 6 oder 10 Gy einen Überlebensvorteil. Zudem hatte sich ihre Morphologie deutlich verändert, die Zellen wiesen eine Verlängerung und/oder Verbreiterung auf. Zudem bildeten sich Dendriten artige Ausläufer und zeigten weniger Cluster Bildung (Abb. 22).

Auch die Zellen mit induzierbarem TrkB wurden analog untersucht. Dazu wurden die Zellen 24 h mit TET behandelt, um die TrkB-Expression zu induzieren. Hiernach wurden die Zellen 3 h mit BDNF aktiviert und anschließend mit 0, 2, 6 und 10 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden daraufhin unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung von x40 fotografiert.

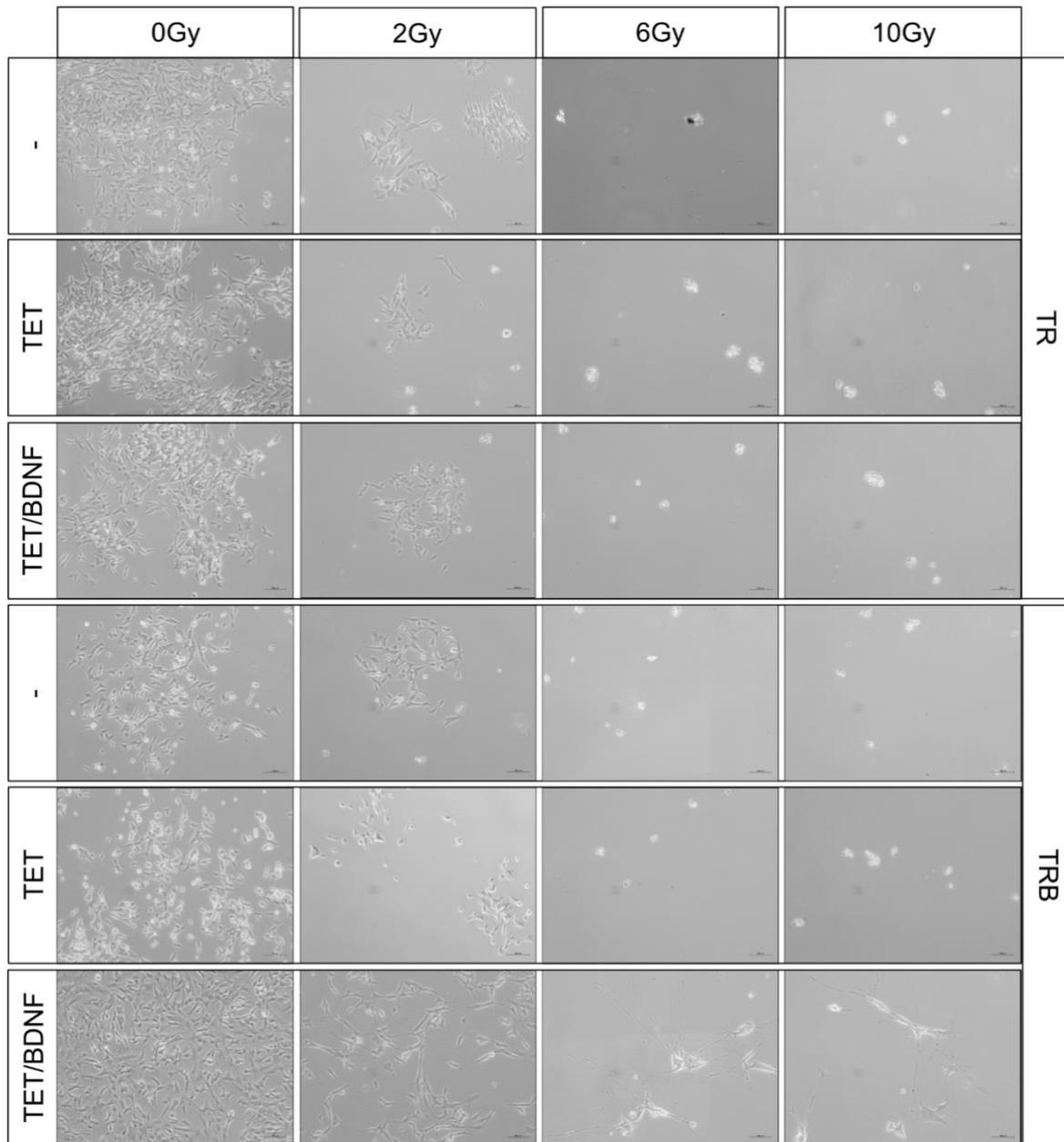


Abbildung 23: Mikroskopie Bilder der SY5Y- Zellen mit konditionaler TrkB Expression nach Bestrahlung mit 0, 2, 6 und 10 Gy

Die konditionale SY5Y Zellen (SY5Y TRB; Vektorkontrolle SY5Y TR) wurde zunächst entweder mit 24 h mit TET behandelt oder 24 h mit TET und anschließend 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit 0, 2, 6 und 10 Gy bestrahlt und nach 24 h mit einer 40-fachen Vergrößerung im Mikroskop aufgenommen. Für die konditionalen SY5Y-Zellen wurden aus fünf Aufnahmen je ein repräsentatives Bild ausgewählt. Behandlung der Zellen: TET (45 μ M) und BDNF (3,6 μ M).

SY5Y-Zellen mit induzierter TrkB-Expression wiesen die gleichen morphologischen Veränderungen auf wie die konstitutiv TrkB-exprimierenden Zellen. Die Reduktion der Zellzahl war in diesem Modell ab einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy deutlich sichtbar.

Zudem war auch in diesem Modell die morphologische, spindelförmige Veränderung in den TrkB-exprimierenden Zellen, klar zu erkennen (Abb. 23).

7.3 Einfluss von TrkB-Überexpression auf das Kurzzeit- und Langzeitüberleben

Nach der phänotypischen Beschreibung der Zellen sollte im nächsten Schritt ermittelt werden, ob die im Mikroskop beobachteten Veränderungen mit einem TrkB-vermittelten Einfluss auf das Überleben der Zellen einhergingen. In diesem Zusammenhang wurde das Kurzzeitüberleben durch einen MTT-Test untersucht. Konstitutiv TrkB-exprimierende Zellen wurden hierzu 48 h nach Auspattieren für 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt. Zellen mit induzierbarer TrkB-Expression wurden 24 h nach Auspattieren für 24 h vor der Bestrahlung zusätzlich mit TET inkubiert. 48 h nach Bestrahlung wurden die Zellen mit MTT-Lösung für 3 h behandelt.

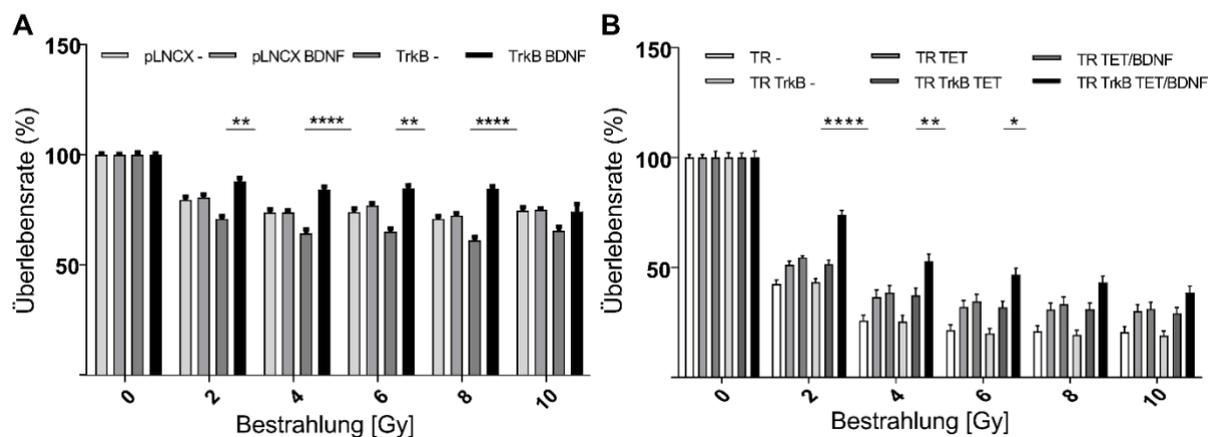


Abbildung 24: Kurzzeitüberleben von SY5Y Zellen mit konstitutiver oder konditionaler TrkB Expression nach Bestrahlung mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy

Das Kurzzeitüberleben der Zellen wurde durch einen MTT-Test gemessen. (A) Das konstitutive SY5Y-Zellmodell (SY5Y TrkB; Vektorkontrolle pLNCX) wurde 48 h nach Auspattieren für 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend mit 0, 2, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und nach 48 h mit MTT-Lösung für 3 h behandelt (B) Das konditionale SY5Y-Zellmodell (SY5Y TRB; Vektorkontrolle SY5Y TR) wurde 24 h nach Auspattieren für 24 h mit TET und darauf folgend 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit 0, 2, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und nach 48 h mit MTT-Lösung für 3 h behandelt. Für das konstitutive Zellmodell wurden sechs Experimente und für das konditionale Zellmodell vier Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (45 μ M) und BDNF (3,6 μ M). Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung

mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Es konnte belegt werden, dass Zellen mit aktiviertem TrkB ein signifikant besseres Überleben 48 h nach der Bestrahlung verzeichnen als Zellen ohne TrkB-Expression oder ohne TrkB-Aktivierung durch BDNF. Diese signifikante Veränderung konnte in Bestrahlungsdosen bis zu 8 Gy bei der konstitutive TrkB-exprimierenden Zelllinie und bis zu 6 Gy im konditionalen System nachgewiesen werden (Abb. 24).

Um sicherzustellen, dass die Aktivierung von TrkB zu diesem Anstieg des Kurzzeitüberlebens führt, wurden die Zellen mit dem Trk-Inhibitor LOXO 101 1 h vor der Bestrahlung behandelt. Zunächst wurde die Hemmung von TrkB durch den Inhibitor LOXO 101 anhand einer Western-Blot Analyse überprüft.

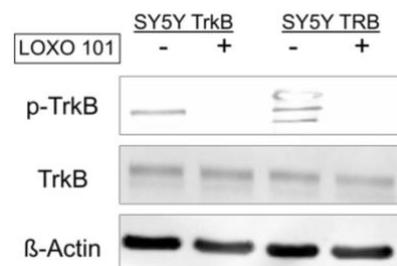


Abbildung 25: TrkB und p-TrkB Protein-Level nach 1 h Behandlung mit oder ohne LOXO 101 im SY5Y-Zellmodell

Das Protein-Level von TrkB und p-TrkB wurde durch die Western-Blot Analyse in TrkB-exprimierenden SY5Y-Zellen nachgewiesen. Die SY5Y TRB Zellen wurden 24 h nach Auspattieren mit TET für 24 h und anschließend 3 h BDNF behandelt und die SY5Y TrkB Zellen nur 3 h mit BDNF. Anschließend wurden die Zellen 1 h mit LOXO 101 behandelt oder unbehandelt belassen. Für die konstitutiven SY5Y-Zellen wurden aus drei Experimenten und für die induzierbaren SY5Y-Zellen aus vier Experimenten ein repräsentativer Western-Blot gezeigt. Behandlung der Zellen: TET (45 μM), BDNF (3,6 μM) und LOXO 101 (10 μM).

Es konnte gezeigt werden, dass LOXO 101 die Phosphorylierung von TrkB sowohl im konstitutiven als auch im konditionalen Zellsystem komplett unterdrückt (Abb. 25).

Anschließend wurden die Zellen 1 h vor der Bestrahlung mit LOXO 101 behandelt, um den TrkB-vermittelten Einfluss auf das Kurzzeitüberleben zu analysieren.

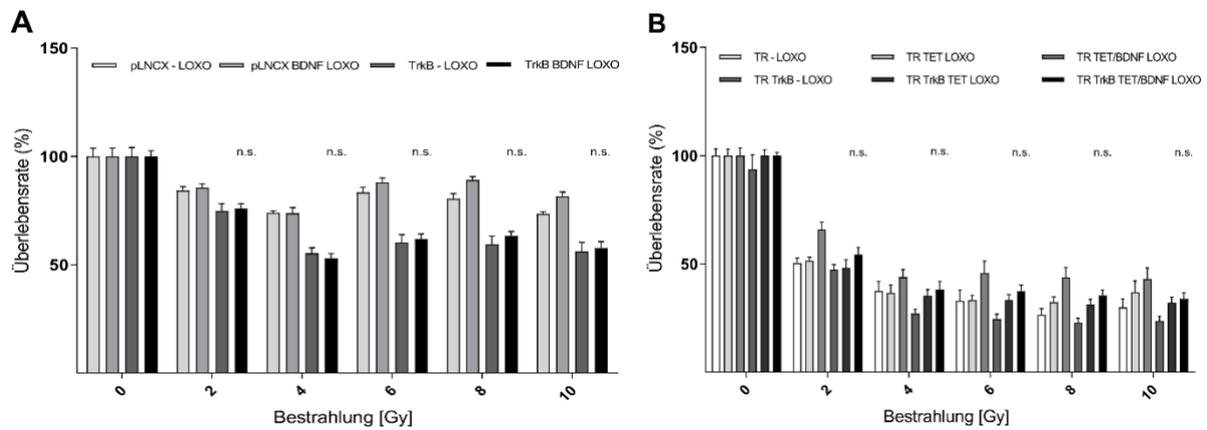


Abbildung 26: Kurzzeitüberleben des konstitutiven und konditionalen SY5Y-Zellmodells nach Bestrahlung mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy und Behandlung mit LOXO 101

Das Kurzzeitüberleben der Zellen nach LOXO 101 Behandlung wurde durch einen MTT-Test gemessen. (A) Das konstitutive SY5Y-Zellmodell (SY5Y TrkB, Vektorkontrolle pLNCX) wurde 48 h nach Ausspattieren für 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden alle Zellen 1 h mit LOXO 101 behandelt und dann mit 0, 2, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und nach 48 h mit MTT-Lösung für 3 h behandelt. (B) Das konditionale SY5Y-Zellmodell (SY5Y TRB, Vektorkontrolle TR) wurde 24 h nach Ausspattieren für 24 h mit TET und darauf folgend 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden alle Zellen 1 h mit LOXO 101 behandelt und dann mit 0, 2, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und nach 48 h mit MTT-Lösung für 3 h inkubiert. Für das konstitutive Zellmodell wurden drei Experimente und für das konditionale Zellmodell vier Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (45 µM), BDNF (3,6 µM) und LOXO 101 (10 µM). Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (n.s.).

Die Analyse der MTTs ergab, dass die Behandlung der Zellen mit LOXO 101 zu einem geringeren Überleben 48 h nach der Bestrahlung in TrkB-Aktivierten Zellen im Vergleich zu LOXO 101 unbehandelten Zellen führte (Abb. 26A). In Zellen mit induzierbarer TrkB-Expression zeigte sich weiterhin ein Unterschied zwischen den Gruppen, die TET oder TET/BDNF erhalten hatten, und den unbehandelten Zellen, jedoch war dieser nicht mehr signifikant (Abb. 26B).

Nun stellte sich die Frage, ob TrkB-Aktivierung ebenso einen Einfluss auf das Langzeitüberleben zeigt. Dazu wurde ein Koloniebildungs-Test durchgeführt. Die Zellen wurden analog zu den Experimenten zum Kurzzeitüberleben behandelt, und die Kolonien wurden nach 14 Tagen gezählt.

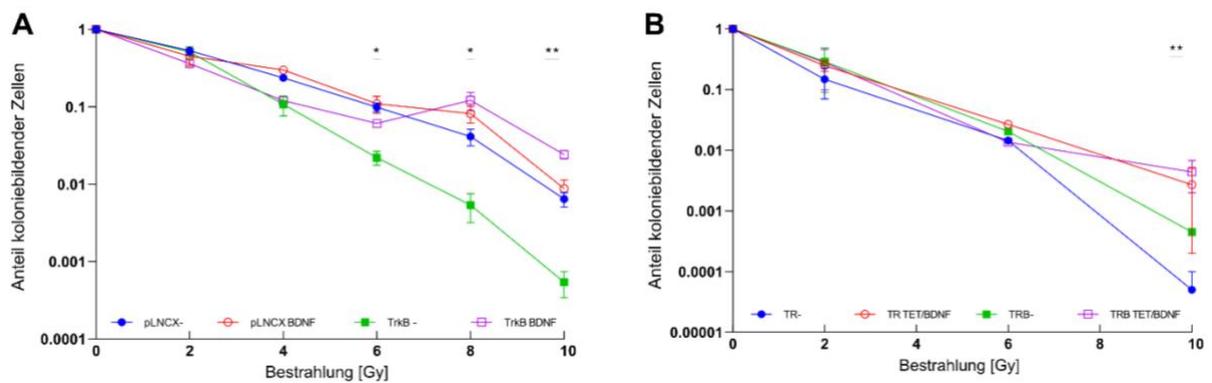


Abbildung 27: Langzeitüberleben von SY5Y-Zellen mit konstitutiver und konditionaler TrkB-Expression nach Bestrahlung mit 0, 2, 6 und 10 Gy

Das Langzeitüberleben wurde durch Koloniebildungs-Tests gemessen. (A) Das konstitutive SY5Y-Zellmodell (SY5Y TrkB, Vektorkontrolle pLNCX) wurde 48 h nach Auspattieren für 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend mit 0, 2, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und nach zwei Wochen die Kolonien gezählt. (B) Das konditionale SY5Y Zellmodell (SY5Y TRB, Vektorkontrolle TR) wurde 24 h nach Auspattieren für 24 h mit TET und darauf folgend 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit 0, 2, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und nach zwei Wochen die Kolonien gezählt. Für das konstitutive System wurden acht Experimente und für das konditionale System wurden drei Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (45 μ M) und BDNF (3,6 μ M). Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Die Untersuchung des Langzeitüberlebens konnte die Ergebnisse aus dem MTT-Test bestätigen. Auch hier führte die Aktivierung von TrkB durch BDNF sowohl im konstitutiven als auch im konditionalen Modell zu einer erhöhten Koloniebildungsfähigkeit. Bei höheren Bestrahlungsdosen (>6 Gy für konstitutiv TrkB-exprimierende Zellen, 10 Gy für Zellen mit induzierbarer TrkB-Expression) konnte eine signifikant höhere Anzahl an Kolonien gezählt werden. TrkB exprimierende Zellen ohne Aktivierung wiesen zudem einen niedrigeren Anteil an koloniebildenden Zellen auf im Vergleich zu den nicht TrkB-exprimierenden Zellen (Abb. 27).

