

Auswirkungen der Ras-Inaktivierung durch
Farnesyltransferaseinhibitoren auf die Signaltransduktion des
autokrinen Wachstumsfaktors IGF-II beim Neuroblastom

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Josefa Wittrock
aus Papenburg
2000

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Paul Schweizer für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Alfred Nordheim danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Koreferats und sein Interesse an dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Rainer Girgert möchte ich mich ganz besonders herzlich für die wertvolle Unterstützung dieser Arbeit sowie für seine außerordentlich große Diskussionsbereitschaft und seine konstruktive Kritik bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Annette Zipfel und Herrn Dr. Martin Schenk, die mir bei allen auftretenden Softwareproblemen jederzeit sehr hilfreich zur Seite standen.

Bei Herrn Dr. Joachim Schwäble bedanke ich mich ganz besonders für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Etablierung der nicht-radioaktiven Northern-Blots. Bei Frau Karin Weber bedanke ich mich ganz besonders für die radioaktiven Messungen der IGF-II Überstände.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht und mich sehr wertvoll unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	1
1	Einleitung	3
1.1	Das Neuroblastom	3
1.2	Molekulargenetische Tumormarker des Neuroblastoms	4
1.2.1	Amplifikation und Expression des N-myc-Gens	4
1.2.2	Deletion am Chromosom 1 p 36	5
1.2.3	Hyperploidie	6
1.2.4	Tyrosinkinase-Rezeptor Expressionen	7
1.2.5	Angiogenese	7
1.2.6	Überexpression des " Multidrug resistance-associated protein"	8
1.2.7	CD 44 Expression	8
1.3	Das N-myc-Protoonkogen	8
1.4	p21 ras-Protoonkogene	10
1.4.1	Die ras-Gene	10
1.4.2	Struktur und Funktion der Ras-Proteine	10
1.4.3	Die Rolle der p21-Ras-Proteine bei der intrazellulären Signaltransduktion	12
1.4.4	Unterbrechung der Signaltransduktion durch Verhinderung der Membranverankerung der Ras-Proteine	15
1.5	Farnesyltransferaseinhibitoren	15
1.6	Der Wachstumsfaktor IGF-II (insulin-like-growth-factor) und seine Rezeptoren	17
1.7	Autokrine Stimulation beim Neuroblastom	18
1.8	Aufgabenstellung	19

2	Material und Methoden	21
2.1	Geräte, Materialien und Chemikalien	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Plastikmaterialien	22
2.1.3	Chemikalien	22
2.1.4	Zelllinien	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellkulturen	24
2.2.1.1	Anzucht und Subkultivierung von Zellen	24
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
2.2.1.3	Behandlung der Zellen mit dem Wachstumsfaktor IGF-II	25
2.2.1.4	Behandlung der Zellen mit dem Hemmstoff "FTI277"	25
2.2.2	Zellzahlbestimmung	26
2.2.3	Proliferationstest (MTT)	26
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.4.1	Isolierung der mRNA	27
2.2.4.2	Northern-Blotting	30
2.2.4.2.1	mRNA-Elektrophorese	31
2.2.4.2.2	Northern-Blotting	32
2.2.4.2.3	Fixierung der RNA auf der Membran	33
2.2.4.3	Markierung von cDNA Sonden über Reverse-Transkriptase- Polymerasekettenreaktion und gleichzeitigem Digoxigenineinbau (RT-PCR Digoxigenin labeling)	33
2.2.4.4	Hybridisierung und Detektion mit Digoxigenin-markierten-cDNA- Sonden	38
2.2.4.5	Recyclen des Northern-Blot	41
2.2.4.6	Semi-quantitative RT-PCR zum Nachweis der mRNA Expression	41
2.2.5	Nicht-radioaktiver Nachweis der MAPK-Aktivität	42
2.2.5.1	Lyse der Zellen	42
2.2.5.2	Proteinbestimmung nach Pierce (Bicinchoninic Acid (BCA))	43
2.2.5.3	Immunpräzipitation der MAPK	43

2.2.5.4	Western-Blot	44
2.2.6	Bestimmung der IGF-II-Konzentration in Zellkulturüberständen	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Nachweis der autokrinen IGF-II Produktion in Neuroblastomzellen	47
3.1.1	Expression der mRNA für IGF-II	47
3.1.2	Expression der mRNA für den IGF-Rezeptor	48
3.1.3	Messung der IGF-II Überstände in vier Neuroblastomzelllinien	49
3.2	Stimulation der Zellproliferation von Neuroblastomzellen durch den Wachstumsfaktor IGF-II	50
3.2.1	Zellproliferation durch autokrin produziertes IGF-II	50
3.2.2	Wachstumskinetik der Zelllinie Kelly in Abhängigkeit der IGF-II Konzentration	52
3.2.3	Vergleich der Wachstumskinetik von Neuroblastomzelllinien bei [50 ng/ml IGF-II]	53
3.2.4	Einfluß der Verhinderung der Membranverankerung der Ras-Proteine auf die Zellproliferation der Neuroblastomzellen	55
3.3	Funktioneller Nachweis der Verhinderung der Membranverankerung von Ras-Proteinen durch Untersuchung der MAPK-Aktivität nach Stimulation mit IGF-II	59
3.3.1	Nichtradioaktiver Nachweis der Aktivierung der MAPK	59
3.3.2	Untersuchung von vier Neuroblastomzelllinien auf die Aktivierung der MAPK durch IGF-II	60
3.3.3	Einfluß der Inaktivierung der Ras-Proteine auf die MAPK-Aktivität	61
3.3.4	Densitometrische Auswertung der MAPK-Aktivitäten	63
3.4	Regulation der N-myc-Expression in Abhängigkeit von IGF-II	64
3.4.1	Messung der N-myc-Expression im Ruhezustand	64
3.4.2	Zeitkinetik der Induktion der N-myc-Expression durch IGF-II	66

3.4.3	Nachweis der N-myc-Expression in drei Neuroblastomzelllinien nach IGF-II Stimulation	67
3.4.4	Auswirkungen der Unterbrechung des Signaltransduktionsweges von IGF-II durch Verhinderung der Ras-Membranverankerung auf die N-myc-Expression	68
3.4.4.1	Bestimmung der optimalen Zyklenzahl zum quantitativen Nachweis der N-myc-Expression	69
3.4.4.2	Einfluß der Verhinderung der Ras-Membranverankerung auf die N-myc-Expression in der Neuroblastomzelllinie IMR32	71
4	Diskussion	73
4.1	Auswirkungen der autokrinen Stimulation von IGF-II auf das Tumorwachstum von Neuroblastomzellen	73
4.2	Auswirkungen der Verhinderung der Ras-Membranverankerung auf die Signaltransduktion des IGF-Rezeptors	78
4.3	Einfluß von IGF-II auf die N-myc-Expression in Neuroblastomzellen	81
5	Literaturverzeichnis	87
6	Zusammenfassung	101
	Lebenslauf	104

Abkürzungen

Abb	Abbildungen
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American-Type-Culture-Collection, USA
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CSPD [®]	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5`chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl) Phenylphosphat
Depec	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DM	“Double minute”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<u>E</u> xtrazellulär- <u>r</u> egulierende- <u>K</u> inase
FCS	Fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FPT	Farnesylproteintransferase
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GTP/GDP	Guanosintriphosphat, Guanosindiphosphat
Grb2	growth-factor-receptor-bound-protein-2
HLH	Helix-Loop-Helix
HMG CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A
HSR	Homogeneous-staining-region
IGF	Insulin-like-growth-factor
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
Kbp	Kilobasenpaare

KDa	Kilodalton
LOH	Loss-of-Heterocycosity
MAPK	Mitogen-aktivierende-Kinase
MG	Molekulargewicht
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	“messenger” Ribonukleinsäure
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]2,5 diphenyl-tetrazolium-bromid
NF	Neurofibomatose
NGF	Nerve-growth-factor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Q	Reinheitsgrad
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium
RT	Reverse-Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TCF	Ternary-complex-factor
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	Tyrosinkinase
ZIP	Leucine-Zipper

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein Tumor des embryonalen sympathischen Gewebes, der durch pathologische Veränderungen aus dem neuroektodermalen Gewebe entsteht und sich durch aggressives Wachstum und frühe Metastasierung auszeichnet.

Die Neuroblastome gehören zu den häufigsten soliden Tumoren im Kindesalter, mit einer jährlichen Inzidenz von 9 Fällen pro Jahr je 1 Million Kinder unter 15 Jahren (Wargalla-Plate et al., 1995).

Die Patienten werden aufgrund verschiedener Parameter (Alter, N-myc-Amplifikation, Ploidie, Histologie nach Shimada) in drei Risikogruppen eingeteilt (Katzenstein und Cohn, 1998).

Eine Besonderheit sind die Neuroblastome in situ, die sich morphologisch nicht von symptomatisch diagnostizierten Neuroblastomen unterscheiden. Diese Neuroblastome bilden kleine Knoten in der Nebenniere. Bei 5 von 6000 Resektionen von Kindern, die im ersten Lebensjahr an anderen Ursachen gestorben sind, wurden im Nebennierenmark unreife Neuroblastomzellen gefunden. Die Inzidenz dieser in situ-Neuroblastome ist 50 mal so groß wie die Inzidenz der Neuroblastome, die erst nach seiner Manifestation diagnostiziert werden. Die meisten in-situ Neuroblastome differenzieren spontan zu benignen Zellen (Beckwith und Perrin, 1963) (Haas et al., 1988). Die Mechanismen, die dieser spontanen Regression zugrunde liegen, konnten nicht eindeutig bestimmt werden. Es werden immunologische Reaktionen oder endogene Zellmechanismen, wie Apoptose, als Ursache diskutiert.

Therapeutisch steht beim Neuroblastom die chirurgische Exzision im Vordergrund, zum Teil kombiniert mit Chemotherapie und lokaler Bestrahlung des Tumors. Die Überlebenschancen der Neuroblastompatienten sind abhängig vom Alter und vom Stadium des Tumors. Kinder unter einem Jahr oder im Stadium 1 und 2 haben eine verhältnismäßig gute Überlebenschance von 90-100 %. Die

Behandlung des Stadiums 3 mit 70 %, und des Stadiums 4 mit nur noch 12 % Überlebenschance, ist noch sehr verbesserungsbedürftig (Grosfeld, 1999).

Obwohl das Neuroblastom zu den bestuntersuchten Tumoren bezüglich ihres klinischen Verhaltens und ihrer Genetik gehört, sind noch viele Fragen bezüglich der Tumorgenese und der Therapie nicht ausreichend geklärt.

Im Folgenden soll nun genauer auf die genetischen Tumormarker des Neuroblastoms eingegangen werden.

1.2 Molekulargenetische Tumormarker des Neuroblastoms

Histologische, cytogenetische und molekulargenetische Marker sind Faktoren, die zur Klassifizierung von Tumoren herangezogen werden. Das Neuroblastom läßt sich neben der klinischen Klassifizierung über das Ausbreitungsstadium des Tumors auch cytogenetisch und molekulargenetisch in verschiedene Risikogruppen einteilen.

1.2.1 Amplifikation und Expression des N-myc-Gens

Eine Form chromosomaler Veränderungen, die häufig bei Tumoren beobachtet wird, ist die Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte. Hierbei liegen bestimmte Bereiche eines Chromosoms in hoher Kopienzahl vor. Nachweisen lassen sich diese Bereiche als homogen angefärbte Regionen (homogeneous-staining-regions, HSR), die das normale Bandenmuster eines Chromosoms unterbrechen (Cowell, 1982) oder als zusätzliche extrachromosomale, gepaarte DNA Partikel, die sog. "double-minute" Chromosomen (DMs) (Barker et al., 1982).

Eine verstärkte Onkogenamplifikation wurde beim Neuroblastom beschrieben. Bei der N-myc-Amplifikation (N=Neuroblastom) handelt es sich um eine genetische Veränderung, die heute klinisch als prognostischer Marker dient.

Der molekulare Mechanismus, der der Entstehung der N-myc-Amplifikation zugrunde liegt, ist immer noch nicht eindeutig aufgeklärt. Diskutiert wird ein sog.

Replikations-Exzissions-Modell. Hierbei durchläuft die N-myc-DNA während der Zellteilung eine zusätzliche Replikation. Diese extrareplizierte DNA tritt dann als extrachromosomale DNA in sog. "DM" auf, oder insertiert in ein beliebiges Chromosom, und durchläuft hier mehrere Zyklen einer in-situ-Amplifikation (Schwab, 1999) (Corvi et al, 1995). Mit dieser Hypothese in Einklang steht die Beobachtung, daß die "HSR" beim Neuroblastom nie im Bereich der Lokalisation des normalen N-myc-Gens (2 p24) gefunden wird. Das N-myc-Gen kommt amplifiziert sehr häufig in Tumoren neuroektodermalen Ursprungs vor (Schwab et al., 1990). Eine verstärkte N-myc-Amplifikation wurde beschrieben beim Neuroblastom (Schwab et al., 1983), beim Retinoblastom (Choi et al., 1993), dem kleinzelligen Lungenkarzinom (Nau et al., 1986) und dem Astrocytom (Garson et al., 1985).

In Neuroblastomen kann das N-myc-Gen bis zu 700-fach amplifiziert vorliegen (Kohl et al.; 1983). Neuroblastome mit einer Amplifikation des N-myc-Gens wachsen besonders aggressiv. Ein hoher Amplifikationsgrad ist dadurch mit einer schlechten Prognose verbunden (Brodeur et al., 1994; Schwab et al., 1992).

Es gibt jedoch auch Neuroblastome, die sich in fortgeschrittenen Stadien befinden, ohne eine N-myc-Amplifikation aufzuweisen. In diesen Tumoren wird jedoch verstärkt N-myc-mRNA exprimiert. Eine verstärkte N-myc-Expression ohne N-myc-Amplifikation kann eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Neuroblastomen spielen (Wada et al., 1993).

1.2.2 Deletion am Chromosom 1 p 36

Neben der N-myc-Amplifikation gibt es noch weitere Faktoren, die den malignen Charakter des Tumors beeinflussen.

Deletionen sind chromosomale Veränderungen, die häufig bei Tumorzellen beobachtet werden. Sie lassen sich durch klassische Karyotypisierung von Metaphasezellen oder durch Fluoreszenz "in situ" Hybridisierung (FISH) nachweisen. Eine Deletion am kurzen Arm des Chromosoms 1 in der Region 3,

Bande 6 (=1 p 36) findet man in mehr als 70 % der Fälle in Neuroblastomen mit Patientenalter über 1 Jahr, oder in fortgeschrittenen Stadien (Brodeur et al., 1992). In der Lokalisation von 1 p 36 wird ein Tumorsuppressorgen vermutet, welches zur Entstehung und/oder Progression des Neuroblastoms beiträgt (Fong et al., 1989). Eine Untersuchung von 1995 führte zu dem Schluß, daß durch diese Deletion ein Repressorgen für das N-myc-Gen inaktiviert wird, und somit ein Zusammenhang zwischen der 1 p Deletion und der N-myc-Expression besteht. Beide Marker treten in fortgeschrittenen und höher malignen Stadien gemeinsam auf. In der Region 1 p 36 gibt es wahrscheinlich mehrere Tumorsuppressorgene. Bei einer Deletion am Chromosom 1 proximal von 1 p 35-36.1 ist das vermutete Repressorgen für N-myc betroffen, und es wird eine gleichzeitig verstärkte N-myc-Amplifikation nachgewiesen. Bei der kleineren Deletion im Bereich 1 p 36.23-33 besteht keine Korrelation mit dem Auftreten einer N-myc-Amplifikation (Cheng et al., 1995).

Von der 1 p 36.23-33 Deletion ist beim Neuroblastom in 87 % der Fälle das mütterliche Chromosom betroffen. Dies deutet hin auf ein "genomic imprinting" Phänomen, mit Inaktivierung des väterlichen Chromosoms (Caron et al., 1995). Neben der 1p Deletion werden noch weitere Deletionen und somit Verluste von Tumorsuppressorgen am Chromosom 11q, 14q und 17p beschrieben (Fong 1992). Es ist jedoch noch nicht bekannt, welche Funktionen diese Deletionen haben. Die 11q23 Deletion wird bei Neuroblastomen in fortgeschrittenen Stadien ohne N-myc-Amplifikation gehäuft gefunden (Guo et al., 1999).

1.2.3 Hyperplodie

In den verschiedenen Neuroblastomstadien werden unterschiedliche Karyotypen beobachtet, wobei die nahezu diploiden Chromosomensätze ausgerechnet bei späteren, prognostisch ungünstigen Stadien vorkommen (Look et al., 1984). Die Ploidiemessung kann durch Vergleich des DNA Gehalts der Tumorzellen mit dem von Lymphozyten im Impulszytofluorimeter durchgeführt werden.

1.2.4 Tyrosinkinase-Rezeptor Expressionen

Neurotrophine, wie der “nerve-growth-factor” (NGF), “brain-derived-growth-factor” (BDNF) oder Neurotrophin-3 (NT-3) aktivieren Tyrosinkinaserzeptoren (trk-Rezeptoren). Der trk-A-Rezeptor (trkA) ist der hochaffine Rezeptor für den Nervenwachstumsfaktor (NGF) (Kaplan et al., 1991). Die Bindung von NGF an den trk-A-Rezeptor der Nervenzellen ist für das Überleben der rezeptor-tragenden Zellen notwendig und fördert deren Differenzierung. Bei bösartigen Neuroblastomen wurde nur eine sehr geringe Expression des trk-A-Rezeptors beobachtet (Suzuki et al., 1993). Es besteht ein reziproker Zusammenhang zwischen der Amplifikation des N-myc-Gens und der Expression des trk-A-Rezeptors (Kogner et al., 1993).

Das trk-B-Gen codiert den Rezeptor für den “brain-derived-neurotrophic-factor” (BDNF) (Klein et al., 1991). Das trk-C-Gen codiert für den Rezeptor des neurotrophen Wachstumsfaktor NT-3 (Lamballe et al., 1993). Eine starke trk-C Expression wirkt sich beim Neuroblastom prognostisch günstig aus (Yamashiro et al., 1996), wohingegen bei undifferenzierten Neuroblastomen eine starke trk-B Expression gefunden wird (Nakagawara et al., 1994).

1.2.5 Angiogenese

Maligne Tumore sezernieren oft Wachstumsfaktoren, die die Zellproliferation, aber auch die Vaskularisierung, durch Aktivierung von Endothelzellen zur Neoangiogenese, ermöglichen. Beim Neuroblastom korreliert die N-myc-Amplifikation, die schlechte Prognose und die Disseminierung der Erkrankung mit einer hohen Neovaskularisierung. In Tiermodellen konnte mit Antiangiogenesefaktoren das Tumorwachstum unterdrückt werden (Wassberg et al., 1997).

1.2.6 Überexpression des "Multidrug resistance-associated protein"

Die Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika führt oft zu einer positiven Selektion von Zellen, die sog. Multi-Drogen-Resistenz-Transporterproteine (multidrug-resistance-protein) (MDR) exprimieren. Die Überexpression von MDR führt dazu, daß die Zellen gleichzeitig gegenüber einer Reihe von Chemotherapeutika unempfindlich werden. Das MDR-Protein pumpt die cytotoxischen Substanzen aus der Zelle heraus. Beim Neuroblastom korreliert eine MRP-Expression (multidrug-resistance-associated protein) mit der N-myc-Amplifikation (Bordow et al., 1994).

1.2.7 CD 44 Expression

Das Glykoprotein CD 44 ist ein Zelloberflächenmarker, der bei Zelladhäsionen involviert ist. Beim Neuroblastom wird der Nachweis von CD 44 als günstiger prognostischer Marker beschrieben (Combaret et al., 1996).

1.3 **Das N-myc-Protoonkogen**

Das N-myc-Gen gehört zur myc-Onkogenfamilie, zu der neben N-myc auch die Gene c-myc und L-myc gehören.

Das N-myc-Onkogen wurde erstmals 1983 von Schwab et al. beschrieben. Es handelt sich um eine c-myc verwandte DNA-Sequenz, die N-myc (N=Neuroblastoma) genannt wird. Das c-myc-Gen wurde als zelluläres Homolog zum transformierenden Gen des "avian-myelocytomatosis-virus" identifiziert (Vennstrom et al., 1982). N-myc und L-myc sind dagegen keine klassischen Protoonkogene, da für sie kein virales Gegenstück gefunden wurde. Aufgrund von Sequenzhomologien und einer ähnlichen genomischen Organisation, werden sie jedoch der myc-Familie zugeordnet (Yancopolous et al., 1985).

Die Lokalisation des N-myc-Gens ist das Chromosom 2 p 24 (Kanda et al., 1983). Das N-myc-Onkogen besteht aus 3 Exons und zwei Introns, wobei die proteincodierenden Sequenzen im zweiten und dritten Exon liegen. Das erste Exon codiert eine sehr lange Leadersequenz der mRNA (Stanton et al., 1986). Die mRNA des N-myc-Gens hat eine kurze Halbwertszeit von 30 bis 50 Minuten.

Das Genprodukt des N-myc-Gens stellt ein nukleäres Protein dar, das die Transkription von weiteren Genen steuert, die die Zellproliferation beeinflussen (Keim et al., 1993). Es besteht aus zwei Polypeptiden mit einem MG von 62 bzw. 64 kDa, die durch die Caseinkinase II phosphoryliert werden (Hamann et al., 1991).

Derartige genspezifische Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende-Proteine. Diese Genregulatorproteine erkennen spezifische DNA Sequenzen von 8-10 Nukleotiden in ihren Zielgenen durch bestimmte Motive innerhalb ihrer Aminosäuresequenzen. Die carboxyterminale Region besitzt eine "Helix-loop-Helix" (HLH) und eine "Leucin-Zipper (ZIP) Domäne, die die DNA bindenden Regionen der Myc-Proteine darstellen. Die N-terminale Region trägt die sogenannte "Myc-Box", die die transkriptionsaktivierende Domäne des Proteins darstellt. Für die Wirkung des N-Myc-Proteins ist ein weiteres b-HLH-Zip-Protein (Max) notwendig, das in der Lage ist, eine spezifische Interaktion mit der b-HLH-Domäne von Myc einzugehen (Myc-Max-Komplex). Dieser Komplex besitzt die Fähigkeit einer sequenzspezifischen DNA Bindung (CACGTG), die stärker ist, als die des nicht mit Max assoziierten Myc-Proteins (Blackwood et al., 1991). Die N-terminale Region des N-Myc-Proteins ist in der Lage, die Transkription anderer Gene zu aktivieren, die die Zellproliferation steigern. Die Heterodimerisierung des N-Myc-Proteins mit dem Max-Protein verstärkt diese Aktivität, während Max-Max Homodimere die Transkription der Zielgene unterdrücken (Wenzel et al., 1995) (Cole et al., 1999).

1.4 p21 ras-Protoonkogene

1.4.1 Die ras-Gene

Bei den ras-Genen wird zwischen mehreren verschiedenen Genen unterschieden. Für die Karzinogenese des Menschen sind vor allem drei ras-Gene von Interesse.

Das H-ras-Gen, welches im Harvey-Sarkoma-Virus erstmals beschrieben wurde, ist 3 kbp groß und auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert. H-ras wurde als erstes transformierendes Gen der ras-Familie in einem humanen Tumor, einem Blasenkarzinom, als Onkogen entdeckt. Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 ist das K-ras-Gen lokalisiert, das zuerst im Kirsten-Sarkoma-Virus entdeckt wurde und mit über 35 kbp das größte der drei ras-Gene ist. In humanen Tumoren ist es das am häufigsten aktivierte ras-Onkogen. Das N-ras-Gen wurde erstmals aus der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH isoliert, es ist 8 kbp groß und liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 (Barbacid et al., 1987). Eine Mutation des N-ras-Gens tritt beim Neuroblastom nur sehr selten auf. In frisch gewonnenem Tumormaterial sowie in weiteren Zelllinien des Neuroblastoms wurde sie nur mit einer Häufigkeit von 5 % gefunden (Moley et al., 1991).

1.4.2 Struktur und Funktion der Ras-Proteine

Bei den Genprodukten der ras-Gene handelt es sich um kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. Die Ras-Proteine gehören zur Familie der Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine).

Die Ras-Proteine besitzen eine GTP-bindende Region, eine GTPase Aktivität und eine GDP/GTP Austausch-Funktion (Barbacid et al., 1987). Sie besitzen Schalterfunktionen und wechseln zwischen zwei Konformationszuständen: als GTP-gebundene Moleküle sind sie aktiviert, während sie in der GDP-gebundenen Form inaktiv sind. Bei der Aktivierung z.B. durch Wachstumsfaktoren

wird GDP durch GTP ausgetauscht, wodurch das Protein aktiviert wird. Die Ras-Proteine besitzen eine endogene GTPase Aktivität, die durch einen allosterischen Aktivator (GAP) oder das Protein des Neurofibromatose-Gens (NF1) erhöht wird (Martin et al., 1990). Den negativen Regulatoren wirken die Guanin-nukleotid-freisetzenden Proteine (GNRPs) z.B. Sos entgegen, die den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP aus dem Cytosol fördern und dadurch Ras-Proteine aktivieren.

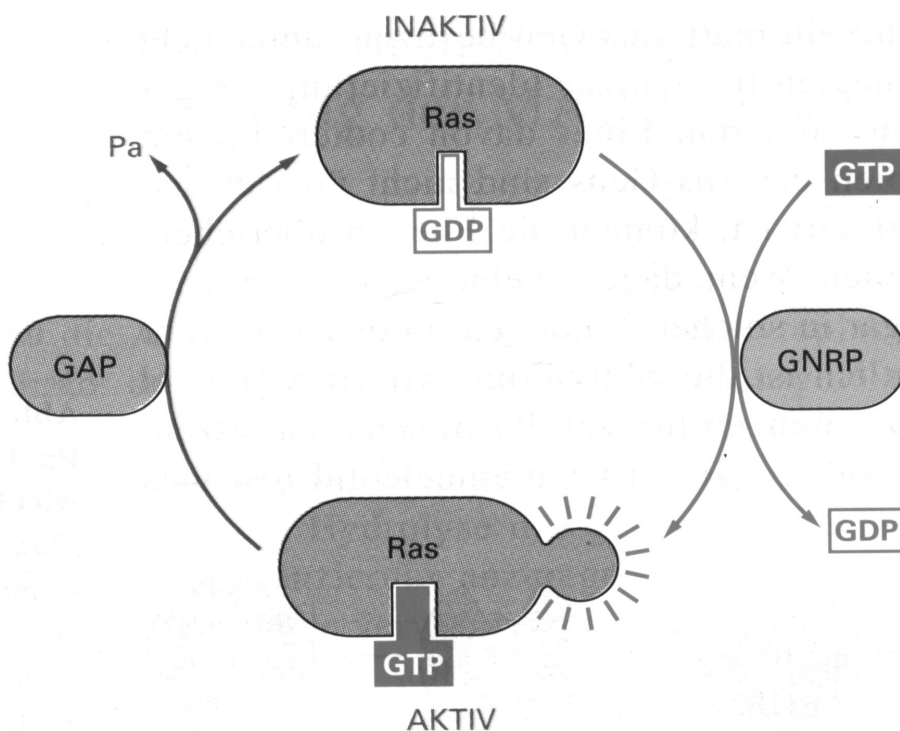


Abb.1: Schematische Darstellung der Regulierung der Aktivität von Ras-Proteinen

Die Ras-Proteine sind durch einen Farnesylrest an der Innenseite der Membran verankert. Diese Membranverankerung ist Voraussetzung für die biologische Aktivität der Ras-Proteine (Jackson et al., 1990; Casey et al., 1989). Die Farnesyl-Protein-Transferase (FPTase), eine Prenyltransferase, bewirkt diese posttranslationale Modifikation. Dieses Enzym besteht aus einer α Untereinheit, die das Farnesylpyrophosphat (Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese) bindet, und einer β Untereinheit, die das Ras-Protein bindet. Ras-Proteine besitzen an ihrem C-terminalen Ende das sog. CAAX-Motiv. Es handelt sich dabei um ein Tetrapeptid mit folgender Sequenz: Cystein, aliphatische-AS, alpha-

tische AS, X= beliebige AS, vorzugsweise Methionin, Serin, Alanin oder Glutamin (Haubruck et al., 1991). Die FPTase erkennt diese C-terminale CAAX Sequenz, die alle Ras-Proteine gemeinsam haben (Gutierrez et al., 1989). Weiterhin werden bei den meisten Ras-Proteinen benachbarte Cysteinreste palmitoyliert, was die Membranbindung verstärkt (Hancock et al., 1990).

