

# **DIE ROLLE DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS PHOX2B IN DER ENTSTEHUNG DES NEUROBLASTOMS**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich der Biowissenschaften der Johann Wolfgang  
Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von Tobias Reiff (Dipl.-Biol.)

aus Hofheim am Taunus

Frankfurt am Main,

den 15.März 2010

(D30)

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Neurochemie am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main unter Anleitung von Prof. Dr. Hermann Rohrer durchgeführt.

vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. W. Volkmandt

Prof. Dr. H. Rohrer

Datum der Disputation: 26.08.2010

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Rüdiger R, Binder E, Tsarovina K, Schmidt M, **Reiff T**, Stubbusch J, Rohrer H. :

**In vivo role for CREB signaling in the noradrenergic differentiation of sympathetic neurons.**

Mol Cell Neurosci. 2009 Oct;42(2):142-51. Epub 2009 Jun 21.

**Reiff T**, Tsarovina K, Majdazari A, Schmidt M, del Pino I, Rohrer H.

**Neuroblastoma Phox2b variants stimulate proliferation and dedifferentiation of immature sympathetic neurons.**

J Neurosci. 2010 Jan 20;30(3):905-15.

## INHALTSVERZEICHNIS

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1      | EINLEITUNG .....  | 1  |
| 1.1    | DAS NERVENSYSTEM .....  | 1  |
| 1.2    | DAS PERIPHERE NERVENSYSTEM.....                                 | 2  |
| 1.3    | ENTWICKLUNG DES PNS AUS ZELLEN DER NEURALLEISTE.....            | 2  |
| 1.4    | DETERMINIERUNG VON NEURALLEISTENZELLEN DURCH BMPs.....          | 3  |
| 1.5    | TRANSKRIPTIONSFAKTOREN SYMPATHOADRENERGER DIFFERENZIERUNG ..... | 4  |
| 1.6    | NEUROCRISTOPATHIEN.....   | 9  |
| 1.7    | DAS NEUROBLASTOM .....  | 10 |
| 1.8    | PROLIFERATIONSKONTROLLE IN FRÜHEN SYMPATHISCHEN NEURONEN .....  | 12 |
| 1.9    | ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....                                    | 14 |
| 2      | MATERIAL UND METHODEN .....                                     | 16 |
| 2.1    | MATERIAL .....  | 16 |
| 2.1.1  | HERSTELLERNACHWEISE .....                                       | 16 |
| 2.1.2  | MEDIEN UND LÖSUNGEN.....  | 19 |
| 2.1.3  | MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR ZELLKULTUR .....                        | 19 |
| 2.1.4  | MEDIEN FÜR BAKTERIENZELLKULTUR .....                            | 20 |
| 2.1.5  | LÖSUNGEN FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGIE .....                        | 20 |
| 2.1.6  | LÖSUNGEN FÜR DIE IMMUNZYTOCHEMIE .....                          | 21 |
| 2.1.7  | IMMUNOLOGISCHE REAGENZIEN.....                                  | 21 |
| 2.1.8  | DNA-KONSTRUKTE .....  | 23 |
| 2.1.9  | OLIGONUKLEOTIDE .....   | 25 |
| 2.1.10 | ORGANISMEN.....   | 27 |
| 2.2    | METHODEN .....  | 28 |
| 2.2.1  | ARBEITEN MIT ZELLKULTUREN.....                                  | 28 |
| 2.2.2  | IMMUNZYTOCHEMIE .....   | 33 |
| 2.2.3  | ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN .....                                | 35 |
| 2.2.4  | ARBEITEN MIT PROTEINEN .....                                    | 44 |
| 2.2.5  | REPORTERGENASSAYS.....  | 47 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 3     | ERGEBNISSE.....  | 49  |
| 3.1   | UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON PHOX2B UND NEUROBLASTOMA-PHOX2B-MUTATIONEN IN DER DIFFERENZIERUNG UND PROLIFERATION SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN..... | 49  |
| 3.1.1 | HERSTELLUNG VON PHOX2B-MUTATIONEN DURCH MUTAGENESE .....   | 49  |
| 3.1.2 | EXPRESSIONSNACHWEIS DER PHOX2B MUTATIONEN IN FIBROBLASTEN.....   | 51  |
| 3.1.3 | EXPRESSIONSNACHWEIS DER PHOX2B MUTANTEN IN SYMPATHISCHEN NEURONEN.....   | 52  |
| 3.1.4 | SYMPATHOADRENERGE VORLÄUFERZELLKULTUREN ALS MODELLSYSTEM FÜR PROLIFERATIONSKONTROLLE .....   | 54  |
| 3.1.5 | UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON PHOX2B UND NEUROBLASTOMA PHOX2B-MUTATIONEN IN DER PROLIFERATION SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN.....                     | 56  |
| 3.1.6 | FUNKTIONSNACHWEIS DER siRNA GEGEN PHOX2B.....  | 60  |
| 3.1.7 | PHOX2B-MUTANTEN STIMULIEREN DIE PROLIFERATION SYMPATHISCHER NEURONE .....  | 61  |
| 3.1.8 | PROLIFERATIONSKONTROLLE IN SYMPATHISCHEN VORLÄUFERZELLEN.....  | 64  |
| 3.1.9 | DIE ROLLE VON HAND2 IN DER PROLIFERATION SYMPATHISCHER VORLÄUFERZELLEN.....  | 67  |
| 3.2   | UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON PHOX2B UND NEUROBLASTOMA-PHOX2B-MUTATIONEN IN DER DIFFERENZIERUNG SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN.....                   | 74  |
| 4     | DISKUSSION.....  | 79  |
| 4.1   | PRIMÄRKULTUREN SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN ALS MODELLSYSTEM FÜR PROLIFERATIONSUNTERSUCHUNGEN .....  | 80  |
| 4.2   | EFFEKTE VON WILDTYP-PHOX2B UND NB-PHOX2B-MUTATIONEN AUF DIE PROLIFERATION SYMPATHISCHER VORLÄUFERZELLEN.....   | 81  |
| 4.3   | STRUKTURELLE KONSEQUENZEN DER NEUROBLASTOMA-PHOX2B-MUTATIONEN... 85  |     |
| 4.4   | DIE ROLLE VON PHOX2B UND NB-PHOX2B-MUTANTEN IN DER PROLIFERATIONSKONTROLLE SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN.....                                       | 87  |
| 4.5   | DIE ROLLE VON HAND2 IM NB UND IN DER PROLIFERATIONSKONTROLLE SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN.....   | 92  |
| 4.6   | DER EINFLUSS VON PHOX2B <sup>WT</sup> UND NB-PHOX2B-VARIANTEN AUF DIE DIFFERENZIERUNG SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN.....                            | 95  |
| 4.7   | NEUROBLASTOMA-PRÄDISPOSITION DURCH MUTATIONEN IN PHOX2B.....   | 97  |
| 4.8   | AUSBLICK .....   | 99  |
| 5     | ZUSAMMENFASSUNG .....  | 102 |
| 6     | LITERATURANGABEN .....   | 107 |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DAS NERVENSYSTEM

Einfache Nervensysteme finden sich bei allen Metazoen (mit Ausnahme der *Parazoa*). Als ein einfaches Netz aus Mechanorezeptoren zur Reaktion auf Umweltreize bei den *Cnidaria* ausgebildet, übernimmt das Nervensystem mit zunehmender Komplexität der Organismen auch vielfältigere Aufgaben. Hochkomplexe Verschaltungen von spezialisierten Neuronen ermöglichen die Zusammenarbeit einzelner Organe, Rezeptoren und Effektoren, sowie die Entwicklung von Gedächtnis und Bewusstsein.

Das Nervensystem der *Cephalopoda* und *Vertebrata* lässt sich in das zentrale Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn und Rückenmark, und das periphere Nervensystem, bestehend aus Ganglien und peripheren Nerven, gliedern (siehe Abb. 1.1). Trotz der anatomischen Trennung beeinflussen sich beide Systeme in ihren Funktionen.

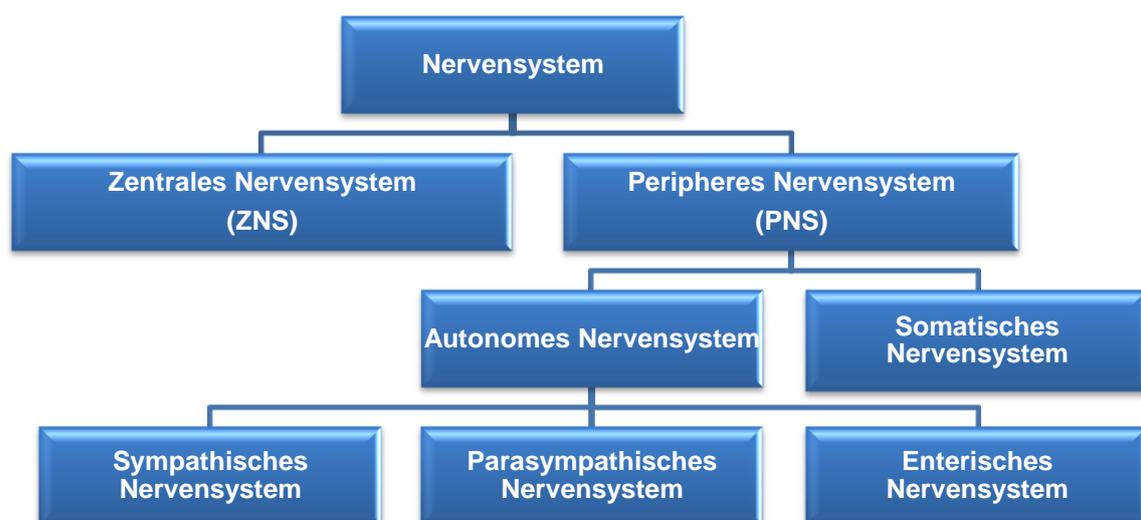


ABB. 1.1 ORGANISATION DES NERVENSYSTEMS BEI VERTEBRATEN.