Auch in diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die TrkB-Aktivierung ursächlich für das bessere Langzeitüberleben ist oder ob andere Faktoren ebenfalls eine Rolle spielen. Daher wurden auch in diesem Assay die Zellen 1 h vor der Bestrahlung mit dem Trk-Inhibitor LOXO 101 behandelt.

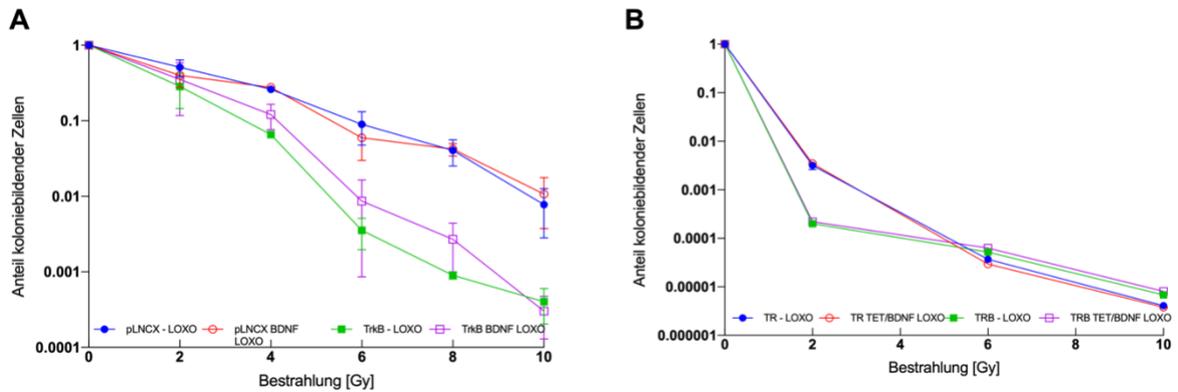


Abbildung 28: Langzeitüberleben des SY5Y Zellmodells in Abhängigkeit von TrkB Expression nach Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 10 Gy und einstündiger LOXO 101 Behandlung

Das Langzeitüberleben wurde durch Koloniebildungs-Tests gemessen. (A) Das konstitutive SY5Y Zellmodell (SY5Y TrkB, Vektorkontrolle pLNCX) wurde 48 h nach Ausspätieren für 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden alle Zellen 1 h mit LOXO 101 behandelt und dann mit 0, 2, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und nach zwei Wochen die Kolonien gezählt. (B) Das konditionale SY5Y Zellmodell (SY5Y TRB, Vektorkontrolle TR) wurde 24 h nach Ausspätieren für 24 h mit TET und darauf folgend 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden alle Zellen 1 h mit LOXO 101 behandelt und dann mit 0, 2, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und nach zwei Wochen die Kolonien gezählt. Für das konstitutive System wurden drei Experimente und für das konditionale System wurde zwei Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (45 μ M), BDNF (3,6 μ M) und LOXO 101 (10 μ M). Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (n.s.).

Die Analyse des Koloniebildungstests bewies, dass das signifikant bessere Langzeitüberleben TrkB exprimierender Zellen durch die LOXO 101-vermittelte Inhibition von TrkB reduziert wird. In Zellen mit konstitutiver TrkB-Expression und TrkB-Aktivierung durch BDNF ist eine deutliche Reduktion der Kolonien nach LOXO 101-Behandlung zu verzeichnen (Abb. 28A). Im konditionalen System ist ein ähnlicher Effekt von LOXO 101 zu beobachten. Zellen mit TrkB-Aktivierung weisen die gleiche Kolonienzahl auf wie die Kontroll-Zelllinien. Wohingegen TrkB-Expression ohne TrkB-Aktivierung die Zahl an gebildeten Kolonien verringert (Abb. 28B). Basierend auf diesem Fund stellte sich die Frage, welche Signalwege in diesen Phänotyp involviert sind.

7.4 Einfluss der Inhibition kanonischer Signalwege auf die TrkB-abhängige Proliferation

Es sind drei Hauptsignalwege bekannt, welche von TrkB aktiviert werden, der PI3K-Signalweg, der MEK/ERK-Signalweg und der PLC γ -Signalweg. Diese tragen in unterschiedlichem Maße und in Abhängigkeit vom zellulären Kontext zu TrkB-vermitteltem Überleben und zur Proliferation bei. Um zu analysieren, ob diese Signalwege in den Überlebensvorteil nach Bestrahlung involviert sind, wurde die Überlebensrate nach Inhibitor Behandlung untersucht. Zuvor jedoch wurde der IC50 der Inhibitoren analysiert und die Inhibition der Signalwege durch Western Blot Analyse nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen entweder mit einem PDK1-Inhibitor (LY294002), einem MEK-Inhibitor (PD98059) oder einem PLC γ -Inhibitor (U73122) behandelt um den PI3K-, den MEK/ERK- oder den PLC γ zu inhibieren. Zudem wurden Proteine nach der Inhibitor-Behandlung isoliert, um die Inhibition der Signalwege im Western Blot nachzuweisen.

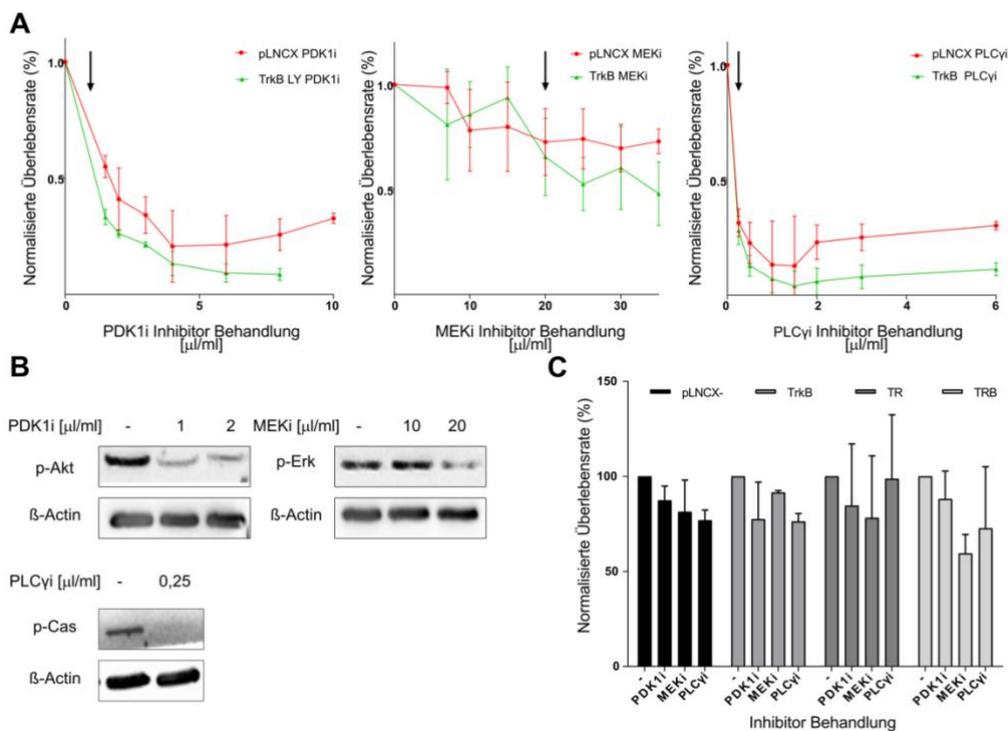


Abbildung 29: Bestimmung der optimalen Konzentration für PDK-, MEK- und PLC γ Inhibition

Die Inhibitor-Konzentration, bei der eine Blockade des Signalwegs, aber keine signifikante Reduktion der Proliferation eintrat, wurde durch MTT Tests bestimmt. (A) Überlebensrate des konstitutiv SY5Y Zellmodells (SY5Y TrkB, Vektorkontrolle pLNCX) nach 48 h Behandlung mit PDK1-Inhibitor (PDK1i), MEK-Inhibitor (MEKi) und PLC γ -Inhibitor (PLC γ i) in verschiedenen Konzentrationen gemessen mit MTT. Pfeil: gewählte Konzentration (B) Western Blot Analyse von p-Akt, p-Erk und p-Cas, als Nachweis für die

funktionierende Inhibition im konstitutiven Zellmodell. (C) Das normalisierte Überleben des konstitutive und induzierten SY5Y-Zellmodells nach 48h Inhibitor Behandlung. Gemessen durch MTT. Für den IC50 wurden Daten aus jeweils einem Experiment verwendet, für den Western Blot des konditionale System wurde aus zwei Experimenten ein repräsentativer Blot ausgewählt und für das MTT wurden vier Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (45 μ M), BDNF (3,6 μ M). Gewählte Konzentration: PDK1i (20 μ M), MEKi (50 μ M) und PLC γ i (2,5 μ M). Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (n.s.).

Durch die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen konnte für alle Inhibitoren eine geeignete Behandlungskonzentration ermittelt werden. Diese ergab sich aus der IC50 Messung (Abb. 29A) und den Western Blot Ergebnissen (Abb. 29B). Im Test MTT konnte gezeigt werden, dass die Inhibitoren keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben aufweisen (Abb. 29C).

Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss die Inhibitoren auf das Überleben unter Bestrahlung aufweisen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Inhibitoren für die verschiedenen Signalwege 1 h vor der Bestrahlung behandelt und anschließend im MTT-Test analysiert.

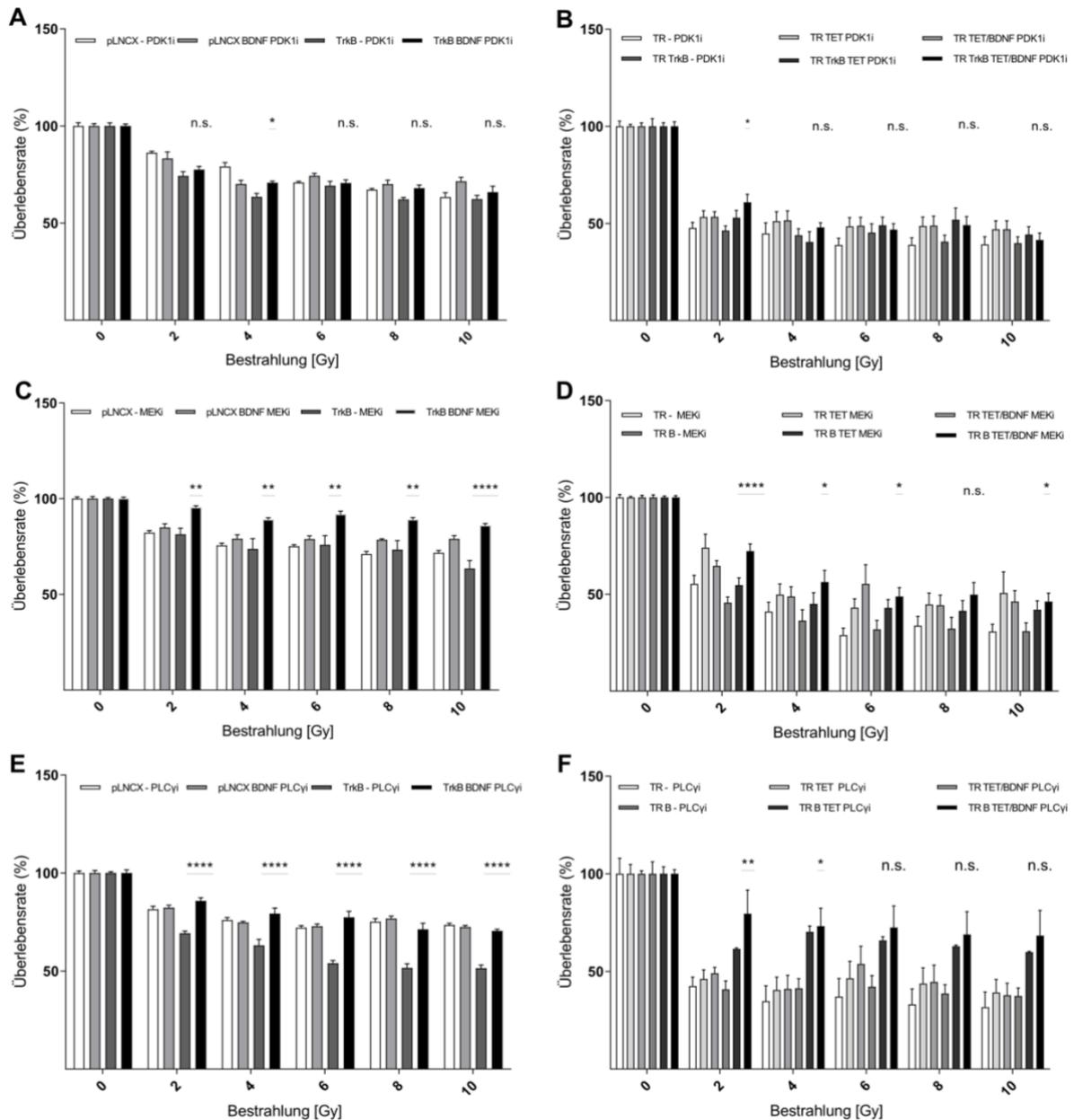


Abbildung 30: Kurzzeitüberleben von SY5Y-Zellen mit des konstitutiven oder konditionaler TrkB-Expression nach Bestrahlung mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy und Behandlung mit PDK1-Inhibitor (PDK1i), MEK-Inhibitor (MEKi) oder PLCy -Inhibitor (PLCyI)

Das Kurzzeitüberleben der Zellen unter Inhibitor-Behandlung wurde durch einen MTT-Test gemessen. (A) Das konstitutive SY5Y-Zellmodell (SY5Y TrkB, Vektorkontrolle pLNCX) wurde 48 h nach Auspattieren für 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden alle Zellen 1 h mit PDK1i behandelt und dann mit 0, 2, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und nach 48 h mit MTT-Lösung für 3 h behandelt (B) Das konditionale SY5Y-Zellmodell (SY5Y TRB, Vektorkontrolle TR) wurde 24 h nach Auspattieren für 24 h mit TET und darauf folgend 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden alle Zellen 1 h mit PDK1i behandelt und dann wie in A bestrahlt und nach 48 h mit MTT-Lösung für 3 h behandelt. (C) Das konstitutive SY5Y Zellmodell wurde 48 h nach Auspattieren für 3 h mit BDNF behandelt

oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden alle Zellen 1 h mit MEKi behandelt und dann wie in A bestrahlt und nach 48 h mit MTT-Lösung für 3 h behandelt. (D) Das konditionale SY5Y Zellmodell wurde 24 h nach Auspattieren für 24 h mit TET und darauf folgend 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden alle Zellen 1 h mit MEKi behandelt und dann wie in A bestrahlt und nach 48h mit MTT-Lösung für 3 h behandelt. (E) Das konstitutive SY5Y Zellmodell wurde 48 h nach Auspattieren für 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden alle Zellen 1 h mit PLC γ i behandelt und dann wie in A bestrahlt und nach 48 h mit MTT-Lösung für 3 h behandelt. (F) Das konditionale SY5Y Zellmodell wurde 24 h nach Auspattieren für 24 h mit TET und darauf folgend 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden alle Zellen 1 h mit PLC γ i behandelt und dann wie in A bestrahlt und nach 48 h mit MTT-Lösung für 3 h behandelt. Für das konstitutive Zellmodell wurden jeweils drei Experimente und für das konditionale Zellmodell jeweils drei Experimente zusammengefasst. Behandlung der Zellen: TET (45 μ M), BDNF (3,6 μ M), PDK1i (20 μ M), MEKi (50 μ M) und PLC γ i (2,5 μ M). Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit PDK1i der Überlebensvorteil TrkB-aktivierter Zellen im konstitutiven wie auch im konditionalen System verringert wurde. Im konstitutiven System konnte ein signifikant besseres Überleben nur noch nach der Bestrahlung mit 4 Gy und im konditionalen System nur nach der Bestrahlung mit 2 Gy nachgewiesen werden (Abb. 30A, B). Die Inhibition der Zellen mit MEKi zeigte eine leichte Reduktion des Überlebens der aktivierten TrkB Zellen im konstitutiven und konditionalen System. Allerdings konnte nach der Behandlung mit MEKi im konstitutiven sowie im konditionalen System ein signifikant erhöhtes Überleben der aktivierten TrkB Zellen nach 10 Gy Bestrahlung festgestellt werden, was zuvor nicht nachzuweisen war (Abb 30C, D). Die Behandlung mit PLC γ i führte beim konditionalen System zu einer leichten Reduktion des Überlebens von aktivierten TrkB Zellen, hingegen im konstitutiven System führte die Inhibition zu einem deutlich stärker ausgeprägten Phänotyp und demnach zu einem deutlich höheren Überleben der aktivierten TrkB Zellen nach Bestrahlung und Behandlung mit PLC γ i (Abb. 30E, F). Dies lässt annehmen, dass die Aktivierung des PI3K-Signalwegs zum gesteigerten Überleben der aktivierten TrkB Zellen führt.