1.4.3 Die Rolle der p21 Ras-Proteine bei der intrazellulären Signaltransduktion

Ras-Proteine besitzen als regulatorische Proteine eine Schlüsselfunktion bei der intrazellulären Signaltransduktion zwischen Oberflächenrezeptoren für Stimulationsfaktoren und dem Zellkern (Qui et al., 1991). Extrazelluläre Stimuli sind z.B. NGF (nerve-growth-factor), PDGF (platelet-derived-growth-factor), EGF (epidermal-growth-factor), FGF (fibroblast-growth-factor), IGF-1 (insulin-like-growth-factor) u.s.w. (Medema und Bos 1993).

Es ist jedoch nicht eindeutig spezifiziert worden, welches der drei in der Zelle vorkommenden Ras-Onkoproteine für die Signaltransduktion der jeweiligen Wachstumsfaktoren verantwortlich ist.

Durch Mutationen oder autokriner Stimulation können Ras-Proteine ständig aktiviert werden und somit zur Tumorgenese beitragen.

Mutierte Ras-Proteine treten als Folge von Punktmutationen der Codons 12, 13, 59 oder 61 auf. Diese mutierten Ras-Proteine können mit GTPase aktivierenden Proteinen nicht mehr in Wechselwirkung treten und sind somit ständig aktiv (Barbacid 1987).

20-30 % aller menschlichen Malignome werden Ras-Mutationen zugeschrieben (Bos et al., 1989), wobei beim Neuroblastom die Ras-Punktmutation eine untergeordnete Rolle spielt (Moley et al., 1990). Hier wird durch die autokrine Stimulation von Wachstumsfaktoren das Ras-Protein ständig aktiviert.

Aktivierte Ras-Proteine stimulieren Signalkaskaden, die unterschiedliche zelluläre Antworten induzieren (Joneson and Bar-Sagi 1997).

Die Rezeptoren, über die Ras-Proteine aktiviert werden, können Tyrosinkinase-rezeptoren (Mulcahy et al., 1985), Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (Woodrow et al., 1993) oder heterotrimere G-Proteine (Van Corven et al., 1993) sein. Wachstumsfaktoren, wie BDNF (brain-derived-neurotrophic-factor) oder IGF(insulin-like-growth-factor) werden extrazellulär an Tyrosinkinase-rezeptoren gebunden (Ullrich und Schlessinger 1990). Durch die Bindung der Liganden an den Rezeptor wird die intrazelluläre Tyrosinkinase aktiviert, deren Aktivität durch eine Autophosphorylierung noch verstärkt wird.

Über diese Tyrosinkinase-rezeptoren werden verschiedene cytosolische Proteine aktiviert, wie z.B. die Phospholipase C γ 1, Adapterproteine wie SHC und Grb2 oder die Phosphatidylinositolphosphat-3-Kinase.

Die Signalkaskade von IGF-II über den Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg ist bisher am ausführlichsten aufgeklärt worden.

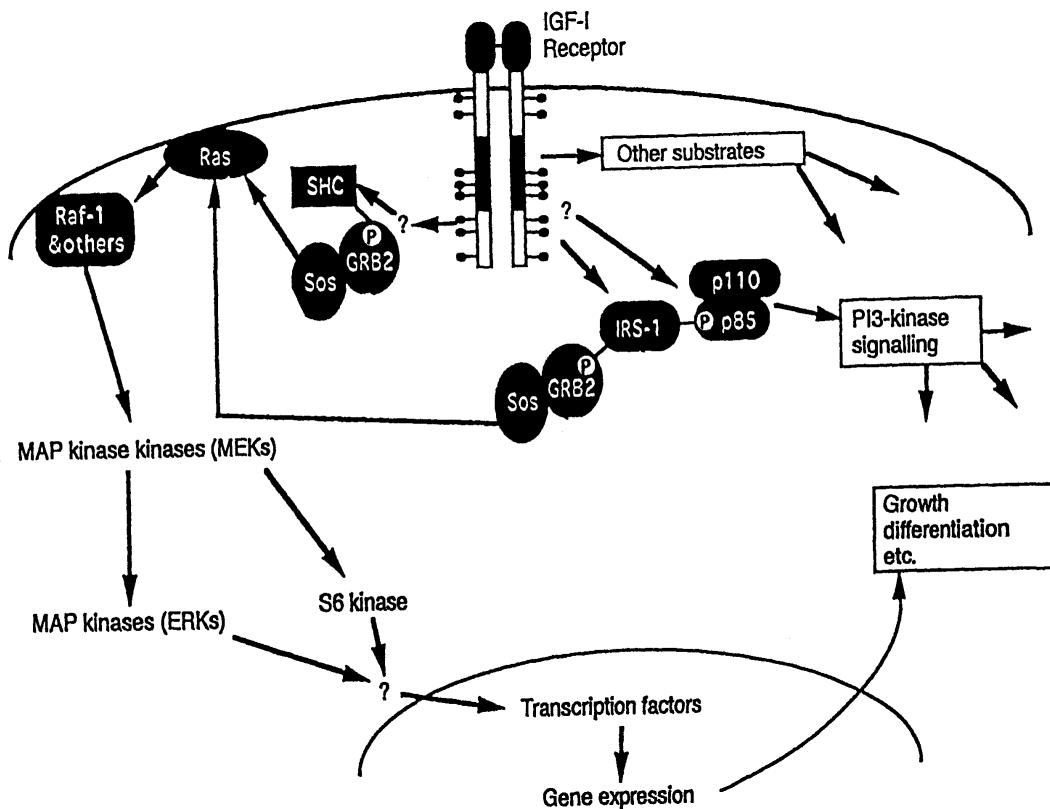


Abb. 2: Signaltransduktionsweg des IGF-Rezeptors-Typ-1 (modifiziert nach LeRoith, 1996)

Der Typ-I-IGF-Rezeptor ist ein Heterotetramer, daß aus 2 α -Ketten und 2 β -Ketten besteht und strukturhomolog zum Insulinrezeptor ist. Die Bindung des IGF-II an den IGF-Rezeptor-Typ-I führt zu einer Transphosphorylierung der cytosolischen Anteile der β Ketten des IGF-I Rezeptors. An bestimmte phosphorylierte Tyrosinreste des cytosolischen Anteils des Rezeptors binden die Adaptermoleküle SHC oder IRS-1, die das Signal an das Adapterprotein Grb2 weitergeben. An Grb2 wird der Ras-Aktivator Sos (son of sevenless) oder Ras-GRF (Guanosinnukleotid-releasing-factor) gebunden, der das p21 Ras-Protein aktiviert.

Das aktivierte Ras-Protein aktiviert die MAPKinase-Kinase-Kinase (Raf-Kinase), indem durch Bindung des Raf-Proteins an das aktivierte Ras-Protein in der Plasmamembran und anschließende Phosphorylierung des Raf-Proteins, dessen Kinaseaktivität verstärkt wird (Leevers et al., 1994). Die Serin-Threonin-Kinase Raf ist die erste Kinase einer Phosphorylierungskaskade, die über eine Ras-Aktivierung beschrieben wurde. Das aktivierte Raf-Protein phosphoryliert und aktiviert eine MAP-Kinase-Kinase, auch MEK genannt, an Serin- und Threoninresten (Marshall et al., 1994). Das Substrat für MEK, eine Threonin-Tyrosinkinase, ist die MAP-Kinase (Erk 1/2). MAP-Kinasen phosphorylieren ihre Zielproteine wiederum an Serin- und Threoninresten. Die MAPK wirkt entweder im Cytoplasma oder transloziert in den Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung stimuliert.

Transkriptionsfaktoren erfüllen ihre Aufgaben im Zellkern direkt am Promotor des regulierten Gens.

Aktivierte Ras-Proteine sind in der Lage, die Transkriptionsfaktoren, die mit den Promotoren früh exprimierender Gene assoziiert sind, zu aktivieren. Der c-fos Promotor besitzt regulatorische cis-Elemente, wie das SRE (serum-response element), das einen Komplex mit den regulatorischen Transkriptionsfaktoren SRF (serum-response-factor) und einem TCF (Ternary-complex-factor) bildet (Cahill et al., 1996). Zu den TCF-Proteinen gehört die Familie der ETS-Proteine (ELK-1, Sap-1a/b und Sap-2/Erp/Net). Die Transkription früh exprimierender Gene setzt innerhalb von Minuten nach der Stimulation einer Zelle durch Wachstumsfaktoren ein (Gille et al., 1995).

Zu den MAP-Kinasen gehören mindestens drei Enzyme: 1.) ERK (durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase) aktiviert u.a. die Transkriptionsfaktoren Elk1 (Marais et al., 1993) und c-Myc (Davis, 1995), 2.) JNK (Jun N-terminale Kinase) phosphoryliert c-Jun. Ein Substrat von 3.) p38 ist der Transkriptionsfaktor ATF-2.

1.4.4 Unterbrechung der Signaltransduktion durch Verhinderung der Membranverankerung der Ras-Proteine

Beim Neuroblastom kommt es durch autokrine Stimulation zur ständigen Aktivierung der Ras-Proteine, und somit über den Signaltransduktionsweg zur erhöhten Expression von Transkriptionsfaktoren (Keim et al.; 1993). Da die biologische Aktivität der Ras-Proteine von deren Membranverankerung abhängig ist, läßt sich durch Verhinderung der Membranverankerung der Signaltransduktionsweg der autokrinen Wachstumsfaktoren vom Rezeptor zum Zellkern unterbrechen (Jackson et al., 1990). Die Folge wäre, daß die Expression des c-fos, c-jun aber auch des N-myc-Gens nicht mehr von den Wachstumsfaktoren ausgelöst werden kann.

1.5 **Farnesyltransferaseinhibitoren**

Bei Tumoren, bei denen eine erhöhte Aktivität der Ras-Proteine eine entscheidene Rolle in der Pathogenese spielt, könnte die Inaktivierung von Ras-Proteinen durch Farnesyltransferaseinhibitoren von therapeutischem Nutzen sein. In den letzten Jahren wurde von vielen Arbeitsgruppen nach solchen Inhibitoren gesucht, und ihre Wirkung erforscht, um neue Wege in der Krebstherapie zu entwickeln. Solche Inhibitoren haben nur eine therapeutische Berechtigung, wenn sie das Wachstum von Tumorzellen hemmen, ohne eine Zytotoxizität gegenüber normalen Zellen zu haben. Es werden Farnesyltransferaseinhibitoren mit unterschiedlichen Mechanismen, mit ihren Vor- und Nach-

teilen beschrieben. Spezifische Hemmstoffe der Farnesylproteintransferase wurden sowohl in Struktur analogie zum Farnesylpyrophosphat als auch zur CAAX-Peptidsequenz der Ras-Proteine entwickelt.

Lovastatin bewirkt die Hemmung der HMG-CoA Reduktase, ein Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese. Durch die Unterbrechung der Cholesterinbiosynthese kann Farnesylpyrophosphat, ebenfalls ein Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese, nicht mehr synthetisiert werden, und somit das Ras-Protein nicht farnesyliert werden. Mit *Lovastatin* wurde bereits in verschiedenen Neuroblastomzelllinien eine Reduktion des N-Ras Proteingehalts in der Membranfraktion je nach Zelllinie zwischen 30 % und 43 % erreicht (Girgert et al., 1994).

Patulin, ein Metabolit verschiedener Pilzarten, bewirkt eine direkte Inhibition der FPTase.

Die beiden Farnesylpyrophosphat analoge \rightarrow *Hydroxyfarnesylphosphonat* und der FPT-Inhibitor III, ein Oxyaminoethylphosphonsäurederivat von Farnesol, besitzen zwar die hydrophobe, von dem Enzym Farnesylproteintransferase erkannte Farnesylstruktur, die nicht hydrolysierbare Phosphonatgruppe verhindert jedoch die Übertragung des Farnesylrestes auf das Cystein der Ras-Proteine, so daß diese beiden Hemmstoffe das Farnesylpyrophosphat kompetitiv von dem Enzym verdrängen (Manne et al., 1995). In H-ras-transformierten Mausfibroblasten wurde für die 50 %ige Hemmung der Farnesylierung des H-Ras-Proteins mit α -Hydroxyfarnesylphosphonat eine Konzentration von 1 μ M benötigt (Gibbs et al., 1993).

Tetrapeptide mit der CAAX-Sequenz erwiesen sich zwar als wirkungsvolle Hemmstoffe, konnten jedoch aufgrund ihrer polaren Struktur sehr schlecht in Zellen aufgenommen werden (James et al., 1994).

Peptidomimetika besitzen in ihrer räumlichen Struktur große Ähnlichkeiten zu den CAAX-Tetrapeptiden, weisen jedoch keine spaltbaren Peptidbindungen mehr auf, und enthalten weniger elektrisch geladene Gruppen, so daß die Permeation durch die Zellmembran verbessert ist (Kohl et al., 1994) (Lerner et al., 1995).

In vielen Fällen war es notwendig, für Zellkulturen und vor allen Dingen für die Anwendung im Tierversuch, eine Vorstufe, Prodrug zu entwickeln, die eine bessere Membrangängigkeit besitzt. Hierzu wurde die C-terminale Carboxylgruppe durch einen Methylester ersetzt, der nach der Aufnahme in die Zelle durch intrazelluläre Esterasen abgespalten wird, und dort in den eigentlichen Hemmstoff umgewandelt wird. Diese Substanzen wie z.B. "FTI-277" erwiesen sich als nicht toxisch und es wurden weder makroskopische noch mikroskopische Veränderungen im Knochenmark oder Gastrointestinaltrakt beobachtet (Kohl et al., 1994) (James et al., 1994) (Sun et al., 1995).

Die Beobachtung, daß Tumore ohne aktivierte Ras-Mutation, deren malignes Wachstum durch autokrine Wachstumsfaktoren ausgelöst wird, auf die Hemmung der Farnesylproteintransferase mit einer Blockierung des Wachstums reagieren können, war der Anlaß, die Auswirkungen des Farnesyltransferasehemmstoffes "FTI-277" auf das Wachstum von Neuroblastomzellen zu untersuchen (Sepp et al., 1995).

1.6 Der Wachstumsfaktor IGF-II (insulin-like-growth-factor) und seine Rezeptoren

IGF-I und IGF-II werden zusammengefaßt als Somatomedine bezeichnet. Beide Polypeptide bestehen aus einer singulären Peptidkette und weisen untereinander eine hochgradige Homologie von 62 % auf.

IGF-II ist ein schwach saures Peptid mit 67 Aminosäuren. Das IGF-II-Gen liegt am Ende des kurzen Armes von Chromosom 11 in unmittelbarer Nachbarschaft des Insulin-Gens (11p15) (Tricoli et al., 1984) (Brissenden et al., 1984). Es ist für das Gen eines Peptidhormons außergewöhnlich lang und komplex aufgebaut. Das menschliche IGF-II-Gen besteht aus 9 Exons und enthält 4 Promotoren. Die Verwendung unterschiedlicher Promotoren und der zugehörigen Exons bewirkt eine Heterogenität der IGF-II mRNA mit Längen zwischen 6 und 2,2 kb, die wie bei IGF-I gewebe- und entwicklungspezifisch exprimiert werden (Daughaday et al., 1989).

Die Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II sind Proteine, die neben anderen Wachstumsfaktoren den Zellen das Signal zum Wachstum geben. Die wachstumsfördernden Wirkungen beider IGFs laufen in erster Linie über den IGF-I-Rezeptor und in begrenztem Umfang über den Insulinrezeptor. Der IGF-I-Rezeptor ist ein Heterotetramer aus 2 α -Ketten und 2 β -Ketten. Der Typ-II IGF-Rezeptor besteht aus einer singulären Peptidkette und ist identisch mit dem Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor. IGF-II bindet zwar mit einer höheren Affinität an den IGF-II-Rezeptor, jedoch ist die Signaltransduktion des IGF-II-Rezeptors noch sehr unklar.

Der IGF-I-Rezeptor gehört zur Familie der Insulinrezeptoren, zu der neben dem Insulinrezeptor, der IGF-I-Rezeptor und der "insulin-receptor-related-receptor" gehört. Das IGF-I-Rezeptor Gen liegt auf dem Chromosom 15, ist über 100 kb groß und enthält 21 Exons, die eine 11 kb mRNA codieren (LeRoith et al., 1996) (Meghani et al., 1993). Der Wachstumsfaktor IGF-II spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von neuronalem Wachstum (Martin et al., 1993).

1.7 Autokrine Stimulation beim Neuroblastom

Tumore werden oft durch Wachstumsfaktoren stimuliert, den die Zellen selbst produzieren, und für den sie auch den dazugehörigen Rezeptor exprimieren. Diese autokrine Stimulation des Tumorwachstums wird bei einer Reihe von malignen Erkrankungen beobachtet (Bajzer et al., 1990). Die autokrine Stimulation führt zur ständigen Aktivierung der Signaltransduktionswege und somit zur erhöhten Expression von Transkriptionsfaktoren, die die Zellproliferation beeinflussen. Neuroblastome sezernieren den Wachstumsfaktor IGF-II und exprimieren seinen Rezeptor (El-Badry et al., 1989), aber auch andere Wachstumsfaktoren, wie BDNF und der dazugehörige Rezeptor trk-B, werden von Neuroblastomen exprimiert (Nakagawara et al.; 1994).

Die Unterbrechung der autokrinen Stimulation ist ein interessanter Ansatzpunkt für ursachenspezifische Therapiemöglichkeiten bei diesen Tumoren.

1.8 Aufgabenstellung

Defekte in Signaltransduktionswegen werden bei vielen Tumoren beobachtet. Beim Neuroblastom wird eine autokrine Stimulation durch Wachstumsfaktoren beschrieben. Sowohl in der Pharmaindustrie als auch in der Biologie und Medizin wird nach Inhibitoren gesucht, die diese Signaltransduktionswege unterbrechen und somit das Tumorwachstum unterdrücken können. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, die Auswirkungen der Unterbrechung der autokrinen Stimulation durch den Wachstumsfaktor IGF-II nach Inaktivierung der Ras-Proteine durch Farnesyltransferaseinhibitoren zu untersuchen.

1. Nachweis der autokrinen Stimulation durch den Wachstumsfaktor IGF-II und seinem Rezeptor

Im ersten Teil der Arbeit sollten Neuroblastomzellen auf die autokrine Stimulation von IGF-II sowie dessen Rezeptor geprüft werden. Mittels eines radioaktiven IGF-II Nachweises sollte die IGF-II Konzentration in Zellüberständen gemessen werden. Mit Hilfe der nicht-radioaktiven Northern-Blot Technik sollte die Expression des IGF-I-Rezeptors nachgewiesen werden.

2. Untersuchung des Signaltransduktionsweges von IGF-II über den IGF-I- Rezeptor auf verschiedenen Ebenen

Der IGF-II Signaltransduktionsweg wird u.a. über den Ras/Raf/MAPK/Signaltransduktionsweg beschrieben. Es werden Aktivierungen von Proteinkinasekaskaden bis zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie c-Fos, c-Jun und c-Myc beschrieben (Mattson et al., 1990) (Strong et al., 1994), (Haguel de Mouzon et al., 1991),

Mit Hilfe eines nicht-radioaktiven-MAPK-Assays sollte untersucht werden, ob durch IGF-II die MAPK aktiviert wird.

Beim Neuroblastom wird in fortgeschrittenen Stadien eine verstärkte N-myc-Amplifikation und Expression beobachtet. Es sollte überprüft werden, ob die N-myc-mRNA durch die autokrine Stimulation mit dem Wachstumsfaktor IGF-II

hochreguliert wird. Dieses sollte mit der nicht-radioaktiven Northern-Blot Technik untersucht werden.

3. Unterbrechung des Signaltransduktionsweges mit Inhibitoren der Farnesyltransferase und deren Auswirkung

Die Unterbrechung der autokrinen Stimulation ist ein Ansatzpunkt für ursachenspezifische Therapiemöglichkeiten bei diesen Tumoren.

In diesem Teil der Arbeit sollten die Auswirkungen der Unterbrechung der intrazellulären Signaltransduktion von IGF-II untersucht werden. Wie bereits beschrieben, ist das Ras-Protein nur aktiv, wenn es farnesyliert vorliegt.

Bei der Untersuchung der Hemmung der Ras-Membranverankerung in unserem Labor wurde gezeigt, daß nach 4 Tagen Behandlung mit 10 µM "FTI 277" in den Zelllinien Kelly und IMR32 eine 50 % Hemmung der Ras Membranverankerung erreicht wird (Girgert, persönliche Mitteilung), (Girgert et al., 2000, Abstract). Nach einer Hemmung der Membranverankerung der Ras-Proteine unter diesen Bedingungen sollte untersucht werden, welche Vorgänge bei der intrazellulären Signaltransduktion von aktivem Ras-Protein abhängig sind.

Durch Northern-Blots und semi-quantitative-RT-PCR sollten die Auswirkungen der Inaktivierung der Ras-Proteine auf die N-myc-Expression untersucht werden. Weiterhin sollte die Inaktivierung der MAPK nach Inaktivierung der Ras-Proteine untersucht werden.

4. Auswirkung der Hemmung der Ras-Membranverankerung auf die Zellproliferation

Die Auswirkungen dieser Hemmversuche auf das Wachstum der Neuroblastomzellen sollten in Proliferationsassays (MTT) überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Versuche verwendet:

Begasungsbrutschrank: Heraeus, Hanau

Elektroblottingapparatur: Biorad, Heidelberg

Elektrophoreseapparatur (14 x 10,5 cm): Marke Eigenbau, Kinderklinik

ELISA-Reader: Pharmacia, Freiburg

Homogenisationsgefäß: Braun, Melsungen

Homogenisationsmotor: Janke und Kunkel KG, Staufen

Hybridisierungsöfen: Bachofer, Reutlingen

Hyperfilm TM-ECL: Amersham, Braunschweig

Mikroskop Leitz Fluovert FS: Leitz, Wetzlar

Mikrowaage Analytic A120S: Sartorius, Göttingen

Netzgerät: Renner, Darmstadt

pH-Meter: WTW, Weilheim

Phast System: Pharmacia LKB, Freiburg

Plattenschüttler: Roth, Karlsruhe

Röntgenfilmkassette: Siemens GmbH, Berlin

Spektralphotometer PM2D: Zeiss, Oberkochen

Sterile Werkbank HLB 2472 GS: Heraeus, Hanau

Teflon-Kolben: Braun, Melsungen

Temp-Cycler-II-Coy: Laboratory Products, Am Arbor/USA

Tischzentrifuge Mikroliter: Hettich, Tuttlingen

UV Cross-Linker: Bachofer, Reutlingen

Variofuge K: Heraeus-Christ, Osterode

Videokamera CS-1 Imagen: Cybertech, Berlin

Software: Wincam, Berlin

2.1.2 Plastikmaterialien

Einmalpipetten, Petrischalen und Zentrifugenröhrchen: Greiner, Nürtingen
Zellkulturflaschen, Mikrotiterplatten und Einfrierröhrchen : Costar, Fernwald
Probengefäße: Eppendorf, Hamburg
Oligo-(dT)-Säulen, Elektrophoresekammer-und Kämme: Pharmacia, Freiburg
Zipper-Tops: Aldrich, Steinheim

2.1.3 Chemikalien

Salze und Lösungsmittel wurden in p.A. Qualität bei Sigma und Merck gekauft.
RPMI-1640 Medium, PBS-Dulbecco und Fötale Kälberserum lieferte die Firma Seromed, Berlin.

Phast-Gradientengele (10-15%), Native Pufferstreifen, DTT, Oligo-dT-Cellulose, "Bulk first strand puffer" und dNTP waren von Pharmacia, Freiburg.

Taq-Polymerase, Taq-Puffer und Q-solution waren von Quiagen, Hilden.

Hepes-Puffer, Gentamycin und DNA-Längenstandard wurden bei Gibco, Eggenstein gekauft.

Phenol/Chloroform Lösung, PVDF-Membran, Roti-Block und Maleinsäurepuffer wurde von Roth, Karlsruhe bezogen.

Pyrokohlensäurediethylester, Sodiu-laurylsulfat, Bromphenol, Ethylendiamintetraacetat, Mercaptoethanol, Trypanblau und Guanidin-Thiocyanat-Salz wurde von Sigma, München geliefert.

Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Fab-Fragment, RNA-Längenstandard II (1,6-7,4 kb), Blockierungslösung, PCR-Dig.-Synthese- Kit, Dig. markierte Kontroll-DNA und CSPD wurden von Boehringer, Mannheim bezogen.

Sodium-N-Lauroylsarcosinat lieferte die Firma Fluka, Neu-Ulm.

Dimethylsulfoxid (DMSO) stammte von Merck, Darmstadt.

Die verwendeten Primer wurden von Appligene, Illkirch hergestellt.

Die Nylonmembran Hybond N+ war von Amersham, Braunschweig.

Blotting Papier BF-2 wurde von der Firma Migge und Glock, Leonberg gekauft.

Der Hemmstoff "FTI 277" stammte von Calbiochem, Heidelberg.

IGF-II wurde von der Firma Mediagnost, Tübingen bezogen.

Der nicht-radiokative-MAPK-Immunopräzipitationskit wurde von der Firma Upstate erworben.

Okadaicssäure, Tautomycin, Aprotinin und PMSF wurden von der Firma Sigma bezogen.

Der BCA-Protein-Assay-Kit wurde von der Firma Pierce in Rockford (USA) bezogen.

2.1.4 Zelllinien

Die Neuroblastomzelllinie IMR32 wurde am Institut of Medical Research, Camden, New Jersey (Tumilowicz et al., 1970) etabliert und von der American Type Culture Collection gekauft.

Die Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und SK-N-AS wurden am Sloan-Kettering Institut, New York (Biedler et al., 1973) (Sugimoto et al., 1984) etabliert und über die American Type Culture Collection bezogen.

Die Zelllinie Kelly wurde an der Mount-Sinai-School of Medicine, New York etabliert (Schwab et al., 1983).

Die Rattenphäochromozytomazelllinie PC12 wurde an der Havard-Medical School, Boston etabliert (Greene und Tischler, 1976).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

Die gesamte Arbeit mit Zellkulturen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Kulturmedien:

RPMI-1640-Medium wird supplementiert mit:

- 10 % FCS
- 2 mM L-Glutamin
- 25 mM HEPES-Puffer
- 50 µg/ml Gentamycin

Einfriermedium:

- 40 % RPMI
- 45 % FCS
- 15 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

Das Medium wird bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.1.1 Anzucht und Subkultivierung von Tumorzellen

Die Neuroblastomzellen wachsen als adhärenente Zellen in RPMI-Medium in 5 % CO₂ in einem mit Wasserdampf gesättigten Brutschrank bei 37°C. Ein Mediumwechsel erfolgt an jedem 2. Tag. Ist die Konfluenz erreicht, werden die Zellen subkultiviert. Hierzu wird das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen 3 Minuten mit 2 ml 37°C warmen 1 mM EDTA in PBS⁻ inkubiert und danach von der Kulturflasche abgelöst. Dann werden die abgelösten Zellen in 10 ml RPMI Medium suspendiert und auf zwei Kulturflaschen verteilt (sog. Passagenwechsel). Die Kulturflaschen werden mit Medium auf ca. 20 ml aufgefüllt.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die adhären wachsenden Zellen werden abgelöst, die Zellsuspension in sterilen Zentrifugenröhrchen 10 Minuten bei 400 g abzentrifugiert, das Sediment in 500 µl Kulturmedium resuspendiert, 500 µl Einfriermedium hinzugegeben und anschließend wird die Zellsuspension in Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen werden schonend verpackt, 24 Stunden bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Zellen werden kurz bei 37°C aufgetaut und in Zellkulturflaschen mit 20 ml RPMI Medium pipettiert. Nach einem Tag muß das Kulturmedium gewechselt werden, da DMSO schädigend auf die Zellen wirkt.