### 1.2 DAS PERIPHERE NERVENSYSTEM

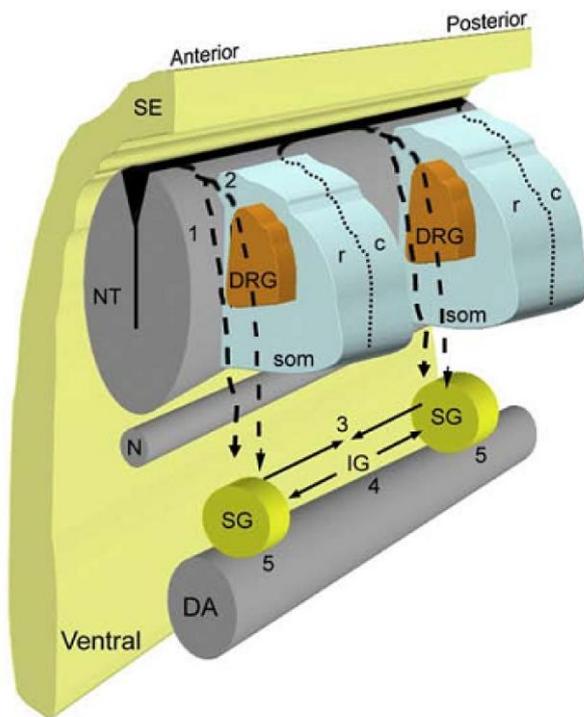
Das periphere Nervensystem (PNS) wird unterteilt in einen somatischen und einen autonomen Teil (siehe Abb. 1.1). Der somatische Teil bildet die Brücke zwischen den Rezeptoren für Reize der Außenwelt und dem ZNS. Es innerviert Haut, Gelenke und Skelettmuskulatur. Das autonome Nervensystem lässt sich weiter in drei räumlich getrennte Systeme unterteilen (siehe Abb. 1.1). Das sympathische (Sympathikus) und das parasympathische Nervensystem (Parasympathikus) wirken antagonistisch. In Stresssituationen steuert der Sympathikus Kampf und Fluchtverhalten, während der Parasympathikus in Phasen der Ruhe und Verdauung aktiv ist. Das enterische Nervensystem ist ein komplexes Netzwerk aus Neuronen, das den gesamten Gastrointestinaltrakt durchzieht und Verdauungsprozesse steuert.

Das vergleichsweise einfach aufgebaute periphere Nervensystem bietet sich an, die Signale und Faktoren, die zur Entstehung der unterschiedlichen Neuronentypen notwendig sind, zu untersuchen.

### 1.3 ENTWICKLUNG DES PNS AUS ZELLEN DER NEURALLEISTE

Sowohl das zentrale als auch das periphere Nervensystem entstehen in der frühen Embryonalentwicklung aus Zellen des Ektoderms. Bereits während der Neurulation bildet sich die Neuralleiste im Grenzbereich zwischen Ektoderm und Neuroektoderm. Die Zellen der Neuralleiste wandern zu beiden Seiten des Neuralrohrs in zwei Hauptrichtungen aus. Früh delaminierende Neuralleistenzellen migrieren in ventraler Richtung (Abb. 1.2, (1)). Ein Teil dieser Zellen aggregiert im rostralen Bereich der Somiten lateral des Neuralrohrs, um die Hinterwurzelganglien (dorsal root ganglion, DRG) zu bilden (Abb. 1.2, (2), Le Dourain und Kalcheim, 1999). Die segmentale Anordnung der DRGs entsteht durch selektive Migration durch den rostralen Teil des Somiten (Gilbert, 2003). Eine weitere Subpopulation der früh delaminierenden Neuralleistenzellen wandert weiter in ventraler Richtung zur dorsalen Aorta (Abb. 1.2, (4)). Eine Wanderungsbewegung entlang der anterior-posterior

Achse der dorsalen Aorta führt schließlich dazu, dass die Neuralleistenzellen aus der interganglionären Zone (Abb. 1.2, (3)) die metamere Struktur der paravertebralen sympathischen Grenzstränge ausbilden (Abb. 1.2, (5), Kulesa et al., 2009)).



**ABB. 1.2 Wanderung der Neuralleistenzellen** Die Migration verläuft in zwei Hauptrichtungen. Früh delaminierende Neuralleistenzellen wandern entlang der Somiten und bilden die sensorischen Hinterwurzelganglien (2) und primären sympathischen Ganglien entlang der dorsalen Aorta (4). Durch Wanderung in der anterior-posterior Achse (3) bilden die Neuralleistenzellen schließlich die segmentartige Form der paravertebralen sympathischen Grenzstränge. (5, modifiziert nach Kulesa et al. 2009, SE – Oberflächen Ektoderm, NT – Neuralrohr, DRG – Hinterwurzelganglion, som – Somit, r – rostral, c – caudal, N – Notochord, IG – Interganglion, SG – sympathische Ganglien, DA – dorsale Aorta).

Eine dritte Subpopulation der früh delaminierenden Neuralleistenzellen migriert weiter in ventraler Richtung und bildet die prävertebralen Ganglien und die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks.

Später delaminierende Neuralleistenzellen migrieren in dorso-lateraler Richtung zwischen Ektoderm und Somiten und bilden die Melanozyten.

#### 1.4 DETERMINIERUNG VON NEURALLEISTENZELLEN DURCH BMPs

Die Endothel- und glatten Muskelzellen der dorsalen Aorta sezernieren Morphogene (bone morphogenic protein, BMP), die die wandernden

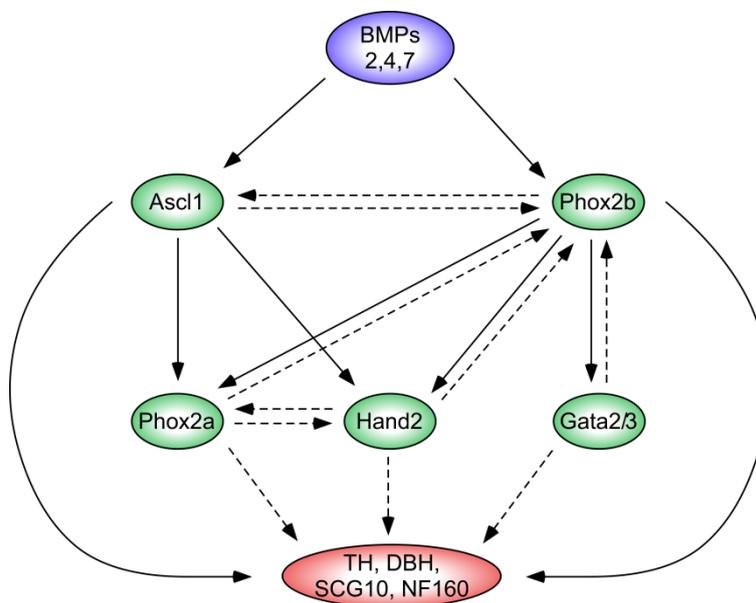
Neuralleistenzellen zu Vorläuferzellen sympathischer Neurone determinieren (Reissmann et al., 1996; Shah et al., 1996; Varley und Maxwell, 1996). Diese Morphogene gehören zur Superfamilie der TGF- $\beta$  Wachstumsfaktoren, deren Funktion ursprünglich in der Entstehung von Knochen aus mesenchymalem Gewebe beschrieben wurde (Urist, 1965). In den sympathischen Vorläuferzellen induzieren die BMPs 2, 4 und 7 über Serin-/Threonin-Kinase Rezeptoren intrazellulär ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren, das die Differenzierung zu sympathischen Neuronen einleitet. Allgemein anerkannte terminale Differenzierungsmarker sympathischer Neurone sind zwei wichtige Enzyme des Noradrenalin-syntheseweges. Die Dopamin-beta-hydroxylase (DBH) katalysiert die Reaktion von Dopamin zu Noradrenalin und die Tyrosin-Hydroxylase (TH) die Reaktion der Aminosäure Tyrosin zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). Überexpression von BMP4 *in vivo* führt zu vergrößerten sympathischen Ganglien und ektopischen TH-exprimierenden Zellen im Brachialnerv, in dem sonst keine sympathische Neurogenese stattfindet. Weiterhin konnte mRNA der BMPs 4 und 7 in den Endothel- und glatten Muskelzellen der dorsalen Aorta nachgewiesen werden. Blockiert man hingegen die Wirkung der BMPs 2, 4 und 7 *in vivo* mit dem spezifischen BMP-Antagonisten Noggin, sind sowohl panneuronale Marker wie SCG10 und NF160, als auch DBH und TH stark reduziert bzw. nicht mehr nachweisbar (Reissmann et al., 1996). In der Embryogenese induzieren die BMPs Transkriptionsfaktoren wie *Ascl1*, *Phox2b*, *Phox2a* und *Gata2/3*. Diese konnten in Noggin-behandelten Embryonen nicht nachgewiesen werden (Guillemot et al., 1993; Pattyn et al., 1999; Stanke et al., 1999; Morin et al., 1997; Tsarovina et al., 2004).