In diesem Zusammenhang wurden Signalwege untersucht, welche vom PI3K-Signalweg beeinflusst werden und zu einem Überlebensvorteil führen können.

7.5 Einfluss von TrkB-Überexpression auf die Epitheliale-Mesenchymale-Transition

Einer der Mechanismen, welcher mit einem Überlebensvorteil in Bezug auf Bestrahlung in Verbindung gebracht wurde, ist die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT). Basierend auf den morphologischen Veränderungen der Zellen durch TrkB-Aktivierung wurden die Zeb1, Vimentin und Snail Protein-Level in Zellen mit und ohne TrkB-Expression und mit und ohne TrkB-Aktivierung im Western-Blot verglichen. Zudem wurden die Zellen bestrahlt, um den Einfluss der Bestrahlung auf die Proteine zu analysieren.

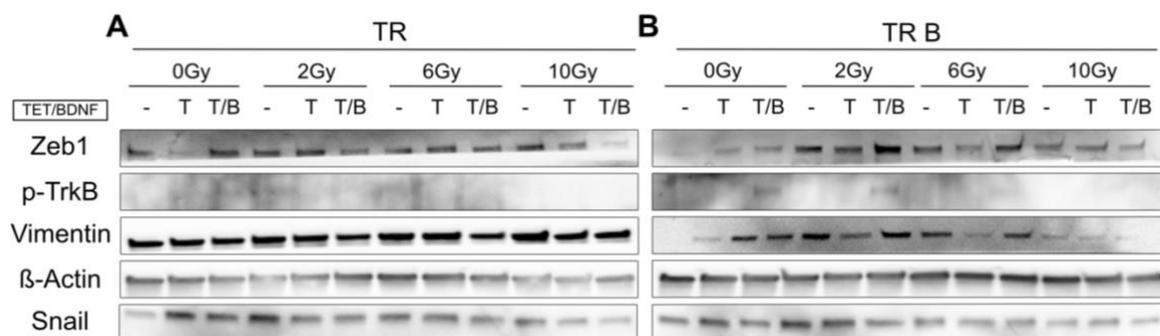


Abbildung 31: Zeb1, p-TrkB, Vimentin, β -Actin und Snail Protein-Level nach Behandlung mit oder ohne TET/BDNF im konditionalen SY5Y-Zellmodell unter Bestrahlung

Die Protein Expression von Zeb1, Snail, Vimentin, β -Actin und die Aktivierung von TrkB durch den p-TrkB Antikörper in der Western-Blot Analyse im konditionalen SY5Y-Zellmodell (SY5Y TRB, Vektorkontrolle TR) nachgewiesen. Zellen wurden zuvor mit TET für 24 h und/oder anschließend 3 h BDNF behandelt oder unbehandelt belassen (-). Die Zellen wurden mit 0, 2, 6 und 10 Gy bestrahlt. (A) SY5Y TR Kontroll-Zelllinien (B) SY5Y TRB Zelllinie. Für die SY5Y TR Zellen wurden aus drei Experimenten und für die SY5Y TRB Zellen aus ebenfalls drei Experimenten ein repräsentativer Western-Blot gezeigt. Behandlung der Zellen: TET (45 μ M) und BDNF (3,6 μ M).

Es konnte belegt werden, dass Zeb1 und Vimentin Protein-Expression durch TrkB-Aktivierung in den SY5Y TRB Zellen ansteigt. Die Expression von Snail ist leicht reduziert nach TrkB-Aktivierung (Abb. 31A). In den Kontroll-Zellen (SY5Y TR) wurden unabhängig von der Aktivierung keine signifikant unterschiedlichen Mengen an Zeb1, Vimentin oder Snail exprimiert die von der Behandlung abhängig waren (Abb. 31B). Da ZEB1 als wichtige Schaltstelle für die EMT-Induktion gilt, stellte sich die Frage, ob

die Inhibition von ZEB1 durch si-RNA einen Einfluss auf das Überleben der Zellen haben könnte.

7.6 Auswirkung der siRNA-vermittelten Herunterregulation von ZEB1 auf die Zellproliferation unter Bestrahlung

Um zu analysieren, ob die Reduktion der Zeb1-Expression zu einer verringerten Strahlenresistenz führt, wurden Zellen mit Zeb1-spezifischen siRNAs transfiziert und anschließend die Zeb1-Expression gemessen. Daraufhin wurden das Kurzzeitüberleben der Zellen nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von Zeb1 in Abhängigkeit von TrkB-Aktivierung evaluiert.

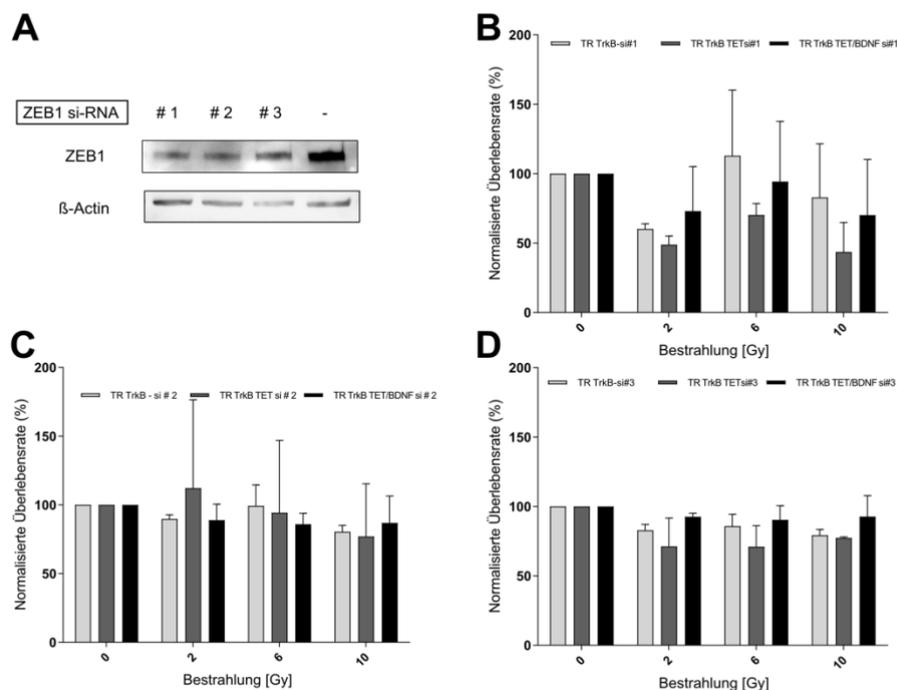


Abbildung 32: Kurzzeitüberleben des konditionalen SY5Y-Zellmodells nach Bestrahlung mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy und Behandlung mit ZEB1 si-RNA

Das Kurzzeitüberleben der Zellen nach ZEB1 siRNA Behandlung wurde durch einen MTT-Test gemessen. SY5Y-Zellen mit konditionaler TrkB Expression (SY5Y TRB, Vektorkontrolle TR) wurden 24 h nach Ausplattierung mit drei verschiedenen siRNAs für ZEB1 behandelt. Anschließend wurden die Zellen 24 h mit TET und darauffolgend 3 h mit BDNF behandelt oder unbehandelt belassen und dann mit 0, 2, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt. Nach 48 h wurden die Zellen für 3 h mit MTT-Lösung inkubiert. (A) Western Blot Nachweis für ZEB1 *knockdown* im Vergleich zur Kontrolle. MTT Test mit verschiedenen si-RNAs (B) siRNA #1 (C) siRNA #2 (D) siRNA #3. Für die MTT Tests wurden zwei Experimente zusammengefasst und aus zwei Experimenten wurde ein repräsentativer Western-Blot gezeigt. Behandlung der Zellen: TET (45 µM), BDNF (3,6 µM) und siRNAs (10 nM). Die

statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „two-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (n.s.).

Es konnte durch die Western Blot Analyse veranschaulicht werden, dass die Behandlung der Zellen mit Zeb1 si-RNA zu einer eindeutigen Reduktion des Zeb1 Levels in SY5Y-Zellen mit konditionaler TrkB Expression führt (Abb. 32A).

Darüber hinaus konnte in den siRNA behandelten Zellen trotz TrkB-Aktivierung keine signifikant erhöhte Überlebensrate festgestellt werden im Vergleich zu Zellen ohne TrkB-Aktivierung (Abb. 32 B, C, D).

Diskussion & Ausblick

8 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Überexpression von Neurotrophin Rezeptoren TrkA und TrkB in Neuroblastom Zellen unter Bestrahlung untersucht. Dazu wurden Neuroblastom-Zelllinien mit Überexpression von TrkA oder TrkB genutzt und eine phänotypische Analyse durchgeführt. Anschließend wurden basierend auf den phänotypischen Ergebnissen die involvierten Signalwege analysiert.

8.1 TrkA-Aktivierung führt zu einem G2/M-Kontrollpunkt Defekt

Neuroblastome mit einer Überexpression von TrkA weisen häufig eine gute Prognose auf, da die Tumore oft eine spontane Regression durchlaufen (Mosse et al. 2007; Schleiermacher et al. 2012; Brodeur 2003). Die Heilungschancen sind sehr gut im Vergleich zu anderen Neuroblastom-Typen. Daher besteht Interesse an der Fragestellung, warum durch TrkA-Überexpression ein deutlicher Vorteil für den Patienten entsteht und ob dieser möglicherweise für Neuroblastom-Therapie im Allgemeinen zu nutzen ist. Initial wurde TrkA-Überexpression im Zusammenhang mit Induktion von Differenzierung, Wachstumsarrest und Einleitung der Apoptose in Neuroblastom Zellen in Verbindung gebracht (Eggert et al. 2001; Eggert et al. 2000). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass TrkA die Expression von NRG1 induziert wird. Dies wiederum führt zur Proliferation von Schwann Zellen, welche einen parakrinen Loop starten, in dem sie NGF exprimieren und TrkA wiederum aktivieren (Pajtler et al. 2014). Dank Dr. Ines Rudolf war zudem bekannt, dass SY5Y-Zellen mit vermehrter TrkA-Expression und Aktivierung einen höheren mitotischen Index nach Bestrahlung durch 1 Gy nach 1 h und 3 h aufwiesen. Diese Ergebnisse konnten in der SY5Y Zelllinie und einer weiteren Neuroblastom-Zelllinie Kelly reproduziert werden. Sowohl in SY5Y- als auch Kelly-Zellen mit einer TrkA-Überexpression wurden ein erhöhter MI gemessen, dies weist auf eine erhöhte Anzahl von Zellen in der Mitose hin. Es ist bekannt, dass Zellen nach Bestrahlung Kontrollpunkte aktivieren, die einen Zellzyklus Arrest bewirken. Damit sollen die Möglichkeit zur Reparatur von Schäden ermöglicht werden, welche während der Bestrahlung entstanden sind (Yang et al. 2003; Santivasi and Xia 2014). Ein erhöhter MI nach Bestrahlung weist auf einen

defekten G2/M-Kontrollpunkt hin. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TrkA-Aktivierung den G2/M-Kontrollpunkt beeinflusst und funktionell abschaltet. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass in den untersuchten Zellmodellen eine Inhibition von TrkA durch den Trk-Inhibitor LOXO 101 zu einer deutlichen Reduktion des MIs nach Bestrahlung führte (Berger et al. 2018). Zudem konnte in den Zellmodellen auch unter höheren Bestrahlungsdosen bis zu 4 Gy ein erhöhter MI nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass TrkA nicht nur in geringen, sondern auch in höheren Gy Dosen einen Einfluss auf den G2/M-Kontrollpunkt hat.

8.2 TrkA-Aktivierung führt zu erhöhtem Kurzzeitüberleben

Es ist bekannt, dass TrkA durch Aktivierung des PI3K Signalwegs die Transkription von Proteinen induziert, die das Zellüberleben begünstigen (Qian et al. 1998; Banerjee et al. 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass Aktivierung von TrkA durch NGF das Überleben von Neuronen verbessert (MacInnis and Campenot 2002). In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob der erhöhte MI ebenfalls einen Einfluss auf das Kurzzeit-, sowie das Langzeitüberleben hat. Es konnte in beiden Zellmodellen nachgewiesen werden, dass TrkA-Aktivierung zu einem verbesserten Kurzzeitüberleben führt, jedoch nicht zu einem verbesserten Langzeitüberleben. In Verbindung mit den Ergebnissen zum mitotischen Übergang lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Zellen durch die TrkA-Aktivierung nach der Bestrahlung nicht in den G2/M Kontrollpunkt-vermittelten Zellzyklusarrest gehen, sondern weiter proliferieren und dadurch einen kurzzeitigen Überlebensvorteil aufweisen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen mit TrkA-Aktivierung keinen Vorteil in Bezug auf das klonogene Überleben aufwiesen. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass TrkA-Aktivierung sich kurzzeitig vorteilhaft auf die Proliferationsfähigkeit auswirken kann. Langfristig gesehen weisen diese Zellen jedoch Nachteile durch die fehlende Reparatur und die Akkumulation von Schäden nach Bestrahlung auf. Es konnte nachgewiesen werden, dass Zellen, welche keine Reparaturmechanismen nach der Bestrahlung aktivieren, auf Dauer in Seneszenz oder Apoptose übergehen (Jackson and Bartek 2009).

8.3 TrkA-Aktivierung führt zur Inhibierung des ATM/ATR-Signalwegs

Es ist bekannt, dass der ATM/ATR-Signalweg durch DNA Doppelstrang-Brüche nach Bestrahlung aktiviert wird (Myers and Cortez 2006). Die Aktivierung des Signalwegs führt zum Stopp des Zellzyklus am G2/M-Kontrollpunkt, wodurch die Zellen nicht mehr in die Mitose gehen können (Jazayeri et al. 2006; Shiloh and Ziv 2013; Paull 2015). Somit können Schäden, welche während der Bestrahlung entstanden sind, repariert werden und werden nicht an die Tochterzellen vererbt (Hustedt and Durocher 2016; Chapman et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit ATM- oder ATR-Inhibitoren unter Bestrahlung zu einem unverminderten MI führt (Mladenov et al. 2019). Vivian Boron war es möglich in ihrer Bachelorarbeit nachzuweisen, dass die Behandlung mit ATMi und ATRi in SY5Y-Zellen, welche keine TrkA-Aktivierung aufwiesen, ebenfalls ein MI Level aufweisen, das mit unbestrahlten Zellen vergleichbar ist. Diese Ergebnisse konnten reproduziert werden und zudem war es möglich, auch in Kelly-Zellen mit konditionaler TrkA-Aktivierung durch die Behandlung mit ATMi und ATRi den Bestrahlungs-induzierten G2/M Kontrollpunkt auszuschalten. Zudem konnte in SKNAS Zellen, welche eine ATR-Mutation tragen, gezeigt werden, dass TrkA Aktivierung in diesen Zellen nicht zu einem erhöhten MI nach Bestrahlung führt. Zusätzlich war bekannt, dass inaktives ATR zu einem defekten Zellzyklus Kontrollpunkt in Zellen führt (Cliby et al. 1998). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Veränderungen des ATM/ATR-Signalwegs auf Protein-Ebene untersucht. Es konnte eine Reduktion des p-ATM Levels durch TrkA-Aktivierung nachgewiesen werden, jedoch auch eine erhöhte Phosphorylierung von ATR. Es konnte in der Vergangenheit bei Patienten mit Ataxia telangiectasia (AT), welche eine rezessive vererbte Mutation des ATM-Gens aufweisen (Savitsky et al. 1995), gezeigt werden, dass bestrahlte AT-Zellen in der G2-Phase ungehindert in die Mitose übergehen können (Beamish et al. 1996). Zusammen mit der Erkenntnis, dass ATR durch die Hemmung der Replikation aktiviert werden kann (Smith et al. 2010) führt dies zur Hypothese, dass eine Hemmung der Phosphorylierung von ATM zu einem defekten G2/M-Kontrollpunkt führt. Jedoch sind nicht alle Zellen von dieser Hemmung gleich betroffen, wodurch ein Teil der Zellen in den Replikations-Arrest gehen, der wiederum ATR aktiviert. Diese These wird unterstützt von der Reduktion der Phosphorylierung von Chk1 und Chk2 unter Bestrahlung nach Aktivierung von TrkA. Allgemein ist Chk1 als *downstream target* von ATR bekannt, jedoch konnte belegt werden, dass Chk1 im Falle von DNA-Schäden ebenfalls von ATM phosphoryliert wird (Yang et al. 2003;

Ashwell et al. 2008). Zudem interagieren Chk1 und Chk2, wodurch es ebenfalls zu einer Hemmung von Chk1 kommen kann (Ronco et al. 2017). Des Weiteren konnten Veränderungen der CDC25 Level und deren Phosphorylierung nachgewiesen werden. CDC25A hat mit CDC25B und CDC25C Einfluss auf den Zellzyklus aktivierenden Cyclin-Cdk-Komplexe und sind dadurch die letzte regulierende Einheit des Zellzyklus. Es ist bekannt, dass CDC25A durch die Dephosphorylierung von Cyclin E und Cdk2 hauptsächlich für den G1/S-Kontrollpunkt verantwortlich ist (Brenner et al. 2014). In den TrkA-aktivierten Neuroblastom Zellen konnte keine Veränderung von CDC25A nachgewiesen werden, zudem konnten keine Veränderungen in der S-Phase gemessen werden. Jedoch konnte ein erhöhter CDC25B Spiegel im Western Blot visualisiert werden. CDC25B ist ein unstabiles Protein und wird während der späten S-Phase und frühen G2-Phase akkumuliert (Nishijima et al. 1997). Daher ist ein erhöhtes CDC25B Level für den Eintritt in die M-Phase notwendig (Lammer et al. 1998; Frazer and Young 2012). Die hier gezeigten Ergebnisse legen den Schluss nahe dass CDC25B-Stabilisierung unter Bestrahlung spezifisch für TrkA-aktivierten Zellen ist. Schlussendlich konnte eine Reduktion des CDC25C Levels und dessen Phosphorylierung nachgewiesen werden. CDC25C ist für die Dephosphorylierung von CDK1 verantwortlich, um die Mitose zu aktivieren. Dabei wird CDC25C an Ser216 von CDK1 phosphoryliert. Jedoch kann es durch die Phosphorylierung von Chk1/Chk2 an Ser216 gehemmt werden, da dies eine Andockstelle für 14-3-3 bildet, wodurch es in das Zytoplasma relokalisiert und abgebaut wird (Peng et al. 1997; Matsuoka et al. 1998; Sanchez et al. 1997). Diese Kenntnisse führen zu einer Hypothese, dass CDC25C CDK1 dephosphoryliert und anschließend abgebaut wird, wodurch es zu einem geringeren CDC25C Protein-Level kommt. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass CDC25C durch die Phosphorylierung an Thr48 während der Mitose ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel aufweist, sodass es zu einem geringeren CDC25C Protein-Level in der Western Blot Analyse kommt (Franckhauser et al. 2013; Peng et al. 1997). Beide Hypothesen würden das geringere CDC25C Protein-Level erklären. Zusammenfassend kann man aus diesen Untersuchungen der ATM- und ATR-abhängigen Signalkaskaden geschlossen werden, dass TrkA-Aktivierung direkt oder indirekt zur Hemmung der ATM-Phosphorylierung beiträgt. Durch die TrkA-vermittelte Hemmung des ATM-abhängigen DNA-Schadenssignalwegs wird der G2/M-Kontrollpunkt ausgeschaltet, was nach Stabilisierung von CDC25B den Eintritt in die Mitose ermöglicht.