2.2.1.3 Behandlung der Zellen mit dem Wachstumsfaktor IGF-II

Die Zellen werden 48 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Danach werden die Zellen mit [50 ng/ml] IGF-II für 15 bzw. 30 Minuten stimuliert und anschließend die mRNA isoliert. Aufgrund der hohen Plastikadhärenz der Wachstumsfaktoren wird dem serumfreien Medium 0,1 % BSA zugefügt.

2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit dem Hemmstoff "FTI 277"

Die Zellen werden für 48 Stunden mit [10 µM] Hemmstoff "FTI 277" in Vollmedium und für weitere 48 Stunden mit [10 µM] Hemmstoff "FTI 277" in serumfreiem Medium inkubiert. Die mRNA dieser Zellen wird dann sofort isoliert (Kontrolle) oder die behandelten Zellen werden nochmals für 15 bzw. 30 Minuten mit [50 ng/ml] IGF-II in serumfreiem Medium stimuliert und dann eine mRNA Isolierung durchgeführt.

2.2.2 Zellzahlbestimmung

20 µl Zellsuspension werden mit 20 µl Trypanblau (0,4 %) gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Die Zellen werden im Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt. Die vitalen Zellen sind ungefärbt, die toten Zellen färben sich blau. Die Zellzahl in einem Quadranten (16 große Quadrate) mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert, ergibt die Zellzahl pro Milliliter.

2.2.3 Proliferationstest (MTT)

Der MTT Proliferationstest ist ein quantitativ colorimetrischer Test, der lebende Zellen durch ihre mitochondriale Stoffwechselaktivität nachweist. Das den Zellen angebotene MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird von Mitochondrien vitaler Zellen in einer NADH abhängigen Reaktion zu Formazanen umgebaut. Die Farbintensität und Vitalität sind einander direkt proportional.

Durchführung:

In 96-Loch-Mikrotiterplatten werden 2×10^4 Zellen pro well in 50 µl

- a) Vollmedium (als Wachstumskontrolle)
- b) 0,2 % Serum

ausgesät und für 24 h bei 37°C kultiviert.

Nachdem die Zellen an Plastik adhärent angewachsen sind, wird

- a.) der Wachstumsfaktor IGF-II in 50 µl zugeführt. Die Endkonzentration beträgt [10, 50 und 100 ng/ml].

Zur Vermeidung der starken Plastikadhärenz von IGF-II wird 0,1 % BSA/RPMI als Lösungsmittel verwendet.

- b.) der Hemmstoff "FTI-277" [10 µM] zugegeben.

Nach verschiedenen Inkubationszeiten (0 h, 24 h und 48 h) werden je 10 µl MTT Lösung [0,5 mg/ml] zu den 100 µl Medium pro well zugegeben. Die 96-Loch-Platten werden für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Durch anschließende

Zugabe von 100 µl saurem Isopropanol [4mM HCl] pro well werden die Zellen lysiert. Die während der Inkubationszeit aus dem MTT gebildeten blauen Farbkristalle werden durch Ultraschall gelöst und bei 500 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm in Mikrotiterplattenphotometer gemessen. Als Nullwert wird die Extinktion in einem Ansatz bestimmt, der die jeweiligen Lösungen und Medium enthält, jedoch keine Zellen.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolierung der mRNA

Der Anteil der mRNA beträgt nur 3-5 % der Gesamt-RNA einer Zelle. Zuerst wird aus den Zellen die Gesamtmenge aller Nukleinsäuren isoliert. Diese Präparation dient als Ausgangsmaterial zur mRNA-Isolierung. Der Extraktionspuffer, in dem die Zellen homogenisiert werden, enthält Guanidiniumthiocyanat mit einer chaotropen Wirkung. Es bewirkt eine Denaturierung der Proteine und Inaktivierung der RNA-Endonukleasen, welche die RNA nach dem Homogenisieren der Zellen verdauen könnten (Chirgwin et al., 1979). Die anschließende Chloroform-Phenol-Extraktion dient der Abtrennung von Proteinen aus dem Isolat. Durch eine anschließende Ethanol-fällung werden die Nukleinsäuren konzentriert.

Eukaryontische mRNA besitzt an ihrem 3' Ende eine Kette von etwa 200 Adenylresten. Diese Eigenschaft wird zur Isolierung der mRNA ausgenutzt. Die Oligo-(dT)-Cellulose dient dabei mit ihren Thymidinresten als Hybridisierungspartner der Adenylketten der mRNA-Moleküle. Die Intensität der Bindung nimmt mit der Salzkonzentration des umgebenden Puffers zu. Deshalb finden die Bindung der mRNA an die Oligo-(dT) Cellulose und die ersten Waschschriffe im Bindungspuffer mit einer relativ hohen NaCl Konzentration [0,5 M] statt. Die weiteren Waschschriffe im "Low-salt-Puffer" mit einer geringeren NaCl-Konzentration [0,1 M] dienen der Auflockerung der Bindung zwischen mRNA und

Oligo-(dT)-Cellulose. Eluiert wird die mRNA von der Oligo-(dT)-Cellulose bei 68°C mit einem Elutionspuffer, welcher kein NaCl enthält.

Durchführung:

Präparation der Zellen und Homogenisierung:

Die Zellen werden von der Kulturflasche mit 5 ml PBS/EDTA abgelöst und 10 Minuten bei 400 g abzentrifugiert. Anschließend wird eine Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

Das Pellet wird in 1 ml Extraktionspuffer aufgenommen (37°C), gevortext und homogenisiert. Alle Schritte sollten auf Eis erfolgen. Das Homogenat wird mit 2 ml Elutionspuffer verdünnt, anschließend wird 5 Minuten zentrifugiert (11000 g, 4 °C).

Chloroform-Phenol-Extraktion

3 ml Chloroform-Phenol-Gemisch werden mit dem zentrifugierten Überstand versetzt, geschüttelt und 5 Minuten bei 4500 rpm in der Variofuge Heraeus zentrifugiert. Es entstehen 2 Phasen. An der Phasengrenze sammeln sich die denaturierten Proteine als weiße Bande gut sichtbar an. Die oberstehenden DNA- und RNA-haltige wässrige Phase wird abgenommen.

Die Nukleinsäurelösung wird mit 1/10 (Volumen) [2,5 M] Kaliumacetat (pH 5,0) und mit dem 2,5 fachen (Volumen) 100 % kaltem Ethanol für mindestens 24 Stunden gefällt (20°C). Anschließend wird die Lösung 5 Minuten bei 11 000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für ca. 1 Stunde getrocknet. Das Pellet wird in 100 µl "High-salt-Puffer" aufgenommen, resuspendiert und die Konzentration der Nukleinsäure bei 260 nm bestimmt (1:200 Verdünnung).

mRNA Isolierung

1 ml Oligo-(dT)-Cellulose [25 mg/ml] in Bindungspuffer wird für 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Nukleinsäurelösung wird auf das Oligo-(dT)-Cellulose-Pellet pipettiert und für 3 Minuten geschüttelt. Anschließend wird 10 Sekunden bei 11 000 g zentrifugiert.

Das Sediment wird 5 mal mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen (jeweils 10 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert). Danach wird 2 mal mit jeweils 1 ml Puffer

eines niedrigen Salzgehaltes (Low-salt-Puffer) gewaschen. Das Sediment wird in 300 µl "Low-salt-Puffer" aufgenommen. Diese Suspension wird auf eine Säule für die Oligo-(dT) Chromatographie pipettiert und zentrifugiert. Es werden nochmals 300 µl "Low-salt-puffer" auf diese Säule pipettiert und zentrifugiert. Anschließend wird die gebundene mRNA 2 mal mit jeweils 300 µl eines auf 65°C erwärmten Elutionspuffers von der Oligo-(dT)-Cellulose zentrifugiert. Dann erfolgt die Bestimmung der mRNA-Konzentration im Eluat und eine erneute Ethanol-fällung.

Photometrische Bestimmung der RNA Konzentration

RNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Definitionsgemäß entspricht eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer RNA-Konzentration von [40 µg/ml]. Daraus ergibt sich für die Berechnung der RNA-Konzentration in den Proben folgende Formel:

$$E_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA } [\mu\text{g/ml}]$$

Neben der Messung bei 260 nm wird eine weitere OD-Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Der Quotient E_{260}/E_{280} erlaubt eine Aussage über die Reinheit der RNA Präparation: Werte größer als 2,0 weisen auf eine hohe RNA-Reinheit hin, während Werte kleiner als 1,8 für eine Kontamination der Probe mit Proteinen sprechen.

Die zweite Ethanol-fällung dient der Verringerung des Probenvolumens auf 10 µl. Es folgt eine weitere photometrische Bestimmung der mRNA Konzentration. Bis zur weiteren Verwendung werden die mRNA Proben bei -70 C gelagert.

Zur mRNA-Isolierung wurden 7-10 Millionen Zellen eingesetzt. Aus diesen Zellen wurden durch Chloroform-Phenol-Extraktion 100-200 µg Gesamt-RNA gewonnen. Durch die Affinitätschromatographie an Oligo-(dT)-Cellulose wurden aus der Gesamt-RNA etwa [5-10 µg] mRNA isoliert. Dieses entspricht einer 20-fachen Anreicherung der mRNA.

Verwendete Puffer und Chemikalien:

Extraktionspuffer:	4 M GTC 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) 1 % Mercaptoethanol 0,5 % Sarcosine
High-salt-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA 0,5 M NaCl
Low-salt-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA 0,1 M NaCl
Elutionspuffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA
Oligo-(dT)-Cellulose:	25 mg/ml (Bindungspuffer)
Kaliumacetat:	2,5 M Kaliumacetat (pH 5,0)
PBS-EDTA:	1 mM EDTA PBS (w/o Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺)

2.2.4.2 Northern-Blotting

Zur Quantifizierung der Genexpression werden die mRNA Proben unter denaturierten Bedingungen in einem Agarosegel elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Daraufhin folgt das Übertragen der mRNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran durch Kapillarkräfte (Blotting). Durch das an-

schließende UV-Crosslinken kommt es zu kovalenten Bindungen zwischen der mRNA und der Nylonmembran.

Die mit den mRNA Molekülen beladene Nylonmembran wird mit Digoxigenin markierten cDNA-Sonden hybridisiert. Die markierte cDNA-Sonde kann nach der Bindung an die spezifische mRNA durch eine immunologische Reaktion nachgewiesen werden. Dazu wird ein Anti-Dig.-Antikörper, welcher das Enzym Alkalische Phosphatase trägt, mit der Nylonmembran inkubiert. Das zum Schluß hinzugegebene Detektionsreagenz wird von der Alkalischen Phosphatase des Antikörpers unter Freisetzung von Licht umgesetzt, welches auf einem Röntgenfilm festgehalten wird.

2.2.4.2.1 mRNA-Elektrophorese

Die mRNA wird nach Molekulargewichten in einem [0,8 %] Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu werden die Proben 10 Minuten bei 70 °C denaturiert, um Bindungen komplementärer Sequenzen zu verhindern. Danach werden die Proben auf Eis gestellt, um Reassoziationen zu vermeiden.

Die elektrophoretische Auftrennung der mRNA erfolgt bei 110 V, max. 60 mA für 3 Stunden.

Gelzusammensetzung: 0,8 % Agarosegel (Schmelztemperatur 36 °C)
 20 mM MOPS (4-Morpholino-propansulfat)
 1,1 % Formaldehyd

Verwendete Puffer:

10 X MOPS 200 mM MOPS (pH 7,0)
 50 mM Natriumacetat
 10 mM EDTA

Probenpuffer: 50 % Formamid
 6 % Formaldehyd
 0,025 % Bromphenol
 3 % Glycerin
 20 mM MOPS

Laufpuffer: 20 mM MOPS

2.2.4.2.2 Northern-Blotting

Die nach Molekulargewichten aufgetrennte mRNA wird auf eine Nylonmembran übertragen (geblottet).

Für den Transfer der RNA von dem Gel auf die Nylonmembran wird ein sog. "downward-blotting" von oben nach unten verwendet. Zuerst wird das Gel 3 x 5 Minuten in DEPEC-Wasser gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Anschließend wird das Gel in 20 x SSC äquilibriert. Auf einen Stapel Papiertücher werden fünf Streifen Blotting-Papier und die positiv geladene Nylonmembran in Gelgröße (10 x 12,5 cm) gelegt. Unmittelbar auf der Membran kommt das Gel zu liegen. Über das Gel werden nochmals drei Blotting-Papiere in Gelgröße und darüber zwei längere Blotting-Papiere, die in ein Vorratsgefäß mit 20 x SSC reichen, gelegt. Das Blotting-Papier, sowie die Nylonmembran sind mit 20 x SSC getränkt. Nach 14 Stunden blotten wird die Nylonmembran 5 Minuten in DEPEC-Wasser gewaschen und 1 Stunde getrocknet.

20 X SSC: 3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat (pH 7,0)

2.2.4.2.3 Fixierung der RNA auf der Membran

UV Bestrahlung [0,15 J/cm²] stabilisiert die Bindung der RNA an der Nylonmembran. Die UV Bestrahlung führt zu Strangbrüchen. Durch die entstehenden offenen Enden wird die RNA besser an die Nylonmembran gebunden.

2.2.4.3 Markierung von cDNA-Sonden über Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion und gleichzeitigem Digoxigenineinbau (RT-PCR Digoxigenin labeling)

Da die Polymerasekettenreaktion DNA als Ausgangsmaterial benötigt, erfolgt zunächst die Anfertigung einer komplementären DNA Kopie (cDNA). Die cDNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transcriptase hergestellt. Reverse Transcriptase ist ein Enzym, welches aus Retroviren isoliert wird und in der Lage ist RNA in DNA zu transkribieren. Dieses Template (RNA-DNA-Hybrid) wird in die Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Durch die PCR erfolgt eine Vermehrung (Amplifikation) von bestimmten cDNA-Sequenzen aus dem Gen. Bei der PCR bedient man sich der Eigenschaften der DNA Replikation. Zwei Primer, deren Sequenz komplementär zu einem Randbereich von jeweils einem der beiden Stränge der cDNA ist, fungieren dann als Startermoleküle für die DNA Synthese durch die Taq-Polymerase.

Durchführung:

a.) *Reverse Transkriptase (RT)*

Die als Ausgangsmaterial benötigte mRNA wurde aus Neuroblastomzellen der Zelllinie IMR32 isoliert. Die mRNA wird 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Anschließend wird folgendes Pipettierschema entsprechend der Anleitung des "First-strand-cDNA-Kit" (Pharmacia) verwendet.

Material und Methoden

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
mRNA	8 µl	1 µg/15µl
"Bulk first strand"*	5 µl	
DTT (200 mM)	1 µl	15 mM
Primer B (25 pmol/µl)	1 µl	1,67 µM

*"Bulk first strand Puffer" : 45 mM Tris (pH 8,3); 68 mM KCl; 9 mM MgCl; 0,008 mg/ml BSA; je 1,8 mM dNTP; Reverse Transcriptase [5 U/µl]; RNase-Inhibitor [2,7 U/µl].

Die 15 µl Gesamtvolumen werden für 1 h bei 37°C inkubiert.

Das RT-Produkt (RNA-DNA-Hybrid) ist Ausgangsmaterial für die PCR.

b.) Polymerasekettenreaktion (PCR) (Taq-DNA Polymerase Kit von Quiagen)

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
RT	5 µl	
dNTP Stocklösung*	4 µl	200 µM/Nukleotid
10 x Q-Lösung*	10 µl	
A-Primer (25 pmol/µl)	1 µl	0,5 µM
B-Primer (25 pmol/µl)	1 µl	0,5 µM
10 x PCR-Puffer*	5 µl	
Taq DNA-Polymerase* (5 U/µl)	0,5 µl	0,05 U/µl
DEPEC-Wasser	23,5 µl	

*10xPCR-Puffer: Tris-Cl; KCl; (NH₄)₂SO₄; 15 mM MgCl₂; pH 8,7 (20 °C)
(Fertiglösung von Quiagen, unbekannte Konzentrationen)

* Q-Lösung. 10 x konzentriert (Fertiglösung von Quiagen)

*dNTP Mix: 10 mM dATP; dCTP; dGTP und dTTP

c.) PCR Programm

1. Die cDNA wird zu Beginn bei 92°C für 30 Sekunden denaturiert.
2. Nach Absenkung der Temperatur erfolgt die Anlagerung der Primer an den jeweiligen DNA Einzelstrang bei einer für jedes Gen spezifischen Temperatur für 1 Minute. Dieser Vorgang wird als "Annealing" bezeichnet.
3. Dann erfolgt die DNA-Synthese mit Hilfe der Taq-Polymerase in Gegenwart von Nukleotiden bei 72°C für 1 Minute und 30 Sekunden. Die Schritte 1-3 werden abhängig vom Gen in 20 -30 Zyklen wiederholt.

Zum Schluß erfolgt die Auffüllreaktion für 10 Minuten bei 72°C.

Als Endergebnis einer PCR enthält das Reaktionsgemisch am Ende von n Zyklen ein theoretisches Maximum von 2^n doppelsträngigen DNA Molekülen, die Kopien der zwischen den Primern gelegenen DNA Sequenz darstellen.

Die Zyklusbedingungen sowie die "Annealing-Temperatur" sind abhängig von Template, Primer und Thermocycler. Die Anzahl der Zyklen, sowie die "Annealing-Temperatur" müssen für jedes Gen empirisch bestimmt werden.

d.) Verwendete Primer

Die cDNA Sonden werden durch die RT-PCR unter Verwendung der Primer A und B mit folgender Sequenz hergestellt:

N-myc-A-Primer: 5' TGATCTGCAAGAACCCAGAC 3'

N-myc-B-Primer: 5' CTTGTTACGGGAAAGGGGA 3'

Die N-myc-cDNA Sonde ist 561 bp lang und der Sequenz der mRNA zwischen der Base 1660 und der Base 2221 komplementär (Stanton et al. 1986).

GAPDH A-Primer: 5' AAGGACTCATGACCACAGTC 3'

GAPDH-B-Primer: 5' CTACATGGCAACTGAGAGGA 3'

Die GAPDH-cDNA Sonde ist 618 bp lang und der Sequenz der mRNA zwischen der Base 685 und der Base 1303 komplementär (Hanauer et al., 1984).

IGF-1 Rezeptor A-Primer: 5' TGAGTAGAACTACCGCTGCT 3'

IGF-1 Rezeptor B-Primer: 5' TTCTTCCTCACAGACCTTCG 3'

Die IGF-I Rezeptor-cDNA Sonde ist 408 bp lang und der Sequenz der mRNA zwischen der Base 642 und der Base 1050 komplementär (Ullrich et al., 1986).

IGF-II A-Primer: 5' ATGCTGGTGCTTCTCACCTT 3'

IGF-II B-Primer: 5' GACTGCTTCCAGGTGTCATA 3'

Die IGF-II Sonde ist 340 bp lang und der Sequenz der mRNA zwischen der Base 275 und der 615 Base komplementär (Bell et al., 1994).

e.) Elektrophorese und Silberfärbung zum Nachweis der PCR-Produkte

Das fertige PCR Produkt wird anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer Silberfärbung nachgewiesen. Als Größenmarker wird ein DNA-Marker verwendet.

4 µl des Amplifikationsansatzes werden auf einem Polyacrylamidgradientengel [10-15 %] aufgetrennt. Im Vorlauf werden die Ionen bei 10 mA für 200 Vh ins Gel transportiert. Zu Beginn des zweiten Schrittes werden die Proben bei einer Stromstärke von 1 mA für 2 Vh aufgetragen. Die Trennung der cDNA erfolgt bei einer Stromstärke von 10 mA für 75 Vh.

Die Gelbanden werden durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht.

Entwickler: 2,5 % Natriumcarbonat (w/v), 0,033 % Formaldehyd

Konservierer: 10 % Essigsäure, 10% Glycerin

Silberfärbung der Gele:

Schritt	Lösungen	t (min.)	T (°C)
1	20 % Trichloressigsäure	5	20
2	8,3 % Glutaraldehyd	5	50
3	Aqua bidest.	2	50
4	Aqua bidest.	2	50
5	Aqua bidest.	2	50
6	0,5 % Silbernitrat	8	40
7	Aqua bidest.	0,5	30
8	Aqua bidest.	0,5	30
9	Aqua bidest.	0,5	30
10	Entwickler	4	30
11	Entwickler	2	50
12	5 % Essigsäurekonservierer	3	50

f.) PCR zum Einbau von Digoxigenin in die cDNA Sonde

Nach ausreichender Amplifikation des Gens erfolgt der Einbau von Digoxigenin in die cDNA Sonde, der ebenfalls mit Hilfe der PCR stattfindet. Digoxigenin wird in Form von Dig.-11-dUTP anstelle von dTTP in die amplifizierte cDNA eingebaut. Hierzu wird der "PCR DIG Probe Synthese Kit" von Boehringer Mannheim (Roche) verwendet.

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
RT Produkt	5 µl	
*10 x PCR-Puffer	5 µl	
*10 x PCR Dig.-Mix	5 µl	200 µM dNTP
A-Primer (25 pmol/µl)	1 µl	0,5 µM
B-Primer (25 pmol/µl)	1 µl	0,5 µM
*Enzym-Mix	0,75 µl	
DEPEC-Wasser	32,25 µl	

* Enzym-Mix: 3,5 Einheiten/µl Taq DNA Polymerase (Expand High Fidelity), 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 100 mM KCl; 1 mM DTT; 0,1 mM EDTA; 0,5 % Tween 20 (v/v); 0,5 % Nonidet P40 (V/v); 50 % Glycerin(v/v)

* 10 x PCR-Puffer: Expand High Fidelity Puffer, 10 x Mg Cl₂

* 10 x PCR-Dig.-Mix: dATP; dCTP; dGTP (jeweils 2 mM); 1,3 mM dTTP; 0,7 mM Dig.-11-dUTP, Alkali-labil (pH 7,0)

g.) Qualitätskontrolle der Markierung der Sonde (Dot-Blot)

Die Dot-Blot Methode erlaubt einen schnellen Nachweis der Markierungseffizienz der Sonde. Die markierte Sonde wird in einer Verdünnungsreihe auf die Nylonmembran transferiert.

Der Nachweis erfolgt durch, an eine Anti-Dig.-Antikörper gekoppelte, Alkalische Phosphatase (Dig-AP-Fab-AK) und nachfolgender Chemolumineszenz.

2.2.4.4 Hybridisierung und Detektion mit Digoxigenin-markierten-cDNA-Sonden

Die mit Digoxigenin-markierte-cDNA-Sonde hybridisiert mit der spezifischen mRNA. Durch mehrmaliges Waschen bei unterschiedlichen Temperaturen bleiben nur die exakt gepaarten Hybride gebunden. Das Hybridisierungsprodukt

wird dann mit einem Alkalische Phosphatase markierten Antikörper gegen Digoxigenin nachgewiesen.

Praehybridisierung

Die Nylonmembran wird mit 10 ml Hybridisierungspuffer für 1 Stunde bei 68°C vorhybridisiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen abzudecken und vorhandene Loopbildungen zu öffnen.

Hybridisierung

Die cDNA-Sonde [25-100 ng/ml] wird 10 Minuten gekocht, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Dann wird die Sonde zu dem Hybridisierungspuffer pipettiert und der Northern-Blot über Nacht bei 65°C im Hybridisierungsofen inkubiert.

Waschen

Die Nylonmembran wird anschließend 3 mal für 30 Minuten bei 65°C mit Waschpuffer gewaschen, sodaß nur noch die genau gepaarte Sonde hybridisiert bleibt.

Anschließend wird die Membran für 5 Minuten in Maleinsäurepuffer gewaschen.

Nachweis der Hybridisierung

Die Membran wird mit 10 ml Blockierungslösung 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wird die Membran mit 10 ml Anti-Digoxigenin-AP-AK für 30 Minuten inkubiert und danach 3 mal für 45 Minuten mit Maleinsäurepuffer gewaschen. Anschließend wird die Membran nochmals 10 Minuten in AK-Puffer äquilibriert.

Die Membran wird 5 Minuten mit dem Detektionsreagenz inkubiert. Das im Reaktionsreagenz enthaltene CSPD dient der, an den Anti-Dig.-Antikörper gebundenen Alkalischen Phosphatase als Substrat, welches unter Entstehung von Chemolumineszenzlicht umgesetzt wird.

Die Membran wird in eine durchsichtige Plastiktüte verpackt, in eine Filmkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Der Film wird je nach verwendeter Sonde zwischen 30 Minuten und 120 Minuten exponiert und anschließend entwickelt und fixiert.

Material und Methoden

Verwendete Puffer:

SSC (20X): 3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat (pH 7,0)

Hybridisierungspuffer: 250 mM Di-Natriumhydrogenphosphat (pH 7,2)
1 mM EDTA
20 % SDS
0,5 % Boehringer Blockingreagenz

Waschpuffer: 20 mM Di-Natriumhydrogenphosphat
1 mM EDTA
1 % SDS

AK-Puffer: 100 mM Tris HCl (pH 9,5),
100 mM NaCl

Anti-Digoxigenin-AP-AK: Anti-Dig.-AP wird 1:20000
mit AK-Puffer verdünnt

Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure (pH 7,5)
150 mM NaCl

Blockierungslösung: 1 %ige Lösung des Blockierungsreagenz
wird mit MS-Puffer verdünnt

Detektionsreagenz: CSPD (1:100) in AK-Puffer

2.2.4.5 Recyclen des Northern-Blot

Es ist möglich den Northern-Blot nach jeder Hybridisierung von der gebundenen Sonde zu befreien und anschließend mit einer weiteren Sonde zu hybridisieren. Der Northern-Blot wird für 10 Minuten in dem Recyclingpuffer gekocht [0,1 % SDS] und sofort aus der Lösung entfernt, um Reassoziationen mit der Sonde zu verhindern.

2.2.4.6 Semi-quantitative RT-PCR zum Nachweis der mRNA Expression

Für den quantitativen Nachweis der mRNA Expression aus Zellen mit sehr niedrigem RNA Gehalt, wie z.B. Zellen, die mit einem Hemmstoff behandelt wurden oder den Nachweis spezifischer mRNA, die nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird, ist es schwierig die Northern-Blot-Technik anzuwenden, weil für den Northern-Blot normalerweise [5-10 µg] mRNA benötigt werden. Bekanntlich sind für die PCR Reaktion bereits [0,5-1 µg] cDNA als Ausgangsmaterial ausreichend. Mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR wird daher die mRNA Expression aus Zellen mit sehr geringem mRNA Gehalt bestimmt.

Durchführung:

Zunächst wird mit Hilfe einer Verdünnungsreihe und unterschiedlichen Zyklenzahlen (20-30 Zyklen) die optimale DNA Amplifikationsphase gewählt, um nicht in die Sättigung der Reaktion zu gelangen.

Hierzu wird das RT-Produkt von [0,1 µg]; [0,2 µg]; [0,5 µg] und [1 µg] bei unterschiedlicher Zyklenzahl (20,22, ..30) amplifiziert. Die Durchführung der RT-PCR erfolgt wie unter 2.2.4.3 beschrieben.