Im folgenden Abschnitt soll die Funktion dieser BMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren näher beschrieben werden.

### 1.5 TRANSKRIPTIONSFAKTOREN SYMPATHOADRENERGER DIFFERENZIERUNG

Der BMP-Signalweg induziert in den sympathoadrenergen Vorläufern ein regulatorisches Netzwerk von Transkriptionsfaktoren. Bisher konnte für *Ascl1*,

Phox2b, Phox2a, Hand2 und Gata2/3 eine Rolle in der Entwicklung nachgewiesen werden (Guillemot et al., 1993; Pattyn et al., 1999; Stanke et al., 1999; Morin et al., 1997; Tsarovina et al., 2004). Diese komplexen Interaktionen wurden sowohl *in vitro* also auch *in vivo* in transgenen Tieren nachgewiesen.



**ABB. 1.3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER NORADRENERGEN DIFFERENZIERUNG** Die BMPs induzieren die Expression einer Signalkaskade von Transkriptionsfaktoren (Ascl1, Phox2b, Phox2a, Hand2 und Gata2/3). Diese Transkriptionsfaktoren steuern die Differenzierung sympathischer Vorläuferzellen. Am Ende des regulatorischen Netzwerks steht die Expression der terminalen Differenzierungsgene (TH, DBH, SCG10, NF160). Die Transkriptionsfaktoren können sich untereinander regulieren. Durchgezogene Pfeile symbolisieren Regulation aus Überexpressions- oder Funktionsblockierungsexperimenten, gestrichelte Pfeile Regulation aus Überexpression oder Funktion in der Erhaltung der Expression (modifiziert nach Goridis und Rohrer, 2002)

### ASCL1 (ACHAETE SCUTE LIKE 1)

Ascl1 ist ein Helix-Schleife-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktor, der ursprünglich in *Drosophila* als proneurales Gen Achaete-Scute identifiziert wurde (Ascl1 von Achaete-Scute-Like 1, Ghysen und Dambly-Chaudière, 1988; Alonso und Cabrera, 1988; Martin-Bermudo et al., 1991; Skeath und Carroll, 1992). Ascl1 ist sowohl im Huhn als auch in der Maus bereits sehr früh in den sympathischen Vorläuferzellen exprimiert wird (Lo et al., 1991; Guillemot et al. 1993). Die Expression von Ascl1 im Huhn beginnt bei Hamburger-Hamilton-Stadium 15 (HH, Hamburger und Hamilton, 1949), verläuft transient und endet am Embryonaltag fünf (E5, Jasoni et al., 1994; Ernsberger et al. 1995). Ascl1-

defiziente transgene Mäuse bilden zwar Zellaggregate an der Stelle der sympathischen Ganglien, eine Differenzierung dieser Zellen findet jedoch nicht statt. Es werden weder panneuronale noch noradrenerge Markergene exprimiert und die undifferenzierten Zellen werden apoptotisch (Guillemot et al., 1993). Überexpression von *Ascl1* *in vivo* führt zu ektopischen, peripheren Neuronen im Brachialnerv (Stanke et al., 2004).

### GATA2/3

Die Familie der Gata-Transkriptionsfaktoren umfasst insgesamt sechs Mitglieder, von denen Gata2 und Gata3 im peripheren Nervensystem der Maus exprimiert sind. Im Huhn ist Gata2, jedoch nicht Gata3, ab HH-Stadium 18 nachweisbar und ist ebenfalls von der Induktion durch BMPs abhängig (Groves et al., 1995, Tsarovina et al., 2004). Überexpression von Gata2 im Brachialnerv des Huhnes zieht die ektopische Expression des panneuronalen Markers SCG10 nach sich, jedoch nur eine geringe Induktion der noradrenergen Genexpression. Die Funktionsblockierung von Gata2 über ein dominant-negatives Konstrukt führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu verminderter TH-Expression, die panneuronale Genexpression ist *in vitro* nicht betroffen (Tsarovina et al., 2004, Tsarovina et al., eingereicht). Nach Überexpression von *Phox2b* entstehen im Brachialnerv ektopische noradrenerge Neurone, die ebenfalls Gata2 positiv sind. Da Gata2 nur im geringen Umfang noradrenerge Eigenschaften induzieren kann und chronologisch nach *Phox2b* exprimiert wird, spricht dieses Resultat für eine Rolle von Gata2 unterhalb von *Phox2b* im kreuzregulatorischen Netzwerk (Tsarovina et al., 2004). In Gata3-defizienten Mäusen ist die Größe der sympathischen Ganglien (E13,5) und selektiv die TH-Expression (E11,5) stark reduziert. Neuere Studien in konditionell defizienten Mäusen, in denen Gata3 in bereits differenzierten adulten sympathischen Neuronen eliminiert wird, zeigen eine Rolle von Gata3 im Überleben dieser Neurone. Die Größe des SG ist bei allen untersuchten Markern stark reduziert und eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen befindet sich im Bereich des SG (Tsarovina et al., 2004, Tsarovina et al., eingereicht). Zusammengefasst könnte Gata2/3, abhängig von zellulären Interaktionspartnern, als Ko-Regulator der

Transkription sowohl noradrenerger als auch panneuronaler Gene fungieren oder ebenfalls kontextabhängig wichtig für das Überleben sympathoadrenerger Neurone sein. Als Interaktionspartner kommen Phox2b, Phox2a, Hand2 oder auch noch völlig unbekannte Faktoren in Frage.

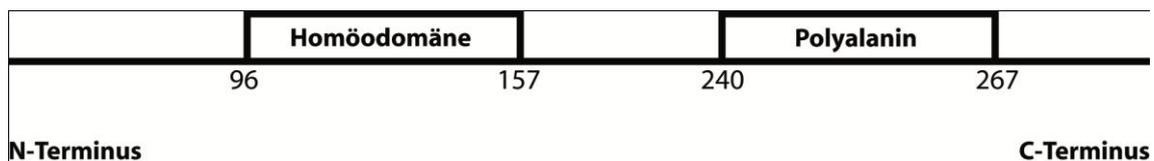
### *HAND2*

Hand2 (auch dHand; deciduum, hearth, autonomic nervous system, neural crest derived) ist ein Transkriptionsfaktor mit Helix-Schleife-Helix-Motiv und wird in den SG des Huhnes chronologisch nach Ascl1 und Phox2b und vor DBH und TH exprimiert (Howard et al., 1999, 2000). Die Expression von Hand2 ist BMP-abhängig. In Ascl1- und Phox2b-defizienten Mäusen finden sich keine Hand2 exprimierenden Zellen (Howard et al., 2000; Pattyn et al., 1999). Hand2 ist damit im Netzwerk der BMP-induzierten Transkriptionsfaktoren unterhalb von Ascl1 und Phox2b einzuordnen. Im Gegensatz zu Gata2 ist Hand2 durch Überexpression im Brachialnerv des Huhnes in der Lage noradrenerge ektopische Neurone zu induzieren (Howard et al., 2000). Frühe Experimente an Hand2-defizienten Mäusen scheiterten am lethalen Herzphänotyp dieser Tiere, der an E9,5, also vor der Differenzierung sympathischer Neurone, zum Tod führt (Srivastava et al., 1999). Eine kürzliche Untersuchung in Mäusen, in denen Hand2 konditionell in Neuralleistenabkömmlingen eliminiert wird, zeigte, dass fehlende Hand2-Expression zu einer verringerten Anzahl Gata3- und Phox2a-positiver Zellen führt. Ebenfalls ist die Expression von DBH, TH und Hu, einem panneuronalen Marker, betroffen. Ascl1 und Phox2b werden durch die Eliminierung von Hand2 nicht beeinflusst, ebenso ist das Überleben der Neurone im SG nicht betroffen. Ein weiterer wichtiger Befund dieser Studie zeigt, dass die Anzahl der proliferierenden Neurone im SG durch das Fehlen von Hand2 stark reduziert wird, jedoch keine Apoptose festgestellt werden kann (Hendershot et al., 2008). Hand2 interagiert zudem direkt mit Phox2a und aktiviert synergistisch mit Phox2a den DBH-Promotor (Rychlik et al., 2003; Xu et al., 2003). Die Funktion von Hand2 auf die noradrenerge Differenzierung und die Proliferation ist auch in differenzierten Neuronen nachzuweisen (Schmidt et al., 2009).

Hand2 ist somit im Netzwerk der BMP-induzierten Transkriptionsfaktoren unterhalb von Ascl1 und Phox2b einzuordnen, jedoch mit direkter Wirkung auf die noradrenergen Markergene und einem bislang nicht weiter charakterisierten Einfluss auf den Zellzyklus früher sympathischer Neurone.