8.4 G2/M-Kontrollpunkt Defekt ist kein Tyrosin-Kinase-Rezeptor Phänotyp

TrkA ist eine prototypische Rezeptor-Tyrosin-Kinase, bei der die Bindung eines Liganden (NGF) zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten führt. Typischerweise sind Tyrosin-Kinase-Rezeptoren wie TrkA- oder der EGF-Rezeptor (EGFR) wichtige Schaltstellen, welche die Proliferation von normalen und malignen Zellen regulieren. In Säugetierzellen ist für die Mitose aktiviertes EGFR erforderlich (Walker et al. 2007). Um nachzuvollziehen, ob EGFR ebenfalls unter Bestrahlung einen Einfluss auf den G2/M-Kontrollpunkt hat, oder ob es sich um einen TrkA spezifischen Phänotyp handelt, wurde der MI von A549 und H1975 Lungenkarzinomzellen mit EGFR-Aktivierung unter Bestrahlung analysiert. Meine Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass durch die Bindung von EGF an den Rezeptor kein erhöhter MI nach Bestrahlung gemessen werden konnte. Dies spricht gegen die Hypothese, dass Tyrosin-Kinase-Rezeptoren einen generellen Einfluss auf den Zellzyklus Kontrollpunkt haben. In den konstitutiv EGFR-aktivierten Zellen H1975 konnte zwar ein residualer MI um die 20% nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Allerdings wiesen auch unbestrahlte H1975 Zellen bereits einen höheren MI, z.B. im Vergleich zu den A549 Zellen auf. Möglicherweise wird die Proliferation hier durch andere Faktoren und pro-proliferative Signalwege zusätzlich aktiviert.

8.5 TrkB führt zu einem gesteigerten Überleben unter Bestrahlung

Neuroblastome mit einer Überexpression von TrkB haben ein höheres Rezidiv-Risiko und eine schlechte Prognose (Brodeur 2003), welche durch Strahlentherapie oder Chemotherapie nur bedingt verbessert werden konnte. Es ist bekannt, dass TrkB-Phosphorylierung zur Aktivierung autokriner Signalwege führt, welche Invasion, Metastasen und Angiogenese steuern (Jaboin et al. 2002; Nakagawara et al. 1994; Acheson et al. 1995; Matsumoto et al. 1995; Nakamura et al. 2006). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass TrkB einen Einfluss auf die Chemotherapie-Resistenz in SY5Y Neuroblastom- Zellen hat (Hua et al. 2016; Jaboin et al. 2002; Schulte et al. 2005). Auch wurden in Zellen im Hippocampus mit TrkB-Aktivierung erhöhte antioxidative Kapazität nachgewiesen, welche einen Einfluss im erwachsenen Hirn auf den Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) haben (Huang and McNamara 2012). Dies ist einer der Mechanismen, mit denen TrkB in physiologischem Kontext

neuroprotektiv wirkt. Basierend auf diesem Wissen wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit TrkB ebenfalls einen Einfluss auf die Strahlentherapie-Resistenz aufweist. Mit Hilfe des MTT-Tests konnte die Proliferation gemessen werden, wodurch auf das Kurzzeitüberleben geschlossen werden kann. Es konnte belegt werden, dass Zellen mit einer konstitutiven oder induzierten TrkB-Überexpression eine höhere Überlebensrate nach Bestrahlung auswiesen. Zudem konnte auch in Koloniebildungs-Tests ein signifikant besseres Langzeitüberleben und -Proliferation durch aktiviertes TrkB nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass TrkB-Aktivierung zur Strahlenresistenz in Neuroblastom-Zellen führt, wurde dadurch unterstützt, dass nach Behandlung mit dem Trk-Inhibitor LOXO 101 den Verlust des Überlebensvorteils zur Folge hatte. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden daher untersucht ob die TrkB-abhängigen Signalwege zur TrkB-vermittelten Strahlenresistenz beitragen.

8.6 Inhibition des PI3K-Signalwegs reduziert TrkB-vermittelte Strahlenresistenz

TrkB aktiviert als Teil der Neurotrophin-Rezeptor Familie drei verschiedene Signalwege, den MEK/ERK-Signalweg (van Groningen et al.), den PI3K-Signalweg und den PLC- γ 1-Signalweg (Penault-Llorca et al. 2019; Nakagawara 2001; Amatu et al. 2016; Kaplan and Miller 2000; Pawson and Nash 2000). Es ist bekannt, dass die Aktivierung des PI3K-Signalweges zur vermehrten Expression von überlebensfördernden Proteinen führt. Zudem konnte gezeigt werden, dass TrkB-assoziierte Chemoresistenz durch die Aktivierung des PI3K-Signalweges induziert wird (Hua et al. 2016; Jaboin et al. 2002). Daher wurden alle drei Signalwege auf ihren Beitrag zur TrkB-vermittelten Strahlenresistenz untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Inhibitoren behandelt, welche jeweils spezifisch für einen der drei Signalwege war. Es konnte gezeigt werden, dass nur PI3K-Inhibition in Zellen mit aktiviertem TrkB den Überlebensvorteil nach Bestrahlung reduzierte. Dadurch kann die Hypothese aufgestellt werden, dass TrkB über den PI3K-Signalweg Einfluss auf die Strahlenresistenz hat. Diese These sollte jedoch weiter auf Protein-Ebene untersucht werden und es sollte nachgewiesen werden, durch welche *downstream* Signalwege vom PI3K-Signalweg es zur erhöhten Strahlenresistenz kommt.

8.7 Morphologische Veränderung und Induktion von EMT-Proteinen nach TrkB-Aktivierung

TrkB hat während der neuronalen Entwicklung Einfluss auf Plastizität und das Überleben neuronaler Zellen (Tejeda and Diaz-Guerra 2017). Zusätzlich konnte bereits nachgewiesen werden, dass TrkB-Aktivierung zu einem erhöhten Zeb1 Level in Epithelzellen von Ratten führt (Smit and Peeper 2011a). In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass TrkB EMT induzieren und Resistenz gegenüber Anoikis vermitteln kann (Smit and Peeper 2011b). Zeb1 ist nachweislich in EMT involviert und korreliert in verschiedenen Tumortypen mit schlechter Prognose (Aigner et al. 2007b; Aigner et al. 2007a; Adachi et al. 2009; Bendoraite et al. 2010). In kolorektalen Karzinomen konnte ein hohes TrkB Level ebenfalls mit schlechter Prognosen und der Induktion von EMT in Verbindung gebracht werden (Fujikawa et al. 2012). Da eine TrkB-Aktivierung in Neuroblastomzellen morphologisch unter dem Mikroskop mit einem Verlust der Polarität einhergeht, was ein Zeichen für EMT sein kann, wurden die Protein-Expression für die EMT-Marker Zeb1, Vimentin und Snail untersucht. Konditionale Aktivierung von TrkB führen zu deutlich erhöhter Zeb1- und Vimentin-Expression und dies war auch bei Bestrahlung mit bis zu 6Gy nachweisbar. In konstitutiv TrkB-exprimierenden Zellen konnten diese Veränderungen im Zeb1 Level nicht gemessen werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass konstitutiv TrkB exprimierende Zellen TrkB-Autophosphorylierung aufweisen. In diesem Fall kommt es unabhängig von Liganden-Bindung zu TrkB-Dimerisierung und Aktivierung, die ebenfalls als leichte Bande im Western Blot nachgewiesen werden konnte. Diese geringfügige dauerhafte Aktivierung dazu beitragen, dass sich die konstitutiv TrkB-exprimierenden Zellen in Kultur verändern und somit auch Einfluss auf das Zeb1 Level haben. In jedem Fall zeigen die Ergebnisse im konditionalen Modell, dass TrkB Aktivierung in Neuroblastom-Zellen Zeb1-Expression und weitere EMT-Marker induziert, was wiederum mit einer erhöhten Bestrahlungsresistenz einhergeht. Diese Hypothese wurde unterstützt durch die Ergebnisse der MTTs, in denen Zeb1 durch siRNA ausgeschaltet wurde, was zur Reduktion der Strahlenresistenz führte. Zudem ist es denkbar, dass TrkB Zeb1 über den PI3K-Signalweg reguliert, da die Aktivierung des PI3K Signalwegs ebenfalls zu EMT und Metastasierung beitragen kann (Douma et al. 2004). Des Weiteren wurde EMT auch als möglicher Resistenzmechanismus bei Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika festgestellt (Du and Shim 2016).

Als Zusammenfassung der Ergebnisse ergibt sich, dass eine Strahlenresistenz infolge von TrkB-Aktivierung über die Aktivierung des PI3K Signalwegs und die Induktion von Zeb1 mit nachfolgendem Übergang zu einer mesenchymalen Morphologie erklärt werden kann.

9 Ausblick

Die grundlegenden Unterschiede in der genomischen Stabilität zwischen Neuroblastomen, die entweder den Neurotrophinrezeptor TrkA oder den Gegenspieler TrkB exprimieren, sind nach wie vor weitgehend ungeklärt. Ein wesentlicher Befund dieser Arbeit ist, dass Zellen mit einer Aktivierung von TrkA nach Bestrahlung den G2/M-Kontrollpunkt durch Hemmung des ATM-Signalwegs inaktivieren und in die Mitose übergehen. In Folgeexperimenten könnte man nun den Einfluss der Hemmung des G2/M Kontrollpunkts auf die Genomstabilität und Chromatinstruktur nachvollziehen, um z.B. mitotische Katastrophen oder andere Indikatoren fehlerhafter Zellteilung bei vorhandenen DNA-Schäden zu analysieren. Es wäre interessant zu untersuchen, inwieweit diese *in vitro* Befunde die genomische Instabilität TrkA-exprimierender Neuroblastome erklären könnten.

Untersuchungen an Zellen mit konditionaler TrkB Überexpression zeigten, dass TrkB-Aktivierung zu einer erhöhten Strahlenresistenz führt, die von einer epithelialen-zu-mesenchymalen Transition (EMT) begleitet wird. Dabei konnte einer der Schlüsselfaktoren für EMT, ZEB1, als TrkB-Target bestätigt werden. In weiteren Experimenten könnte man detaillierter die TrkB-vermittelte Regulation von ZEB1 untersuchen. So legen präliminäre Daten eine Beteiligung des PI3K-Signalwegs hierbei nahe. Zudem würde es sich anbieten, das mit TrkB/ZEB1-assoziierte Langzeitüberleben und die Induktion von Anoikis in Abhängigkeit von Bestrahlung zu testen. Auch wäre interessant zu untersuchen, ob der Prozess der EMT reversibel ist und durch TrkB-Inhibition eventuell eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) und somit Sensibilisierung gegenüber Strahlentherapie möglich ist. Im Sinne einer translationalen Fragestellung wäre es auch wichtig, den Effekt fraktionierter Bestrahlung in Abhängigkeit von TrkB zu prüfen.

Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor, der sich im sympathischen Nervensystem entwickelt. Es ist der am häufigsten vorkommende solide Tumor im Kindesalter und ist verantwortlich für 15% der Krebstode im Kindesalter, obwohl er nur 8-10% aller Malignome ausmacht. Durch genetische Analysen von Neuroblastomen konnten zwei Subtypen identifiziert werden, die sich unter anderem durch die Expression der Neurotrophinrezeptoren, TrkA und TrkB, unterscheiden. Der erste Subtyp zeichnete sich durch gute Prognosen und eine TrkA-Überexpression aus. Der zweite Typ weist eine hohe TrkB-Expression auf und korreliert mit schlechten Prognosen und Behandlungsresistenzen. In dieser Arbeit sollte der Effekt von TrkA- und TrkB-Überexpression auf Neuroblastom-Zellen unter Bestrahlung untersucht werden.

Basierend auf Ergebnissen auf früheren Studien gab es Hinweise, dass TrkA-überexprimierende und aktivierende Zellen einen dysfunktionalen G2/M-Kontrollpunkt zeigten, der durch einen erhöhten mitotischen Index nach Bestrahlung mit 1 Gy in der Neuroblastom Zelllinien SY5Y nachgewiesen wird. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls in der Neuroblastom Zelllinie Kelly mit einer konditionalen TrkA-Überexpression reproduziert werden. Zudem konnte der gleiche Phänotyp durch die Behandlung mit ATM/ATR-Inhibitoren erzielt werden. Dies führte zu der Hypothese, dass der ATM/ATR-regulierte DNA-Schadenssignalweg an den TrkA-vermittelten Effekten beteiligt sein könnte. Die Untersuchung des Phosphorylierungsniveaus des ATR/ATM-abhängigen DNA-Schadenssignalwegs bestätigte, dass die TrkA-Aktivierung zu einer geringeren Phosphorylierung von ATM und Chk1 nach Bestrahlung mit 1 Gy führt, ohne die Expressionsniveaus der beteiligten Proteine zu beeinflussen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass TrkA-Aktivierung den G2/M-Kontrollpunkt durch die Hemmung des ATM/ATR-Signalwegs nach Bestrahlung blockiert, wodurch es zu einem kurzzeitigen Überlebensvorteil kommt.

Im Gegensatz dazu wurden bei Überexpression und Aktivierung von TrkB keine Änderungen in der Zellzyklusverteilung festgestellt. Zellen mit TrkB-Überexpression und -Aktivierung zeigten jedoch bei Bestrahlung ein erhöhtes Langzeit- und Kurzzeitüberleben, das durch Behandlung mit einem Trk-Inhibitor aufgehoben werden konnte. Die Hemmung bekannter Signalwege von TrkB deutet auf eine Beteiligung des PI3K-Signalwegs an der Modulation der TrkB-abhängigen Strahlenresistenz hin. Zudem legen die Daten nahe, dass aktives TrkB zu einer Hochregulation von ZEB1

und nachfolgend zu mesenchymaler Transition (EMT) führt, welche durch ZEB1 vermittelt wird. Die EMT führt zu einer höheren Strahlenresistenz, und Zellen mit reduzierten Zeb1/EMT zeigen sich sensitiver für Bestrahlung. Diese experimentellen Daten zeigen, dass sowohl TrkA als auch TrkB entlang kanonischer und nicht-kanonischer Signalwege Modulatoren der Strahlungsantwort in Neuroblastomzellen sind.

Abstract

Neuroblastoma (NB) is a malignant tumor in the sympathetic nervous system. It is the most common solid tumor in childhood accounting for 8-10% of all malignancies and is responsible for 15% of childhood cancer deaths. Genomic analyzes previously revealed two subtypes of neuroblastoma characterized, among other, by differential expression of neurotrophin receptors, TrkA and TrkB. The first subtype is characterized by good prognoses and TrkA overexpression. The second type associates with high TrkB expression and is correlated with poor prognoses and treatment resistance. As irradiation is a common treatment modality in neuroblastoma, this thesis, focused on the effect of TrkA and TrkB overexpression and activation on the radiation response in neuroblastoma cells.