Anhand einer Kurve, in der die Signalintensität des Produktes gegen die Zyklenzahl aufgetragen wird, wird die optimale Zyklenzahl bestimmt, bei der ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter RNA-Menge und dem erzeugten Produkt besteht.

Ist die optimale "Annealing-Temperatur", Zyklenzahl und Template-Konzentration bestimmt, werden die zu untersuchenden mRNAs isoliert, amplifiziert,

elektrophoretisch aufgetrennt und gefärbt (2.2.4.3). Zur quantitativen Bestimmung der Expression werden die Signale im silbergefärbten Polyacrylamidgel mittels einer Videokamera gescannt. Die Auswertung erfolgt mit dem Wincam Software Programm.

Die Primer für die RT-PCR wurden wie unter 2.2.4.3 beschrieben verwendet. Der N-myc B Primer wurde neu gewählt:

N-myc-A-Primer: 5' TGA TCT GCA AGA ACC CAG AC 3'

N-myc-B-Primer: 5' TCG TTC TCA AGC AGC ATC TC 3'

2.2.5 Nicht-radioaktiver Nachweis der MAPK-Aktivität

Für den Nachweis der MAPK-Aktivität wird zunächst die MAPK spezifisch von anderen im Cytosol vorhandenen Kinasen mittels einer Immunpräzipitation getrennt und anschließend mit Hilfe des Substrats MBP (myelin-basic-Protein) nachgewiesen. Der Antikörper (Anti-MAPK ERK-1 und ERK-2) ist spezifisch gegen die Aminosäuren 333-337 von ERK-1 und ERK-2 gerichtet. Laut Herstellerangaben (Upstate) wurden keine Kreuzreaktionen gegenüber anderen MAPK wie z.B. JNK oder p38 beobachtet (Yon et al., 1996), (Boulton et al., 1990).

Die Menge des durch die MAP-Kinase phosphorylierten MBP wird auf einem Western-Blot mit einem phospho-MBP-spezifischen Antikörper quantifiziert.

2.2.5.1 Lyse der Zellen

Die zu untersuchenden Zellen werden mit PBS von der Kulturflasche abgelöst, abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl Lysepuffer resuspendiert, gevortext und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Kerne abzentrifugiert und vom Überstand eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Lysepuffer: 50 mM Tris HCl (pH 7,5); je 1mM EDTA und EGTA; 0,5 mM Na_3VO_4 ; 1 % Triton-X; 50 mM Natriumfluorid; 5 mM Natriumpyrophosphat; 0,1 % Mercaptoethanol; 0,1 mM PMSF; je 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, Pepstatin und Leupeptin ; 100 nM Okadaicsäure; 1 μM Tautomycin

2.2.5.2 Proteinbestimmung nach Pierce (Bicinchoninic Acid (BCA))

Der BCA-Assay kombiniert die Biuret-Reaktion (Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Protein unter alkalischem pH) und die Fähigkeit von BCA, mit Cu^{1+} einen stabilen, photometrisch meßbaren Komplex zu bilden.

Durchführung:

10 μl Probe
+ 1 ml Reaktionslösung
Inkubation über 30 Minuten bei 37°C.

Die Messung erfolgt bei 562 nm gegen den verwendeten Puffer als Leerwert. Als Standard dient BSA in einer Konzentration von [2.0, 1.0, 0.5, 0.25 und 0.13 mg/ml]. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt anhand der Standardkurve.

2.2.5.3 Immunpräzipitation der MAPK

Die zu untersuchenden MAPK (ERK-1 und ERK-2) werden mit einem spez. Anti-MAPK Agarose Konjugat aus 1 mg Gesamtprotein immunpräzipitiert.

Durchführung:

Anti-MAPK-Agarose-Konjugat [10 μl] der Firma Upstate werden mit 300 μl Lysepuffer für 1 h bei 4° C inkubiert und anschließend wieder pelletiert. 1 mg Protein werden zu dem Pellet gegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Der Agarose-Enzymkomplex wird 3 x mit Lysepuffer* und anschließend 2 x mit ADB-Puffer* gewaschen.

werden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit 10 %igem Roti-Block (Roth, Karlsruhe) für 3 Stunden blockiert. Zum Nachweis des phospho-MBP wird die Membran in TBST mit [0,75 µg/ml] Anti-Phospho-MBP 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Der Blot wird fünfmal 20 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend 90 Minuten mit einem Alkalische Phosphatase-konjugierten-Anti-Maus-Antikörper (1:50000) bei 4°C inkubiert. Die Membran wird erneut fünfmal 20 Minuten mit TBST und einmal mit TBS gewaschen. Vor der Detektion wird die Membran 10 Minuten in einem alkalischen Tris-Puffer (pH 9,5) äquibriert und mit einer 1:100 Verdünnung des Chemolumineszenzreagenz CSPD getränkt. Die Membran wird in eine durchsichtige Plastiktüte verpackt, in eine Filmkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Der Film wird je nach Signalintensität zwischen 20 Minuten und 1 Stunde exponiert und anschließend entwickelt und fixiert.

Laufpuffer:	25 mM TrisHCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 2 % SDS
Transferpuffer:	80 % Tris/Glycin Puffer 20 % Methanol
TBST	10 mM Tris (pH 8,0) 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20
TBS:	10 mM Tris HCl (pH8,0) 150 mM NaCl
Tris-Puffer:	100 mM Tris HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl

2.2.6 Bestimmung der IGF-II-Konzentration in Zellkulturüberständen

Die Neuroblastomzelllinien werden 48 Stunden in serumfreiem RPMI-Medium kultiviert. Der Zellkulturüberstand wird durch Zentrifugation bei 400 g von abgelösten Zellen und Zelltrümmern befreit und der Überstand in einem IGF-II-Radioimmunoassay eingesetzt. 100 µl des Überstandes werden mit 100 µl anti-IGF-II Serum aus Kaninchen (1:10000) in einer Kaninchen-Gammaglobulin-Lösung [50µg/ml] in Assay-Puffer (s.u.) gemischt. Nach Zugabe von 100µl ¹²⁵J-markiertem IGF-II (150000cpm/ml) als Tracer werden die Proben gemischt und 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Esel-anti-Kaninchen Serum (1:150) in kaltem 4 %igen Polyethylenglykol werden die Proben weiter eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Durch Zentrifugation (20 Minuten bei 4000 rpm) werden die Immunkomplexe präzipitiert und der Überstand abgesaugt. Der Niederschlag wird einmal mit 1 ml kaltem, deionisiertem Wasser gewaschen und nach erneuter Präzipitation die gebundene Radioaktivität in einem Gamma-Counter gemessen. Die gebundene Aktivität der Probe wird mit der Aktivität einer Standardkurve ins Verhältnis gesetzt, die definierte Konzentrationen rekombinantes IGF-II enthalten.

Die Messungen wurden im Rahmen von Patientenuntersuchungen im endokrinologischen Labor der Kinderklinik von Frau Weber durchgeführt.

“Assay-Puffer”:
Natriumphosphat 0,05 M (pH 7,4)
0,1 M NaCl
0,05 % NaN₃
0,2 % BSA
0,1 % Triton X -100

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der autokrinen IGF-II Produktion in Neuroblastomzellen

Beim Neuroblastom wird in vielen Fällen eine autokrine Stimulation durch IGF-II beobachtet (Yee et al., 1990) (El-Badry et al., 1989) (Martin et al., 1993). Durch die unkontrollierte, autokrine Produktion von IGF-II, für das die Tumorzellen gleichzeitig Rezeptoren an ihrer Zellmembran exprimieren, stimulieren sie ihr Wachstum selbst und werden unabhängig von exogenen Wachstumskontrollmechanismen.

3.1.1 Expression der mRNA für IGF-II

Zwei Zelllinien (SK-N-AS und SK-N-SH) in denen keine N-myc-Amplifikation vorliegt und zwei Zelllinien (IMR32 und Kelly) in denen N-myc-Amplifikationen nachgewiesen wurden (Schwab et al., 1984), wurden mittels Northern-Blots auf die Expression von IGF-II untersucht. Es wurden je nach Zelllinie bis zu drei verschieden große Transkripte (6,1 kb; 4,8 kb und 2,2 kb) nachgewiesen. Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse.

Die Zelllinien SK-N-AS exprimiert fünfmal soviel von dem 6,1 kb Transkript als von den 4,8 kb Transkript von IGF-II. In der Zelllinie Kelly wurde ein Verhältnis der Transkripte von $4,5 \pm 2,3$ gemessen. Das Signal des 2,2 kb Transkripts war in der Zelllinie SK-N-AS gleich stark ausgeprägt wie das Signal des 4,8 kb Transkripts, in der Zelllinie Kelly war das 2,2 kb Signal nur halb so stark, wie das 4,8 kb Transkript.

In den Zelllinien SK-N-SH und IMR32 waren die 6,1 kb und 4,8 kb Transkripte nicht nachzuweisen. Nur das 2,2 kb Transkript war in diesen beiden Zelllinien schwach exprimiert. Die Zelllinie SK-N-AS exprimiert von allen vier Zelllinien die größte Menge an 2,2 kb Transkript. Die Zelllinie Kelly exprimiert im Durchschnitt 20 % weniger als die Zelllinie SK-N-AS. In der Zelllinie IMR32 wurde nur 0,4 mal

Ergebnisse

soviel 2,2 kb Transkript nachgewiesen wie in der Zelllinie SK-N-AS. Die Zelllinie SK-N-SH exprimiert nur ein fünftel der Menge, die SK-N-AS exprimiert.

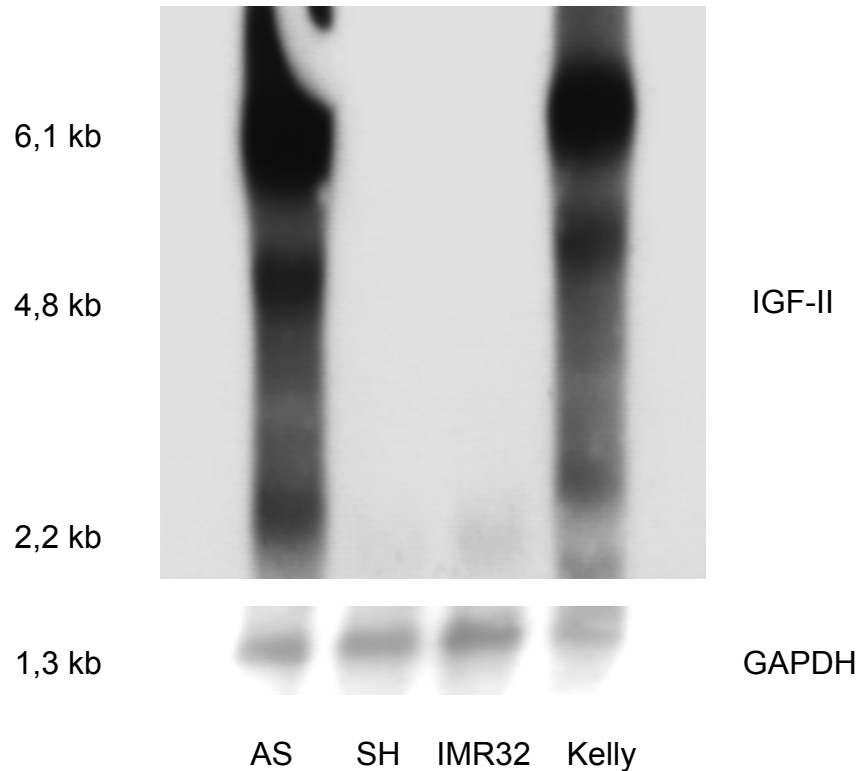


Abb.1: Expression der mRNA für IGF-II in vier Neuroblastomzelllinien
Es wurden [5 µg] mRNA in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer Dig.-markierten IGF-II-cDNA Sonde bei 68°C über Nacht hybridisiert. Der Northern-Blot wurde anschließend mit einer Dig.-markierten-GAPDH Sonde unter gleichen Bedingungen hybridisiert. Die Expositionszeit betrug für den Nachweis des IGF-II-Gens 60 Minuten und für den Nachweis des GAPDH-Gens 10 Minuten. Die Größe der mRNA Transkripte wurde mit Hilfe eines Längenstandards (BM) bestimmt, der mit Methylenblau separat gefärbt werden mußte. Repräsentativer Northern-Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 1 zeigt, daß die IGF-II-Expression unabhängig von der N-myc-Amplifikation ist, da sowohl die Neuroblastomzelllinie SK-N-AS ohne N-myc-Amplifikation als auch die Zelllinie Kelly mit N-myc-Amplifikation große Mengen IGF-II mRNA exprimieren.

3.1.2 Expression der mRNA für den IGF-I-Rezeptor

Die Dig.-markierte IGF-II-cDNA Sonde aus Abbildung 1 wurde mit [0,1 %] SDS von den Northern-Blots entfernt und die Northern-Blots im Anschluß mit einer IGF-I-Rezeptor-Sonde hybridisiert. In den Zelllinien SK-N-SH und IMR32 wurde ein 11 kb großes Transkript der IGF-I-Rezeptor mRNA nachgewiesen. Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse. Während in den Zelllinien SK-N-AS und Kelly auf den Northern-Blots keine mRNA für den IGF-I Rezeptor beobachtet werden konnte, war im Mittel in der Zelllinie IMR32 3-mal soviel mRNA für den IGF-I-Rezeptor nachweisbar als in der Zelllinie SK-N-SH.

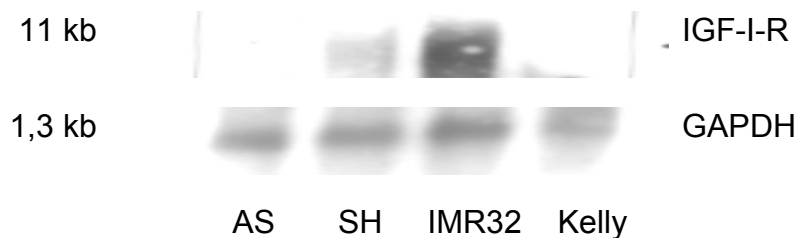


Abb.2: Expression der m-RNA des IGF-Rezeptors-Typ-I in vier Neuroblastomzelllinien

Die auf IGF-II-Expression untersuchten Northern-Blots aus 3.1.1 wurden von der IGF-II-Sonde befreit und mit einer IGF-I-Rezeptor-spez. Sonde hybridisiert. Expositionszeit: 60 min. Zum Nachweis, daß von allen Zelllinien gleiche Mengen mRNA aufgetragen wurden, wurden die Northern-Blots anschließend mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert. Expositionszeit:10 min. Die Größe der mRNA Transkripte wurde mit Hilfe eines Längenstandards (BM) bestimmt, der mit Methylenblau separat gefärbt werden mußte. Repräsentativer Northern-Blot aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Messung der IGF-II Überstände in vier Neuroblastomzelllinien

Die IGF-II Konzentration wurde in Zellkulturüberständen von zwei Zelllinien mit und zwei Zelllinien ohne N-myc-Amplifikation gemessen. Die Tabelle 1 zeigt die Messergebnisse.

Zelllinie	IGF-II [ng/1Mill.]
SK-N-AS	99 ± 20,2
SK-N-SH	4,5 ± 0,07
IMR 32	24 ± 2,26
Kelly	35 ± 2,30

Tab.1: IGF-II-Bestimmungen nach 48 Stunden Serumentzug in verschiedenen Neuroblastomzellen

Die Zellen wurden für 48 Stunden in serumreduziertem Medium kultiviert. Dieses Medium enthält zusätzlich [0,1 %] BSA zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, da IGF-II eine sehr starke Plastikadhärenz aufweist. Die [0,1 %] BSA-Lösung wurde zuvor bei 65°C für 2 Stunden inaktiviert, um noch eventuell im BSA enthaltene Wachstumsfaktoren zu inaktivieren. Nach 48 Stunden Serumentzug wurde die IGF-II Konzentration mittels eines Radioimmunoassays gemessen (Protokoll nach Blum et al., 1988).

Im Zellkulturüberstand der nicht N-myc-amplifizierten Zelllinie SK-N-AS wurde eine sehr hohe Konzentration an autokrin produziertem IGF-II gemessen, während die Zelllinie SK-N-SH nur sehr wenig IGF-II produziert. In den beiden N-myc-amplifizierten Zelllinien Kelly und IMR32 wurde ungefähr gleich viel IGF-II produziert.

3.2 Stimulation der Zellproliferation von Neuroblastomzellen durch den Wachstumsfaktor IGF-II

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die den Zellen das Signal zum Wachstum geben. Neuroblastomzellen, die den IGF-I Rezeptor besitzen, proliferieren bereits im serumfreien Medium. Nach Zugabe von anti-IGF-II wird eine Abnahme der Zellzahl beobachtet (Martin et al., 1993).

Nachdem im Abschnitt 3.1 die IGF-II Konzentrationen in Zellüberständen nachgewiesen wurden, wurden die Auswirkungen von IGF-II auf die Zellproliferation von Neuroblastomzellen untersucht.

3.2.1 Zellproliferation durch autokrin produziertes IGF-II

Der Einfluß der autokrinen IGF-II-Produktion auf die Proliferation der Neuroblastomzellen wurde bei einer minimalen Serumkonzentration mittels eines Proliferationstestes (MTT) gemessen. In einer Verdünnungsreihe wurde die minimale Serumkonzentration von [0,2 %] Serum ermittelt, bei der die Neuroblastomzellen gerade noch überlebten. Bei noch geringeren Konzentrationen starben die Zellen innerhalb von 48 Stunden ab. 2×10^4 Zellen wurden in RPMI-Medium mit [0,2 %] Serum in Mikrotiterplatten ausgesät. Das serumreduzierte Medium wurde mit [0,1 %] inaktiviertem BSA supplementiert, um die Plastikadhärenz von IGF-II zu blockieren. Die Zellzahl wurde nach 0, 24 und 48 Stunden gemessen. Die Abbildung 3 zeigt das Wachstum der Zellen in dem serumreduzierten Medium.

Die Neuroblastomzellen proliferieren bereits in dem serumreduzierten Medium unterschiedlich stark. Nach 48 Stunden in diesem Medium wurde bei der Zelllinie Kelly eine Zunahme der Zellzahl um 70 % beobachtet. In der Zelllinie SK-N-SH erhöhte sich die Zellzahl nach 48 Stunden um 30 %. Die Zelllinien IMR32 und SK-N-AS zeigten eine Zunahme der Zellzahl von unter 20 %.

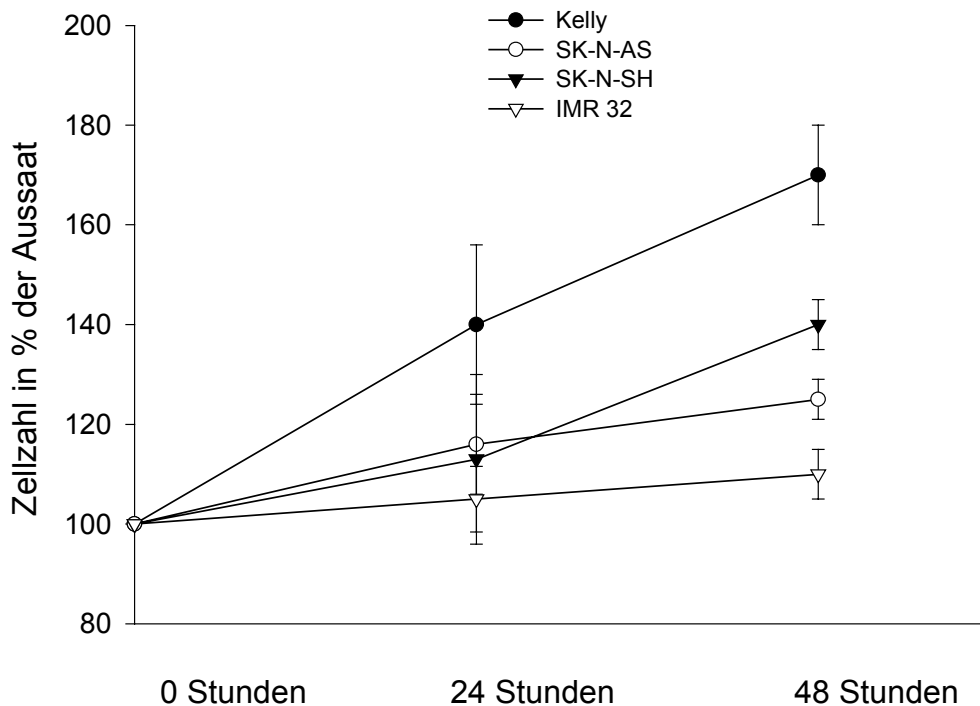


Abb.3: Wachstumskinetik von Neuroblastomzellen nach Kultivierung im serumreduzierten Medium

Die Zellen wurden in einer Konzentration von $[2 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}]$ in Mikrotiterplatten ausgesät. Das Kulturmedium enthielt $[0,2 \text{ \%}]$ Serum und $[0,1 \text{ \%}]$ BSA. Die Messung der Zellproliferation erfolgte nach 0; 24 und 48 Stunden im MTT-Test. Der Nullstundenwert diente als Grundwert $[100 \text{ \%}]$. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit Achtfachbestimmung.

3.2.2 Wachstumskinetik der Zelllinie Kelly in Abhängigkeit der IGF-II Konzentration

Weiterhin wurde die Proliferationssteigerung in Abhängigkeit der IGF-II Konzentration untersucht. Es ist beschrieben, daß die IGF-II Konzentration einen Einfluß auf die Zellproliferation nimmt, jedoch in hohen Konzentrationen auch die Zelldifferenzierung auslösen kann (Petley et al., 1999). Die Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse des Wachstums der Zelllinie Kelly in Gegenwart verschiedener IGF-II Konzentrationen.

Die Zellen wurden vor Zugabe des IGFs für 24 Stunden kultiviert, um zu gewährleisten, daß sie gut angewachsen sind. Nach 24 Stunden sahen die Zellen mikroskopisch sehr vital aus. Die Zellen wurden mit dem Wachstumsfaktor IGF-II in unterschiedlichen Konzentrationen [10, 50 und 100 ng/ml] versetzt. Zellen, die in Vollmedium gezüchtet wurden, dienten als Wachstumskontrolle. Auch ohne Zusatz von IGF-II wachsen die Zellen aufgrund des auto-krin produzierten IGF-II und nehmen um 69 % zu. 10 ng/ml IGF-II bewirken in 48 Stunden nur eine Zunahme der Zellzahl um weitere 13 % im Vergleich zum serumreduzierten Medium. Dagegen konnte nach Zugabe von [50 ng/ml] IGF-II die Zellzahl in 48 Stunden um 110 % gesteigert werden. Bei einer Konzentration von [100 ng/ml] IGF-II wurde keine weitere Steigerung des Wachstums im Vergleich zu [50 ng/ml] IGF-II beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, daß die Zelllinie Kelly auf IGF-II mit verstärkter Proliferation reagiert, ist ein Hinweis darauf, daß sie IGF-I-Rezeptoren oder Insulinrezeptoren exprimiert, über die IGF-II proliferationsstimulierend wirkt.

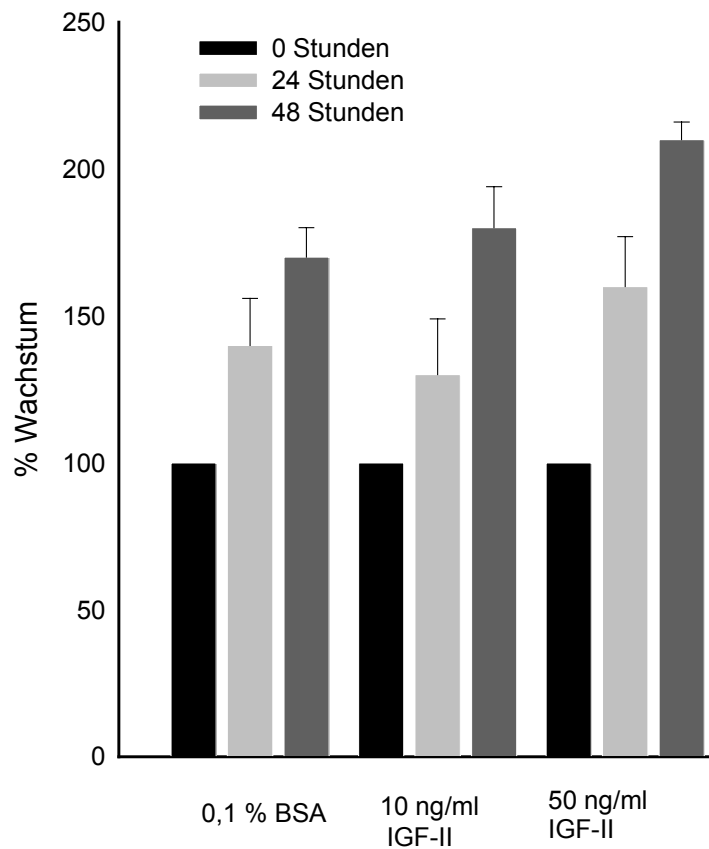


Abb.4: Wachstumskinetik der Zelllinie Kelly in Abhängigkeit der IGF-II Konzentration

Die Zellen wurden in einer Konzentration von $[2 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}]$ in Mikrotiterplatten ausgesät. Das Kulturmedium enthielt $[0,2 \text{ \%}]$ Serum und $[0,1 \text{ \%}]$ BSA. Es wurden IGF-II Konzentrationen von $[10 \text{ und } 50 \text{ ng/ml}]$ zugefügt. Die Messung der Zellzahl erfolgte nach 0; 24 und 48 Stunden im MTT-Test. Der Nullstundenwert diente als Grundwert $[100 \text{ \%}]$. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei verschiedenen Versuchen.

3.2.3 Vergleich der Wachstumskinetik von Neuroblastomzelllinien bei $[50 \text{ ng/ml}]$ IGF-II

Bei einer Konzentration von $[50 \text{ ng/ml}]$ IGF-II wurde bei der Zelllinie Kelly eine maximale Steigerung der Proliferation erreicht (3.2.2). Als nächstes wurde die

Proliferationssteigerung in verschiedenen Neuroblastomzelllinien nach einer Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II verglichen.

Wie Abbildung 5 zeigt verdoppelt sich in der Zelllinie Kelly die Zellzahl nach 48 Stunden, während in der Zelllinie SK-N-AS lediglich eine Zunahme der Zellzahl um 20 % erreicht wird. Bei den Zelllinien IMR32 und SK-N-SH konnte ebenfalls eine Proliferationssteigerung beobachtet werden. Dieser Anstieg war zwar geringer als bei der Zelllinie Kelly, konnte aber gegenüber serumreduziertem Medium unterschieden werden (siehe Abb.3).