### *PHOX2A UND PHOX2B*

Phox2a und Phox2b sind Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren (paired like homeobox transcription factor 2 a und b; auch Arix für Phox2a / NBPhox für Phox2b), die bereits sehr früh, ab HH-Stadium 18, in den SG exprimiert werden (Ernsberger et al., 2000). Die DNA-bindende Homöodomäne ist bei Phox2a und Phox2b identisch und in verschiedenen Spezies hochkonserviert (Pattyn et al., 1997).



**ABB. 1.4 DOMÄNENSTRUKTUR DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS PHOX2B** Das Phox2b-Gen kodiert für ein 314 Aminosäuren langes Protein mit zwei Domänen. Die DNA-Bindung erfolgt über die Homöodomäne. Sowohl die Homöodomäne als auch der N-Terminus sind zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert. Mutationen, die zu einer Verlängerung des Polyalaninbereiches führen, prädisponieren zum kongenitalen Hypoventilationssyndrom.

Untersuchungen Ascl1-defizienter Mäuse haben ergeben, dass Phox2a nicht exprimiert, die Expression von Phox2b jedoch nicht betroffen ist. Phox2b wird somit Ascl1-unabhängig exprimiert, während die Effekte von Ascl1 durch Phox2a vermittelt werden (Hirsch et al. 1998; Pattyn et al., 1999). Überexpression beider Phox2-Proteine induziert die Expression noradrenerger Marker im Brachialnerv (Stanke et al., 1999, 2004). Phox2a-defiziente Mäuse zeigen keinen Phänotyp in der sympathischen Differenzierung, da Phox2b die Rolle von Phox2a kompensiert. In einem eleganten Experimentansatz, in dem Phox2a in den Phox2b Genlokus eingebracht wurde, konnte gezeigt werden, dass Phox2b nicht durch Phox2a substituiert werden kann (Morin et al., 1997; Coppola et al., 2005). Phox2b-defiziente Mäuse zeigen eine gänzliche Degeneration des gesamten autonomen Nervensystems, repräsentiert durch das Fehlen subtypspezifischer und panneuronaler Marker (Pattyn et al., 1999).

Die Überexpression von Phox2a im Huhn induziert ektopische Phox2b-exprimierende Zellen (Stanke et al., 1999). Phox2a kann somit Phox2b-Expression induzieren, obwohl es von Ascl1 und Phox2b abhängig und damit unterhalb von Ascl1 und Phox2b in der Signalkaskade einzuordnen ist. *In vitro* können Phox2a und Phox2b an den DBH-Promotor binden und dessen Expression regulieren (Swanson et al., 1997; Kim et al., 1998; Yang et al., 1998; Zellmer et al., 1995; Yokoyama et al., 1999; Adachi et al., 2000). Wird Phox2a oder Phox2b über ein dominant-negatives Konstrukt in Primärkulturen von Neuralleistenzellen bzw. postmitotischen sympathischen Neuronen blockiert, ist die Expression der TH stark reduziert (Lo et al., 1999; Rüdiger et al., 2009).

Phox2b nimmt also im Netzwerk der BMP-induzierten Transkriptionsfaktoren eine Schlüsselrolle ein. Die Bedeutsamkeit von Phox2b für die Entwicklung des autonomen Nervensystems zeigt sich in humanen Krankheitsbildern. Veränderungen im Phox2b-Gen, wie beispielsweise Punktmutationen, Leserasterverschiebungen, Duplikationen oder kompletter Funktionsverlust führen zu Neurocristopathien.

### 1.6 NEUROCRISTOPATHIEN

Unter Neurocristopathien werden sämtliche Krankheitsbilder zusammengefasst, die auf der fehlerhaften Migration, Reifung und Differenzierung von Neuralleistenzellen beruhen. Sie können isoliert, häufig auch kombiniert auftreten (Bolande et al., 1973). Dazu gehören eine Reihe von Tumorerkrankungen wie Phäochromozytoma, Karzinome im medullärem Teil der Schilddrüse, neuroendokrine Tumore sowie Neuroblastome (NB). Weitere nicht Tumor-assoziierte Neurocristopathien sind beispielsweise kongenitale Hypoventilation (CCHS, congenital central hypoventilation syndrome) und Morbus Hirschsprung (HSCR, Hirschsprung Cristopathy). Mutationen im Phox2b-Gen prädisponieren sowohl zur Entwicklung eines NB als auch zu CCHS und HSCR (Mosse et al., 2004; Amiel et al., 2003; Garcia-Barcelo et al., 2003). In genetischen Screening-Verfahren wurden überwiegend Phox2b-

Mutationen, die zu einer Verlängerung des Polyalanin-Bereichs des Proteins führen, als hauptursächlich für die Erkrankung an CCHS identifiziert (Trochet et al., 2005). CCHS-Patienten leiden unter einer Insuffizienz der autonomen Kontrolle der Atmung und müssen im Schlaf künstlich beatmet werden. Untersuchungen an einem CCHS-Mausmodell zeigten kürzlich, dass Phox2b-exprimierende glutamaterge Neurone des retrotrapezoiden Nukleus komplett fehlen und somit keine Antwort auf steigende CO<sub>2</sub>-Konzentrationen im Blut (Hyperkapnie) stattfindet (Dubreuil et al., 2008). Ursprünglich wurde Phox2b-Haploinsuffizienz als Ursache von CCHS diskutiert. Der Hypoventilationsphänotyp heterozygoter Phox2b-defizienter Mäuse ist dagegen sehr mild, was gegen einen einfachen Funktionsverlust spricht (Dauger et al., 2003). Wahrscheinlicher ist ein dominant-negativer Effekt der Polyalanin Phox2b-Mutationen, der durch Aggregation von sowohl mutiertem- als auch von Wildtyp-Phox2b im Cytoplasma verursacht wird (Trochet et al., 2005). In weiteren Screening Analysen wurde gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit an einem Neuroblastom zu erkranken bei CCHS-Patienten mit Phox2b-Mutationen außerhalb des Polyalanin-Bereichs mit 50% sehr viel höher ist als bei Verlängerungen des Polyalanin-Bereichs (Berry-Kravis et al., 2006).

### 1.7 DAS NEUROBLASTOM

Rudolf Virchow beschrieb 1864 erstmalig einen abdominalen Tumor, bezeichnete ihn aber fälschlicherweise als Gliom. Die ersten Charakteristika des NB, als Tumor des sympathischen Nervensystems und der Nebenniere, wurden 1891 vom Pathologen Felix Marchand beschrieben (Beckwith und Perrin, 1963). Das NB ist der häufigste extracraniale, solide Tumor in der Kindheit und kann an allen Stellen des sympathischen Nervensystems auftreten. 65% der NB treten im Abdomen auf, häufig im Nebennierenmark oder entlang der paravertebralen sympathischen Grenzsträngen. Seltener finden sich NB im Nacken- (5%), Brustkorb- (20%) und Beckenbereich (5%) (Janoueix-Lerosey et al., 2010). Das Bemerkenswerteste am NB ist seine Heterogenität. Das klinische Spektrum des NB reicht von spontaner Regression über Differenzierung zu Ganglioneuroma bis hin zu unbehandelbarem tödlichen

Ausgang (Hoene et al., 2009). Die Einteilung des NB erfolgt nach dem INSS (International Neuroblastoma Staging System) in 4 Stufen. Sie geben unter anderem Auskunft über den MYCN-Amplifikationsstatus (MYCN), mögliche Metastasierung und ob eine Biopsie des malignen Gewebes möglich ist. Eine Amplifikation des auf Chromosom 2p24.1 gelegenen MYCN-Protoonkogens ist in ca. 20% aller NB-Patienten zu finden. MYCN-Amplifikation ist assoziiert mit fortgeschrittenem Tumorstadium, einer schnellen Tumorprogression und einer schlechten Prognose (Hoene et al., 2009; Bagatell et al., 2009).