Previous studies of our group indicated that TrkA overexpressing and activating cells have a dysfunctional G2/M-checkpoint, which was shown by a higher mitotic index after irradiation with 1 Gy in SY5Y neuroblastoma cells. This phenotype was reproduced in Kelly cells upon conditional TrkA overexpression and activation. In addition, ATM or ATR inhibition recapitulated the effect on the G2/M checkpoint. This led to the hypothesis that the ATM/ATR-regulated DNA-damage-pathway could be involved in TrkA-mediated radiation responses. Further investigations could show that the phosphorylation of ATM and Chk1 is downregulated by TrkA activation in cells irradiated with 1 Gy. Consequently, TrkA activation leads to a defect G2/M-checkpoints through blocking the ATM/ATR-signaling pathway upon IR.

In contrast, the overexpression and activation of TrkB had no effect on the cell cycle but enhanced both short- and long-term survival under irradiation. This effect could be abrogated by pre-incubation of cells with a Trk-inhibitor, LOXO101, prior to irradiation. Inhibition of canonical downstream-signaling pathways of TrkB indicated that the PI3K-signaling-pathway was crucially involved in modulation the radiation response and cell survival upon irradiation. In addition, the data suggested that TrkB activated cells undergo a mesenchymal transition (EMT), which correlated with TrkB-dependent upregulation of the EMT-activator, Zeb1. EMT was shown to enhance radiation resistance and siRNA-mediated downregulation of Zeb1 partially abrogated this effect. Our data show that both TrkA and TrkB modulate the radiation response by canonical and non-canonical pathway activation.

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinasen B
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ARID1A	AT-rich Interactive Domain-Containing Protein 1A
ARRID1B	AT-rich Interactive Domain-Containing Protein 1B
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
ATRIP	ATR Interacting Protein
BAD	Bcl-2-antagonist of cell death
BARD1	BRCA1 Associated RING Domain 1
BCA	Bicinchoninsäure
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BSA	Rinderserumalbumin
CaM-Kinasen	Calmodulin-abhängige Proteinkinasen
CaRF	Ca ²⁺ -Reaktionsfaktor
CDC25A/B/C	cell division cycle 25A/B/C
CDK1	Cyclin Dependent Kinase 1
CDK2	Cyclin Dependent Kinase 2
cDNA	komplementäre DNA
Chk1	Checkpoint Kinase 1
Chk2	Checkpoint Kinase 2
CREB	AMP-Antwortelement-Bindungsprotein
Ct-Wert	Cycle Schwellenwert
DAG	Diacylglycerine
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DM	double minutes
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DRG	dorsalen Wurzelganglien
DSBs	Doppelstrangbrüchen
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
Erk1	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1
Erk2	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 2
FDA	Food and Drug Administration
FRK	Forkhead family transcription factor
Gab1	Grb2-assoziiertes-Bindungsprotein 1
Grb2	Wachstumsfaktor-Rezeptor-Bindungsprotein 2
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase 3 β
H3pS10	Serin 10 des Histons H3
HR	homologe Rekombination
HRP	Meerrettichperoxidase

HSR.....	<i>homogeneously staining regions</i>
IDRFs.....	<i>image-defined risk factors</i>
Ig2.....	<i>Immunglobulin-artigen</i>
INRGSS.....	<i>Internationales Neuroblastoma Risiko Gruppen Einstuffungs System</i>
INSS.....	<i>Internationales Neuroblastoma Einstufungs System</i>
IP3.....	<i>Inositol-tris-phosphat</i>
IR.....	<i>Ionisierende Strahlung</i>
JAK.....	<i>Janus Kinase</i>
LET.....	<i>linearen Energie Transfer</i>
LIN28B.....	<i>Lin-28 Homolog B</i>
LMO1.....	<i>LIM Domain Only 1</i>
MAPK.....	<i>mitogenaktivierte Proteinkinasen</i>
MASC.....	<i>mammary analogue secretory carcinoma</i>
MIBG.....	<i>Methyljodbenzylguanidin</i>
mRNA.....	<i>messenger RNA, messenger RNA</i>
NB.....	<i>Neuroblastom</i>
NF- κ B.....	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NGF.....	<i>Nervenwachstumsfaktor</i>
NHEJ.....	<i>nicht homologe Endverknüpfung</i>
NT-3.....	<i>Neurotrophin-3, Neurotrophin-3</i>
NT-4/5.....	<i>Neurotrophine-4/5, Neurotrophin-4/5</i>
NTRK.....	<i>Neurotrophin Rezeptoren</i>
p38MAPK.....	<i>p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen</i>
p75 ^{NTR}	<i>Pan-Neurotrophin-Rezeptor p75, Neurotrophin-Rezeptor p75</i>
Parp.....	<i>Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase</i>
PBS.....	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR.....	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PE.....	<i>Plating efficiency</i>
PHOX2B.....	<i>Paired-like homeobox 2b</i>
PI.....	<i>Propidium Iodid</i>
PI3K.....	<i>Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase</i>
PKC.....	<i>Ca²⁺-Proteinkinase C</i>
PLC- γ 1.....	<i>Phospholipase C-γ1</i>
PTB.....	<i>Polypyrimidin-Trakt-Bindungsprotein</i>
PTPN11.....	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11</i>
Raf.....	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma, rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras.....	<i>Rat sarcoma</i>
Rho.....	<i>Rhodopsin</i>
RIPA.....	<i>Radioimmunpräzipitationsassaypuffer</i>
RNA.....	<i>Ribonukleinsäure</i>
ROS.....	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
RTK.....	<i>Rezeptor-Tyrosin-Kinasen</i>
RT-PCR.....	<i>4.2.7 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion</i>
SCA.....	<i>segmentale chromosomale Abnormitäten</i>
SF.....	<i>Surviving fraction</i>
SHP2.....	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2</i>
SOS.....	<i>son of sevenless</i>

STAT..... *Signal Transducer And Activator Of Transcription*
TET *Tetracyclin*
TKD..... *Alk-Tyrosinkinase-Domäne*
TNF *Tumor Nekrose Faktor*
TrkA..... *Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A*
TrkB..... *Tropomyosin-Rezeptor-Kinase B*
TrkC *Tropomyosin-Rezeptor-Kinase C*
ZNS..... *Zentralnervensystem*

Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15 (17):2177-2196.
- Acharya, S., S. Jayabose, S. J. Kogan, O. Tugal, D. Beneck, D. Leslie, and M. Slim. 1997. Prenatally diagnosed neuroblastoma. *Cancer* 80 (2):304-310.
- Acheson, A., J. C. Conover, J. P. Fandl, T. M. DeChiara, M. Russell, A. Thadani, S. P. Squinto, G. D. Yancopoulos, and R. M. Lindsay. 1995. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374 (6521):450-453.
- Ackermann, S., M. Cartolano, B. Hero, A. Welte, Y. Kahlert, A. Roderwieser, C. Bartenhagen, E. Walter, J. Gecht, L. Kerschke, R. Volland, R. Menon, J. M. Heuckmann, M. Gartlgruber, S. Hartlieb, K. O. Henrich, K. Okonechnikov, J. Altmüller, P. Nürnberg, S. Lefever, B. de Wilde, F. Sand, F. Ikram, C. Rosswog, J. Fischer, J. Theissen, F. Hertwig, A. D. Singhi, T. Simon, W. Vogel, S. Perner, B. Krug, M. Schmidt, S. Rahmann, V. Achter, U. Lang, C. Vokuhl, M. Ortman, R. Büttner, A. Eggert, F. Speleman, R. J. O'Sullivan, R. K. Thomas, F. Berthold, J. Vandesompele, A. Schramm, F. Westermann, J. H. Schulte, M. Peifer, and M. Fischer. 2018. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science* 362 (6419):1165-1170.
- Adachi, Y., T. Takeuchi, T. Nagayama, Y. Ohtsuki, and M. Furihata. 2009. Zeb1-mediated T-cadherin repression increases the invasive potential of gallbladder cancer. *FEBS Lett* 583 (2):430-436.
- Aid, T., A. Kazantseva, M. Piirsoo, K. Palm, and T. Timmusk. 2007. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85 (3):525-535.
- Aigner, K., B. Dampier, L. Descovich, M. Mikula, A. Sultan, M. Schreiber, W. Mikulits, T. Brabletz, D. Strand, P. Obrist, W. Sommergruber, N. Schweifer, A. Wernitznig, H. Beug, R. Foisner, and A. Eger. 2007a. The transcription factor ZEB1 (δ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 26 (49):6979-6988.
- Aigner, K., L. Descovich, M. Mikula, A. Sultan, B. Dampier, S. Bonné, F. van Roy, W. Mikulits, M. Schreiber, T. Brabletz, W. Sommergruber, N. Schweifer, A. Wernitznig, H. Beug, R. Foisner, and A. Eger. 2007b. The transcription factor ZEB1 (δ EF1) represses Plakophilin 3 during human cancer progression. *FEBS Lett* 581 (8):1617-1624.
- Aleem, E., and R. J. Arceci. 2015. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Front Cell Dev Biol* 3:16.
- Allen, S. J., G. K. Wilcock, and D. Dawbarn. 1999. Profound and selective loss of catalytic TrkB immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 264 (3):648-651.
- Amatu, A., A. Sartore-Bianchi, and S. Siena. 2016. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* 1 (2):e000023.
- Arevalo, J. C., B. Condeelis, B. L. Hempstead, M. V. Chao, D. Martin-Zanca, and P. Perez. 2000. TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* 20 (16):5908-5916.
- Ashwell, S., J. W. Janetka, and S. Zabludoff. 2008. Keeping checkpoint kinases in line: new selective inhibitors in clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* 17 (9):1331-1340.

- Aygun, N. 2018. Biological and Genetic Features of Neuroblastoma and Their Clinical Importance. *Curr Pediatr Rev* 14 (2):73-90.
- Ball, H. L., J. S. Myers, and D. Cortez. 2005. ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 16 (5):2372-2381.
- Banerjee, R., A. Ghosh, B. Ghosh, and A. Mondal. 2013. Role of NGF/TrkA signaling milieu in depressogenic induction of rat brain. *Al Ameen J Med Sci* 6:355-363.
- Barjaktarovic, Z., D. Schmaltz, A. Shyla, O. Azimzadeh, S. Schulz, J. Haagen, W. Dörr, H. Sarioglu, A. Schäfer, M. J. Atkinson, H. Zischka, and S. Tapio. 2011. Radiation-induced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to X-rays. *PLoS One* 6 (12):e27811.
- Barone, G., J. Anderson, A. D. J. Pearson, K. Petrie, and L. Chesler. 2013. New Strategies in Neuroblastoma: Therapeutic Targeting of MYCN and ALK. *Clinical Cancer Research* 19 (21):5814-5821.
- Beamish, H., R. Williams, P. Chen, and M. F. Lavin. 1996. Defect in multiple cell cycle checkpoints in ataxia-telangiectasia postirradiation. *J Biol Chem* 271 (34):20486-20493.
- Bendoraitte, A., E. C. Knouf, K. S. Garg, R. K. Parkin, E. M. Kroh, K. C. O'Briant, A. P. Ventura, A. K. Godwin, B. Y. Karlan, C. W. Drescher, N. Urban, B. S. Knudsen, and M. Tewari. 2010. Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: Evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition. *Gynecologic Oncology* 116 (1):117-125.
- Bentzen, S. M. 2006. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* 6 (9):702-713.
- Berger, S., U. M. Martens, and S. Bochum. 2018. Larotrectinib (LOXO-101). *Recent Results Cancer Res* 211:141-151.
- Bernier, J., E. J. Hall, and A. Giaccia. 2004. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer* 4 (9):737-747.
- Bernier, J., and P. M. Poortmans. 2016. Surgery and radiation therapy of triple-negative breast cancers: From biology to clinics. *Breast* 28:148-155.
- Bibel, M., and Y. A. Barde. 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14 (23):2919-2937.
- Blackford, A. N., and S. P. Jackson. 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell* 66 (6):801-817.
- Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu, and M. E. Greenberg. 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286 (5443):1358-1362.
- Bosse, K. R., S. J. Diskin, K. A. Cole, A. C. Wood, R. W. Schnepf, G. Norris, B. Nguyen le, J. Jagannathan, M. Laquaglia, C. Winter, M. Diamond, C. Hou, E. F. Attiyeh, Y. P. Mosse, V. Pineros, E. Dizin, Y. Zhang, S. Asgharzadeh, R. C. Seeger, M. Capasso, B. R. Pawel, M. Devoto, H. Hakonarson, E. F. Rappaport, I. Irminger-Finger, and J. M. Maris. 2012. Common variation at BARD1 results in the expression of an oncogenic isoform that influences neuroblastoma susceptibility and oncogenicity. *Cancer Res* 72 (8):2068-2078.
- Bower, K., C. E. Napier, S. L. Cole, R. A. Dagg, L. M. Lau, E. L. Duncan, E. L. Moy, and R. R. Reddel. 2012. Loss of wild-type ATRX expression in somatic cell hybrids segregates with activation of Alternative Lengthening of Telomeres. *PLoS One* 7 (11):e50062.
- Breit, S., and M. Schwab. 1989. Suppression of MYC by high expression of NMYC in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 24 (1):21-28.

- Brenner, A. K., H. Reikvam, A. Lavecchia, and Ø. Bruserud. 2014. Therapeutic targeting the cell division cycle 25 (CDC25) phosphatases in human acute myeloid leukemia--the possibility to target several kinases through inhibition of the various CDC25 isoforms. *Molecules* 19 (11):18414-18447.
- Brodeur, G. M. 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3 (3):203-216.
- Brodeur, G. M., and R. Bagatell. 2014. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol* 11 (12):704-713.
- Brodeur, G. M., J. E. Minturn, R. Ho, A. M. Simpson, R. Iyer, C. R. Varela, J. E. Light, V. Kolla, and A. E. Evans. 2009. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 15 (10):3244-3250.
- Brodeur, G. M., A. Nakagawara, D. J. Yamashiro, N. Ikegaki, X. G. Liu, C. G. Azar, C. P. Lee, and A. E. Evans. 1997. Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas. *J Neurooncol* 31 (1-2):49-55.
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis, and M. E. Greenberg. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96 (6):857-868.
- Brunet, A., S. R. Datta, and M. E. Greenberg. 2001. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11 (3):297-305.
- Brunet, A., F. Kanai, J. Stehn, J. Xu, D. Sarbassova, J. V. Frangioni, S. N. Dalal, J. A. DeCaprio, M. E. Greenberg, and M. B. Yaffe. 2002. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* 156 (5):817-828.
- Cantley, L. C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296 (5573):1655-1657.
- Capasso, M., M. Devoto, C. Hou, S. Asgharzadeh, J. T. Glessner, E. F. Attiyeh, Y. P. Mosse, C. Kim, S. J. Diskin, K. A. Cole, K. Bosse, M. Diamond, M. Laudenslager, C. Winter, J. P. Bradfield, R. H. Scott, J. Jagannathan, M. Garris, C. McConville, W. B. London, R. C. Seeger, S. F. Grant, H. Li, N. Rahman, E. Rappaport, H. Hakonarson, and J. M. Maris. 2009. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* 41 (6):718-723.
- Challis, G. B., and H. J. Stam. 1990. The spontaneous regression of cancer. A review of cases from 1900 to 1987. *Acta Oncol* 29 (5):545-550.
- Chao, M. V. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4 (4):299-309.
- Chapman, J. R., M. R. Taylor, and S. J. Boulton. 2012. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 47 (4):497-510.
- Chen, Y., J. Takita, Y. L. Choi, M. Kato, M. Ohira, M. Sanada, L. Wang, M. Soda, A. Kikuchi, T. Igarashi, A. Nakagawara, Y. Hayashi, H. Mano, and S. Ogawa. 2008. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455 (7215):971-974.
- Cliby, W. A., C. J. Roberts, K. A. Cimprich, C. M. Stringer, J. R. Lamb, S. L. Schreiber, and S. H. Friend. 1998. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *Embo j* 17 (1):159-169.
- Cocco, E., M. Scaltriti, and A. Drilon. 2018. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 15 (12):731-747.
- Coco, S., J. Theissen, P. Scaruffi, S. Stigliani, S. Moretti, A. Oberthuer, F. Valdora, M. Fischer, F. Gallo, B. Hero, S. Bonassi, F. Berthold, and G. P. Tonini. 2012. Age-

- dependent accumulation of genomic aberrations and deregulation of cell cycle and telomerase genes in metastatic neuroblastoma. *Int J Cancer* 131 (7):1591-1600.
- Cohen, S. 1960. PURIFICATION OF A NERVE-GROWTH PROMOTING PROTEIN FROM THE MOUSE SALIVARY GLAND AND ITS NEURO-CYTOTOXIC ANTISERUM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 46 (3):302-311.
- Cole, W. H., and T. C. Everson. 1956. Spontaneous regression of cancer: preliminary report. *Ann Surg* 144 (3):366-383.
- Corbit, K. C., D. A. Foster, and M. R. Rosner. 1999. Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 19 (6):4209-4218.
- Cunningham, M. E., and L. A. Greene. 1998. A function-structure model for NGF-activated TRK. *Embo j* 17 (24):7282-7293.
- Datta, S. R., A. Brunet, and M. E. Greenberg. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13 (22):2905-2927.
- Datta, S. R., A. Katsov, L. Hu, A. Petros, S. W. Fesik, M. B. Yaffe, and M. E. Greenberg. 2000. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6 (1):41-51.
- Davidson, B., R. Reich, P. Lazarovici, V. Ann Florenes, S. Nielsen, and J. M. Nesland. 2004. Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 83 (2):119-128.
- De Bernardi, B., V. Mosseri, H. Rubie, V. Castel, A. Foot, R. Ladenstein, G. Laureys, M. Beck-Popovic, A. F. de Lacerda, A. D. Pearson, J. De Kraker, P. F. Ambros, Y. de Rycke, M. Conte, P. Bruzzi, and J. Michon. 2008. Treatment of localised resectable neuroblastoma. Results of the LNESG1 study by the SIOP Europe Neuroblastoma Group. *Br J Cancer* 99 (7):1027-1033.
- de Kraker, J., K. A. Hoefnagel, A. C. Verschuur, B. van Eck, H. M. van Santen, and H. N. Caron. 2008. Iodine-131-metaiodobenzylguanidine as initial induction therapy in stage 4 neuroblastoma patients over 1 year of age. *Eur J Cancer* 44 (4):551-556.
- Depamphilis, M., C. de Renty, Z. Ullah, and C. Lee. 2012. "The Octet": Eight Protein Kinases that Control Mammalian DNA Replication. *Frontiers in physiology* 3:368.
- Diskin, S. J., M. Capasso, R. W. Schnepf, K. A. Cole, E. F. Attiyeh, C. Hou, M. Diamond, E. L. Carpenter, C. Winter, H. Lee, J. Jagannathan, V. Latorre, A. Iolascon, H. Hakonarson, M. Devoto, and J. M. Maris. 2012. Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nat Genet* 44 (10):1126-1130.
- Douma, S., T. van Laar, J. Zevenhoven, R. Meuwissen, E. van Garderen, and D. S. Peeper. 2004. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 430 (7003):1034-1039.
- Drilon, A., G. Li, S. Dogan, M. Gounder, R. Shen, M. Arcila, L. Wang, D. M. Hyman, J. Hechtman, G. Wei, N. R. Cam, J. Christiansen, D. Luo, E. C. Maneval, T. Bauer, M. Patel, S. V. Liu, S. H. Ou, A. Farago, A. Shaw, R. F. Shoemaker, J. Lim, Z. Hornby, P. Multani, M. Ladanyi, M. Berger, N. Katabi, R. Ghossein, and A. L. Ho. 2016. What hides behind the MASC: clinical response and acquired resistance to entrectinib after ETV6-NTRK3 identification in a mammary analogue secretory carcinoma (MASC). *Ann Oncol* 27 (5):920-926.
- Du, B., and J. S. Shim. 2016. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* 21 (7).