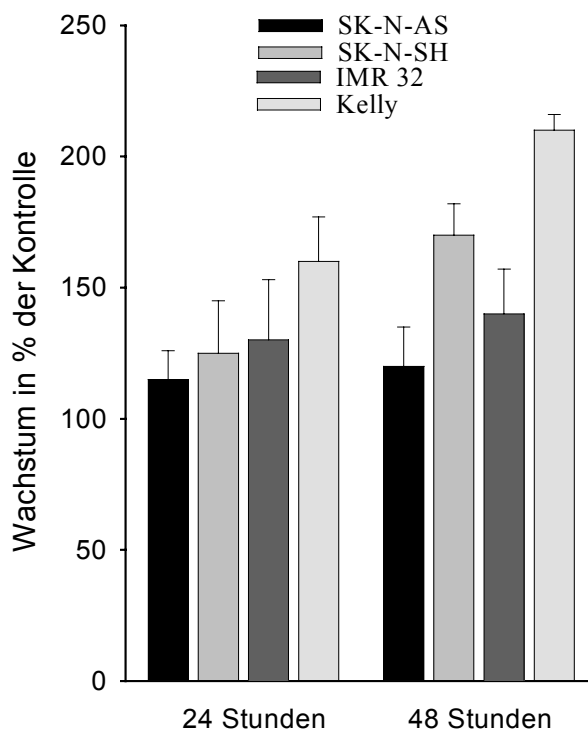


Abb.5: Wachstumskinetik von Neuroblastomzellen in Gegenwart von [50 ng/ml] IGF-II

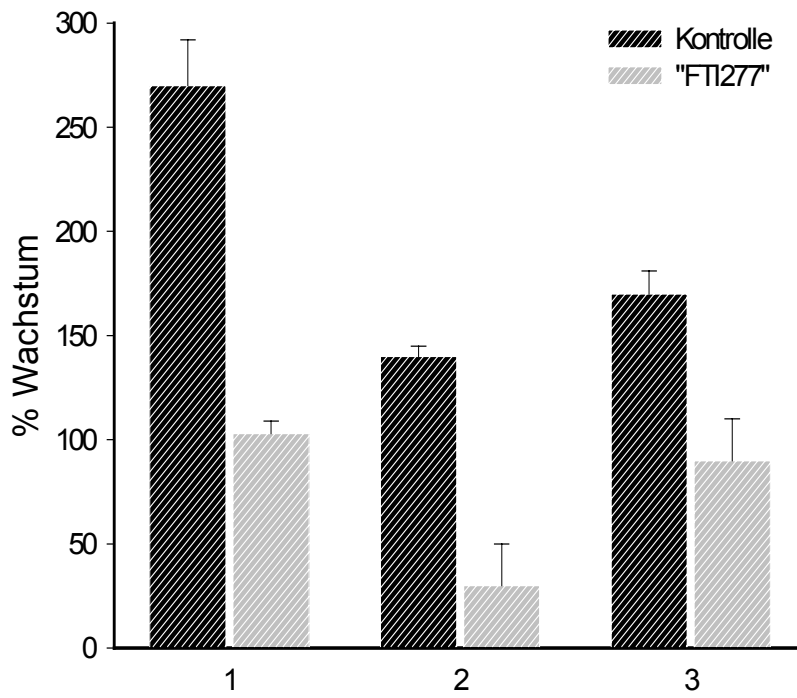
Die Zellen wurden in einer Konzentration von [2×10^4 /100 μ l] in Mikrotiterplatten ausgesät. Das Kulturmedium enthielt [0,2 %] Serum und [0,1 %] BSA. Es wurden [50 ng/ml] IGF-II zugefügt. Die Messung der Zellzahl erfolgte nach 0; 24 und 48 Stunden im MTT-Test. Der Nullstundenwert diente als Grundwert [100 %]. Mittelwerte und Standardabweichung aus drei verschiedenen Versuchen.

3.2.4 Einfluß der Verhinderung der Membranverankerung der Ras-Proteine auf die Zellproliferation der Neuroblastomzellen

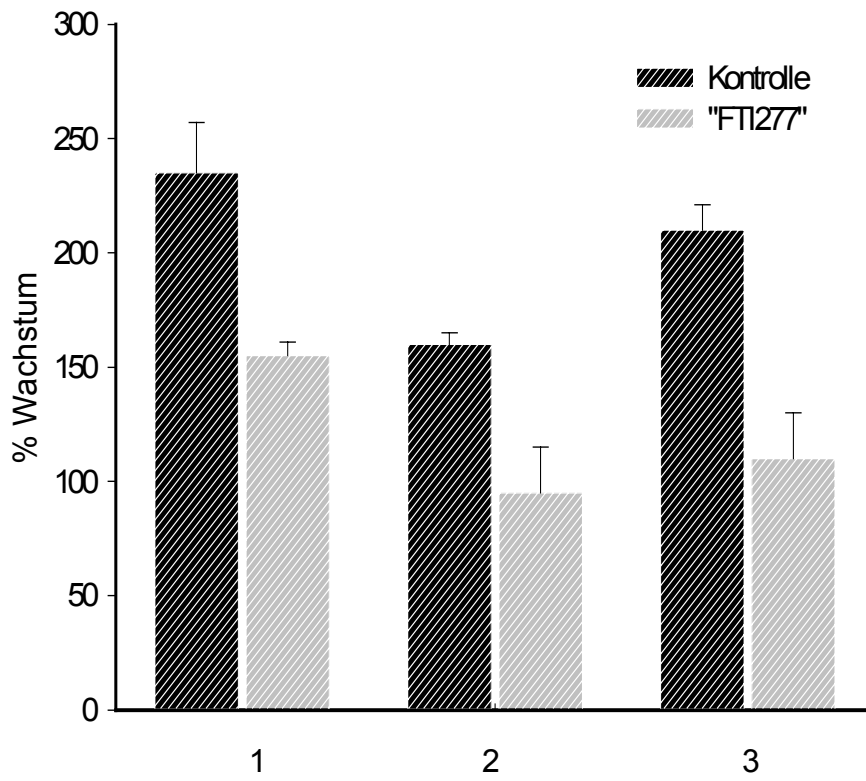
Der IGF-II Signaltransduktionsweg verläuft u.a. über den Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg (White et al., 1994). Ras-Proteine sind nur biologisch aktiv, wenn sie durch eine Farnesylierung an der Membrannenseite gebunden sind. Nachdem gezeigt werden konnte, daß sich die Neuroblastomzellen durch IGF-II stimulieren lassen, wurde nun der Einfluß der Inaktivierung der Ras-Membranverankerung auf die Stimulation der Zellproliferation der Neuroblastomzellen durch IGF-II untersucht. Von den drei Ras-Proteinen H-Ras, N-Ras und K-Ras wird in den vier Neuroblastomzelllinien in erster Linie das N-Ras-Protein exprimiert. Hemmversuche mit dem Farnesyltransferaseinhibitor "FTI277" haben gezeigt, daß eine Behandlung der Neuroblastomzelllinien IMR32 und Kelly mit [10 µM] "FTI277" nach 4 Tagen zu einer Reduktion des N-Ras-Membrangehaltes um 50 % führt (persönliche Mitteilung Girgert), (Girgert et al., 2000 Abstract).

Um den Einfluß der Hemmung der Ras-Membranverankerung auf die Proliferation der Neuroblastomzellen zu messen, wurden die Neuroblastomzellen zunächst 2 Tage mit [10 µM] Farnesyltransferaseinhibitor "FTI277" behandelt. Nach 48 Stunden wurden diese Zellen in Mikrotiterplatten ausgesät und nochmals für 48 Stunden mit [10 µM] "FTI277" in verschiedenen Medien kultiviert. Die Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse mit drei verschiedenen Neuroblastomzelllinien.

-A-



-B-



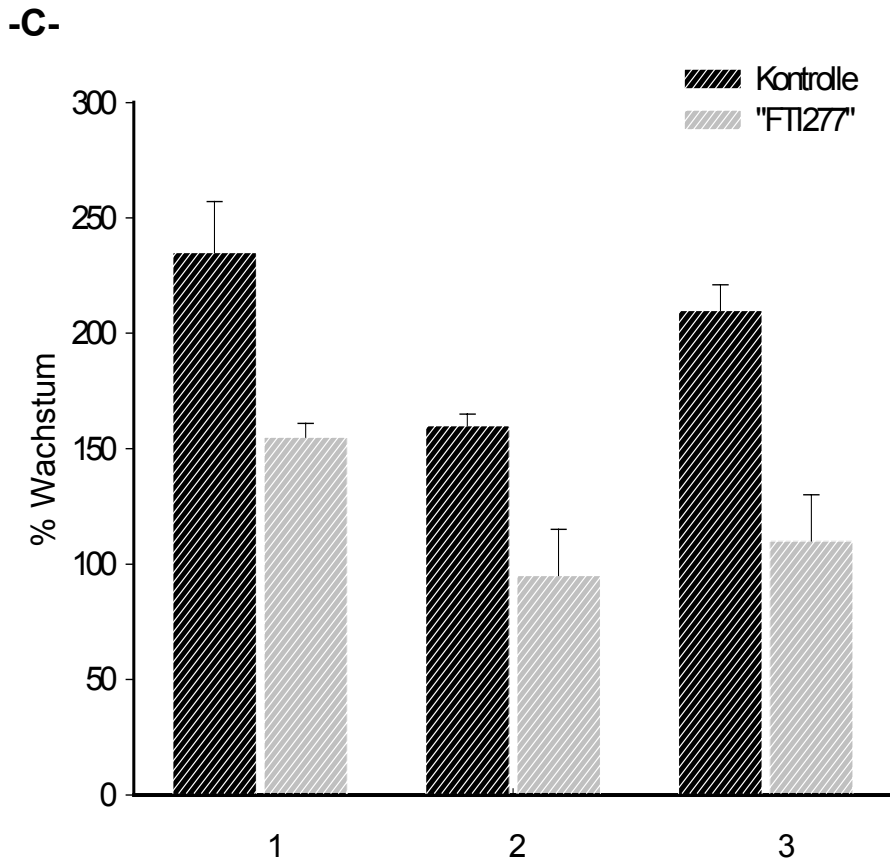


Abb.6: Wachstumsverhalten der Zelllinien SK-N-SH, Kelly und IMR32 nach Behandlung mit [10 μ M] "FTI277"

Die Zellen wurden für 48 Stunden mit [10 μ M] "FTI277" in Vollmedium vorbehandelt, danach in einer Konzentration von [2x10⁴/100 μ l] in Mikrotiterplatten ausgesät und nochmals für 48 Stunden mit [10 μ M] "FTI277" behandelt. Die Messung der Zellzahl erfolgte nach 48 Stunden im MTT-Test. Zellen ohne Hemmstoffbehandlung dienen jeweils als Kontrolle.

A: SK-N-SH; **B:** Kelly und **C:** IMR32 Zellen

1= Zellen nach 96 Stunden Behandlung mit [10 μ M] "FTI277" in Vollmedium; 2= Zellen nach 96 Stunden Behandlung mit [10 μ M] "FTI277" in serumreduziertem Medium; 3= Zellen nach 96 Stunden Behandlung mit [10 μ M] "FTI277" in serumreduziertem Medium, davon die letzten 48 Stunden bei Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

In der Zelllinie SK-N-SH (Abb.6A) wird nach 96-stündiger Hemmstoffbehandlung mit [10 µM] "FTI277" im Vollmedium eine Abnahme der Zellproliferation um 70 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet (Abb. 6A-1). Wurden die Zellen im serumreduzierten Medium mit [10 µM] Hemmstoff behandelt, konnte im Vergleich zur Kontrolle eine Reduzierung der Zellproliferation um 85 % beobachtet werden (Abb. 6A-2). Während die Zugabe von [50 ng/ml] IGF-II in den unbehandelten Kontrollzellen nur eine Steigerung um 17 % der Proliferation im Vergleich zum serumreduziertem Medium bewirkte, war in den "FTI277" behandelten Neuroblastomzellen eine deutlichere Wachstumsstimulation durch IGF-II zu beobachten (Abb.6A-3).

Die Abb. 6B zeigt in der Zelllinie Kelly im Vollmedium, wie auch im serumreduzierten Medium, eine Verminderung der Zellproliferation nach 96-stündiger Hemmstoffbehandlung um 35-41 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 6B-1 und 6B-2). Durch Stimulation der Hemmstoff-behandelten Zellen mit [50 ng/ml] IGF-II konnte die Zellproliferation in der Zelllinie Kelly nur um 20 % gegenüber den Zellen in serumreduziertem Medium erhöht werden.

Die Abb. 6C zeigt die Ergebnisse der Hemmstoffbehandlung in der Zelllinie IMR32. Auch hier konnte eine Verminderung der Zellproliferation nach 96 Stunden Hemmstoffbehandlung im Vollmedium, wie auch im serumreduzierten Medium um 35-42 % beobachtet werden. Nach Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II konnte auch in den Hemmstoff-behandelten IMR32 Zellen eine Steigerung der Zellzahl von nur 20 % gegenüber dem serumreduzierten Medium beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigte die "FTI277" Behandlung in allen drei Neuroblastomzelllinien ähnliche Ergebnisse. Sowohl im Vollmedium als auch im serumreduzierten Medium wirkt sich die Verminderung der Ras-Membranverankerung, die nach 48 Stunden Behandlung mit dem Hemmstoff "FTI277" erreicht wird, sehr stark auf die Zellproliferation aus. Nach Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II wird in den Zelllinien IMR32 und Kelly trotz der Reduktion der Ras-Membranverankerung durch die Behandlung mit "FTI277" weiterhin ein leichter Anstieg der Zellproliferation um 20 % beobachtet. Bei der Zelllinie SK-N-SH steigt die Zellzahl durch [50 ng/ml] IGF-II wieder auf das 2,5-fache des Wertes

an, der in hemmstoffbehandelten Zellen in serumfreiem Medium erreicht wurde. Das Wachstum der hemmstoffbehandelten Zellen fällt jedoch deutlich schwächer aus, als in den ungehemmten Kontrollzellen. Die Proliferationssteigerung durch IGF-II in den hemmstoffbehandelten Zellen ist wahrscheinlich auf die noch in der Membran verbliebene Aktivität der Ras-Proteine zurückzuführen.

3.3 Funktioneller Nachweis der Verhinderung der Membranverankerung von Ras-Proteinen durch Untersuchung der MAPK-Aktivität nach Stimulation mit IGF-II

Die Bindung des Wachstumsfaktors IGF-II an seinen Rezeptor führt über die Ras-Proteine zur Aktivierung der MAPK (ERK-1 und ERK-2). In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob sich die MAPK (ERK-1 und ERK-2) in den Neuroblastomzellen durch Stimulation mit IGF-II aktivieren lassen und diese Aktivierung der MAPK nach Inaktivierung der Ras-Proteine reduziert ist.

3.3.1 Nichtradioaktiver Nachweis der Aktivierung der MAPK

Für den Nachweis der Phosphotransferaseaktivität der MAPK wurde ein nicht-radioaktiver MAPK-Test durchgeführt. Die MAPK (ERK-1 und ERK-2) wurden durch Immunpräzipitation mit einem AK, der gegen die Aminosäuren 333-367 von ERK-1 und ERK-2 gerichtet ist, isoliert (Boulton et al., 1990). In einer folgenden enzymatischen Reaktion wurde dann eines ihrer spezifischen Substrate, MBP (Myelin-basic-protein) phosphoryliert. Das phosphorylierte MBP wurde mittels Western-Blots mit einem spez. AK (anti-phospho-MBP) nachgewiesen (Yon et al., 1996). Der zur Immunpräzipitation verwendete Antikörper weist laut Herstellerangaben keine Kreuzreaktivität gegenüber JNK und p38 (SAPK) auf.

In der Zelllinie PC-12 wird die MAPK-Aktivität durch Stimulierung mit dem Wachstumsfaktor NGF stark erhöht. Diese Zelllinie wurde als positive Kontrolle

verwendet (Abb.7: Bahn 1 und 2). Das nicht enzymatisch umgesetzte Substrat MBP wurde als Negativkontrolle eingesetzt, um die Spezifität des Nachweises mit dem anti-phospho-MBP zu belegen (Abb.7: Bahn 3).

Abbildung 7 zeigt, daß in der Zelllinie PC-12 durch [50 ng/ml] NGF die Aktivität der MAPK um den Faktor $2,5 \pm 0,25$ ansteigt (Positivkontrolle). Die Neuroblastomzelllinie IMR32 zeigt nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor IGF-II [50 ng/ml] eine starke Phosphorylierung von MBP durch die MAPK (ERK-1 und ERK-2). Die MBP-Phosphorylierung war nach einer 15-minütigen Stimulation mit IGF-II um den Faktor $2 \pm 0,57$ erhöht (Abb.7: Bahn 4 und 5) .

In Abbildung 7 sollte zunächst einmal dargestellt werden, daß sich die Phosphorylierung des Substrates MBP durch die MAPK mit Hilfe eines nicht-radioaktiven Assays nachweisen läßt. In den folgenden Versuchen wurden weitere Neuroblastomzelllinien auf die Aktivierung der MAPK durch IGF-II untersucht.

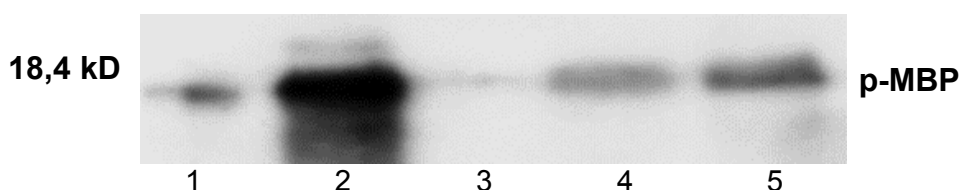


Abb. 7: Westernblotanalyse der MAPK-Aktivität

Jeweils 0,2 mg Gesamtprotein wurden mit einem anti-MAPK (ERK-1 und ERK-2) Agarose-Konjugat immunpräzipitiert. Mittels einer enzymatischen Reaktion wurde das spezifische Substrat MBP phosphoryliert, anschließend die Proteine in einem [15 %] SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit anti-Phospho-MBP nachgewiesen. Die Expositionszeit betrug 20 Minuten.

1= PC12 Zellen: 48 Stunden Serumentzug (SE); 2= PC12 Zellen: SE und 15 Minuten Stimulation mit [50 ng/ml] NGF (Positivkontrolle); 3= unphosphoryliertes Substrat MBP (Negativkontrolle); 4= IMR32 Zellen: SE; 5= IMR32 Zellen: SE und 15 Minuten Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II. Repräsentativer Western-Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

3.3.2 Untersuchung von vier Neuroblastomzelllinien auf die Aktivierung der MAPK durch IGF-II

Die Induktion der MAPK-Aktivität nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor IGF-II wurde in den Neuroblastomzelllinien SK-N-AS, Kelly, SK-N-SH und IMR32 untersucht.

Nach einem 48-stündigen Serumentzug wurden die Zellen mit [50 ng/ml] IGF-II für 15 Minuten stimuliert und die MAPK-Aktivität mit der von Zellen verglichen, die nach 48 Stunden Serumentzug nicht mit dem Wachstumsfaktor stimuliert wurden. Die Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse. Die Zelllinie SK-N-AS zeigt eine sehr schwache MAPK-Aktivität im Ruhezustand, die sich durch IGF-II nicht induzieren läßt. Bei der Zelllinie Kelly ließ sich die MAPK-Aktivität durch Stimulation mit IGF-II ebenfalls nicht stimulieren. Die MAPK-Aktivität war jedoch im Ruhezustand schon stärker als in allen anderen untersuchten Zelllinien. Bei der Zelllinie SK-N-SH wurde die MAPK-Aktivität nach 15 Minuten Stimulation mit dem Wachstumsfaktor IGF-II um den Faktor $3,2 \pm 1,24$ erhöht (Tabelle 2).

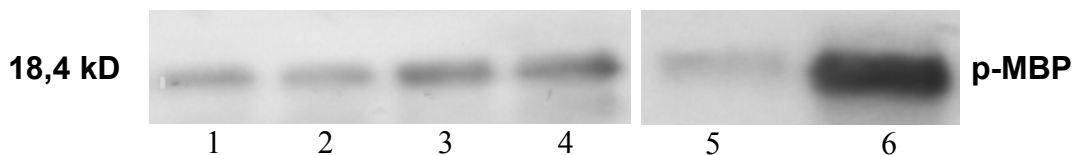


Abb. 8: Westernblotanalyse zum Nachweis der MAPK-Aktivität von Neuroblastomzellen nach Stimulation mit IGF-II

Jeweils 0,2 mg Gesamtprotein wurden mit einem anti-MAPK (ERK-1 und ERK-2) Agarose-Konjugat immunpräzipitiert. Mittels einer enzymatischen Reaktion wurde das spezifische Substrat MBP phosphoryliert, anschließend die Proteine in einem [15 %] SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit anti-Phospho-MBP nachgewiesen. Die Expositionszeit betrug 20 Minuten.

1=SK-N-AS: 48 Stunden Serumentzug (SE); 2=SK-N-AS: SE und 15 Minuten IGF-II Stimulation [50 ng/ml]; 3=Kelly: SE; 4 =Kelly: SE und 15 Minuten Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II; 5=SK-N-SH: SE; 6=SK-N-SH: SE und 15 Minuten Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II. Repräsentativer Western-Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

3.3.3 Einfluß der Inaktivierung der Ras-Proteine auf die MAPK-Aktivität

Mit Hilfe eines Farnesyltransferaseinhibitors ("FTI277") wurde die Membranverankerung der Ras-Proteine blockiert. Um den Einfluß des Farnesyltransferaseinhibitors auf die MAPK-Aktivität zu untersuchen, wurden die Zellen mit [10 µM] Hemmstoff für 2 Tage in Vollmedium und für 2 weitere Tage in serumreduziertem Medium behandelt. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse.

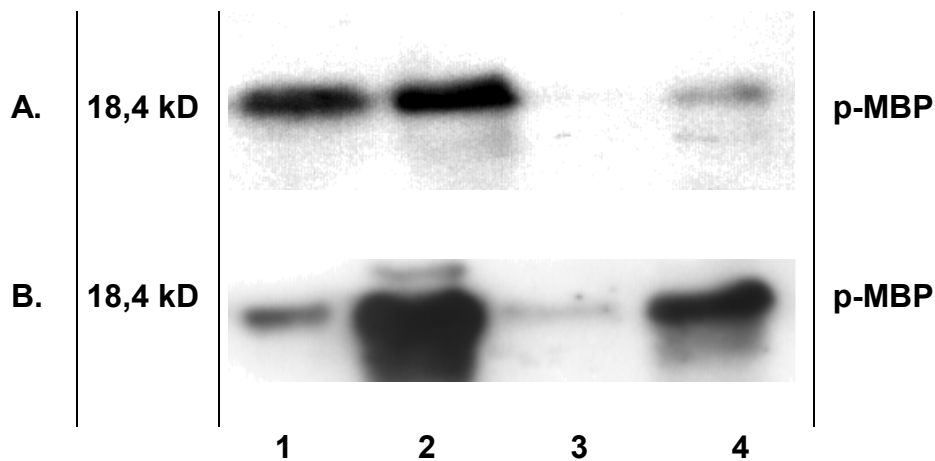


Abb. 9: Westernblotanalyse nach Inhibition der MAPK-Aktivität durch den Farnesyltransferaseinhibitor "FTI 277" in den Zelllinien IMR32 und SK-N-SH

Jeweils 0,2 mg Gesamtprotein wurden mit einem anti-MAPK (ERK-1 und ERK-2) Agarose-Konjugat immunpräzipitiert. Mittels einer enzymatischen Reaktion wurde das spezifische Substrat MBP phosphoryliert, anschließend die Proteine in einem [15 %] SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit anti-Phospho-MBP nachgewiesen. Die Expositionszeit betrug 20 Minuten.

A. 1= IMR32: 48 Stunden Serumentzug; 2= IMR32: SE und 15 Minuten Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II; 3 =IMR32: 4 Tage Präparation mit [10 µM] "FTI-277", 4 =IMR32: 4 Tage Präparation mit [10 µM] "FTI-277" und anschließend 15 Minuten Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II. Repräsentativer Western-Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

B. SK-N-SH Zellen 1-4 behandelt wie unter A. Repräsentativer Western-Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

In der Zelllinie IMR32 wie auch in der Zelllinie SK-N-SH wurde bereits ein starker inhibitorischer Effekt des Farnesyltransferaseinhibitors auf die MAPK-Aktivität im Ruhezustand der Zellen beobachtet. In der Zelllinie IMR32 zeigte die MAPK-Aktivität im Ruhezustand eine Reduktion um 90 %, in der Zelllinie SK-N-SH wurde eine Reduktion dieser Aktivität um 60 % beobachtet. Diese niedrige verbleibende Restaktivität in den Hemmstoff-behandelten Zellen konnte durch IGF-II Stimulation zwar wieder um den Faktor 4-5 erhöht werden, die MAPK-Aktivität erreichte jedoch in der Hemmstoff-behandelten Zelllinie IMR32 nur noch 25 % der Aktivität, die in den ungehemmten Zellen erreicht wurde.

3.3.4 Densitometrische Auswertungen der MAPK-Aktivitäten

Zur quantitativen Bestimmung der MAPK-Aktivität wurden die Signale auf den Western-Blot mittels einer Videokamera gescannt. Die Evaluation erfolgte mit dem Wincam Software Programm. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in der Tabelle 2 dargestellt.

Zelllinien	Serumentzug	50 [ng/ml] IGF-II	10 [µM] "FTI277"	10 [µM] "FTI277" 50 [ng/ml] IGF-II
IMR32	1,00	2,00 ± 0,57	0,10 ± 0,04	0,5 ± 0,1
KELLY	1,00	1,10 ± 0,20		
SK-N-SH	1,00	3,22 ± 1,24	0,40 ± 0,09	2,0 ± 0,2
SK-N-AS	1,00	1,17 ± 0,32		

Tab.2: Evaluation der Chemolumineszenz-Signale von Western-Blots zum Nachweis der MAPK-Aktivität

Alle Werte beziehen sich auf die ungehemmten Zellen, deren MAPK-Aktivität nach 48 Stunden Serumentzug gemessen wurde. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

3.4 Regulation der N-myc-Expression in Abhängigkeit von IGF-II

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die Modulation der Expression des N-myc-Gens in Abhängigkeit von IGF-II in Neuroblastomzelllinien untersucht.

Um Grundvoraussetzungen für die Regulation der N-myc-Expression in Abhängigkeit von IGF-II zu ermitteln, wurde zunächst in einem Vorversuch die Zeit bestimmt, in der die N-myc-Expression durch Serumentzug auf ein Mindestmaß reduziert wird. Ausgehend von diesem Ruhezustand wurde die Zeit ermittelt, in der die N-myc-Expression durch IGF-II maximal stimuliert wird.

3.4.1 Messung der N-myc-Expression im Ruhezustand

In der Zelllinie IMR32 wurde die Expression des N-myc-Gens nach 24 und 48 Stunden Serumentzug auf mRNA-Ebene mit der Methode des Northern-Blots bestimmt. Bei den Zellen wurde alle 12 Stunden ein Mediumwechsel vorgenommen, damit das Medium keine autokrin produzierten Wachstumsfaktoren enthält und somit die N-myc-mRNA im Ruhezustand gemessen werden konnte. Abbildung 10 zeigt die Autoradiographiesignale.

Abbildung 10 zeigt in allen Proben ein Hybridisierungssignal bei 2,8 kb, welches der N-myc-mRNA entspricht.

Beim Vergleich der N-myc-Expression zeigte die Zelllinie IMR32 nach 24 Stunden Serumentzug zunächst einen Anstieg um 20 % im Vergleich zum Vollmedium. Erst nach 48 Stunden Serumentzug war die N-myc-Expression im Vergleich zum Vollmedium um 80 % reduziert.

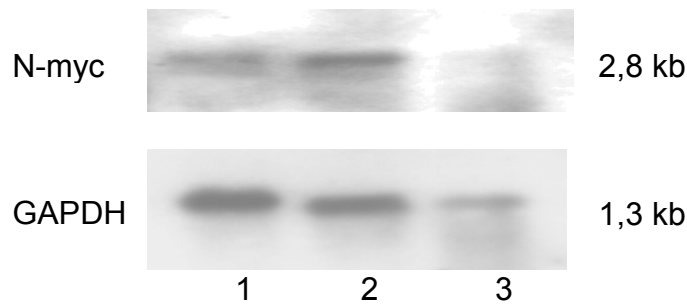


Abb.10: Expression der N-myc-mRNA in IMR32 Zellen nach Serumentzug
Es wurden 5 μ g mRNA in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer Dig.-markierten N-myc-cDNA Sonde bei 68°C über Nacht hybridisiert. Der Northern-Blot wurde anschließend mit einer GAPDH-Dig.-markierten-Sonde unter gleichen Bedingungen hybridisiert. Die Expositionszeit betrug für den Nachweis des N-myc-Gens 20 Minuten und für den Nachweis des GAPDH-Gens 5 Minuten. 1= IMR32: Vollmedium; 2= IMR32: 24 Stunden Serumentzug; 3= IMR32: 48 Stunden Serumentzug. Die Größe der mRNA Transkripte wurde mit Hilfe eines Längenstandards (BM) bestimmt, der mit Methylenblau separat gefärbt werden mußte. Repräsentativer Northern-Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

3.4.2 Zeitkinetik der Induktion der N-myc-Expression durch IGF-II

In einem weiteren Vorversuch wurde untersucht, wann eine maximale N-myc-Expression nach IGF-II Stimulation erreicht wird. Die Zelllinie IMR32 wurde nach einem 48-stündigen Serumentzug für 10, 20 und 30 Minuten mit [50 ng/ml] IGF-II stimuliert. Die Quantifizierung der N-myc-Expression erfolgte wieder mit der Methode des Northern-Blots und anschließender densitometrischer Auswertung. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse.