Bereits im Jahr 2003 wurde Phox2b als das erste zu NB prädispositionierende Gen identifiziert. Mutationen des Phox2b-Gens finden sich in rund 2% der Patienten mit familiär vererbtem NB. Die geringe Penetration in familiär vererbtem NB und der Fakt, dass in sporadischem NB bisher nur sehr vereinzelt Phox2b-Mutationen beschrieben wurden, sprechen gegen eine Hauptrolle von Phox2b-Mutationen in der Karzinogenese des NB (Trochet et al., 2003; Mosse et al., 2004; Perri et al., 2005; Fischer et al., 2009). Grundsätzlich korreliert ausgeprägte Expression sympathoadrenerger bzw. cholinergischer Marker mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eines milden Krankheitsverlaufs. Aufgrund der Abstammung von autonomen Vorläuferzellen sind weitere Marker wie Phox2a, Hand2, Gata2/3/4, noradrenerge Markerenzyme wie DBH und TH sowie cholinerge Marker wie VACHT und VIP in vielen Fällen im Tumorgewebe exprimiert (Hoene et al., 2009; Voth et al., 2009; Longo et al., 2008; Bourdeaut et al., 2009). Kürzlich konnte mit ALK (anaplastic lymphoma kinase) ein zweites zu NB prädisponierendes Gen beschrieben werden (Janoueix-Lerosey et al., 2008; George et al., 2008; Chen et al., 2008; Bourdeaut et al., 2009). ALK ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase der Insulin Rezeptor-Superfamilie. Homodimerisierung der extrazellulären Domänen nach Ligandenbindung aktiviert die Tyrosinkinase-Aktivität von ALK (Mossé et al., 2009). Pleiotrophin und Midkin kommen als Ligand in Frage und werden noch kontrovers diskutiert (Stoica et al., 2001; Stoica et al., 2002). Erhöhte ALK-Expressionslevel oder Mutationen im ALK-Gen, die zu einer konstitutiven Kinaseaktivität führen, werden sowohl in familiären als auch sporadisch auftretenden NB gefunden. Die Penetration von Alk-Mutationen ist mit rund 40% bei familiärem- und rund 8% bei sporadischem NB sehr viel höher als die von Mutationen in Phox2b (Janoueix-Lerosey et al., 2008, 2010). Als Signalweg kommen sowohl STAT3,

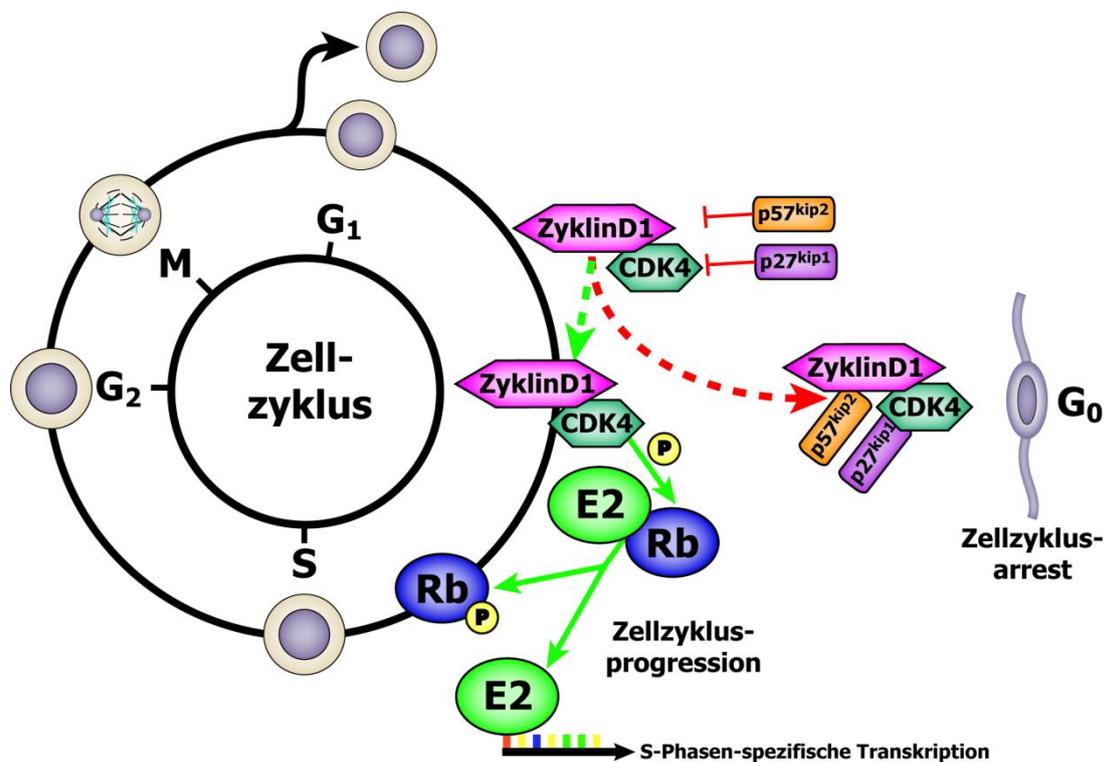
AKT/PI3K oder RAS/ERK in Frage, welche Proliferation, Überleben und Zellzyklus beeinflussen können (Mossé et al., 2009). Pharmakologische Blockade des ALK-Signalwegs führt sowohl in NB-Zelllinien mit erhöhter ALK-Expression als auch mit konstitutiv aktiven ALK-Mutationen zu Proliferationsstopp und Zelltod (Passoni et al., 2009). Untersuchungen der Transkriptionsfaktoren Phox2b, Phox2a, Hand2 und Gata2/3/4 beschränkten sich bisher auf Differenzierungseffekte. Über eine mögliche Rolle in der molekularen Kontrolle der Neurogenese in autonomen Ganglien ist wenig bekannt.

### 1.8 PROLIFERATIONSKONTROLLE IN FRÜHEN SYMPATHISCHEN NEURONEN

Neurogenese beschreibt die Reifung eines Neurons durch asymmetrische Teilung aus dem Stammzellstadium über ein Vorläuferzellstadium. Sowohl im ZNS als auch in parasymphatischen und sensorischen Ganglien teilen sich die Stamm- und Vorläuferzellen. Mit dem Austritt aus dem Zellzyklus beginnt die Expression terminaler Differenzierungsgene. Eine Teilung reifer Neurone findet in diesen Geweben nicht statt. Die Neurone der SG bilden hier eine Ausnahme. *In vitro* konnte hier gezeigt werden, dass reife Neurone <sup>3</sup>H-Thymidin inkorporierten und gleichzeitig mit Q211, einem Antikörper gegen ein Polysialogangliosid auf der Oberfläche differenzierter Neurone gefärbt werden konnten (Rohrer und Thoenen, 1987). *In vitro* und *in vivo* wurden proliferierende, TH-exprimierende Zellen nachgewiesen (Rothman et al., 1978; Tsarovina et al., 2008). Analysen über die Proliferationskontrolle dieser sympathischen Neurone stehen noch aus.

Zwei Klassen von Zellzyklusregulatoren, Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (Cyclin-dependent Kinase, CDK), steuern auf molekularer Ebene die Dauer und Abfolge der Zellzyklusphasen. Abb. 1.5 zeigt exemplarisch die Kontrolle des G<sub>1</sub>-S-Übergangs durch den ZyklinD1-CDK4-Komplex. Dieser Komplex phosphoryliert Rb (Retinoblastoma Protein). Das hyperphosphorylierte Rb dissoziiert aus dem Komplex mit E2, welches in Folge dessen die Transkription S-Phasen-spezifischer Gene initiiert (siehe Abb. 1.5).

Untersuchungen des Zellzyklusaustritts in Geweben des ZNS, wie beispielsweise dem zerebralen Kortex oder der Retina, identifizierten eine Reihe von Zyklin-abhängigen Kinase Inhibitoren (Cyclin-dependent Kinase-Inhibitor, CKI) als wichtige Regulatoren der Neurogenese (Nguyen et al., 2006, Dyer und Cepko, 2001). CKIs führen zum Zellzyklusaustritt ( $G_0$ ) während der  $G_1$ -Phase, indem sie spezifisch an Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen assoziieren und deren Phosphorylierung durch ATP verhindern (Nguyen et al., 2006; Vidal und Koff, 2000). Zwei dieser CKIs,  $p27^{kip1}$  und  $p57^{kip2}$ , sind ebenfalls im sich entwickelnden Rückenmark exprimiert (Gui et al., 2006). Sie verhindern die für den S-Phasen Eintritt notwendige Phosphorylierung von Rb, das für die Transkription S-Phasen spezifischer Gene wie der E2-Faktoren notwendig ist (Macleod, 1999).



**ABB. 1.5 EINFACHE DARSTELLUNG DES EUKARYOTISCHEN ZELLYKLUSESSES.** In der S-Phase findet die DNA-Synthese und Genom Duplikation statt. Mit G<sub>2</sub> beginnt die Mitose (M) und es entstehen bei symmetrischer Teilung zwei Tochterzellen. In der G<sub>1</sub>-Phase entscheidet sich nun, ob die Zelle im Zyklus verbleibt, also eine neue S-Phase beginnt, oder aus dem Zellzyklus austritt und terminal differenziert ( $G_0$ ). (modifiziert nach Dyer und Cepko). Zellzyklusprogression findet durch Phosphorylierung von Rb durch den ZyklinD1/CDK4-Komplex statt. Hyperphosphoryliertes Rb dissoziiert aus dem E2-Komplex, welches wiederum S-Phasen-spezifische Gentranskription aktiviert. Die Bindung der CKIs  $p27^{kip1}$  und  $p57^{kip2}$  an den ZyklinD1/CDK4-Komplex führt zu Zellzyklusarrest (grün: proliferationsstimulierend; rot: antiproliferativ).

In der Retina ist sowohl in  $p27^{kip1}$ - als auch  $p57^{kip2}$ -defizienten Mäusen die Anzahl der Zellzyklen erhöht und somit auch das Verhältnis der einzelnen Subtypen der Ganglionzellen verschoben (Dyer und Cepko, 2000, 2001). Damit

übereinstimmend konnte ein verfrühter Zellzyklusaustritt von Müller-Glia-Zellen bei retroviraler p27<sup>kip1</sup>- bzw. von Amakrinzellen bei p57<sup>kip2</sup>-Überexpression festgestellt werden (Dyer und Cepko, 2000, 2001). Darüber hinaus sind beide CKIs überwiegend in postmitotischen Zellen exprimiert (Nagahama et al., 2001).