- Eggert, A., M. A. Grotzer, N. Ikegaki, X. G. Liu, A. E. Evans, and G. M. Brodeur. 2002. Expression of the neurotrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cancer Res* 62 (6):1802-1808.
- Eggert, A., M. A. Grotzer, T. J. Zuzak, B. R. Wiewrodt, R. Ho, N. Ikegaki, and G. M. Brodeur. 2001. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res* 61 (4):1314-1319.
- Eggert, A., N. Ikegaki, X. Liu, T. T. Chou, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, and G. M. Brodeur. 2000. Molecular dissection of TrkA signal transduction pathways mediating differentiation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 19 (16):2043-2051.
- Emdal, K. B., A. K. Pedersen, D. B. Bekker-Jensen, K. P. Tsafou, H. Horn, S. Lindner, J. H. Schulte, A. Eggert, L. J. Jensen, C. Francavilla, and J. V. Olsen. 2015. Temporal proteomics of NGF-TrkA signaling identifies an inhibitory role for the E3 ligase Cbl-b in neuroblastoma cell differentiation. *Sci Signal* 8 (374):ra40.
- Ernsberger, U. 2009a. Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell and tissue research* 336 (3):349-384.
- Ernsberger, U. 2009b. Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell and tissue research* 336 (3):349-384.
- Ernst, C., V. Deleva, X. Deng, A. Sequeira, A. Pomarenski, T. Klempan, N. Ernst, R. Quirion, A. Gratton, M. Szyf, and G. Turecki. 2009. Alternative splicing, methylation state, and expression profile of tropomyosin-related kinase B in the frontal cortex of suicide completers. *Arch Gen Psychiatry* 66 (1):22-32.
- Evans, A. E., K. D. Kisselbach, X. Liu, A. Eggert, N. Ikegaki, A. M. Camoratto, C. Dionne, and G. M. Brodeur. 2001. Effect of CEP-751 (KT-6587) on neuroblastoma xenografts expressing TrkB. *Med Pediatr Oncol* 36 (1):181-184.
- Evans, A. E., K. D. Kisselbach, D. J. Yamashiro, N. Ikegaki, A. M. Camoratto, C. A. Dionne, and G. M. Brodeur. 1999. Antitumor activity of CEP-751 (KT-6587) on human neuroblastoma and medulloblastoma xenografts. *Clin Cancer Res* 5 (11):3594-3602.
- Everson, T. C. 1964. SPONTANEOUS REGRESSION OF CANCER. *Ann N Y Acad Sci* 114:721-735.
- Falck, J., J. Coates, and S. P. Jackson. 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434 (7033):605-611.
- Fei, P., and W. S. El-Deiry. 2003. P53 and radiation responses. *Oncogene* 22 (37):5774-5783.
- Feinendegen, L. E. 2002. Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Hum Exp Toxicol* 21 (2):85-90.
- Fenner, M. E., C. L. Achim, and B. M. Fenner. 2014. Expression of full-length and truncated trkB in human striatum and substantia nigra neurons: implications for Parkinson's disease. *J Mol Histol* 45 (3):349-361.
- Ferrer, I., C. Marin, M. J. Rey, T. Ribalta, E. Goutan, R. Blanco, E. Tolosa, and E. Marti. 1999. BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol Exp Neurol* 58 (7):729-739.
- Franckhauser, C., A. Fernandez, and N. J. Lamb. 2013. Purification and biochemical analysis of catalytically active human cdc25C dual specificity phosphatase. *Biochimie* 95 (7):1450-1461.
- Frazer, C., and P. Young. 2012. Protein Phosphorylation in Human Health.

- Friedman, W. J., and L. A. Greene. 1999. Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res* 253 (1):131-142.
- Fujikawa, H., K. Tanaka, Y. Toiyama, S. Saigusa, Y. Inoue, K. Uchida, and M. Kusunoki. 2012. High TrkB expression levels are associated with poor prognosis and EMT induction in colorectal cancer cells. *J Gastroenterol* 47 (7):775-784.
- Gatta, G., L. Botta, S. Rossi, T. Aareleid, M. Bielska-Lasota, J. Clavel, N. Dimitrova, Z. Jakab, P. Kaatsch, B. Lacour, S. Mallone, R. Marcos-Gragera, P. Minicozzi, M. J. Sánchez-Pérez, M. Sant, M. Santaquilani, C. Stiller, A. Tavilla, A. Trama, O. Visser, and R. Peris-Bonet. 2014. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EURO CARE-5--a population-based study. *Lancet Oncol* 15 (1):35-47.
- George, R. E., T. Sanda, M. Hanna, S. Fröhling, W. Luther, 2nd, J. Zhang, Y. Ahn, W. Zhou, W. B. London, P. McGrady, L. Xue, S. Zozulya, V. E. Gregor, T. R. Webb, N. S. Gray, D. G. Gilliland, L. Diller, H. Greulich, S. W. Morris, M. Meyerson, and A. T. Look. 2008. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 455 (7215):975-978.
- Ghosh, A., J. Carnahan, and M. E. Greenberg. 1994. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263 (5153):1618-1623.
- Goldschneider, D., and P. Mehlen. 2010. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29 (13):1865-1882.
- Good, J. S., and K. J. Harrington. 2013. The hallmarks of cancer and the radiation oncologist: updating the 5Rs of radiobiology. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 25 (10):569-577.
- Goodman, M., J. Gurney, M. Smith, and A. Olshan. 1999. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. *Bethesda: National Cancer Institute, SEER Program*.
- Gudkov, A. V., and E. A. Komarova. 2003. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 3 (2):117-129.
- Gunn-Moore, F. J., A. G. Williams, and J. M. Tavaré. 1997. Analysis of mitogen-activated protein kinase activation by naturally occurring splice variants of TrkC, the receptor for neurotrophin-3. *The Biochemical journal* 322 (Pt 1) (Pt 1):193-198.
- Harada, S., G. L. Esch, M. Holgado-Madruga, and A. J. Wong. 2001. Grb-2-associated binder-1 is involved in insulin-induced egr-1 gene expression through its phosphatidylinositol 3'-kinase binding site. *DNA Cell Biol* 20 (4):223-229.
- Harada, T., Y. Yatabe, M. Takeshita, T. Koga, T. Yano, Y. Wang, and G. Giaccone. 2011. Role and relevance of TrkB mutations and expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 17 (9):2638-2645.
- Harper, J. W., and S. J. Elledge. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28 (5):739-745.
- Hero, B., T. Simon, R. Spitz, K. Ernestus, A. K. Gnekow, H. G. Scheel-Walter, D. Schwabe, F. H. Schilling, G. Benz-Bohm, and F. Berthold. 2008. Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression: results of the prospective trials NB95-S and NB97. *J Clin Oncol* 26 (9):1504-1510.
- Hetman, M., J. E. Cavanaugh, D. Kimelman, and Z. Xia. 2000. Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20 (7):2567-2574.
- Hetman, M., and Z. Xia. 2000. Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60 (4):531-545.

- Hiyama, E., K. Hiyama, T. Yokoyama, Y. Matsuura, M. A. Piatyszek, and J. W. Shay. 1995. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1 (3):249-255.
- Hua, Z., X. Gu, Y. Dong, F. Tan, Z. Liu, C. J. Thiele, and Z. Li. 2016. PI3K and MAPK pathways mediate the BDNF/TrkB-increased metastasis in neuroblastoma. *Tumour Biol* 37 (12):16227-16236.
- Huang, E. J., and L. F. Reichardt. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- . 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- Huang, Y. Z., and J. O. McNamara. 2012. Neuroprotective effects of reactive oxygen species mediated by BDNF-independent activation of TrkB. *J Neurosci* 32 (44):15521-15532.
- Hubenak, J. R., Q. Zhang, C. D. Branch, and S. J. Kronowitz. 2014. Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plast Reconstr Surg* 133 (1):49e-56e.
- Huber, S. M., L. Butz, B. Stegen, D. Klumpp, N. Braun, P. Ruth, and F. Eckert. 2013. Ionizing radiation, ion transports, and radioresistance of cancer cells. *Front Physiol* 4:212.
- Hustedt, N., and D. Durocher. 2016. The control of DNA repair by the cell cycle. *Nat Cell Biol* 19 (1):1-9.
- Iliakis, G., E. Mladenov, and V. Mladenova. 2019. Necessities in the Processing of DNA Double Strand Breaks and Their Effects on Genomic Instability and Cancer. *Cancers (Basel)* 11 (11).
- Indo, Y. 2014. Neurobiology of pain, interoception and emotional response: lessons from nerve growth factor-dependent neurons. *Eur J Neurosci* 39 (3):375-391.
- Irwin, M. S., and J. R. Park. 2015. Neuroblastoma: paradigm for precision medicine. *Pediatr Clin North Am* 62 (1):225-256.
- Iyer, R., C. R. Varela, J. E. Minturn, R. Ho, A. M. Simpson, J. E. Light, A. E. Evans, H. Zhao, K. Thress, J. L. Brown, and G. M. Brodeur. 2012. AZ64 inhibits TrkB and enhances the efficacy of chemotherapy and local radiation in neuroblastoma xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol* 70 (3):477-486.
- Jaboin, J., C. J. Kim, D. R. Kaplan, and C. J. Thiele. 2002. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res* 62 (22):6756-6763.
- Jackson, S. P., and J. Bartek. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461 (7267):1071-1078.
- Janoueix-Lerosey, I., D. Lequin, L. Brugières, A. Ribeiro, L. de Pontual, V. Combaret, V. Raynal, A. Puisieux, G. Schleiermacher, G. Pierron, D. Valteau-Couanet, T. Frebourg, J. Michon, S. Lyonnet, J. Amiel, and O. Delattre. 2008. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455 (7215):967-970.
- Jazayeri, A., J. Falck, C. Lukas, J. Bartek, G. C. Smith, J. Lukas, and S. P. Jackson. 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8 (1):37-45.
- Jin, W. 2020. Regulation of BDNF-TrkB Signaling and Potential Therapeutic Strategies for Parkinson's Disease. *J Clin Med* 9 (1).
- Jing, S., P. Tapley, and M. Barbacid. 1992. Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 9 (6):1067-1079.
- Kam, W. W., and R. B. Banati. 2013. Effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free Radic Biol Med* 65:607-619.

- Kaplan, D. R., B. L. Hempstead, D. Martin-Zanca, M. V. Chao, and L. F. Parada. 1991. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252 (5005):554-558.
- Kaplan, D. R., and F. D. Miller. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10 (3):381-391.
- Klein, R., S. Q. Jing, V. Nanduri, E. O'Rourke, and M. Barbacid. 1991. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65 (1):189-197.
- Kogner, P., G. Barbany, C. Dominici, M. A. Castello, G. Raschellá, and H. Persson. 1993. Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* 53 (9):2044-2050.
- Krishnan, V., and E. J. Nestler. 2010. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *Am J Psychiatry* 167 (11):1305-1320.
- Kumar, V., M. X. Zhang, M. W. Swank, J. Kunz, and G. Y. Wu. 2005. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 25 (49):11288-11299.
- Lagadec, C., S. Meignan, E. Adriaenssens, B. Foveau, E. Vanhecke, R. Romon, R. A. Toillon, B. Oxombre, H. Hondermarck, and X. Le Bourhis. 2009. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 28 (18):1960-1970.
- Lamballe, F., P. Tapley, and M. Barbacid. 1993. trkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. *Embo j* 12 (8):3083-3094.
- Lammer, C., S. Wagerer, R. Saffrich, D. Mertens, W. Ansorge, and I. Hoffmann. 1998. The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 16):2445-2453.
- Lange, A. M., and H. W. Lo. 2018. Inhibiting TRK Proteins in Clinical Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 10 (4).
- Laprie, A., J. Michon, O. Hartmann, C. Munzer, M. D. Leclair, C. Coze, D. Valteau-Couanet, D. Plantaz, C. Carrie, J. L. Habrand, C. Bergeron, P. Chastagner, A. S. Défachelles, O. Delattre, V. Combaret, J. Bénard, Y. Pérel, V. Gandemer, and H. Rubie. 2004. High-dose chemotherapy followed by locoregional irradiation improves the outcome of patients with international neuroblastoma staging system Stage II and III neuroblastoma with MYCN amplification. *Cancer* 101 (5):1081-1089.
- Leach, J. K., G. Van Tuyle, P. S. Lin, R. Schmidt-Ullrich, and R. B. Mikkelsen. 2001. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res* 61 (10):3894-3901.
- Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237 (4819):1154-1162.
- Levi-Montalcini, R., H. Meyer, and V. Hamburger. 1954. In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res* 14 (1):49-57.
- Liu, Y., and L. R. Rohrschneider. 2002. The gift of Gab. *FEBS Lett* 515 (1-3):1-7.
- Look, A. T., F. A. Hayes, J. J. Shuster, E. C. Douglass, R. P. Castleberry, L. C. Bowman, E. I. Smith, and G. M. Brodeur. 1991. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 9 (4):581-591.
- Luce, A., A. Courtin, C. Levalois, S. Altmeyer-Morel, P. H. Romeo, S. Chevillard, and J. Lebeau. 2009. Death receptor pathways mediate targeted and non-targeted effects of ionizing radiations in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 30 (3):432-439.