Schon nach 10 Minuten Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II war das N-myc-Signal gegenüber den Proben nach 48 Stunden Serumentzug um den Faktor $1,7 \pm 0,8$ erhöht. Nach 30 Minuten Stimulation mit IGF-II [50 ng/ml] wurde das Maximum der N-myc-Expression mit einer 2,3 fachen Erhöhung erreicht.

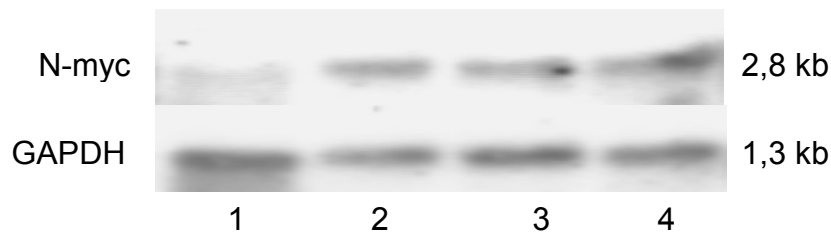


Abb. 11: Expression der mRNA in IMR32 Zellen nach 10, 20 und 30-minütiger Stimulation mit IGF-II

Es wurden 5 µg mRNA in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer Dig.-markierten N-myc-cDNA Sonde bei 68°C über Nacht hybridisiert. Der Northern-Blot wurde anschließend mit einer GAPDH-Dig.-markierten-Sonde unter gleichen Bedingungen hybridisiert. Die Expositionszeit betrug für den Nachweis des N-myc-Gens 20 Minuten und für den Nachweis des GAPDH-Gens 5 Minuten. 1= IMR32: 48 Stunden Serumentzug (SE); 2, 3 und 4= IMR32: 10, 20 und 30 Minuten Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II nach SE. Die Größe der mRNA Transkripte wurde mit Hilfe eines Längenstandards (BM) bestimmt, der mit Methylenblau separat gefärbt werden mußte. Repräsentativer Northern-Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

3.4.3 Nachweis der N-myc-Expression in drei Neuroblastomzelllinien nach IGF-II Stimulation

Nachdem in Vorversuchen die Grundvoraussetzungen für den Nachweis der N-myc-Expression in den Neuroblastomzellen erzielt wurden, wurde nun in den Neuroblastomzelllinien SK-N-SH, Kelly und IMR32 die Regulation der N-myc-Expression nach 30-minütiger IGF-II Stimulation [50 ng/ml] mittels Northern-Blots untersucht. Die mRNA der Zelllinien ohne IGF-II Stimulation diente als Kontrolle.

Abbildung 12 zeigt, daß in allen drei Zelllinien die N-myc-Expression nach 30-minütiger Stimulation mit IGF-II [50 ng/ml] im Vergleich zur Kontrolle ansteigt. In der Zelllinie SK-N-SH wurde ein Anstieg um 66 % Prozent, in der Zelllinie Kelly um 14 % und in der Zelllinie IMR32 um 37 % im Vergleich zur Kontrolle gemessen.

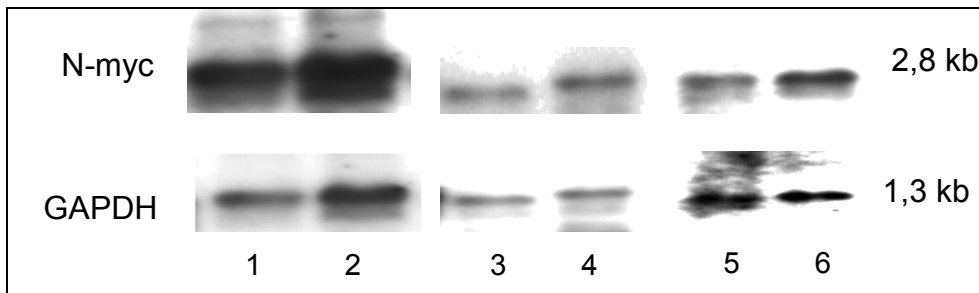


Abb.12: Expression der N-myc-mRNA in drei Neuroblastomzelllinien nach IGF-II Stimulation

Es wurden 5 µg mRNA in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer Dig.-markierten N-myc-cDNA Sonde bei 68°C über Nacht hybridisiert. Der Northern-Blot wurde anschließend mit einer GAPDH-Dig.-markierten-Sonde unter gleichen Bedingungen hybridisiert. Die Expositionszeit betrug für den Nachweis des N-myc-Gens 20 Minuten und für den Nachweis des GAPDH-Gens 5 Minuten.

1: SK-N-SH; 3: Kelly; 5: IMR32: 48 Stunden Serumentzug (SE)

2: SK-N-SH; 4: Kelly; 6: IMR32: 30 Minuten Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II nach SE. Die Größe der mRNA Transkripte wurde mit Hilfe eines Längensstandards (BM) bestimmt, der mit Methylenblau separat gefärbt werden mußte. Repräsentativer Northern-Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich die N-myc-mRNA durch 30 Minuten Stimulation mit dem Wachstumsfaktor IGF-II hochregulieren läßt.

3.4.4 Auswirkungen der Unterbrechung des Signaltransduktionsweges von IGF-II durch Verhinderung der Ras-Membranverankerung auf die N-myc-Expression

Der intrazelluläre Signaltransduktionsweg von IGF-II ist u.a. abhängig von farnesylierten Ras-Proteinen. Nachdem im Abschnitt 3.4.4 gezeigt wurde, daß die mRNA des N-myc-Gens durch IGF-II hochreguliert wird, wurden die Auswirkungen der Verhinderung der Farnesylierung der Ras-Proteine durch den Farnesyltransferaseinhibitor "FTI277" auf die Expression von N-myc untersucht.

Bei der Kultivierung der Neuroblastomzellen in Gegenwart von "FTI277" veränderten sich die Zellen morphologisch sehr stark und wirkten weniger vital. Nach 72 Stunden Behandlung mit "FTI277" begannen die Zellen sich vom Boden der Kulturflasche abzulösen. Dieser Vitalitätsverlust durch die Behandlung mit "FTI277" erschwerte es erheblich eine genügend hohe Ausbeute an mRNA aus diesen Zellen zu isolieren. Da für den Nachweis der N-myc-Genexpression auf mRNA-Ebene mittels Northern-Blots zumindest 5 µg mRNA benötigt werden, erfolgte der Nachweis der Genexpression in den "FTI277" behandelten Zellen mittels der semi-quantitativen RT-PCR. Für die RT-PCR war eine mRNA Menge von [0,5-1 µg] ausreichend, um sowohl die Expression des N-myc-Gens als auch der GAPDH zu bestimmen.

3.4.4.1 Bestimmung der optimalen Zyklenzahl zum quantitativen Nachweis der N-myc-Expression

Der quantitative Nachweis der N-myc-mRNA-Expression aus den Zellen, die mit "FTI277" behandelt wurden, wurde mit der semi-quantitativen RT-PCR durchgeführt.

Zunächst wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe und unterschiedlichen Zyklenzahlen die optimale DNA-Amplifikationsphase ermittelt, bei der die Reaktion noch nicht die Sättigung erreicht. Die Signale der PCR-Produkte wurden mittels einer Videokamera aufgenommen und densitometrisch ausgewertet. Bei einer Zyklenzahl von 28 und einer Annealingtemperatur von 56°C konnte bei einer Templatekonzentration zwischen 33 und 330 ng ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter RNA-Menge und dem erzeugten Produkt erzielt werden.

Bei 30 Zyklen befand sich die Reaktion bereits in der Sättigung. Nach densitometrischer Auswertung konnten hier keine Unterschiede der Signalstärke bei verschiedenen Templatekonzentrationen mehr beobachtet werden.

Bei der Etablierung der optimalen DNA-Amplifikationsbedingungen für das GAPDH-Gen wurde genau gleich verfahren (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse


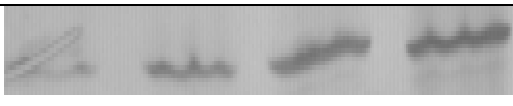
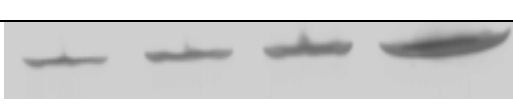
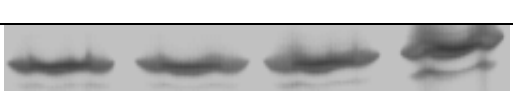
223 bp					24 Zyklen
223 bp					26 Zyklen
223 bp					28 Zyklen
223 bp					30 Zyklen
	33 ng	66 ng	165 ng	330 ng	

Abb.13: Polyacrylamidgelelektrophorese der PCR-Produkte nach Amplifikation des N-myc-Gens bei unterschiedlichen RT-Templatekonzentrationen und Zyklenzahlen

Die RT-Produkte von 33, 66, 165 und 330 ng wurden jeweils bei 24, 26, 28 und 30 Zyklen bei einer "Annealing-Temperatur" von 56°C amplifiziert, in einem 10-15 % Polyacrylamidgradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend silbergefärbt. Die Länge der N-myc cDNA liegt bei 223 bp. Repräsentatives Gel aus drei unabhängigen Versuchen.

Templatekonzentration	33 ng	66 ng	165 ng	330 ng	
	1	1,3	4,5	11,3	24 Cyclen
	1	2,3	5,4	9,6	26 Cyclen
	1	1,7	4,4	12,2	28 Cyclen
	1	1,2	1,5	2,2	30 Cyclen

Tab.3: Quantifizierung der silbergefärbten PCR-Produkte nach Amplifikation des N-myc-Gens bei unterschiedlichen RT-Templatekonzentrationen und Zyklenzahlen (Signale aus Abbildung 13)

Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

3.4.4.2 Einfluß der Verhinderung der Ras-Membranverankerung auf die N-myc Expression in der Neuroblastomzelllinie IMR32

Nachdem die optimalen PCR-Bedingungen für den Nachweis der N-myc und GAPDH-Gene etabliert waren, wurden die zu untersuchenden mRNAs aus der Zelllinie IMR32 mittels RT-PCR amplifiziert. Von den beiden Zelllinien SK-N-SH und IMR32, deren MAPK auf Stimulation mit IGF-II reagierten, wurde die N-myc amplifizierte Zelllinie IMR32 ausgewählt, um den Einfluß der Hemmung der Ras-Membranverankerung auf die N-myc-Expression zu untersuchen. Die mRNA wurde aus IMR32 Zellen, die 4 Tage mit [10µM] "FTI277" behandelt wurden, isoliert. Zur quantitativen Bestimmung der Expressionen wurden die Signale im silbergefärbten Polyacrylamidgel mittels einer Videokamera gescannt und mit dem Wincam Software Programm ausgewertet. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse.

Nach 96-stündiger Hemmstoffbehandlung im serumfreien Medium wurde eine Reduzierung der N-myc-Expression von 37 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet.

Die verbleibende Restexpression des N-myc-Gens wurde in den mit Hemmstoff-behandelten Zellen durch IGF-II Stimulation wieder leicht hochreguliert. Dieses Phänomen ist auf die nicht vollständige Inaktivierung der Ras-Membranverankerung zurückzuführen. Die N-myc-Expression erreichte jedoch keineswegs mehr das Niveau, daß in den unbehandelten mit IGF-II stimulierten Zellen erreicht wurde.

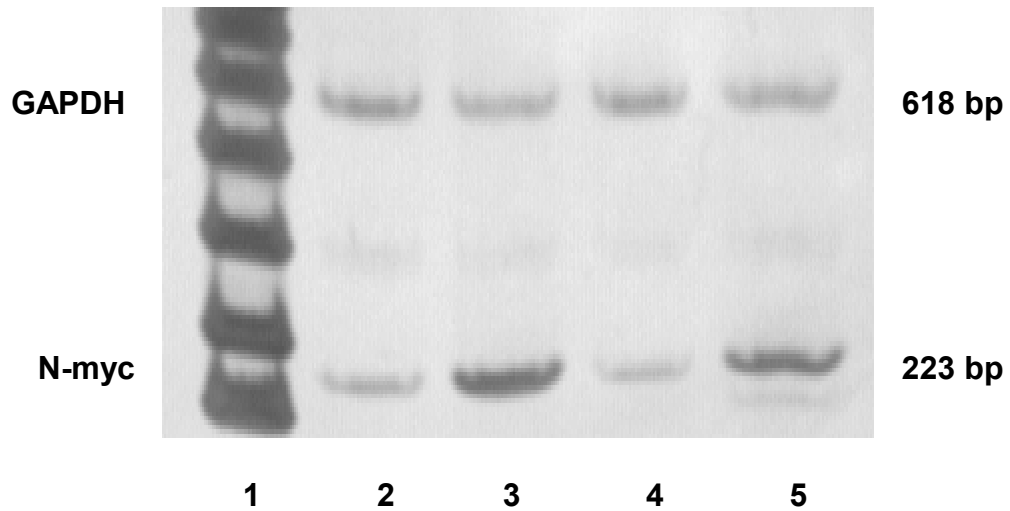


Abb.14: Nachweis der Reduzierung der N-myc-Expression in IMR32 Zellen durch den Farnesyltransferaseinhibitor “FTI277”

Polyacrylamidgelelektrophorese (10-15 %) der RT-PCR Produkte N-myc und GAPDH mit anschließender Silberfärbung; Längenstandard:123 bp DNA Molekulargewichtsmarker. Die Länge der N-myc-cDNA liegt bei 223 bp, der GAPDH cDNA bei 618 bp. 1= Marker; 2= IMR32: 48 Stunden Serumentzug (SE); 3= IMR32: 30 Minuten Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II nach SE; 4= IMR32: 4 Tage “FTI277”; 5= IMR32: 4 Tage “FTI277” und 30 Minuten Stimulation mit IGF-II [50 ng/ml]. Die Abbildung 14 zeigt das Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

4 Diskussion

4.1 Auswirkungen der autokrinen Stimulation von IGF-II auf das Tumorwachstum von Neuroblastomzellen

Die Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II beeinflussen eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen. Sie bewirken eine Stimulierung von Proliferation, Differenzierung und zellspezifische Funktionen, wie Apoptoseresistenz (Petley et al., 1999). Der Wachstumsfaktor IGF-II wird als potentes Mitogen beschrieben, welches verstärkt in fötalen Geweben exprimiert wird und als autokriner Wachstumsfaktor während der frühen Embryogenese bekannt ist (Martin et al., 1993) (Macaulay et al., 1992). Die autokrine Stimulation des IGF-I Rezeptors durch den Wachstumsfaktor IGF-II ist ein Mechanismus, der auch für das unkontrollierte Tumorwachstum verantwortlich ist (Singleton et al., 1996) (El-Badry et al., 1989).

Viele Tumore, wie das Neuroblastom (Sullivan et al., 1995), der Wilms Tumor (Scott et al., 1985) und das Rhabdomyosarcom (El-Badry et al., 1990) werden durch die autokrine Produktion des Wachstumsfaktors IGF-II und die Expression seines Rezeptors stimuliert (Kiess et al., 1997). Eine autokrine Stimulation durch den Wachstumsfaktor IGF-I konnte beim Neuroblastom dagegen nicht nachgewiesen werden (Melino et al.; 1993).

Das Zellwachstum wird durch Wachstumsfaktoren reguliert und erfordert meistens die Kooperation mehrerer Wachstumsfaktoren (Baserga et al., 1997).

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen des Wachstumsfaktors IGF-II auf Neuroblastomzellen näher untersucht.

Alle Versuche mit dem Wachstumsfaktor IGF-II wurden in Gegenwart von 0,1 % inaktiviertem BSA durchgeführt, da in Vorversuchen beobachtet wurde, daß IGF-II bis zu 95 % am Plastik der Zellkulturflaschen haftet und dadurch der Wirkung auf die Zellen entzogen wird. Durch die Zugabe von 0,1 % BSA konnte die Kunststoffaffinität um 75 % reduziert werden.

Unter diesen Bedingungen konnten bei den Neuroblastomzellen IGF-II Konzentrationen von [4,5-99,5 ng/Mio. Zellen] nach 48 Stunden Serumzug im Überstand gemessen werden (Abschnitt 3.1).

Der Wachstumsfaktor IGF-II gehört zur Familie der Insulinwachstumsfaktoren, zu der neben IGF-II noch die Wachstumsfaktoren Insulin und IGF-I gehören. Die Rezeptoren dieser Wachstumsfaktorfamilie sind der Insulinrezeptor, der IGF-I-Rezeptor, der IGF-II- Rezeptor und der "Insulin-receptor-related-receptor" (IRR). In Hinsicht auf die Zellproliferation ist der IGF-I-Rezeptor der wichtigste Rezeptor, durch den alle drei Liganden (IGF-I, IGF-II und Insulin) die Zellproliferation regulieren (LeRoith et al., 1996) (Baserga et al., 1997). Die Affinität für IGFs und Insulin zum IGF-I Rezeptor nimmt in der Reihenfolge IGF-I>IGF-II>Insulin ab.

Auch die Stimulation des Insulinrezeptors kann eine mitogene Wirkung auf Zellen haben. In Zellen der Ratten-Hepatoma-Zelllinie H-35, die keinen IGF-I Rezeptor exprimiert, wirkte IGF-II über den Insulinrezeptor (Krett et al., 1987). Der IGF-II Rezeptor weist zwar eine höhere Affinität zum IGF-II auf, ist jedoch nicht an der Regulierung der Zellproliferation beteiligt (Waelbroeck et al., 1979) (De-Meyts et al., 1995) (Meghani et al., 1993).

In menschlichen Tumoren, wie dem Mammacarcinom, dem Lungencarcinom, dem Colonicarcinom, dem Pankreascarcinom u.s.w. wird eine Überexpression von IGF-I Rezeptoren beschrieben (Macaulay et al., 1992).

Bei der Untersuchung der Expression der IGF-I-Rezeptoren in den Neuroblastomzellen wurde in den Zelllinien Kelly und SK-N-AS keine Expression der IGF-I-Rezeptor mRNA gefunden, wohingegen in den Zelllinien IMR32 und SK-N-SH die IGF-I-Rezeptor mRNA auf Northern-Blots nachgewiesen wurde (3.1.2).

Der funktionelle Nachweis der autokrinen Stimulation durch IGF-II wurde mittels eines Proliferationstestes (MTT) durchgeführt. Die Zellen der verschiedenen Zelllinien proliferierten bereits in serumfreiem Medium unterschiedlich stark. Diese Proliferation erwies sich nicht nur von der Menge des produzierten IGF-II abhängig, sondern auch von der Expression der verschiedenen Rezeptoren.

Bei der Zelllinie SK-N-AS wurde die höchste IGF-II Produktion von [99 ng/Mio. Zellen] in 48 Stunden gemessen. Da in dieser Zelllinie jedoch keine mRNA für

den IGF-I-Rezeptor auf Northern-Blots nachgewiesen werden konnte, ließ sich ihr Wachstum durch dieses autokrin gebildete IGF-II nicht oder nur mäßig stimulieren. Hingegen zeigte die Zelllinie Kelly, mit einer mäßigen IGF-II Produktion in serumfreiem Medium, eine Steigerung der Zellzahl um 70 %, obwohl auch in dieser Zelllinie keine mRNA für den IGF-I-Rezeptor nachgewiesen werden konnte. Bei der Zelllinie Kelly muß daher angenommen werden, daß die beobachtete Stimulation der Proliferation durch IGF-II über den Insulinrezeptor verläuft, da sich diese Zelllinie durch IGF-II stark stimulieren läßt, aber keine IGF-I-Rezeptor-mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte.

In der Zelllinie SK-N-SH, die die geringste autokrine IGF-II-Produktion zeigte, aber eine nachweisbare IGF-I-Rezeptor Expression aufwies, wurde eine 40%ige Steigerung der Zellzahl nach 48 Stunden Serumentzug gemessen.

Die Zelllinie IMR32, die sowohl IGF-II produziert, als auch den IGF-I-Rezeptor exprimiert, zeigte nach 48 Stunden Serumentzug nur eine sehr schwache Zunahme der Zellzahl, obwohl in dieser Zelllinie die optimalen Bedingungen für die autokrine Wachstumsstimulation vorliegen. Es war relativ schwierig diese Zellen für den MTT-Test in Mikrotiterplatten zu kultivieren. Die IMR32 Zellen reagierten in der Zellkultur sehr empfindlich auf Serumentzug mit Veränderungen der Zellmorphologie, wie dem Verlust von Neuriten und der Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturplatten.

Die Zellproliferation wurde weiterhin in Abhängigkeit der Konzentration von zusätzlich hinzugefügten IGF-II untersucht. Bei [50 ng/ml] IGF-II wurde ein maximales Zellwachstum beobachtet, mit [100 ng/ml] IGF-II konnte keine Steigerung der Proliferation mehr erreicht werden. Auch hier wurden Unterschiede in der Stimulierbarkeit der einzelnen Zelllinien beobachtet. In der Zelllinie Kelly kam es nach Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II zu einer weiteren Steigerung der Zellzahl um 40 %, so daß sich die Zellzahl in 48 Stunden verdoppelte. Bei der Zelllinie SK-N-SH war die Zellzahl nach 48 Stunden um den Faktor 1,7 erhöht. Die SK-N-AS Zellen ließen sich durch IGF-II nicht stimulieren. Eine differenzierende Wirkung bei hohen Konzentrationen von IGF-II wie sie von Petley et al., beschrieben wurde, konnte in den Neuroblastomzellen nicht beobachtet werden.

Nachdem die Auswirkungen der IGF-II Stimulation auf die Zellproliferation der Neuroblastomzelllinien untersucht waren, wurde der Signaltransduktionsweg von IGF-II in den Neuroblastomzellen genauer untersucht. Die Wirkung von IGF-II wurde bereits in anderen Zellsystemen u.a. über den Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg beschrieben (Robbins et al, 1992) (Zumkeller et al.,1999). Durch die Bindung von IGF-II an den Tyrosinkinase-rezeptor wird über das Adapterprotein (Grb2) und das Guaninnukleotidaustauschprotein (Sos) das Ras-Protein aktiviert und anschließend eine Proteinkinasekaskade in Gang gesetzt. Die auf diese Weise aktivierten MAPKinasen (ERK-1 und ERK-2) translozieren in den Zellkern und phosphorylieren hier Transkriptionsfaktoren, die zur Zellproliferation beitragen (Brunet et al., 1995).

Es sind über ein Dutzend Mitglieder der Familie der MAPK bekannt (Cobb 1999). Die beststudierten MAPKinasen sind die ERKs, die JNK/SAPKs und p38. Die Familien können durch unterschiedliche extrazelluläre Stimuli und durch verschiedene Zwischenstufen in der Signaltransduktion unterschieden werden (Cahill et al., 1996).

Zunächst wurde die Aktivierung der MAPK (ERK-1 und ERK-2) in den Neuroblastomzellen nach Stimulation mit IGF-II mittels Western-Blots untersucht.

Dazu wurde in dieser Arbeit der nicht-radioaktive MAPK-Kit der Firma Upstate verwendet, bei dem die MAPK (ERK-1 und ERK-2) mit einem Antikörper, der gegen die Aminosäuren 333-337 von ERK-1 und ERK-2 gerichtet ist, durch Immunpräzipitation isoliert wurde und in einer folgenden enzymatischen Reaktion eines ihrer Substrate (MBP) phosphorylierte. Von der Rattenphaeochromocytomazelllinie PC-12 ist bekannt, daß die MAPK (ERK-1 und ERK-2) durch [50 ng/ml] NGF stark aktiviert werden (Robbins et al.,1992). Diese Zelllinie wurde in allen Versuchen als positive Kontrolle eingesetzt (3.3.1). Weiterhin wurde die Spezifität des anti-phospho-MBP nochmals überprüft. Es konnte gezeigt werden (3.3.1), daß mit Hilfe des anti-phospho-MBP nur phosphoryliertes MBP erkannt wird, der Antikörper also sehr spezifisch ist, und dieser Test somit als Alternative zum radioaktiven Nachweis der MAPK-Aktivität eingesetzt werden kann.

In allen untersuchten Zelllinien konnte eine Grundaktivität der MAPK nachgewiesen werden. Durch 15-minütige Stimulation mit dem Wachstumsfaktor IGF-II [50 ng/ml] wurde die MAPK-Aktivität in der Zelllinie SK-N-SH und in der Zelllinie IMR32 hochreguliert. Bei diesen beiden Zelllinien wurde auch die Expression des IGF-I-Rezeptors nachgewiesen (3.1.2). Die Zelllinie IMR32 zeigte im Vergleich zur Zelllinie SK-N-SH schon im Grundzustand eine sehr starke MAPK-Aktivität, die möglicherweise auf die hohe autokrine Produktion von IGF-II in der Zelllinie IMR32 zurückzuführen ist (Abb. 7 und Abb. 8). Bei der Zelllinie Kelly wurde schon eine sehr starke Anfangsaktivität der MAPK beobachtet, die durch die Stimulation mit IGF-II jedoch nicht gesteigert werden konnte, wohingegen die Zelllinie SK-N-AS nur eine schwache Anfangsaktivität zeigte. Auch in dieser Zelllinie war keine weitere Stimulation der MAPK-Aktivität durch IGF-II möglich. Sowohl in der Zelllinie Kelly als auch in der Zelllinie SK-N-AS wurde keine mRNA für den IGF-I Rezeptor nachgewiesen (3.1.2).

Die Beobachtung einer Steigerung der Zellproliferation durch IGF-II Stimulation in der Zelllinie Kelly, ohne daß IGF-I-Rezeptoren nachweisbar waren, und die Tatsache, daß sich die MAPK-Aktivität in der Zelllinie Kelly durch IGF-II nicht steigern ließ, ist ein Hinweis darauf, daß IGF-II unterschiedliche Signaltransduktionswege für die Induktion der Zellproliferation verwenden kann. Möglicherweise nutzt die Zelllinie Kelly den Insulinrezeptor für die autokrine Stimulation durch IGF-II, da der Insulinrezeptor in Gegenwart hoher Konzentrationen Insulins und IGF-II mitogene Wirkung zeigen kann (Meghani et al., 1993). Neben dem Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg werden auch andere Signaltransduktionswege der IGF-Rezeptoren beschrieben, so daß eine Erhöhung der MAPK-Aktivität für die Proliferation der Zelllinie Kelly nicht unbedingt erforderlich ist.

Neben dem Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg kann IGF-II auch über den Phosphatidylinositolphosphat-3-Kinase-Weg proliferierende Wirkung zeigen (Petley et al., 1999).

Bei den Neuroblastomzelllinien IMR32 und SK-N-SH, die IGF-I-Rezeptor mRNA exprimieren, findet nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor IGF-II eine Aktivierung der MAPK statt.

Die aktivierte MAPK (ERK-1 und ERK-2) phosphoryliert und reguliert auch den Transkriptionsfaktor c-myc (Seth et al.; 1992) (Gupta et al., 1994).

In wie weit auch das N-myc Gen durch die MAPK (ERK-1 und ERK-2) aktiviert wird, wurde bislang noch nicht beschrieben.