Über eine Rolle von p27<sup>kip1</sup> und p57<sup>kip2</sup> in der Kontrolle der Proliferation im PNS ist bisher wenig bekannt. In Wachtel-Neuralleistenzellkulturen sowie in der noradrenergen CAD-Zelllinie konnte demonstriert werden, dass Phox2a zusammen mit zyklischem AMP (cAMP) die Expression von p27<sup>kip1</sup> stimuliert (Paris et al., 2006). Die Überexpression sowohl von Phox2b als auch der Phox2-Homöodomäne alleine führt im Neuralrohr des Huhnes zu einer verminderten Expression der Gene Hes5b und Id2, die im Neuralrohr Marker für unreife, proliferative Neurone sind. Zusätzlich ist die Anzahl BrdU-positiver Zellen verringert, was für vermehrten Zellzyklusaustritt spricht (Dubreuil et al., 2000, 2002). Zudem konnte in einer Neuroblastoma Zelllinie gezeigt werden, dass Phox2b antiproliferativ wirkt (Raabe et al., 2008).

### 1.9 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine mögliche Rolle des Transkriptionsfaktors Phox2b in der Tumorgenese des Neuroblastoms untersucht werden. Phox2b ist ein Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, der essentiell für die initiale Entwicklung des autonomen Nervensystems ist und durch den BMP-Signalweg aktiviert wird (Stanke et al., 1999; Pattyn et al., 1999). Zeitgleich werden eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren (Ascl1, Phox2a, Hand2 und Gata2/3) durch den BMP-Signalweg induziert und bilden ein kreuzregulatorisches Netzwerk, das zur Differenzierung sympathischer Nervenzellen mit panneuronaler und noradrenerger Genexpression führt. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass Mutationen im für Phox2b kodierenden Gen zu schweren Störungen in der Entwicklung des autonomen Nervensystems führen (Trochet et al., 2003).

Durch genetische Screening-Analysen von Neuroblastoma-Patienten konnte bei Trägern einer Phox2b-Mutation eine Prädisposition zur Erkrankung an diesem Tumor festgestellt werden (Trochet et al., 2003). Neuroblastome entstehen aus sympathoadrenergen Vorläuferzellen, die genetischen Grundlagen, die zur Tumorgenese führen, sind jedoch unklar. Zwei Kennzeichen tumorartigen Wachstums sind Entartung und unkontrollierte Teilung von Zellen. Vorangegangene Untersuchungen zeigten für Phox2b sowohl eine Rolle in der Differenzierung als auch in der Proliferation früher Neurone (Pattyn et al., 1999; Dubreuil et al., 2002; Raabe et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit sollten nun die Auswirkungen von Phox2b und Phox2b-Mutationen, die in Patienten zu NB führten, auf mitotische, sympathoadrenerge Vorläuferzellen untersucht werden. Zellen dieses Typs stellen die Ausgangszellpopulation für die Tumorgenese des NB dar (Alam et al., 2009). Um die Rolle von Phox2b in dieser initialen Phase der Tumorentstehung zu verstehen, sollten die Auswirkungen der tumor-assoziierten Phox2b-Mutationen auf den Differenzierungsstatus, die Proliferation und das Überleben in primären Gewebskulturen untersucht werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 *HERSTELLERNACHWEISE*

| <b>HERSTELLER</b>                           | <b>MATERIAL</b>  |
|---|--|
| <b>Amxa</b> , Köln, Deutschland             | Chicken Nucleofector Kit   |
| <b>Biomol</b> , Hamburg, Deutschland        | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG), 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal) |
| <b>Boehringer</b> , Mannheim, Deutschland   | Nervenwachstumsfaktor (Nerve Growth Factor; NGF)   |
| <b>Difco</b> , Detroit, Michigan USA        | Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Trypton, Bacto-Agar   |
| <b>Greiner</b> , Frickenhausen, Deutschland | 35 mm Gewebekulturschalen mit 4 Kulturarealen $\varnothing=10$ mm  |
| <b>Invitrogen</b> , Karlsruhe, Deutschland  | Taq DNA Polymerase Kit, T4 DNA Ligase, 1 kb plus DNA Ladder, Glutamin  |

|  |   |
|--|---|
| <b>Eurogentec</b> , Köln, Deutschland                            | Bakterien-Elektroporationsküvetten  |
| <b>Life Technologies</b> , Gibco BRL,<br>Eggenstein, Deutschland | Agarose, Glutamin Agarose,<br>Glutamin, Penicilin-Streptomycin-<br>Lösung (5000 U/ml, 5000 mg/ml),<br>fötales Kälberserum (FCS), DMEM,<br>MEM, F14  |
| <b>Merck</b> , Darmstadt, Deutschland                            | Borsäure, Eisessig, MgCl <sub>2</sub> ,<br>CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, NaCl, NaHCO <sub>3</sub> ,<br>MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, Kaisers Glycerin<br>Gelatine, Natriumcitrat, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Glucose, KCl, KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,<br>LiCl |
| <b>Messer Griesheim</b> , Frankfurt,<br>Deutschland              | CO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub>  |
| <b>Millipore</b> , Schwalbach, Deutschland                       | Sterivex-GS 0,22 mm-Filtereinheiten<br>(Glockenfilter)  |
| <b>Mobitec</b> , Göttingen, Deutschland                          | Zweitantikörper   |
| <b>Nunc</b> , Wiesbaden, Deutschland                             | 35 mm Gewebekulturschalen   |
| <b>Polysciences</b> , Warrington, USA                            | Aqua Poly/Mount   |
| <b>Promega</b> , Mannheim, Deutschland                           | pGEMTeasy-Vektor Kit  |
| <b>Qiagen</b> , Hilden, Deutschland                              | Plasmid Purification Mini Kit   |

|   |  |
|---|--|
|   | Plasmid Purification Midi Kit  |
|   | PCR Aufreinigungs Kit  |
|   | Gel Eluation Kit   |
| <b>Riedel-de-Haen</b> , Seelze,<br>Deutschland            | Ethanol, NaOH, HCl   |
| <b>Roche Diagnostics</b> , Heidelberg,<br>Deutschland     | Ampicillin, DNA Längenstandard,<br>DIG-Nucleinsäure-Detektionskit,<br>Restriktionsendonukleasen mit den<br>zugehörigen Puffern, Pferdeserum<br>(HS)            |
| <b>Roth</b> , Karlsruhe, Deutschland                      | Glycerin, Triton-X100,<br>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)  |
| <b>Serva</b> , Heidelberg, Deutschland                    | Paraformaldehyd  |
| <b>Sigma-Aldrich-Chemie</b> , Taufkirchen,<br>Deutschland | Ethidiumbromid (EtBr), Isopropanol,<br>Tween-20 (Polyoxyethylensorbitan-<br>Monolaureat), Poly-DL-Ornithin<br>Hydrobromid, DNase I, HEPES,<br>Dimethylsulfoxid |
| <b>Stratagene</b> , Amsterdam, Niederlande                | XL-1 Blue elektrokompetente Zellen,<br>JM110 elektrokompetente Zellen  |
| <b>Worthington</b> , Freehold, Ohio, USA                  | Trypsin, Trypsininhibitor  |

2.1.2 **MEDIEN UND LÖSUNGEN**

Alle Medien und Lösungen werden, wenn nicht anders angegeben, mit hochgereinigtem H<sub>2</sub>O (MilliQ-Filtersystem der Firma Millipore) angesetzt.

2.1.3 **MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR ZELLKULTUR**

|   |  |
|---|--|
| Medium für sympathische<br>Ganglienkulturen (5% CO <sub>2</sub> ) | MEM<br>+10% HS<br>+5% FCS<br>+1% Glutamin<br>+1% Penicillin/Streptomycin                       |
| Medium für Maus-SCG-<br>Kulturen(5% CO <sub>2</sub> )             | DMEM/F12 (1:1)<br>+1% N2-Supplement<br>+1% Glutamin<br>+0,1%BSA<br>+1% Penicillin/Streptomycin |
| Medium für PC12 Zellen(5% CO <sub>2</sub> )                       | DMEM<br>+ 10% HS<br>+ 1% Penicillin/Streptomycin   |
| Medium für SH-SY5Y NB-<br>Zellen(5% CO <sub>2</sub> )             | MEM<br>+ 10% FCS<br>+ 1% Penicillin/Streptomycin   |
| Medium für DF1-Fibroblasten<br>(10% CO <sub>2</sub> )             | DMEM<br>+ 10% HS<br>+ 1% Penicillin/Streptomycin   |

---

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Poly-(DL)-Ornithin in Boratpuffer | 0,5 mg Poly-(DL)-Ornithin pro ml<br>0,15 M Boratpuffer lösen, steril<br>filtrieren |
|-----------------------------------|--|

---

#### 2.1.4 **MEDIEN FÜR BAKTERIENZELLKULTUR**

|                           |  |
|---------------------------|--|
| LB-(Luria Bertani) Medium | 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl in 1 l H <sub>2</sub> O lösen; autoklavieren |
|---------------------------|--|

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| LB-(Luria Bertani) Agarplatten | 5 g Hefe-Extrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl, 15 g Agar in 1 l H <sub>2</sub> O lösen; autoklavieren und unter Rühren auf 60°C im Wasserbad abkühlen lassen. (Bei Selektionsplatten bis auf 37°C abkühlen lassen und Ampicillin hinzugeben) Platten gießen und bei 4°C lagern |
|--------------------------------|--|

Zur Herstellung von Selektionsmedien oder –platten werden 50 mg/ml Ampicillin oder eines anderen Antibiotikums hinzugegeben.