- MacInnis, B. L., and R. B. Campenot. 2002. Retrograde support of neuronal survival without retrograde transport of nerve growth factor. *Science* 295 (5559):1536-1539.
- Marchetti, A., L. Felicioni, G. Pelosi, M. Del Grammastro, C. Fumagalli, M. Sciarrotta, S. Malatesta, A. Chella, F. Barassi, F. Mucilli, P. Campese, T. D'Antuono, R. Sacco, and F. Buttitta. 2008. Frequent mutations in the neurotrophic tyrosine receptor kinase gene family in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Hum Mutat* 29 (5):609-616.
- Maris, J. M., M. D. Hogarty, R. Bagatell, and S. L. Cohn. 2007. Neuroblastoma. *Lancet* 369 (9579):2106-2120.
- Martin-Zanca, D., R. Oskam, G. Mitra, T. Copeland, and M. Barbacid. 1989. Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol* 9 (1):24-33.
- Matsumoto, K., R. K. Wada, J. M. Yamashiro, D. R. Kaplan, and C. J. Thiele. 1995. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 55 (8):1798-1806.
- Matsuoka, S., M. Huang, and S. J. Elledge. 1998. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282 (5395):1893-1897.
- Matthay, K. K., K. DeSantes, B. Hasegawa, J. Huberty, R. S. Hattner, A. Ablin, C. P. Reynolds, R. C. Seeger, V. K. Weinberg, and D. Price. 1998. Phase I dose escalation of 131I-metaiodobenzylguanidine with autologous bone marrow support in refractory neuroblastoma. *J Clin Oncol* 16 (1):229-236.
- McGregor, L. M., B. K. McCune, J. R. Graff, P. R. McDowell, K. E. Romans, G. D. Yancopoulos, D. W. Ball, S. B. Baylin, and B. D. Nelkin. 1999. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (8):4540-4545.
- Meek, K., V. Dang, and S. P. Lees-Miller. 2008. DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol* 99:33-58.
- Mello, S. S., and L. D. Attardi. 2018. Deciphering p53 signaling in tumor suppression. *Curr Opin Cell Biol* 51:65-72.
- Middleton, G., M. Hamanoue, Y. Enokido, S. Wyatt, D. Pennica, E. Jaffray, R. T. Hay, and A. M. Davies. 2000. Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol* 148 (2):325-332.
- Minichiello, L., M. Korte, D. Wolfer, R. Kühn, K. Unsicker, V. Cestari, C. Rossi-Arnaud, H. P. Lipp, T. Bonhoeffer, and R. Klein. 1999. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24 (2):401-414.
- Minturn, J. E., A. E. Evans, J. G. Villablanca, G. A. Yanik, J. R. Park, S. Shusterman, S. Groshen, E. T. Hellriegel, D. Bensen-Kennedy, K. K. Matthay, G. M. Brodeur, and J. M. Maris. 2011. Phase I trial of lestaurtinib for children with refractory neuroblastoma: a new approaches to neuroblastoma therapy consortium study. *Cancer Chemother Pharmacol* 68 (4):1057-1065.
- Miranda, C., M. Mazzoni, M. Sensi, M. A. Pierotti, and A. Greco. 2014. Functional characterization of NTRK1 mutations identified in melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 53 (10):875-880.
- Mladenov, E., X. Fan, R. Dueva, A. Soni, and G. Iliakis. 2019. Radiation-dose-dependent functional synergisms between ATM, ATR and DNA-PKcs in checkpoint control and resection in G(2)-phase. *Sci Rep* 9 (1):8255.
- Molenaar, J. J., J. Koster, D. A. Zwijnenburg, P. van Sluis, L. J. Valentijn, I. van der Ploeg, M. Hamdi, J. van Nes, B. A. Westerman, J. van Arkel, M. E. Ebus, F. Haneveld, A. Lakeman, L. Schild, P. Molenaar, P. Stroeken, M. M. van Noesel,

- I. Ora, E. E. Santo, H. N. Caron, E. M. Westerhout, and R. Versteeg. 2012. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes. *Nature* 483 (7391):589-593.
- Mora, J. 2016. Dinutuximab for the treatment of pediatric patients with high-risk neuroblastoma. *Expert Rev Clin Pharmacol* 9 (5):647-653.
- Mosse, Y. P., S. J. Diskin, N. Wasserman, K. Rinaldi, E. F. Attiyeh, K. Cole, J. Jagannathan, K. Bhambhani, C. Winter, and J. M. Maris. 2007. Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* 46 (10):936-949.
- Mosse, Y. P., M. Laudenslager, D. Khazi, A. J. Carlisle, C. L. Winter, E. Rappaport, and J. M. Maris. 2004. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 75 (4):727-730.
- Mossé, Y. P., M. Laudenslager, L. Longo, K. A. Cole, A. Wood, E. F. Attiyeh, M. J. Laquaglia, R. Sennett, J. E. Lynch, P. Perri, G. Laureys, F. Speleman, C. Kim, C. Hou, H. Hakonarson, A. Torkamani, N. J. Schork, G. M. Brodeur, G. P. Tonini, E. Rappaport, M. Devoto, and J. M. Maris. 2008. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455 (7215):930-935.
- Myers, J. S., and D. Cortez. 2006. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *J Biol Chem* 281 (14):9346-9350.
- Nakagawara, A. 2001. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 169 (2):107-114.
- Nakagawara, A., M. Arima-Nakagawara, N. J. Scavarda, C. G. Azar, A. B. Cantor, and G. M. Brodeur. 1993. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328 (12):847-854.
- Nakagawara, A., C. G. Azar, N. J. Scavarda, and G. M. Brodeur. 1994. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 14 (1):759-767.
- Nakagawara, A., and G. M. Brodeur. 1997. Role of neurotrophins and their receptors in human neuroblastomas: a primary culture study. *Eur J Cancer* 33 (12):2050-2053.
- Nakamura, K., K. C. Martin, J. K. Jackson, K. Beppu, C. W. Woo, and C. J. Thiele. 2006. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 66 (8):4249-4255.
- Nandakumar, P., A. Mansouri, and S. Das. 2017. The Role of ATRX in Glioma Biology. *Frontiers in oncology* 7:236-236.
- Nikoletopoulou, V., H. Lickert, J. M. Frade, C. Rencurel, P. Giallonardo, L. Zhang, M. Bibel, and Y. A. Barde. 2010. Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature* 467 (7311):59-63.
- Nimnual, A. S., B. A. Yatsula, and D. Bar-Sagi. 1998. Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 279 (5350):560-563.
- Nishijima, H., H. Nishitani, T. Seki, and T. Nishimoto. 1997. A dual-specificity phosphatase Cdc25B is an unstable protein and triggers p34(cdc2)/cyclin B activation in hamster BHK21 cells arrested with hydroxyurea. *J Cell Biol* 138 (5):1105-1116.
- Obermeier, A., R. A. Bradshaw, K. Seedorf, A. Choidas, J. Schlessinger, and A. Ullrich. 1994. Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *Embo j* 13 (7):1585-1590.

- Ogawa, Y. 2016. Paradigm Shift in Radiation Biology/Radiation Oncology-Exploitation of the "H₂O₂ Effect" for Radiotherapy Using Low-LET (Linear Energy Transfer) Radiation such as X-rays and High-Energy Electrons. *Cancers (Basel)* 8 (3).
- Pajtler, K. W., E. Mahlow, A. Odersky, S. Lindner, H. Stephan, I. Bendix, A. Eggert, A. Schramm, and J. H. Schulte. 2014. Neuroblastoma in dialog with its stroma: NTRK1 is a regulator of cellular cross-talk with Schwann cells. *Oncotarget* 5 (22):11180-11192.
- Papac, R. J. 1998. Spontaneous regression of cancer: possible mechanisms. *In Vivo* 12 (6):571-578.
- Paull, T. T. 2015. Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev Biochem* 84:711-738.
- Pawson, T., and P. Nash. 2000. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev* 14 (9):1027-1047.
- Penault-Llorca, F., E. R. Rudzinski, and A. R. Sepulveda. 2019. Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer. *J Clin Pathol* 72 (7):460-467.
- Peng, C. Y., P. R. Graves, R. S. Thoma, Z. Wu, A. S. Shaw, and H. Piwnica-Worms. 1997. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277 (5331):1501-1505.
- Poremba, C., C. Scheel, B. Hero, H. Christiansen, K. L. Schaefer, J. Nakayama, F. Berthold, H. Juergens, W. Boecker, and B. Dockhorn-Dworniczak. 2000. Telomerase activity and telomerase subunits gene expression patterns in neuroblastoma: a molecular and immunohistochemical study establishing prognostic tools for fresh-frozen and paraffin-embedded tissues. *J Clin Oncol* 18 (13):2582-2592.
- Pruunsild, P., A. Kazantseva, T. Aid, K. Palm, and T. Timmusk. 2007. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90 (3):397-406.
- Pugh, T. J., O. Morozova, E. F. Attiyeh, S. Asgharzadeh, J. S. Wei, D. Auclair, S. L. Carter, K. Cibulskis, M. Hanna, A. Kiezun, J. Kim, M. S. Lawrence, L. Lichenstein, A. McKenna, C. S. Peadarallu, A. H. Ramos, E. Shefler, A. Sivachenko, C. Sougnez, C. Stewart, A. Ally, I. Birol, R. Chiu, R. D. Corbett, M. Hirst, S. D. Jackman, B. Kamoh, A. H. Khodabakshi, M. Krzywinski, A. Lo, R. A. Moore, K. L. Mungall, J. Qian, A. Tam, N. Thiessen, Y. Zhao, K. A. Cole, M. Diamond, S. J. Diskin, Y. P. Mosse, A. C. Wood, L. Ji, R. Sposto, T. Badgett, W. B. London, Y. Moyer, J. M. Gastier-Foster, M. A. Smith, J. M. Guidry Auvil, D. S. Gerhard, M. D. Hogarty, S. J. Jones, E. S. Lander, S. B. Gabriel, G. Getz, R. C. Seeger, J. Khan, M. A. Marra, M. Meyerson, and J. M. Maris. 2013. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* 45 (3):279-284.
- Pulciani, S., E. Santos, A. V. Lauver, L. K. Long, S. A. Aaronson, and M. Barbacid. 1982. Oncogenes in solid human tumours. *Nature* 300 (5892):539-542.
- Qian, X., A. Riccio, Y. Zhang, and D. D. Ginty. 1998. Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron* 21 (5):1017-1029.
- Rajan, N., R. Elliott, O. Clewes, A. Mackay, J. S. Reis-Filho, J. Burn, J. Langtry, M. Sieber-Blum, C. J. Lord, and A. Ashworth. 2011. Dysregulated TRK signalling is a therapeutic target in CYLD defective tumours. *Oncogene* 30 (41):4243-4260.
- Ricci, A., S. Greco, S. Mariotta, L. Felici, E. Bronzetti, A. Cavazzana, G. Cardillo, F. Amenta, A. Bisetti, and G. Barbolini. 2001. Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25 (4):439-446.
- Riccio, A., S. Ahn, C. M. Davenport, J. A. Blendy, and D. D. Ginty. 1999. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286 (5448):2358-2361.

- Richards, M. W., S. G. Burgess, E. Poon, A. Carstensen, M. Eilers, L. Chesler, and R. Bayliss. 2016. Structural basis of N-Myc binding by Aurora-A and its destabilization by kinase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (48):13726-13731.
- Robinson, R. C., C. Radziejewski, D. I. Stuart, and E. Y. Jones. 1995. Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry* 34 (13):4139-4146.
- Ronco, C., A. R. Martin, L. Demange, and R. Benhida. 2017. ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells. *MedChemComm* 8 (2):295-319.
- Sait, S., and S. Modak. 2017. Anti-GD2 immunotherapy for neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 17 (10):889-904.
- Sanchez, Y., C. Wong, R. S. Thoma, R. Richman, Z. Wu, H. Piwnica-Worms, and S. J. Elledge. 1997. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277 (5331):1497-1501.
- Santivasi, W. L., and F. Xia. 2014. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxid Redox Signal* 21 (2):251-259.
- Sausen, M., R. J. Leary, S. Jones, J. Wu, C. P. Reynolds, X. Liu, A. Blackford, G. Parmigiani, L. A. Diaz, Jr., N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, and M. D. Hogarty. 2013. Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat Genet* 45 (1):12-17.
- Savitsky, K., A. Bar-Shira, S. Gilad, G. Rotman, Y. Ziv, L. Vanagaite, D. A. Tagle, S. Smith, T. Uziel, S. Sfez, M. Ashkenazi, I. Pecker, M. Frydman, R. Harnik, S. R. Patanjali, A. Simmons, G. A. Clines, A. Sartiel, R. A. Gatti, L. Chessa, O. Sanal, M. F. Lavin, N. G. Jaspers, A. M. Taylor, C. F. Arlett, T. Miki, S. M. Weissman, M. Lovett, F. S. Collins, and Y. Shiloh. 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268 (5218):1749-1753.
- Schleiermacher, G., V. Mosseri, W. B. London, J. M. Maris, G. M. Brodeur, E. Attiyeh, M. Haber, J. Khan, A. Nakagawara, F. Speleman, R. Noguera, G. P. Tonini, M. Fischer, I. Ambros, T. Monclair, K. K. Matthay, P. Ambros, S. L. Cohn, and A. D. Pearson. 2012. Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. *Br J Cancer* 107 (8):1418-1422.
- Schram, A. M., M. T. Chang, P. Jonsson, and A. Drilon. 2017. Fusions in solid tumours: diagnostic strategies, targeted therapy, and acquired resistance. *Nat Rev Clin Oncol* 14 (12):735-748.
- Schulte, J. H., A. Schramm, L. Klein-Hitpass, M. Klenk, H. Wessels, B. P. Hauffa, J. Eils, R. Eils, G. M. Brodeur, L. Schweigerer, W. Havers, and A. Eggert. 2005. Microarray analysis reveals differential gene expression patterns and regulation of single target genes contributing to the opposing phenotype of TrkA- and TrkB-expressing neuroblastomas. *Oncogene* 24 (1):165-177.
- Schwab, M., K. Alitalo, K. H. Klempnauer, H. E. Varmus, J. M. Bishop, F. Gilbert, G. Brodeur, M. Goldstein, and J. Trent. 1983. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305 (5931):245-248.
- Schwab, M., H. E. Varmus, J. M. Bishop, K. H. Grzeschik, S. L. Naylor, A. Y. Sakaguchi, G. Brodeur, and J. Trent. 1984. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 308 (5956):288-291.

- Segal, R. A. 2003. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci* 26:299-330.
- Shiloh, Y., and Y. Ziv. 2013. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14 (4):197-210.
- Shimada, H., I. M. Ambros, L. P. Dehner, J. Hata, V. V. Joshi, and B. Roald. 1999a. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 86 (2):349-363.
- Shimada, H., I. M. Ambros, L. P. Dehner, J. Hata, V. V. Joshi, B. Roald, D. O. Stram, R. B. Gerbing, J. N. Lukens, K. K. Matthay, and R. P. Castleberry. 1999b. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86 (2):364-372.
- Shimada, H., J. Chatten, W. A. Newton, Jr., N. Sachs, A. B. Hamoudi, T. Chiba, H. B. Marsden, and K. Misugi. 1984. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 73 (2):405-416.
- Shimada, H., S. Umehara, Y. Monobe, Y. Hachitanda, A. Nakagawa, S. Goto, R. B. Gerbing, D. O. Stram, J. N. Lukens, and K. K. Matthay. 2001. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 92 (9):2451-2461.
- Singer, H. S., B. Hansen, D. Martinie, and C. L. Karp. 1999. Mitogenesis in glioblastoma multiforme cell lines: a role for NGF and its TrkA receptors. *J Neurooncol* 45 (1):1-8.
- Smit, M. A., and D. S. Peeper. 2011a. Zeb1 is required for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and metastasis. *Oncogene* 30 (35):3735-3744.
- . 2011b. Zeb1 is required for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and metastasis. *Oncogene* 30 (35):3735-3744.
- Smith, J., L. M. Tho, N. Xu, and D. A. Gillespie. 2010. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 108:73-112.
- Spencer, M. L., H. Shao, and D. A. Andres. 2002a. Induction of neurite extension and survival in pheochromocytoma cells by the Rit GTPase. *J Biol Chem* 277 (23):20160-20168.
- Spencer, M. L., H. Shao, H. M. Tucker, and D. A. Andres. 2002b. Nerve growth factor-dependent activation of the small GTPase Rin. *J Biol Chem* 277 (20):17605-17615.
- Stephens, R. M., D. M. Loeb, T. D. Copeland, T. Pawson, L. A. Greene, and D. R. Kaplan. 1994. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 12 (3):691-705.
- Strohmaier, C., B. D. Carter, R. Urfer, Y. A. Barde, and G. Dechant. 1996. A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *Embo j* 15 (13):3332-3337.
- Stucky, C. L., T. DeChiara, R. M. Lindsay, G. D. Yancopoulos, and M. Koltzenburg. 1998. Neurotrophin 4 Is Required for the Survival of a Subclass of Hair Follicle Receptors. *The Journal of Neuroscience* 18 (17):7040-7046.
- Su, A. I., T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K. A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M. P. Cooke, J. R. Walker, and J. B. Hogenesch. 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (16):6062-6067.

- Surova, O., and B. Zhivotovsky. 2013. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* 32 (33):3789-3797.
- Suzuki, T., E. Bogenmann, H. Shimada, D. Stram, and R. C. Seeger. 1993. Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 85 (5):377-384.
- Tacconelli, A., A. Farina, L. Cappabianca, A. Gulino, and A. Mackay. 2005. Alternative TrkAIII splicing: A potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. *Future oncology (London, England)* 1:689-698.
- Tacconelli, A., A. R. Farina, L. Cappabianca, G. Desantis, A. Tessitore, A. Vetuschi, R. Sferra, N. Rucci, B. Argenti, I. Screpanti, A. Gulino, and A. R. Mackay. 2004. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 6 (4):347-360.
- Tao, X., S. Finkbeiner, D. B. Arnold, A. J. Shaywitz, and M. E. Greenberg. 1998. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20 (4):709-726.
- Tao, X., A. E. West, W. G. Chen, G. Corfas, and M. E. Greenberg. 2002. A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron* 33 (3):383-395.
- Tejeda, G. S., and M. Diaz-Guerra. 2017. Integral Characterization of Defective BDNF/TrkB Signalling in Neurological and Psychiatric Disorders Leads the Way to New Therapies. *Int J Mol Sci* 18 (2).
- Thiele, C. J., Z. Li, and A. E. McKee. 2009. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* 15 (19):5962-5967.
- Thoenen, H. 1995. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270 (5236):593-598.
- Tomasson, M. H., Z. Xiang, R. Walgren, Y. Zhao, Y. Kasai, T. Miner, R. E. Ries, O. Lubman, D. H. Fremont, M. D. McLellan, J. E. Payton, P. Westervelt, J. F. DiPersio, D. C. Link, M. J. Walter, T. A. Graubert, M. Watson, J. Baty, S. Heath, W. D. Shannon, R. Nagarajan, C. D. Bloomfield, E. R. Mardis, R. K. Wilson, and T. J. Ley. 2008. Somatic mutations and germline sequence variants in the expressed tyrosine kinase genes of patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 111 (9):4797-4808.
- Trochet, D., F. Bourdeaut, I. Janoueix-Lerosey, A. Deville, L. de Pontual, G. Schleiermacher, C. Coze, N. Philip, T. Frébourg, A. Munnich, S. Lyonnet, O. Delattre, and J. Amiel. 2004. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *American journal of human genetics* 74 (4):761-764.
- Tulard, A., F. Hoffschir, F. H. de Boisferon, C. Luccioni, and A. Bravard. 2003. Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity. *Free Radic Biol Med* 35 (1):68-77.
- Urfer, R., P. Tsoulfas, L. O'Connell, J. A. Hongo, W. Zhao, and L. G. Presta. 1998. High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *J Biol Chem* 273 (10):5829-5840.
- Vaillant, A. R., I. Mazzoni, C. Tudan, M. Boudreau, D. R. Kaplan, and F. D. Miller. 1999. Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J Cell Biol* 146 (5):955-966.
- Vaishnavi, A., A. T. Le, and R. C. Doebele. 2015. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov* 5 (1):25-34.