In den Northern-Blot Versuchen wurde daher die N-myc Expression nach Stimulation der Neuroblastomzellen mit IGF-II untersucht. In Abschnitt 3.4.3 werden diese Ergebnisse dargestellt und in Abschnitt 4.3 diskutiert.

4.2 Auswirkungen der Verhinderung der Ras-Membranverankerung auf die Signaltransduktion des IGF-Rezeptors

Der Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Signalen der Wachstumsfaktoren zum Zellkern. Bei vielen Tumoren werden durch Mutationen aktivierte Ras-Proteine oder eine ständige Ras-Aktivierung aufgrund der autokrinen Stimulation beobachtet (Joneson et al., 1997). Mutierte ras-Gene werden in mehr als 20 % aller menschlichen Tumore nachgewiesen, davon in Colon- und Pankreaskarzinomen in über 50 % der Fälle. Chemotherapeutika, die einen Einfluß auf die Aktivität der Ras-Proteine haben, könnten zu einem Fortschritt der Therapie dieser Tumore beitragen.

In den letzten Jahren wurde ein großes Augenmerk auf die biochemische Struktur der Ras-Proteine gelegt.

Die Ras-Proteine sind über einen Farnesylrest, ein Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese, an der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran verankert und nur in dieser Form biologisch aktiv (Jackson et al., 1990). Die Inhibition dieser posttranslationalen Modifikation der Ras-Proteine ist eine Möglichkeit der Inaktivierung der Ras-Proteine (Gibbs et al., 1993). Viele Wissenschaftler und pharmazeutische Unternehmen arbeiten an Verfahren der Inaktivierung der Ras-Proteine durch Farnesyltransferaseinhibitoren. Durch die Inaktivierung der Ras-Proteine sollte die Signaltransduktion zum Zellkern und somit die Zellproliferation inhibiert werden können.

Die Entwicklung dieser Farnesyltransferaseinhibitoren erwies sich jedoch als besonders schwierig, da die Substanzen zum einen äußerst selektiv sein müssen und zum anderen keine toxischen Nebenwirkungen beinhalten dürfen.

Lovastatin, ein kompetitiver Inhibitor der HMG-CoA Reduktase, bewirkt die Verhinderung der Synthese des Farnesylpyrophosphates. Die Behandlung verschiedener Tumorzellen mit Lovastatin bewirkte eine Verhinderung der Membranverankerung des N-Ras-Proteins um 30 % (Girgert et al., 1994). Die Gabe von Lovastatin in der Konzentration von [10 µM] bewirkte jedoch auch eine deutliche Änderung der Zellmorphologie. Die behandelten Zellen lösten sich mit zunehmender Behandlungsdauer vom Untergrund der Zellkulturflasche ab.

In Versuchen mit dem Farnesyltransferaseinhibitor α -Hydroxyfarnesylphosphonat wurde eine 50 % Hemmung der Farnesyl-Protein-Transferase bei einer Konzentration von [3-6 µM] erreicht (Girgert, et al. 1999). Auch hier zeigte der Hemmstoff aufgrund seiner amphipolaren Detergenz-ähnlichen Struktur toxische Nebenwirkungen.

Die Hemmung der Farnesyltransferasen mit CAAX-Peptiden bereitete große Schwierigkeiten, da diese Tetrapeptide aufgrund ihrer polaren Struktur sehr schlecht in Zellen aufgenommen werden (James et al., 1994) und Anfälligkeiten gegenüber der Zerstörung durch Peptidasen beobachtet wurden (Kohl et al., 1993), (Quian et al., 1997). Auf der Basis der CAAX-Peptide wurden dann die Peptidomimetika entwickelt. Sie besitzen in ihrer räumlichen Struktur große Ähnlichkeit zu den CAAX-Peptiden, weisen jedoch keine spaltbaren Peptidbindungen mehr auf, und enthalten weniger elektrisch geladene Gruppen, so daß die Permeation durch die Zellmembran verbessert ist (Lerner et al., 1995).

Der Farnesyltransferaseinhibitor "FTI277", ein Methylesterderivat von "FTI276", ist ein solches Peptidomimetikum und wirkt extrem potent auf die Inhibition von H-Ras-Proteinen [IC₅₀=100 nM] (Lerner et al., 1995).

In dieser Arbeit wurde der Einfluß des "Prodrugs-FTI277" auf die Zellproliferation untersucht.

Nach 4 Tagen Behandlung mit [10 µM] "FTI277" wurde in den Zelllinien IMR32 und Kelly eine Reduzierung der Ras-Membranverankerung um 50 % beobachtet (Girgert, persönliche Mitteilung, Girgert et al., 2000 Abstract). In Neuro-

blastomzellen, die über 4 Tage mit [10 µM] "FTI277" behandelt waren, wurde in serumfreiem Medium eine Reduktion der Zellproliferation von über 50 % gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet. Zellen, die während der 4-tägigen Hemmstoffbehandlung die letzten 48 Stunden mit [50 ng/ml] IGF-II in serumfreiem Medium stimuliert wurden, zeigten wieder einen Anstieg der Zellproliferation von ca. 15 % im Vergleich zur Kultur im serumfreien Medium (Abb.6 A-C). Dieser Anstieg der Zellproliferation fällt nur halb so stark aus wie die Stimulation des Wachstums durch IGF-II in den unbehandelten Zellen der Zelllinien SK-N-SH, IMR32 und Kelly. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Inaktivierung der Ras-Proteine eine starke Auswirkung auf die Zellproliferation hat, da der Wachstumsfaktor IGF-II nur noch vermindert in der Lage ist, seine Signale über den Ras-Zyklus an den Zellkern weiterzuleiten. Der leichte Anstieg der Zellproliferation nach Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II ist durch die nicht vollständige Inaktivierung der Ras-Proteine zu erklären. Die Ergebnisse der 4-tägigen Hemmstoffbehandlung im serumhaltigen Vollmedium zeigten ebenfalls eine Reduzierung der Zellproliferation um 50 %. Diese Beobachtung weist darauf hin, daß auch andere Wachstumsfaktoren als IGF-II aus dem Serum ihre Signale über den Ras-Zyklus weiterleiten und die Proliferation der Neuroblastomzellen stimulieren.

Insgesamt ist zu sehen, daß die Verhinderung der Ras-Membranverankerung eine entscheidene Rolle in der Verhinderung der Zellproliferation spielt, daß aber neben dem Wachstumsfaktor IGF-II auch andere Wachstumsfaktoren bei Neuroblastomzellen zur Zellproliferation beitragen, die ebenfalls über Ras aktiviert werden.

Als weiterer funktioneller Nachweis wurde der Einfluß der 4-tägigen Hemmstoffbehandlung mit [10 µM] "FTI277" auf die MAPK-Aktivität untersucht. In der Zelllinie SK-N-SH wurde die MAPK-Aktivität im Ruhezustand, nach 48 Stunden Serumentzug, durch die Behandlung mit "FTI277" um 60 % reduziert, in der Zelllinie IMR32 sogar um 90 %. Diese nach Hemmung der Ras-Farnesylierung verbleibende Restaktivität konnte in beiden Zelllinien nach Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II um den Faktor 5 wieder erhöht werden, was auf die nicht vollständige Inaktivierung der Ras-Proteine hinweist.

Zusätzlich wurde ein weiterer Mechanismus, wie die Hemmung der MAPK nach Behandlung mit "FTI277" zustande kommt, wie folgt beschrieben:

Das "Prodrug-FTI277" induziert die Akkumulation von nicht farnesylierten H-Ras im Cytosol, das auch dort in der Lage ist, Raf zu binden und Ras/Raf-Komplexe zu bilden, in denen die Raf-Kinase nicht mehr aktiviert werden kann. Hierdurch wird der Signaltransduktionsweg zur MAPK-Kaskade unterbrochen (Lerner et al., 1995).

Da die Ras-Proteine zum Teil auch geranylgeranyliert werden müssen, um biologisch aktiv zu sein, müßte zusätzlich ein Geranylgeranyltransferaseinhibitor eingesetzt werden (Whyte et al., 1997).

Die deutliche Hemmung der Zellproliferation der Neuroblastomzellen zeigt, daß die Verhinderung der Membranverankerung der Ras-Proteine ein vielversprechender Weg in der Therapie dieser Tumore werden könnte.

Es darf an dieser Stelle jedoch nicht vergessen werden, daß Neuroblastome durch verschiedene Wachstumsfaktoren, die über unterschiedliche Signaltransduktionswege ihre Signale weiterleiten, autokrin stimuliert werden und somit ein Netzwerk von Signalwegen zur Pathogenese des Tumors beiträgt.

4.3 Einfluß von IGF-II auf die N-myc-Expression in Neuroblastomzellen

Die Regulation von Zellproliferation und Differenzierung wird u.a. durch Wachstumsfaktoren bestimmt. Durch die Wachstumsfaktor-Rezeptor-Interaktion wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die eine schnelle Induktion von Transkriptionsfaktoren verursacht. Der Wachstumsfaktor IGF-II induziert früh exprimierende Gene, wie das fos-Gen, das jun-Gen und das c-myc-Gen (LeRoith et al.; 1996). Diese sog. "Immediate-early-genes", sind Gene, die durch Wachstumsfaktoren induziert eine frühe Zellantwort, wie z.B. die Zellproliferation, geben.

Das N-myc-Gen codiert ebenfalls für ein nukleäres Protein, das die Transkription von Genen reguliert, die die Zellproliferation beeinflussen (Keim et al., 1993).

Beim Neuroblastom korreliert die Amplifikation des N-myc-Gens in vielen Fällen mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Es werden jedoch in fortgeschrittenen Stadien auch Fälle beobachtet, in denen eine verstärkte N-myc-Expression in Tumoren ohne N-myc-Amplifikation vorkommt (Nisen et al., 1988) (Wada et al., 1993).

Wegen der bedeutenden Rolle, die das N-myc-Gen beim Neuroblastom einnimmt, ist es von besonderem Interesse, die Regulation dieses Gens zu untersuchen.

Bisher ist wenig darüber bekannt, wie die Expression des N-myc-Gens reguliert wird. Gross et al., beschreiben eine Modulation des N-myc-Gens durch Interferon und EGF.

In den Abschnitten 3.1 und 3.2 dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Neuroblastome den Wachstumsfaktor IGF-II produzieren, und ihr Wachstum über den IGF-Rezeptor autokrin stimulieren. Durch IGF-II wird die Zellproliferation der Neuroblastomzellen gesteigert. In Abschnitt 3.3 konnte gezeigt werden, daß der Signaltransduktionsweg von IGF-II in Neuroblastomzellen u.a. über die Aktivierung der MAPK (ERK-1 und ERK-2) verläuft. Ob das N-myc-Gen durch IGF-II über die MAPK aktiviert wird, wurde bislang noch nicht beschrieben. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die N-myc-Expression in Neuroblastomzellen durch IGF-II induziert wird. Gupta et al., beschrieben den Transkriptionsfaktor c-Myc als Substrat für die Phosphorylierung durch die MAPK.

Zur Genexpressionsanalyse stehen mehrere Methoden zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die quantitative Bestimmung der Genexpression auf mRNA-Ebene mittels Northern-Blots durchgeführt. Für die Northern-Blots wurde eine nicht-radioaktive Technik zum Nachweis der N-myc-Expression etabliert, bei der Digoxigenin-markierte-Sonden verwendet werden (Schwäble et al., 1998). Diese Sonden hatten den Vorteil neben der längeren Haltbarkeit, der Vermeidung des Umganges mit radioaktivem Material, auch noch im Piktogramm-Bereich mRNA nachweisen zu können. Mit diesen Sonden war es mög-

lich, die Expression des N-myc-Gens auf Northern-Blots zu bestimmen, auf denen [5 µg] mRNA aufgetragen waren. Aus den Neuroblastomzellen, die mit dem Farnesyltransferaseinhibitor "FTI277" behandelt wurden, ließ sich nicht genügend mRNA für Northern-Blots isolieren. Hier mußte für den Nachweis der N-myc-Expression die Methode der semi-quantitativen RT-PCR angewandt werden, für die nur [0,5 -1 µg] mRNA benötigt wurden. Bei der RT-PCR sind neben der geringen Templatekonzentration, auch die hohe Sensitivität und leichte Durchführbarkeit der Methode von Vorteil. Es handelt sich bei dieser Methode jedoch um einen semiquantitativen Nachweis der Genexpression, da außerhalb eines engen linearen Bereiches der Amplifikation zusätzliche Ungenauigkeiten auftreten, wenn die Amplifikationsreaktion in eine Sättigung gerät (Pilarsky und Flach 1994).

In Vorversuchen wurden daher die optimalen Reaktionsbedingungen bestimmt, bei denen ein linearer Zusammenhang zwischen Templatekonzentration und erzeugtem PCR-Produkt besteht. Bei 28 Zyklen, einer Annealingtemperatur von 56 °C und einer Templatekonzentration von [33-330 ng] mRNA konnte ein solcher linearer Zusammenhang beobachtet werden (Abschnitt 3.4.4.1).

Bei beiden Methoden (Northern-Blot und RT-PCR) ist es wichtig ein Referenzgen als internen Standard mitzuführen, da die Quantifizierung der m-RNA über die OD₂₆₀ gewissen Ungenauigkeiten unterliegt, und die mRNA-Präparationen noch Kontaminationen durch ribosomale RNA enthalten können, die von Präparation zu Präparation variieren, wie durch Methylenblaufärbung von Northern-Blots nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Als Maß dafür, daß in allen Proben gleich viel mRNA aufgetragen wurde, wird in der Regel ein Standardgen durch Hybridisierung mitdetektiert, von dem bekannt ist, daß seine Expression keinen Beeinflussungen von außen unterliegt. Es sind eine Vielzahl von Referenzgenen bekannt. Spanakis et al. beschrieben den Vergleich von GAPDH, β-Actin und ribosomaler RNA als Referenzgene. GAPDH zeigte in dieser Untersuchung die geringsten Schwankungen.

Als Referenzgen wurde in dieser Arbeit deshalb für beide Methoden das GAPDH-Gen gewählt. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) ist ein Enzym der Glykolyse, welches nicht reguliert wird und somit in allen Proben

gleich stark exprimiert wird. Durch die Bildung des Quotienten aus dem N-myc-Gen und dem GAPDH-Gen konnten die Expressionen des N-myc-Gens innerhalb eines Versuches verglichen werden.

In Vorversuchen wurde die N-myc-Expression durch Serumentzug in ihrem Grund bzw.-Ruhezustand gebracht, um Basiswerte für die IGF-II-Stimulation zu erhalten. Nach einem 24-stündigen Serumentzug wurde jedoch unerwarteterweise sogar ein Anstieg der N-myc-Expression beobachtet. Dieser Anstieg der N-myc-Expression ist möglicherweise als Serumentzugsschock zu erklären, da sich die Zellen unter einer sog. Streßbedingung befanden. Nach 48 Stunden Serumentzug sank die N-myc-Expression allerdings auf einen Minimalwert, von dem aus eine Induktion der Expression durch IGF-Stimulation deutlich zu beobachten war.

In einer zeitabhängigen Studie wurde mittels Northern-Blots nachgewiesen, daß bei der Stimulierung mit [50 ng/ml] IGF-II nach 30 Minuten eine maximale N-myc-Expression erreicht wird. Diese Zeitkinetik war notwendig, da die mRNA früh exprimierender Gene eine sehr kurze Halbwertszeit haben.

Abbildung 12 zeigt, daß in den Neuroblastomzelllinien mit N-myc-Amplifikation (IMR32 und Kelly), wie auch in der nicht N-myc-amplifizierten Zelllinie SK-N-SH die N-myc-Expression durch IGF-II [50 ng/ml] hochreguliert wird.

Weiterhin konnte durch Unterbrechung des Signaltransduktionsweges von IGF-II mit dem Farnesyltransferaseinhibitor "FTI277" die N-myc-Expression reduziert werden.

In der Zelllinie IMR32 zeigte sich eine Reduzierung der N-myc-Expression nach 4 Tagen Behandlung mit dem Hemmstoff "FTI-277" von 38 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die N-myc-Expression ließ sich in den mit "FTI277" behandelten Zellen durch IGF-II-Stimulation wieder auf 80 % der Expression in den unbehandelten Zellen steigern. Dieses Phänomen ist auf die nicht vollständige Inaktivierung der Ras-Membranverankerung zurückzuführen.

Weiterhin wurde gezeigt, daß die N-myc-Expression durch IGF-II reguliert wird. Anhand der Zelllinie Kelly ist zu erkennen, wie groß das Netzwerk der Signaltransduktionswege ist. In der Zelllinie Kelly wurde eine erhöhte autokrine Produktion von IGF-II ohne IGF-I-Rezeptoren nachgewiesen. Das autokrin produ-

zierte IGF-II scheint bei der Zelllinie Kelly im Gegensatz zu den anderen untersuchten Neuroblastomzelllinien seine Signale über den Insulinrezeptor weiterzuleiten. Es wurde beschrieben, daß IGF-II in hohen Konzentrationen auch an den Insulinrezeptor bindet und über diesen Rezeptor seine mitogene Wirkung ausübt (De-Meyts et al., 1995) (Waelbroeck et al., 1979). Carel et al., konnten zeigen, daß Insulin die MAPK sowohl in einem Ras-abhängigen Zyklus, wie aber auch in einem Ras-unabhängigen Zyklus stimuliert.

Aktivierte Ras-Proteine werden bei 20-30 % aller menschlichen Malignome beobachtet. Eine Inaktivierung der Ras-Proteine wird daher bei diesen Tumoren als eine neue rationale Möglichkeit des therapeutischen Eingriffs angesehen (Gibbs et al., 1993) (Quian et al., 1997). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß der Einsatz von Farnesyltransferaseinhibitoren zur Inaktivierung von Ras-Proteinen auch in Neuroblastomzellen deutliche Effekte zeigt.

Es wurden unterschiedliche Farnesyltransferaseinhibitoren zur Inaktivierung der Ras-Membranverankerung in Neuroblastomzellen verwendet.

Mit Lovastatin, dem Hemmstoff der Cholesterinbiosynthese, der auch die Biosynthese des Farnesylpyrophosphates verhindert, ließ sich in verschiedenen Neuroblastomzellen die N-Ras-Membranverankerung um 30-43 % reduzieren (Girgert et al. 1994). Mit [20 µM] →Hydroxyfarnesylphosphonat, einem kompetitiven Hemmstoff der Farnesyltransferase, konnte die Membranverankerung des N-Ras-Proteins um 50 % und des H-Ras-Proteins um fast 100 % reduziert werden (Girgert et al. 1999).

Der Farnesyltransferaseinhibitor "FTI277", ein Prodrug des Peptidomimetikum "FTI276", erwies sich in dieser Arbeit als ein sehr geeigneter Inhibitor für die Inaktivierung der Ras-Membranverankerung in Neuroblastomzellen. Neben der hoch potenten Wirkung dieses Inhibitors auf die Ras-Farnesylierung (Lerner et al., 1995) (Girgert, persönliche Mitteilung, Girgert et al., 2000 Abstract) konnten in Mausversuchen kaum toxische Nebenwirkungen beobachtet werden (Sun et al., 1998). Mit [10 µM] "FTI277" konnte der Ras-abhängige Signaltransduktionsweg von IGF-II deutlich gehemmt werden. Die basale MAPK-Aktivität ließ sich nach Serumentzug um 60 -90 % inhibieren, während nach Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II die MAPK Aktivität noch 25-60 % der Aktivität der

ungehemmten Zellen betrug. Die N-myc-Expression ließ sich durch "FTI 277" um 38 % reduzieren, sowie die Zellproliferation um 60-63 % hemmen.

Diese Versuche zeigen sehr deutlich, dass Farnesyltransferaseinhibitoren weitere Wege in der Krebstherapie eröffnen und somit von therapeutischen Nutzen sein können.

5 Literatur

- Bajzer, Z.; Vuk Pavlovic, S.
Quantitative aspects of autocrine regulation in tumors
Crit. Rev. Oncog. **2** 53-73 (1990)
- Barbacid, M.
ras Genes
Ann. Rev. Biochem. **56** 779-827 (1987)
- Barker, P.E.
Double minutes in human tumor cells
Cancer Genet. Cytogenet. **5** 81-94 (1982)
- Baserga, R.; Hongo, A., Rubini, M.; Prisco, M.; Valentinis, B.
The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis
Biochimica and Biophysica acta **1332** 105-126 (1997)
- Beckwith, B.J; Perrin, E.V.
In situ neuroblastoma: A contribution to the natural histology of neural crest tumors
Am. J. Pathol. **43** 1089-1104 (1963)
- Bell, G.I.; Merryweather, J.P.; Sanchez-Pescador, R.; Stempien, M.M.;
Priestley, L.; Scott, J.; Rall, L.B.
Sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin-like growth-factor-II
Nature **310** 775-777 (1984)
- Biedler, J.L.; Helson, L.; Spengler, B.A.
Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture
Cancer-Research **33** 2643-2652 (1973)
- Blackwood, E.M; Eisenmann, R.N.
Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with myc
Science **251** 1211-1217 (1991)
- Blum, W.; Ranke, M.B.; Bierich, J.R.
A specific radioimmunoassay for IGF-II: The interference of IGF 2 binding proteins can be blocked by excess IGF-I
Acta Endocrinol. (Copenhagen) 374-380 (1988)

Bordow, S.B.; Haber, M.; Madafiglio, J.; Cheung, B.; Marshall, G.M., Norms, M.D.

Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma

Cancer-Research **54** 5036-5040 (1994)

Bos, J.L.

Ras Oncogenes in human cancer: A review

Cancer-Research **49** 4682-4689 (1989)

Boulton, T.G.; Yancopoulos, G.D.; Gregory, J.S.; Slaughter, C.; Moomaw, C.; Hsu, J.; Cobb, M.H.

An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control

Science **249** 64-67 (1990)

Brissenden, J.E.; Ullrich, A.; Francke, U.

Human chromosomal mapping of genes for insulin-like-growth-factors-I and II and epidermal-growth-factor

Nature **310** 781-784 (1984)

Brodeur, G.M.; Azar, C.; Brother, M.; Hiemstra, J.; Kaufman, B.; Marshall, H.; Moley, J.; Nakagawara, A.; Saylor, R.; Scavarda, N.; Schneider, S.; Wasson, J.; White, P.S.; Seeger, R.; Look, T.; Castleberry, R.

Effect of genetic factors on prognosis and treatment

Cancer-Supplement **70** 1685-94 (1992)

Brodeur, M.G.

Molecular pathology of human neuroblastomas

Seminars in Diagnostic-Pathology **11** 118-125 (1994)

Brunet, A.; Brondello, J.M.; L'Allemain, G.; Mc Kenzie, F.; Pages, G.;

Pouyssegur, J.;

MAP kinase module: role in the control of cell proliferation

C. R. Seances Soc. Biol. Fil. **189** 43-57 (1995)

Cahill, M.A.; Janknecht, R.; Nordheim, A.

Signalling pathways: Jack of all cascades

Current Biology **6** 16-19 (1996)

Carel, K.; Kummer, L.; Schubert, C.; Leitner, W.; Heidenreich, K.; Draznin, B.
Insulin stimulates mitogen-activated protein kinase by a ras-independent pathway in 3T3-L1 adipocytes

Journal of Biological Chemistry **271** 30625-30630 (1996)

- Caron, H.; Peter, M.; van-Sluis, P.; Speleman, F.; de-Kraker, J.; Laureys, G.; Micho, J.; Brugieres, L.; Voute, P.A.; Westerveld, A.
Evidence for two tumour suppressor loci on chromosomal bands 1p35-36 involved in neuroblastoma: one probably imprinted, another associated with N-myc amplification
Hum. Mol. Genet. **4** 535-539 (1995)
- Casey, P.J.; Soliski, P.A.; Der, C.J.; Buss, J.E.
p21 ras is modified by farnesyl isoprenoid
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86** 8323-8327 (1989)
- Cheng, N.C.; Van-Roy, N.; Chan, A.; Beitsma, M.; Westerveld, A.; Speleman, F.; Vertseeg, R.
Deletion mapping in neuroblastoma cell lines suggests two distinct tumor suppressor genes in the 1 p35-36 region, only one of which is associated with N-myc-amplification.
Oncogene **10** 291-297 (1995)
- Chirgwin, J. M.; Przybyla, A. E.; MacDonald, R. J.; Rutter, W. J.
Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease
Biochemistry **18** 5294-5299 (1979)
- Choi, S.W.; Lee, T.W.; Yang, S.W.; Hong, W.S.; Kim, C.M.; Lee, J.O.
Loss of retinoblastoma-gene and amplification of N-myc gene in retinoblastoma
J. Korean. Med. Sci. **8**:73-77 (1993)
- Cobb, M.H.
MAPK pathways
Progress in Biophysics and Molecular-biology **71** 479-599 (1999)
- Cole, M.D.; McMahon, S.B.
The myc-oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation
Oncogene **18** 2916-2924 (1999)
- Combaret, V.; Gross, N.; Lasset, C.; Frappaz, D.; Peruisseau, G.; Philip, T.; Beck, D.; Favrot, M.C.
Clinical relevance of CD 44 cell-surface expression and N-myc gene amplification in a multicentric analysis of 121 pediatric neuroblastomas
J. Clin. Oncol. **14** 25-34 (1996)
- Corvi, R.; Savelyeva, L.; Schwab, M.
Duplication of N-myc at its resident site 2p24 may be a mechanism of activation alternative to amplification in human neuroblastoma cells
Cancer-Research **55** 3471-3474 (1995)

Cowell, J.K.

Double minutes and homogeneously-staining-regions: gene-amplification in mammalian cells

Annu. Rev. Genet. **16** 21-59 (1982)

Davis, R.J.

Transcriptional regulation by MAP kinases

Mol. Reprod. Dev. **42** 459-467 (1995)

Daughaday, W.H.; Rotwein, P.

Insulin-like growth factors I and II Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations

Endocr. Rev. **10** 68-91 (1989)

De-Meyts, P.; Christoffersen, C.T.; Urso, B.; Wallach, B.; Gronskov, K.;

Yakushiji, F.; Shymko, R.M.

Role of the time factor in signaling specificity: application to mitogenic and metabolic signaling by the insulin and insulin-like growth-factor-I receptor tyrosine kinases

Metabolism **44** 2-11 (1995)

El-Badry, O.M.; Romanus, J.A.; Helman, L.J.; Cooper, M.J.; Rechler, M.M.; Israel, M.A.

Autonomous growth of human neuroblastoma cell line is mediated by insulin-like-growth-factor-II

J. Clin. Invest. **84** 829-839 (1989)

El-Badry, O.M.; Minniti, C.P.; Kohn, E.C.; Houghton, P.J.; Daughaday, W.J.; Helmann, L.J.

Insulin-like-growth-factor-II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors

Cell-growth-Differ. **1** 325-331 (1990)

Fong, C.T.; Dracopoli, N.C.; White, P.S.; Merrill, P.T.; Griffith, R.C.; Housman, D.E.; Brodeur, G.M.

Loss of heterozygosity for the short arm of chromosom 1 in hunan neuroblastoma: correlation with N-myc amplification

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** 3753-3757 (1989)

Fong, C.T.; White, P.S.; Peterson, K.; Sapienza, C.; Cavenee, W.K.; Kern, S.E.; Vogelstein, B.; Cantor, A.B.; Look, A.T.; Brodeur, G.M.

Loss oh heterozygosity for chromosom 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas

Cancer-Research **52** 1780-1785 (1992)

Garson, J.A.; Mc Intyre, P.G.; Kemshead, J.T.