#### 2.1.5 **LÖSUNGEN FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGIE**

|                 |                                       |
|-----------------|---------------------------------------|
| 50 x TAE-Puffer | 40 mM Tris-acetat, 2 mM EDTA (pH 8,0) |
|-----------------|---------------------------------------|

|            |   |
|------------|---|
| 0,5 M EDTA | 186,12 g Ethylendiamintetraacetat in H <sub>2</sub> O lösen, pH 8,0 mit NaOH-Plätzchen und 1 M NaOH einstellen, mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen |
|------------|---|

2.1.6 **LÖSUNGEN FÜR DIE IMMUNZYTOCHEMIE**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| KRH                       | 125 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,3 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 25 mM HEPES, 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 6 mM Glucose, pH 7,3 |
| 10 x PBS                  | 1,3 M NaCl, 40 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 14 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 24 mM KCl, pH 7,3  |
| PBST                      | PBS + 0,1% bis 0,5% Triton  |
| 4% Paraformaldehyd in PBS | 4 g Paraformaldehyd pro 100 ml PBS bei 60°C lösen, pH auf 7,3 einstellen  |
| Färbepuffer               | PBS + 0,5% Triton + 5% FCS  |
| PBS/Glycerin              | PBS / Glycerin 1:1  |

2.1.7 **IMMUNOLOGISCHE REAGENZIEN**

| <b>Antikörper/Reagenz</b>           | <b>Verdünnung/<br/>Inkubation</b> | <b>Spezies</b> | <b>Hersteller</b>                        |
|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------|--|
| Dapi                                | 1:1000 /<br>5 min bei RT          |                | Hoechst,<br>Frankfurt,<br>Deutschland    |
| anti-Dopamin-β-Hydroxylase<br>(DBH) | 1:500 /<br>ÜN bei 4°C             | Kaninchen      | Diasorin,<br>Dietzenbach,<br>Deutschland |

|                                   |                           |           |  |
|-----------------------------------|---------------------------|-----------|--|
| anti-Tyrosin-Hydroxylase (TH)     | 1:1000 /<br>30 min bei RT | Maus      | Arbeitsgruppe<br>Rohrer                          |
| anti-Tuj1                         | 1:1000 /<br>30 min bei RT | Maus      | HiSS<br>Diagnostics,<br>Freiburg,<br>Deutschland |
| anti-Phox2b (H20, N20)            | 1:200 /<br>ÜN bei 4°C     | Ziege     | Santa Cruz,<br>Santa Cruz,<br>USA                |
| anti-Hand2                        | 1:200 /<br>ÜN bei 4°C     | Kaninchen | Santa Cruz,<br>Santa Cruz,<br>USA                |
| anti-mouse Alexa 488, 546,<br>594 | 1:500 /<br>30 min bei RT  | Ziege     | Invitrogen,<br>Paisley,<br>England               |
| anti-goat / rabbit biotinylated   | 1:200 /<br>30 min bei RT  | Esel      | Diasorin,<br>Dietzenbach,<br>Deutschland         |
| Strept / Avidin-Cy3 Konjugat      | 1:200 /<br>30 min bei RT  |           | Diasorin,<br>Dietzenbach,<br>Deutschland         |
| anti-rabbit Alexa 488, 546,594    | 1:500 /<br>30 min bei RT  | Ziege     | Invitrogen,<br>Paisley,<br>England               |

RT – Raumtemperatur, ÜN – Inkubation über Nacht

2.1.8 **DNA-KONSTRUKTE***VERWENDETE VEKTOREN*

| <b>Plasmid</b>       | <b>Größe</b> | <b>Merkmale</b>  | <b>Hersteller</b>                  |
|----------------------|--------------|--|------------------------------------|
| pCAGGS               | 4,8 kb       | Ampicillin-Resistenz (AmpR), Chicken beta-actin/rabbit beta-globin hybrid promotor | H. Niwa, Osaka, Japan              |
| pCAGGS2              | 4,8 kb       | AmpR, Chicken beta-actin/rabbit beta-globin hybrid promotor                        | D. Junghans, Frankfurt, Germany    |
| pBluescript II SK(+) | 3,0 kb       | AmpR, lacZ   | Stratagene, Amsterdam, Niederlande |
| pGEM (T-Easy)        | 3,0 kb       | AmpR, lacZ, TA-Klonierungsvektor   | Promega, Mannheim, Deutschland     |
| pGEX_5_1             | 5,0 kb       | AmpR   | B. Schmitt, Frankfurt, Germany     |
| pRSETA               | 2,9 kb       | AmpR   | B. Schmitt, Frankfurt, Germany     |

*EXPRESSIONSKONSTRUKTE*

| <b>Plasmid</b>   | <b>Größe</b> | <b>Hersteller</b>                       |
|--|--------------|---|
| pCAGGS-eGFP  | 5,6 kb       | C. Goridis,<br>Paris,<br>Frankreich     |
| pCAGGS-engrailed   | 5,8 kb       | T. Reiff,<br>Frankfurt,<br>Deutschland  |
| pCAGGS-Phox2 HD  | 5,0 kb       | C. Goridis,<br>Paris,<br>Frankreich     |
| pCAGGS-Gata2 engrailed                                   | 6,2 kb       | T. Reiff,<br>Frankfurt,<br>Deutschland  |
| pCAGGS-Phox2b  | 6,0 kb       | C. Goridis,<br>Paris,<br>Frankreich     |
| pCAGGS-Phox2b Mutationen<br>(R100L, R141G, K155X, nt676) | 6,0 kb       | T. Reiff,<br>Frankfurt,<br>Deutschland  |
| pCAGGS-Phox2b engrailed                                  | 5,8 kb       | E. Binder,<br>Frankfurt,<br>Deutschland |
| pCAGGS-clD2  | 6,1 kb       | C. Goridis,<br>Paris,<br>Frankreich     |

|                            |        |   |
|----------------------------|--------|---|
| pCAGGS-MYCN                | 6,2 kb | C. Beltinger,<br>USA                    |
| pCAGGS-Hand2               | 5,7 kb | E. Binder,<br>Frankfurt,<br>Deutschland |
| pCAGGS-p27 <sup>kip1</sup> | 5,8 kb | P. Politis,<br>Athen,<br>Griechenland   |

### 2.1.9 OLIGONUKLEOTIDE

#### RT-PCR PRIMER

|                     | Sense Primer (5'-3')           | Antisense Primer (5'-3')         | Laborbuch       |
|---------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| BDNF                | ATAATCTAGATGACCATCCTTT<br>CCTT | ATAATCTAGACTATCTTCCCCTCT<br>TAAT | I, S.213        |
| DBH                 | GCACAACCGAGTCTGTCAACAT<br>C    | CATCGTGGGAACGCAGTTTG             | I, S.199        |
| Hand2               | AAGATCAAACCCCTCCGCCTGG         | ATCGCTGCTGCTAACTGTGC             | II, S.95        |
| GAPDH               | AAGGGTGGTGCTAAGCGT             | GCAGGGGCTCCAACAAAG               | J.<br>Stubbusch |
| ID2                 | CGCAGAACAAGAAGGTCAGCAA<br>G    | GGGGGATAAAGAGCAATCTCG            | II, S.122       |
| MYCN                | CCTAACTCCATCATCATCCAG          | TCTTCATCATCCTCTTCCTCCTC          | I, S.179        |
| p27 <sup>kip1</sup> | AAGGGAGGGGGAGATGTCAA<br>C      | CGGCTTGTGGTTCTGGAAATC            | I, S.240        |
| p75                 | TGGGGCTCCAAGGAAAAGTG           | ACCTCGTTCTTTCGCAGATGG            | I, S.260        |
| Phox2a              | GGGCGGTTTCCAATACAG             | GGTGAGGTCGATCTTCAGG              | II, S.192       |
| Phox2b              | GACCACGGCGGTTTGAACGAGA<br>AG   | GGGTGTAAATGTCGGGGTAGTG<br>CGTC   | I, S.231        |
| TH                  | GCGGCTACAATGAGAACAACAT<br>C    | GGCTCGTATTTCACTGAGAAGGG          | I, S.199        |
| Tlx3                | CTTCCAGAAGTCGCTCAACG           | TCAGACGAGGGAGGTGAC               | I, S.260        |
| TrkA                | CCCCTCATCATGGTCTTCGA           | TGTGGATGTCCTGGATGCGC             | I, S.179        |
| TrkB                | CTGGTGGACAATCCATTCAAGT<br>G    | TGGTGCAAAGAATACCGTCAGTT<br>C     | I, S.179        |
| TrkC                | ATGCTGCCTATCCGCTGGAT           | ACAGGTCGTCGTTTTGTGGG             | I, S.179        |