- van Groningen, T., J. Koster, L. J. Valentijn, D. A. Zwijnenburg, N. Akogul, N. E. Hasselt, M. Broekmans, F. Haneveld, N. E. Nowakowska, J. Bras, C. J. M. van Noesel, A. Jongejan, A. H. van Kampen, L. Koster, F. Baas, L. van Dijk-Kerkhoven, M. Huizer-Smit, M. C. Lecca, A. Chan, A. Lakeman, P. Molenaar, R. Volckmann, E. M. Westerhout, M. Hamdi, P. G. van Sluis, M. E. Ebus, J. J. Molenaar, G. A. Tytgat, B. A. Westerman, J. van Nes, and R. Versteeg. 2017. Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states. *Nat Genet* 49 (8):1261-1266.
- van Limpt, V., A. Schramm, A. van Lakeman, P. Sluis, A. Chan, M. van Noesel, F. Baas, H. Caron, A. Eggert, and R. Versteeg. 2004. The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas. *Oncogene* 23 (57):9280-9288.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3 (7):Research0034.
- Vanhaesebroeck, B., S. J. Leever, K. Ahmadi, J. Timms, R. Katso, P. C. Driscoll, R. Woscholski, P. J. Parker, and M. D. Waterfield. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70:535-602.
- Walker, F., H.-H. Zhang, and A. W. Burgess. 2007. Identification of a novel EGF-sensitive cell cycle checkpoint. *Experimental Cell Research* 313 (3):511-526.
- Wang, H., R. Wang, T. Thrimawithana, P. J. Little, J. Xu, Z. P. Feng, and W. Zheng. 2014. The nerve growth factor signaling and its potential as therapeutic target for glaucoma. *Biomed Res Int* 2014:759473.
- Wang, K., S. J. Diskin, H. Zhang, E. F. Attiyeh, C. Winter, C. Hou, R. W. Schnepf, M. Diamond, K. Bosse, P. A. Mayes, J. Glessner, C. Kim, E. Frackelton, M. Garris, Q. Wang, W. Glaberson, R. Chiavacci, L. Nguyen, J. Jagannathan, N. Saeki, H. Sasaki, S. F. Grant, A. Iolascon, Y. P. Mosse, K. A. Cole, H. Li, M. Devoto, P. W. McGrady, W. B. London, M. Capasso, N. Rahman, H. Hakonarson, and J. M. Maris. 2011. Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature* 469 (7329):216-220.
- Weeraratna, A. T., J. T. Arnold, D. J. George, A. DeMarzo, and J. T. Isaacs. 2000. Rational basis for Trk inhibition therapy for prostate cancer. *Prostate* 45 (2):140-148.
- Weickert, C. S., D. L. Ligans, T. Romanczyk, G. Ungaro, T. M. Hyde, M. M. Herman, D. R. Weinberger, and J. E. Kleinman. 2005. Reductions in neurotrophin receptor mRNAs in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 10 (7):637-650.
- Weiss, W. A., K. Aldape, G. Mohapatra, B. G. Feuerstein, and J. M. Bishop. 1997. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *Embo j* 16 (11):2985-2995.
- Weiss, W. A., T. Godfrey, C. Francisco, and J. M. Bishop. 2000. Genome-wide screen for allelic imbalance in a mouse model for neuroblastoma. *Cancer Res* 60 (9):2483-2487.
- Wilde, A., E. C. Beattie, L. Lem, D. A. Riethof, S. H. Liu, W. C. Mobley, P. Soriano, and F. M. Brodsky. 1999. EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* 96 (5):677-687.
- Xing, J., D. D. Ginty, and M. E. Greenberg. 1996. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273 (5277):959-963.
- Xing, J., J. M. Kornhauser, Z. Xia, E. A. Thiele, and M. E. Greenberg. 1998. Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-

- activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 18 (4):1946-1955.
- Xu, B., K. Zang, N. L. Ruff, Y. A. Zhang, S. K. McConnell, M. P. Stryker, and L. F. Reichardt. 2000. Cortical degeneration in the absence of neurotrophin signaling: dendritic retraction and neuronal loss after removal of the receptor TrkB. *Neuron* 26 (1):233-245.
- Yamada, M., H. Ohnishi, S. Sano, A. Nakatani, T. Ikeuchi, and H. Hatanaka. 1997. Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* 272 (48):30334-30339.
- Yang, J., Y. Yu, H. Biswas, and P. Duerksen-Hughes. 2003. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 24:1571-1580.
- Yuan, J., and B. A. Yankner. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407 (6805):802-809.
- Zafra, F., E. Castrén, H. Thoenen, and D. Lindholm. 1991. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22):10037-10041.
- Zarubin, T., and J. Han. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research* 15 (1):11-18.
- Zhou, Z., E. J. Hong, S. Cohen, W. N. Zhao, H. Y. Ho, L. Schmidt, W. G. Chen, Y. Lin, E. Savner, E. C. Griffith, L. Hu, J. A. Steen, C. J. Weitz, and M. E. Greenberg. 2006. Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron* 52 (2):255-269.
- Zhu, S., J. S. Lee, F. Guo, J. Shin, A. R. Perez-Atayde, J. L. Kutok, S. J. Rodig, D. S. Neuberg, D. Helman, H. Feng, R. A. Stewart, W. Wang, R. E. George, J. P. Kanki, and A. T. Look. 2012. Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Cell* 21 (3):362-373.
- Zhu, Z., H. Friess, F. F. diMola, A. Zimmermann, H. U. Graber, M. Korc, and M. W. Buchler. 1999. Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 17 (8):2419-2428.

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: LISTE DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN	28
TABELLE 2: LISTE DER VERWENDETEN PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN	30
TABELLE 3: TRENNGEL	31
TABELLE 4: SAMMELGEL	31
TABELLE 5: KOMMERZIELLE KITS	32
TABELLE 6: ANTIKÖRPER	32
TABELLE 7: REALTIME PCR - PRIMER	33
TABELLE 8: SI-RNA	34
TABELLE 9: GERÄTE	34
TABELLE 10: VERBRAUCHSMATERIALIEN	35
TABELLE 11: ZELLKULTURMODELLE	36

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GENOMISCHEN STRUKTUREN VON TRKA, TRKB UND TRKC	8
ABBILDUNG 2: SIGNALTRANSDUKTION DER NEUROTROPHINREZEPTOREN	11
ABBILDUNG 3: GENETISCHES MODELL DER NEUROBLASTOMENTWICKLUNG	18
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE ABBILDUNG DER DIREKTEN UND INDIRECTEN EFFEKTE VON IONISIERENDER BESTRAHLUNG	25
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES DNA-SCHADENS-SIGNALWEGS	27
ABBILDUNG 6: MRNA-LEVEL VON TRKA MIT ODER OHNE 24 H BEHANDLUNG MIT TET/NGF IM SY5Y- UND KELLY-ZELLMODELL	47
ABBILDUNG 7: TRKA UND P-TRKA PROTEIN-EXPRESSION NACH BEHANDLUNG MIT ODER OHNE TET/NGF FÜR 24 H IM SY5Y- UND KELLY-ZELLMODELL	48
ABBILDUNG 8: MITOTISCHER INDEX DER SY5Y UND KELLY-ZELLEN NACH BESTRAHLUNG MIT 0 UND 1 GY	49
ABBILDUNG 9: WESTER BLOT ANALYSE DER SY5Y- UND KELLY-ZELLEN NACH EINSTÜNDIGER BEHANDLUNG MIT LOXO 101 UND MITOTISCHER INDEX NACH BESTRAHLUNG MIT 0 UND 1 GY UND EINSTÜNDIGER BEHANDLUNG MIT LOXO 101	51
ABBILDUNG 10: MITOTISCHER INDEX DER SY5Y- UND KELLY-ZELLEN NACH BESTRAHLUNG MIT 0 BIS 4 GY	52
ABBILDUNG 11: KURZZEITÜBERLEBEN DER SY5Y- UND KELLY-ZELLEN NACH BESTRAHLUNG MIT 0, 2, 4, 6, 8 UND 10 GY	53
ABBILDUNG 12: LANGZEITÜBERLEBEN DER SY5Y- UND KELLY-ZELLEN NACH BESTRAHLUNG MIT 0, 2, 6 UND 10 GY	54
ABBILDUNG 13: MITOTISCHER INDEX DER SY5Y- UND KELLY-ZELLEN NACH BESTRAHLUNG MIT 0 UND 1 GY UND EINSTÜNDIGER BEHANDLUNG MIT ATMi UND ATRi	56
ABBILDUNG 14: WESTERN BLOT ANALYSE DER TRKA-EXPRESSION UND AKTIVIERUNG UND MITOTISCHER INDEX DES SKNAS-ZELLMODELLE NACH BESTRAHLUNG MIT 0, 1 UND 4 GY	58

ABBILDUNG 15: MITOTISCHER INDEX DES SKNAS-ZELLMODELLE NACH BESTRAHLUNG MIT 0 UND 1 GY NACH BEHANDLUNG MIT ATMI UND ATRi	59
ABBILDUNG 16: TRKA, P-TRKA, ATM, P-ATM, ATR UND P-ATR PROTEIN-EXPRESSION IM SY5Y- UND KELLY-ZELLMODELL NACH BESTRAHLUNG MIT 1 GY	60
ABBILDUNG 17: TRKA, P-TRKA, CHK1, P-CHK1, CHK2 UND P-CHK2 PROTEIN-LEVEL IM SY5Y- UND KELLY-ZELLMODELL NACH BESTRAHLUNG MIT 1 GY	61
ABBILDUNG 18: TRKA, P-TRKA, CDC25A, P-CDC25A, CDC25B, P-CDC25B, CDC25C UND P-CDC25C PROTEIN-LEVEL IM SY5Y- UND KELLY-ZELLMODELL NACH BESTRAHLUNG MIT 1 GY	62
ABBILDUNG 19: WESTERN BLOT ANALYSE VON EGFR UND P-EGFR UND MITOTISCHER INDEX DER A549- UND H1975-ZELLMODELLE NACH BESTRAHLUNG MIT 0,1 UND 4 GY	63
ABBILDUNG 20: NACHWEIS DER TRKB mRNA IN SY5Y ZELLEN MIT KONSTITUTIVER ODER KONDITIONALER TRKB EXPRESSION	65
ABBILDUNG 21: NACHWEIS DER TRKB UND P-TRKB PROTEINEN IN SY5Y ZELLEN MIT KONSTITUTIVER ODER KONDITIONALER TRKB EXPRESSION	66
ABBILDUNG 22: MIKROSKOPIE BILDER DER SY5Y-ZELLINIEN MIT KONSTITUTIVER TRKB EXPRESSION NACH BESTRAHLUNG MIT 0, 2, 6 UND 10 GY	67
ABBILDUNG 23: MIKROSKOPIE BILDER DER SY5Y- ZELLEN MIT KONDITIONALER TRKB EXPRESSION NACH BESTRAHLUNG MIT 0, 2, 6 UND 10 GY	68
ABBILDUNG 24: KURZZEITÜBERLEBEN VON SY5Y ZELLEN MIT KONSTITUTIVER ODER KONDITIONALER TRKB EXPRESSION NACH BESTRAHLUNG MIT 0, 2, 4, 6, 8 UND 10 GY	69
ABBILDUNG 25: TRKB UND P-TRKB PROTEIN-LEVEL NACH 1 H BEHANDLUNG MIT ODER OHNE LOXO 101 IM SY5Y-ZELLMODELL	70
ABBILDUNG 26: KURZZEITÜBERLEBEN DES KONSTITUTIVEN UND KONDITIONALEN SY5Y-ZELLMODELLS NACH BESTRAHLUNG MIT 0, 2, 4, 6, 8 UND 10 GY UND BEHANDLUNG MIT LOXO 101	71
ABBILDUNG 27: LANGZEITÜBERLEBEN VON SY5Y-ZELLEN MIT KONSTITUTIVER UND KONDITIONALER TRKB-EXPRESSION NACH BESTRAHLUNG MIT 0, 2, 6 UND 10 GY	72
ABBILDUNG 28: LANGZEITÜBERLEBEN DES SY5Y ZELLMODELLS IN ABHÄNGIGKEIT VON TRKB EXPRESSION NACH BESTRAHLUNG MIT 0, 2, 4 UND 10 GY UND EINSTÜNDIGER LOXO 101 BEHANDLUNG	73
ABBILDUNG 29: BESTIMMUNG DER OPTIMALEN KONZENTRATION FÜR PDK-, MEK- UND PLCγ INHIBITION	74
ABBILDUNG 30: KURZZEITÜBERLEBEN VON SY5Y-ZELLEN MIT DES KONSTITUTIVEN ODER KONDITIONALER TRKB-EXPRESSION NACH BESTRAHLUNG MIT 0, 2, 4, 6, 8 UND 10 GY UND BEHANDLUNG MIT PDK1-INHIBITOR (PDK1i), MEK-INHIBITOR (MEKi) ODER PLCγ -INHIBITOR (PLCγi)	76
ABBILDUNG 31: ZEB1, P-TRKB, VIMENTIN, β-ACTIN UND SNAI1 PROTEIN-LEVEL NACH BEHANDLUNG MIT ODER OHNE TET/BDNF IM KONDITIONALEN SY5Y-ZELLMODELL UNTER BESTRAHLUNG	78
ABBILDUNG 32: KURZZEITÜBERLEBEN DES KONDITIONALEN SY5Y-ZELLMODELLS NACH BESTRAHLUNG MIT 0, 2, 4, 6, 8 UND 10 GY UND BEHANDLUNG MIT ZEB1 SI-RNA	79

Danksagung

Auf diesem Wege möchte ich mich bei allen von Herzen bedanken, die mich auf dem Weg meiner Dissertation unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei der DFG für die finanzielle Förderung meines Promotionsprojektes im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK1739 bedanken. Ich danke Prof. Dr. Alexander Schramm dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, wodurch ich die Chance hatte meine Arbeit in einem professionellen und produktiven Umfeld zu erarbeiten. Er betreute mich während meiner Dissertation und unterstützte mich durch sein Wissen. Er engagierte sich zudem sehr, mir die Möglichkeit zu geben an Konferenzen und Meetings teilzunehmen, um mich weiterzubilden.

Ich bedanke mich für die großartigen Kooperationen innerhalb des GRK1739. In diesem Zusammenhang möchte ich mich insbesondere bei Prof. Iliakis und Prof. Stuschke für die Nutzung der Bestrahlungsgeräte, sowie bei Prof. Jendrossek für die Nutzung des Fluoreszenzmikroskops und die Organisation im GRK bedanken. Prof. Iliakis danke ich für die Übernahme des Mentors während meiner Promotion. Zudem möchte ich der Arbeitsgruppe Nuklearmedizin danken für die PET/CT-Durchführung. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der molekularen Onkologie bedanken für die Unterstützung in allen Lebenslagen und die durch Hochs und Tiefs mit mir gegangen sind. Bei Sabine für die technische und seelische Unterstützung und bei Sebastian, ohne dessen Rat und Hilfe ich nie was gefunden hätte. Bei Alexandra die mich sehr bei meinen Mausversuchen unterstützt hat. Anja für die Hilfe im Labor. Bei meinen Bürokolleginnen bedanke ich mich für die lustige Arbeitsatmosphäre. Bei Clotilde für die regelmäßige Erinnerung an *Deadlines*. Bei Cassandra für die mentale Unterstützung mit Kuchen und dafür das sie nie müde geworden ist meine englischen Texte zu korrigieren. Bei Alicia für ihren unendlichen Optimismus. Bei Madeleine, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und oft fachlich weitergeholfen hat und bei Barbara Grüner für die fachliche Unterstützung.

Das Institut Medizinische Strahlenbiologie insbesondere danke ich Dr. Aashish Soni für die Unterstützung bei meinen Experimenten und für die Zusammenarbeit.

Der AG Siveke, insbesondere Konstantinos danke ich für die Unterstützung bei meinen histologischen Experimenten. Esra Köser, Wendy und allen anderen Mitarbeitern des

zentralen Tierlabors danke ich für das liebevolle Kümern um meine Mäuse und für die Aufmunterung.

Außerdem möchte ich meine ehemaligen Kolleginnen Silke, Sofie und Marc und Kristina danken, die mir sowohl fachlich als auch persönlich eine wichtige Stütze waren. Meiner Vorgängerin Katharina danke ich für die Einarbeitung und die Unterstützung. Zuletzt möchte ich meine Familie und meinen Freunden danken, die mir während der Zeit die emotionale Unterstützung und Sicherheit entgegenbrachten.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Modulation der zellulären Strahlenantwort beim Neuroblastom durch die Neurotrophin Rezeptoren TrkA/NTRK1 und TrkB/NTRK2“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Christina Haßiepen befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Prof. Dr. Alexander Schramm

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Christina Haßiepen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Christina Haßiepen