N-myc-amplification in malignant astrocytoma

Lancet **2** 718-719 (1985)

Gibbs, J.B.; Pompliano, D.L.; Mosser, S.D.; Rands, E.; Lingham, R.B.; Singh, S.B.; Scolnick, E.M.; Kohl, N.E.; Oliff, A.
Selective inhibition of farnesyl-protein-transferase blocks ras processing in vivo
J. Biol. Chem. **268** 7617-7620 (1993)

Gille, H.; Kortenjann, M.; Thomae, O.; Moomaw, C.; Slaughter, C.; Cobb, M.H.; Shaw, P.E.
ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation
EMBO Journal **14** 951-962 (1995)

Girgert, R.; Marini, P.; Janessa, A.; Bruchelt, G.; Treuner, J.; Schweizer, P.
Inhibition of membrane localization of ras-p21-protein in N-ras transformed tumor cells by Lovastatin
Oncology **51** 320-322 (1994)

Girgert, R.; Hohnecker, A.; Wittrock, J.; Schweizer, P.
Inhibition of farnesyl-protein-transferase in neuroblastoma cells by alpha-hydroxyfarnesylphosphonate
Anticancer-Research **19** 2959-2962 (1999)

Girgert, R.; Wittrock, J.; Pfister, S.; Schweizer, P.
Disruption of autocrine growth stimulation in neuroblastoma by inhibition of farnesyltransferase
European journal of cell-biology **50** 53 (2000)

Greene, L.A.; Tischler, A.S.
Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve-growth-factor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73** 2424-2428 (1976)

Grosfeld, J.L.
Risk-based management: current concepts of treating malignant solid tumors of childhood
J. Am. Coll. Surg. **189** 407-425 (1999)

Gross, N.; Beck, D.; Favre, S.
In vitro modulation and relationship between N-myc and HLA class I RNA steady-state levels in human neuroblastoma cells
Cancer Research **50** 7532-7536 (1990)

Gupta, S.; Davis, R.J.
MAP kinase binds to the NH₂-terminal activation domain of c-Myc
FEBS-Lett. **353** 281-285 (1994)

Guo, C.; White, P.S.; Weiss, M.J.; Hogarty, M.D.; Thompson, P.S.; Stram, D.O.; Gerbing, R.; Matthay, K.K.; Seeger, R.C.; Brodeur, G.M.; Maris, J.M. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas
Oncogene **18** 4948-4957 (1999)

Gutierrez, L.; Magee, A.I.; Marshall, C.J.; Hancock, J.F. Post-translational processing of p21 ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis
EMBO-Journal **8** 1093-1099 (1989)

Haas, D.; Ablin, A.R.; Miller, C.; Zoger, S.; Matthay, K.K.; Complete pathologic maturation and regression of stage IVS neuroblastoma without treatment
Cancer **62** 818-825 (1988)

Haguel de Mouzon, S.; Kahn, C.R. Insulin-like growth factor-mediated phosphorylation and protooncogene induction in Madin-Darby canine kidney cells
Mol. Endocrinol. **1** 51-60 (1991)

Hamann, U.; Wenzel, A.; Frank, R.; Schwab, M. MycN protein of human neuroblastoma cells is phosphorylated by casein-kinase II in the central region and at serine 367
Oncogene **6** 1745-1751 (1991)

Hanauer, A.; Mandel, L. J. The glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene family: structure of human cDNA and of X chromosome linked pseudogene amazing complexity of the gene family in mouse
EMBO-Journal **3** 2627-2633 (1984)

Hancock, J.F.; Paterson, H.; Marshall, C.J. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane
Cell **63** 133-139 (1990)

Haubruck, H.; McCormick, F. Ras p21: effects and regulation
Biochimica et Biophysica Acta **1072** 215-229 (1991)

Jackson, J.H.; Cochrane, C.G.; Bourne, J.R.; Solski, P.A.; Buss, J.E.; Der, C.J. Farnesol modification of kirsten-ras exon 4 B protein is essential for transformation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** 3042-3046 (1990)

- James, G.L.; Brown, M.S.; Cobb, M.H.; Goldstein, J.L.
Benzodiazepine peptidomimetic BZA-5B interrupts the MAP-Kinase activation pathway in H-Ras-transformed Rat-1 cells, but not in untrans-formed cells
J. Biol. Chem. **269** 27705-27714 (1994)
- Joneson, T.; Bar-Sagi, D.
Ras effectors and their role in mitogenesis and oncogenesis
J. Mol. Med. **75** 587-593 (1997)
- Kanda, N.; Schreck, R.; Alt, F.; Bruns, G.; Baltimore, D.; Latt, S.
Isolation of amplified DNA sequences from IMR32 human neuroblas-toma cells: facilitation by fluorescence activated flow sorting of meta-phase chromosomes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** 4069-4073 (1983)
- Kaplan, D.R.; Hempstead, B.L.; Martin-Zanca, D.; Chao, M.V.; Parada, L.F.
The trk proto-oncogene product: a signal transduction receptor for nerve-growth-factor
Science **252** 554-558 (1991)
- Katzenstein, H.M.; Cohn, S. L.
Advances in the diagnosis of treatment of neuroblastoma
Curr. Opin. Oncol. **1** 43-51 (1998)
- Keim, D.R.; Hailat, N.; Kuick, R.; Reynolds, C.P.; Brodeur, G.M.; Seeger, R.C.; Hanash, S.H.
PCNA levels in neuroblastoma are increased in tumors with an amplified N-myc gene and in metastatic stage tumors
Clin. Exp. Metastasis **11** 83-90 (1993)
- Kiess, W.; Koepf, G.; Christiansen, H.; Blum, W.F.
Human neuroblastoma cells use either insulin-like growth factor-I or insulin-like growth factor-II in an autocrine pathway via the IGF-I receptor. Variability of IGF, IGF binding protein (IGFBP) and IGF receptor-gene-expression and IGF and IGFBP secretion in human neuroblastoma cells in relation to cellular proliferation
Regulatory-peptides **72** 19-29 (1997)
- Klein, R.; Nanduri, V.; Jing, S.Q., Lamballe, F.; Tapley, P.; Bryant, S.; Cordon-Cardo, C.; Jones, K.R., Reichard, L.F.; Barbacid, M.
The trkB tyrosin protein kinase is a receptor for brain-derived neurotro-phic factor and neurotrophin-3
Cell **66** 395-403 (1991)
- Kogner, P.; Barbany, G.; Dominici, C.; Castello, M.A.; Raschelle, G.; Persson, H.
Coexpression of messenger RNA for trk-protocogene and low affinity nerve-growth-factor-receptor in neuroblastoma with favorable prognosis
Cancer Research **53** 2044-2050 (1993)

Kohl, N.E.; Kanda, N.; Schreck, R.R.; Bruns, G.; Latt, S.A.; Gilbert, F.; Alt, F. W.

Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas

Cell **35** 359-367 (1983)

Kohl, N.E.; Wilson, F.R.; Mosser, S.D.; Giuliani, E.; deSolms, S.J.; Conner, M.W.; Anthony, N.J.; Holz, W.J.; Gomez, R.P.; Lee T.J.

Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** 9141-9145 (1994)

Krett, N.L.; Heaton, J.H.; Gelehrter, T.D.

Mediation of insulin-like-growth factor actions by the insulin receptor in H-35 rat-hepatoma cells

Endocrinology **120** 401-410 (1987)

Lamballe, F.; Klein, R.; Barbacid, M.

trk-C, a new member of the family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3

Cell **66** 967-979 (1991)

Leevers, S.J.; Paterson, H.F.; Marshall, C.J.

Requirement for ras in raf activation is overcome by targeting raf to the plasma membrane

Nature **369** 411-414 (1994)

Lerner, E.C.; Qian, Y.; Blaskovich, M.A.; Fossum, R.D.; Vogt, A.; Sun, J.; Cox, A.D.; Der, C.J.; Hamilton, A.D.; Sebt, S.M.

Ras-CAAX-peptidomimetic "FTI277" selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes

J. Biol. Chem, **270** 26802-26806 (1995)

LeRoith D.

Insulin-like-growth-factor-receptors and binding proteins

Bailliere's Clinical-Endocrinology and Metabolism **10** 49-73 (1996)

Look, A.T.; Hayes, F.T.; Nitschke, R.; Mc. Williams, N.W.; Green, A.A.

Cellular DNA-content as a predictor of chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma

N. Engl. J. Med. **311** 231-235 (1984)

Macaulay, W.M.

Insulin-like-growth-factors and cancer

Br. J. Cancer **65** 311-320 (1992)

Manne, V.; Yan, N.; Carboni, J.M.; Tuomari, A.V.; Ricca, C.S.; Brown, J.G.; Andahazy, M.L.; Schmidt, R.J.; Patel, D.; Zahler, R.
Bisubstrate inhibitors of farnesyltransferase: a novel class of specific inhibitors of ras transformed cells
Oncogene **10** 1763-1769 (1995)

Marais, R.; Wynne, J.; Treisman, R.
The SRF accessory protein ELK-1 contains a growth-factor-regulated transcriptional activation domain
Cell **73** 381-393 (1993)

Marshall, C.J.
MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase
Curr. Opin. Genet. Dev. **4** 82-89 (1994)

Martin, G.A.; Viskochil, D.; Bollag, G.; McCabe, P.C.; Crossier, W.J.; Haubruck, H.; Conroy, L.; Clark, R.; O'Connell, P.; Cawthon, R.M.
The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21
Cell **63** 843-849 (1990)

Martin, D. M. and Feldmann, E. L.
Regulation of insulin-like-growth-factor expression and its role in auto-crine growth of human neuroblastoma cells
Journal of cellular-physiology **155** 290-300 (1993)

Mattson, M.E.; Hammerling, U.; Mohall, E.; Hall, K.; Pahlman, S.
Mitogenically uncoupled insulin and IGF-I receptors of differentiated human neuroblastoma cells are functional and mediate ligand induced signals
Growth factors **2** 251-265 (1990)

Medema, R.H.; Bos, J.L.
The role of p21 ras in receptor tyrosine kinase signaling
Crit. Rev. Oncog. **4** 615-661 (1993)

Meghani, M. A.; Martin, D.; Singleton, R.; Feldman, E. L.
Effects of serum and insulin-like growth-factors on human neuroblastoma cell growth
Regulatory-peptides **48** 217-224 (1993)

Melino, G.; Stephanou, A.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Koight, R.A; Pinazzi, Agre A.; Lightmann, S.I
Modulation of IGF-II-expression during growth and differentiation of human neuroblastoma cells; retinoic acid may induce IGF-II
Neurosci.-Lett. **151** 187-191 (1993)

- Moley, J.F.; Brother, M.B.; Wells, S.A.; Spengler, B.A.; Biedler, J.L.; Brodeur, G.M.
Low frequency of ras gene mutations in neuroblastomas, pheochromocytomas, and medullary thyroid cancers
Cancer-Research **51** 1596-1599 (1991)
- Mulcahy, L.S.; Smith, M.R.; Stacey, D.W.
Requirement for ras protooncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells
Nature **313** 241-243 (1985)
- Nakagawara, A.; Azar, C.G.; Scavarda, N.J.; Brodeur, G.M.
Expression and function of trk-B and BDNF in human neuroblastomas
Molecular and Cellular-Biology **14** 759-767 (1994)
- Nau, M.M.; Brooks, B.J.; Carney, D.N.; Gazdar, A.F.; Battey, J.F.; Sausville, E.A.; Minna, J.D.
Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc-gene
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** 1092-1096 (1986)
- Nisen, P.D.; Waber, M.A.; Rich, S.P.; James, R.; Garvin, J.; Gilbert, F.; Lanzkowsky, P.
N-myc-Oncogene-RNA-Expression in Neuroblastoma
Journal of National Cancer Institute **80** 1633-1636 (1988)
- Petley, T.; Graff, W.; Jiang, H.; Florini, J.
Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses
Horm. Metab. Res. **32** 70-76 (1999)
- Pilarsky, CH.; Flach, R.
Quantitative PCR
In Gassen, H.; Sachse, G.E.; Schulte, G.A.: PCR Grundlagen und Anwendungen der Polymerasekettenreaktion 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 97-105 (1994)
- Qian, Y.; Sebt, S.M.; Hamilton, A.D.
Farnesyltransferase as a target for anticancer drug design
Biopolymers. **43** 25-41 (1997)
- Qui, M.S.; Green, S.H.
NGF and EGF rapidly activate p21 ras in PC12 cells by distinct, convergent pathways involving tyrosine phosphorylation
Neuron **7** 937-946 (1991)

Robbins, D.J.; Cheng, M.; Zhen, E.; Vanderbilt, C.A.; Feig, L.A.; Cobb, M.H.
Evidence for a ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (Erk) cascade.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89** 6924-6928 (1992)

Schwab, M.; Alitalo, K.; Klempnauer, K.H.; Varmus, H.E.; Bishop, J.M.; Gilbert, F.; Brodeur, G.; Goldstein, M.; Trent, J.

Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour

Nature **305** 245-248 (1983)

Schwab, M.; Amler, L.C.

Amplification of cellular oncogenes: A predictor of clinical outcome in human cancer

Genes, Chromosomes and Cancer **1** 181-193 (1990)

Schwab, M.

Molecular cytogenetics of human neuroblastoma

Biochemica et Biophysica Acta **1114** 43-50 (1992)

Schwab, M.

Human neuroblastoma: from basic science to clinical debut of cellular oncogenes

Naturwissenschaften **86** 71-78 (1999)

Schwäble, J.; Wittrock, J.; Schweizer, P.; Girgert, R.

Detection of rare target genes on Northern-Blots with cDNA Probes labeled by reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction with simultaneous digoxigenin incorporation

Analytical-biochemistry **262** 77-79 (1998)

Scott, J.; Cowell, J.; Robertson, M.E.; Priestley, L.M.; Wadey, R.; Hopkins, B.; Pritchard, J.; Bell, G.I.; Rall, L.B.; Graham, C.F.; Knott, T.J.

Insulin-like-growth-factor-II gene expression in Wims-Tumour and embryonic tissues

Nature **317** 260-262 (1985)

Sepp-Lorenzino, L.; Ma, Z.; Rands, E.; Kohl, N.E.; Gibbs, J.B.; Oliff, A.; Rosen, N.

A peptidomimetic inhibitor of farnesylprotein transferase blocks the anchorage-dependent and independent growth of human tumor cell lines

Cancer-Research **55** 5302-5309 (1995)

Seth, A.; Gonzales, F.A.; Gupta, S.; Raden, D.L.; Davis, R.J.

Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein-kinase

J. Biol. Chem. **267** 24796-24804 (1992)

- Singleton, J.R.; Randolph, A.E.; Feldmann, E.L.
Insulin-like-growth-factor-I-receptor prevents apoptosis and enhances neuroblastoma tumorigenesis
Cancer-Research **56** 4522-4529 (1996)
- Spanakis, E.
Problems related to two interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls
Nucleic Acids Research **21** 3809-3819 (1993)
- Stanton, L.W.; Schwab, M.; Bishop, J.M.
Nucleotide sequence of the human N-myc-gene
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** 1772-1776 (1986)
- Strong, D.D.; Merriman, H.M.; Landale, E.C.; Baylink, D.J.; Mohan, S.
The effects of the insulin-like growth-factors and transforming growth factor beta on the Jun protooncogene family in MC3T3-E1 cells
Calcif-Tissue-Int. **55** 311-315 (1994)
- Sullivan, K.; Castle, V.P.; Hanash, S.M.; Feldmann, E.L.
Insulin-like-growth-factor-II in the pathogenesis of human neuroblastoma
American Journal of Pathology **147** 1790-1798 (1995)
- Sugimoto, T.; Tatsumi, E.; Kemshead, J.T.; Helson, L.; Green, A.A.; Minowada, J.
Determination of cell surface membrane antigens common to both human-neuroblastoma and Leukemia-Lymphoma cell lines by a panel of 38 monoclonal antibodies
Natl. Cancer. Inst. **73** 51-57 (1984)
- Sun, J.; Qian, Y.; Hamilton, A.D.; Sebti, S.M.
Both farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors are required for inhibition of oncogenic K-Ras prenylation but each alone is sufficient to suppress human tumor growth in nude mouse xenografts
Oncogene **16** 1467-1473 (1998)
- Suzuki, T.; Bogenmann, E.; Shimada, D.S.; Seeger, C.
Lack of high-affinity growth-factor-receptors in aggressive neuroblastoma
Journal of the National Cancer Institute **85** 377-384 (1993)
- Tricoli, J.V.; Rall, L.B.; Scott, J.; Bell, G.I.; Shows, T.B.
Localization of insulin-like-growth-factor genes to human chromosomes 11 and 12
Nature **310** 784 -786 (1984)
- Tumilowicz, J.J.; Nichols, W.W.; Cholon, J.J.; Greene, A.E.
Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma
Cancer Research **30** 2110-2118 (1970)

Ullrich, A.; Gray, A.; Tam, A.W.; Yang-Feng, T.; Tsubokawa, M.; Collins, C.; Henzel, W.; Le-Bon, T.; Kathuria, S.; Chen, E.
Insulin-like-growth-factor-I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity
EMBO-Journal **5** 2503-2512 (1986)

Ullrich, A., Schlessinger, J.
Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity
Cell **61** 203-213 (1990)

Van Corven, E.J.; Horijk, P.L.; Medema, R.H.; Bos, J.L.; Moolenaar, W.H.
Pertussis toxin-sensitive activation of p21 ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** 1257-1261 (1993)

Vennstrom, B.; Sheiness, D.; Zabielski, J.; Bishop, J.M.
Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29
J.-Virol. **42** 773-779 (1982)

Wada, R.K.; Seeger, R.C.; Brodeur, G.M.; Einhorn, P.A.; Rayner, S.A.; Tomayko, M.M.; Reynolds, C.P.
Human neuroblastoma cell lines that express N-myc without gene amplification
Cancer **72** 3346-3354 (1993)

Waelbroeck, M.; van-Obberghen, E.; de-Meyts, P.
Thermodynamics of the interaction of insulin with its receptor
J. Biol. Chem. **254** 7736-7740 (1979)

Wargalla-Plate, U.; Hero, B.; Berthold, F.
Neuroblastom: Diagnostik und Therapie
Schweizer Rundschau (Medizin und Praxis) **84** 1152-1157 (1995)

Wassberg, E.; Christofferson, R.
Angiostatic treatment of neuroblastoma
European journal of cancer **33** 2020-2023 (1997)

Wenzel, A.; Schwab, M.
The mycN/max protein complex in neuroblastoma
European journal of cancer **31** 516-519 (1995)

White, M.F.; Kahn, R.
The insulin signaling system
Journal of biological-biochemistry **269** 1-4 (1994)

Whyte, D.B.; Kirschmeier, P.; Hockenberry, T.N.; Nunez-Oliva, I.; James, L.;
Cartino, J.J.; Bishop, W.R.; Pai, J.K.

K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein
transferase inhibitors

J. Biol. Chem. **272** 14459-14464 (1997)

Woodrow, M.A.; Rayter, S.; Downward, J.; Cantrell, D.A;

p21 ras function is important for T-cell antigen receptor and protein kinase C
regulation of nuclear factor of activated T cells

J. Immunol. **150** 3853-3861 (1993)

Yamashiro, D.J.; Nakagawara, A.; Ikegaki, N.; Liu, X.; Brodeur, G.M.

Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas

Oncogene **12** 37-41 (1996)

Yancopolous, G.D.; Nisen, P.D.; Tesfaye, A.; Kohl, N.E.; Goldfarb, M.P.; Alt,
F.W.

N-myc can cooperate with ras to transform normal cells in culture

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82** 5455-5459 (1985)

Yee, D.; Favoni, R.E.; Lebovic, G.S.; Lombana, F.; Powell, D.R.; Reynolds,
C.P.; Rosen, N.

Insulin-like-growth-factor-I expression by tumors of neuroectodermal origin with
the t (11;22) chromosomal translocation. A potential autocrine growth-factor

J. Clin. Invest. **86** 1806-1814 (1990)

Yon, M.; Ackerley, C.A.; Mastronardi, F.G.; Groome, N.; Mosarello, M.A.

Identification of a mitogen activated protein kinase site in human myelin basic
protein in situ

J-Neuroimmunol. **65** 55-59 (1996)

Zumkeller, W.; Schwab, M.

Insulin-like growth-factor-system in neuroblastoma tumorigenesis and
apoptosis: Potential diagnostic and therapeutic perspectives

Horm. Metab. Res. **31** 138-141 (1999)

6 Zusammenfassung

Das Neuroblastom, ein Tumor des neuroektodermalen Gewebes, ist mit 8 % der dritthäufigste Tumor im Kindesalter. Die Neuroblastome zeigen oft eine autokrine Stimulation des Wachstums, bei der sie Wachstumsfaktoren selbst produzieren, für die sie Rezeptoren besitzen.

Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkungen der autokrinen Stimulation durch IGF-II beim Neuroblastom näher zu untersuchen. Die Unterbrechung dieser autokrinen Stimulation könnte von therapeutischem Nutzen sein.

Beim Neuroblastom wird in vielen Fällen auch eine Amplifikation des N-myc-Gens beschrieben, die mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium korreliert. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen an zwei Zelllinien mit N-myc-Amplifikation (IMR32 und Kelly) und zwei Zelllinien ohne Amplifikation (SK-N-SH und SK-N-AS) durchgeführt. Zunächst wurde die Expression der IGF-II-mRNA und die IGF-I-Rezeptor-mRNA-Expression mittels eines nicht-radioaktiven Northern-Blots untersucht. Die Expression der IGF-II mRNA erwies sich als unabhängig von der N-myc-Amplifikation, da sowohl in der nicht N-myc-amplifizierten Zelllinie SK-N-AS als auch in der N-myc-amplifizierten Zelllinie Kelly große Mengen aller drei Transkripte der IGF-II-mRNA nachgewiesen werden konnten. Die IGF-I-Rezeptor-mRNA-Expression konnte in den Zelllinien SK-N-SH und IMR32 nachgewiesen werden. Diese Zelllinien exprimieren auch in geringen Konzentrationen IGF-II.

In Zellkulturüberständen von den Neuroblastomzellen wurden mit einer radioaktiven Messung IGF-II Konzentrationen von [4,5-99 ng/Mio. Zellen] IGF-II gemessen.

Die Auswirkungen von IGF-II auf die Zellproliferation von Neuroblastomzellen wurden mit einem Proliferationstest (MTT) untersucht. Die Zellzahl der Neuroblastomzellen nahm bereits in serumreduziertem Medium aufgrund der autokrinen Produktion von IGF-II nach 48 Stunden je nach Zelllinie um 20-70 % zu. Durch Zugabe von [50 ng/ml] IGF-II konnte die Zellproliferation in den Neuroblastomzelllinien deutlich gesteigert werden. Während nach Zugabe von [10

ng/ml] IGF-II kein Unterschied zum Wachstum in serumreduziertem Medium beobachtet wurde, erreichte die Wachstumsstimulation bei [50 ng/ml] ihr Maximum. Bei [100 ng/ml] IGF-II wurde keine weitere Steigerung der Zellproliferation beobachtet.

Der IGF-II-Signaltransduktionsweg verläuft u.a. über die Aktivierung der Ras-Proteine. In vielen Tumoren führen die durch Mutationen oder autokrine Stimulation aktivierten Ras-Proteine zur Tumorgenese.

Ras-Proteine aktivieren Proteinkinasekaskaden, wie z.B. die MAPK (ERK-1 und ERK-2). In dieser Arbeit wurde die Phosphorylierung des "Myelin-basic-protein" (MBP) durch die MAPK nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor IGF-II in den Zelllinien SK-N-SH und IMR32 nachgewiesen. Weiterhin wurde die Modulation der Expression des Transkriptionsfaktors N-myc in Abhängigkeit von IGF-II untersucht. Die N-myc-Expression ließ sich in den Zelllinien SK-N-SH, Kelly und IMR32 nach 30 Minuten Stimulation mit [50 ng/ml] IGF-II hochregulieren.

Nachdem der Ras-abhängige Signaltransduktionsweg von IGF-II in den Neuroblastomzellen nachgewiesen wurde, wurden die Auswirkungen der Inaktivierung der Ras-Proteine auf die autokrine Stimulation des Wachstums der Neuroblastomzellen untersucht.

Die Ras-Proteine sind durch einen Farnesylrest an der Innenseite der Membran verankert und nur in dieser Form biologisch aktiv.

In den letzten Jahren wurden sowohl in der Pharmaindustrie, wie auch in der Medizin und Biologie unterschiedliche Farnesyltransferaseinhibitoren entwickelt, um die Farnesylierung der Ras-Proteine nach Behandlung der Tumorzellen zu verhindern.

In dieser Arbeit wurde mit dem Farnesyltransferaseinhibitor "FTI277", sowohl in Vollmedium als auch in serumfreiem Medium eine starke Reduzierung der Zellproliferation beobachtet. Wurden die Hemmstoff-behandelten Zellen mit IGF-II stimuliert, konnte noch ein leichter Anstieg der Zellproliferation beobachtet werden, der aber wesentlich schwächer ausfiel als in den ungehemmten Zellen. Diese geringfügige Stimulation des Wachstums ist auf die noch in der Membran verbliebene Restaktivität der Ras-Proteine zurückzuführen, da die Ras-Membranverankerung unter den gewählten Bedingungen nur um 50 % reduziert war.

Die inhibitorische Wirkung des Hemmstoff "FTI277"s auf die MAPK-Aktivität nach IGF-II Stimulation lag je nach Zelllinie zwischen 60-90 %.

Die Expression des Transkriptionsfaktors N-myc wurde durch 4-tägige Behandlung mit [10 µM] "FTI277" um 37 % reduziert.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß durch den Farnesyltransferaseinhibitor "FTI277" der Ras-abhängige Signaltransduktionsweg von IGF-II unterbrochen werden kann und diese Hemmung eine deutliche Reduktion des Zellwachstums zur Folge hat. Zum Schluß sei erwähnt, daß ein Netzwerk von Signalwegen das Potential besitzt, Transkriptionsfaktoren zu aktivieren und zur Tumorgenese beizutragen. Die Inaktivierung der Ras-Proteine durch Farnesyltransferaseinhibitoren könnte sich zu einem vielversprechenden neuen Therapieansatz beim Neuroblastom entwickeln.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name	Josefa Wittrock
Anschrift	72072 Tübingen, Ludwigstraße 14
Geburtsdatum	05.01.1965
Geburtsort	Papenburg, Niedersachsen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	römisch-katholisch
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1972-1976	Grundschule in Brual
1976-1981	Realschule in Aschendorf
1981-1983	Berufsausbildung zur medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin (MTA/L)
1985-1988	Mathilde Weber Gymnasium, Tübingen
1988	Abitur

Hochschulausbildung:

1988-1993	Studium der Biologie/Diplom an der Universität Tübingen
1992-1993	Auslandsstudium an der Universität Brisbane/St. Lucia, Australien
1993-1995	Diplomarbeit in der Kinderchirurgie in Tübingen Thema: Untersuchungen zur mRNA Expression der Gene N-myc und c-fos in den Neuroblastomzelllinien IMR 32 und SK-N-SH
1995	Diplomabschluß: Abschlußnote: sehr gut
seit 1996	Doktorandin in der Kinderchirurgie in Tübingen

Berufstätigkeit:

1983-1985	MTA an der Universitätskinderklinik Tübingen, Abteilung Hämatologie (Prof. Dr. D. Niethammer)
1985-1990	Teilzeitkraft als MTA/L an der Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik in Tübingen, Abteilung: Notfalllabor
1990-1991	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Kinderklinik, Abteilung Bakteriologie (Prof. Dr. J. Hoppe)
1993	MTA/L an der Kinderklinik in Tübingen (25 %), Abteilung Zentrallabor (Prof. Dr. G. Bruchelt)
seit 1993	MTA/L in der Kinderchirurgie in Tübingen (Prof. Dr. P. Schweizer)
seit 1993	Dozentin (Mikrobiologie und Impfungen) an der Krankenpflegeschule in Sindelfingen