*PRIMER ZUR MUTAGENESE*

| Mutation                | Sense Primer (5'-3')                   | Antisense Primer (5'-3')         | Laborbuch |
|-------------------------|--|----------------------------------|-----------|
| Phox2b <sup>R100L</sup> | CGCAAGCAGCGGCTCATCCGC<br>ACCACC        | GGTGGTGCGGATGAGCCG<br>CTGCTTGCG  | I, S.163  |
| Phox2b <sup>R141G</sup> | CCTCACAGAGGCGGGAGTCCA<br>GGTGTGG       | CCACACCTGGACTCCCGCC<br>TCTGTGAGG | I, S.97   |
| Phox2b <sup>K155X</sup> | GCTAGCACCACCATGTATAAAA<br>TGAATATTCCTC | TTATCGATCTGAGCGAAACT<br>TAGCCCG  | E. Binder |
| Phox2b <sup>nt676</sup> | GCGCTCCGGGGCGGCGGGCC<br>C              | GGGCCCCGCCCGCCAGGAG<br>CGC       | I, S.163  |

*PRIMER FÜR KLONIERUNGEN*

| Konstrukt                                      | Sense Primer (5'-3')                  | Antisense Primer (5'-3')              | Laborbuch |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------|
| pRSETA Hand2                                   | CGCGGATCCATGAGTCT<br>GGTGGGGGGC       | CCCAAGCTTTCACTGCTTGAG<br>CTCCAGGGCCCA | II, S.134 |
| pGEX5_1<br>Phox2b (wt, R100L,<br>R141G, nt676) | CCGGAATTCATGTATAAA<br>ATGAATATTCTTACC | CCGCTCGAGTCAGAACATAC<br>TGCTCTTCAC    | II, S.134 |
| pGEX5_1<br>Phox2b <sup>K155X</sup>             | CCGGAATTCATGTATAAA<br>ATGAATATTCTTACC | CCGCTCGAGCTAGCGAAACT<br>TAGCCCG       | II, S.134 |
| pGEX5_1<br>Phox2 <sup>HD</sup>                 | CCGGAATTCATGGGATC<br>CGGCCTGCATG      | CCGCTCGAGTCATCTAGATTT<br>GGCGCTGG     | II, S.134 |

*PRIMER FÜR SEQUENZIERUNGEN*

| Vektor | Sense Primer (5'-3')      | Antisense Primer (5'-3') | Laborbuch |
|--------|---------------------------|--------------------------|-----------|
| pCAGGS | GCCTTCTTCTTTTCTTACA<br>GC | TGGTATTTGTGAGCCAG<br>GG  | I, S.112  |

*DOPPELSTRÄNGIGE SIRNA (QIAGEN, HILDEN, GERMANY)*

| siRNA                                | Zielsequenz (5'-3')   |
|--------------------------------------|-----------------------|
| siPhox2b                             | CAAGAACGGAGCGGCCGGCAA |
| siHand2                              | CACAGTTAGCAGCAGCGATAA |
| siLuc (Kontrolle firefly luciferase) | CACCTAGATCCTTTTAAAT   |

### 2.1.10 ORGANISMEN

#### *GALLUS GALLUS*

Zur Präparation für Primärkulturen werden sieben Tage (Embryonaltag 7 (E7)) und zwölf Tage (Embryonaltag 12 (E12)) alte Embryonen des Huhnes (*Gallus gallus*) verwendet. Die Eier werden bei einer Temperatur von 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60% inkubiert. Der Tag des Einlegens wird als E0 bezeichnet.

#### *MUS MUSCULUS*

Zur Präparation für Primärkulturen werden zwölf Tage alte Embryonen der Hausmaus (*Mus musculus*) verwendet. Der Tag nach der Verpaarung und positiver Überprüfung der Trächtigkeit des Weibchens wird als E0 bezeichnet.

#### *BAKTERIENSTÄMME ESCHERICHIA COLI*

|           |   |
|-----------|---|
| JM110     | Genetische Marker: RpsL(str <sup>r</sup> ) thr, leu, thi-1, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, D(lac, proAB), (F' traD36, proAB, lac <sup>q</sup> ZDM15), Stratogene |
| XL1-Blue  | Genetische Marker: RecA1, end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, (F' proAB, lac <sup>q</sup> ZDM15, Tn10, (tet <sup>r</sup> ))  |
| NEB Turbo | C2984, New England Biolabs  |

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 *ARBEITEN MIT ZELLKULTUREN*

Zellkulturarbeiten werden in einem separaten Raum in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Inkubatoren bei 37°C, 5-10% CO<sub>2</sub> und unterschiedlichen Kulturmedien abhängig von den Anforderungen der entsprechenden Kulturen (siehe 2.1.3).

#### *BESCHICHTEN VON KULTURSCHALEN MIT POLY-DL-ORNITHIN/LAMININ SUBSTRAT*

Die Kultivierung der Primärkulturen für die immunhistochemische Analyse erfolgte in 35 mm Kulturschalen mit 4 Arealen mit einem Durchmesser von 10 mm. Zum Beschichten der Kulturareale werden 100 µl Poly-Ornithin Lösung in jedes Kulturareal pipettiert. Die Kulturschalen werden dann über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundenes Poly-Ornithin wird am nächsten Tag durch zwei Waschschrte mit H<sub>2</sub>O entfernt. Anschließend trocknen die Kulturschalen in der Sterilwerkbank und sind, durch Lagerung bei 4°C, für mehrere Wochen haltbar. Anschließend wird Laminin auf eine Konzentration von 10 µg pro ml mit PBS verdünnt, je 100 µl dieser Lösung in jedes Well pipettiert und für zwei Stunden inkubiert. Ungebundenes Laminin wird durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Schließlich wird 1 ml Medium vorgelegt und die fertigen Kulturschalen bis zum Ausbringen der Zellen im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert.

### *PRIMÄRKULTUREN*

#### *PRÄPARATION PARAVERTEBRALER SYMPATHISCHER GRENZSTRÄNGE DES HUHNES*

Das Ei wird mit einer Schere geöffnet und der Embryo mit einer Pinzette entnommen. Der Embryo wird dekapitiert, in eine Petrischale überführt und auf den Rücken gelegt. Mit zwei sehr feinen Pinzetten wird die Bauchdecke geöffnet. Durch das Entfernen der inneren Organe wird die dorsale Aorta mit der dahinterliegenden Wirbelsäule sichtbar. Die dorsale Aorta wird mit der Pinzette angehoben und in rostraler Richtung entfernt. Die sympathischen Grenzstränge liegen lateral der Wirbelsäule. Mit der Pinzette wird an der Wirbelsäule entlanggefahren. Durch gleichzeitiges Anheben wird der sympathische Grenzstrang von der Wirbelsäule gelöst und kann herauspräpariert werden.

Die präparierten sympathischen Grenzstränge werden in einer Kulturschale mit PBS/Glukose (1 mg/ml) gesammelt.

### *DISSOZIATION*

Mit einer silikonisierten Pasteur-Pipette werden die sympathischen Grenzstränge in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach einmaligen Waschen mit PBS wird der Überstand abgesaugt. Um die Zellverbände enzymatisch zu dissoziieren werden 100 µl Trypsin (1:10 in PBS verdünnt) hinzugegeben. Trypsin ist eine Endopeptidase die zunächst präferentiell Zell-Zell-Verbindungen der extrazellulären Matrix löst. Die Inkubationsdauer bei 37°C im Wasserbad hängt hierbei von der Größe der Ketten, das heißt vom Alter der präparierten Embryonen ab. Sympathische Grenzstränge von E7-Embryonen werden 25 min inkubiert, sympathische Grenzstränge von E12-Embryonen 30 min.

Die Inkubation wird mit 100 µl Sojabohnentrypsininhibitor abgestoppt. Zusätzlich werden 20 µl DNase-I hinzugegeben, um die bei der Trypsininkubation freigesetzte genomische DNA zu verdauen.

Die sympathischen Grenzstränge werden einmal mit Medium gewaschen und durch Triturieren mit einer rundgeschmolzenen, silikonisierten Pasteur-Pipette mechanisch dissoziiert.

### *BESTIMMUNG DER ZELLZAHL*

Die Zellzahl pro ml wird mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zählkammer besitzt 16 Quadrate, die komplett ausgezählt werden. Über die folgende Formel lässt sich das Volumen für die gewünschte Zellzahl bestimmen.

$$\text{Volumen } [\mu\text{l}] = \frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{(\text{gezählte Zellen} \times 10)}$$

### *TRANSFEKTION UND KULTIVIERUNG DER ZELLEN*

Die Transfektion der Zellen durch Elektroporation erfolgt mit dem Amaxa Chicken Nucleofector Kit. Dieses Kit besteht aus speziellen Elektroporationsküvetten, sterilen Pipetten und der Chicken Nucleofector Lösung.

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch einen kurzen Elektroschock permeabel gemacht. Es entstehen kurzzeitig hydrophile Poren in der Membran des Zellkerns und des Nukleus, durch die Fremd-DNA eingebracht werden kann.

Das Insert im pCAGGS Plasmid kann durch dessen Beta-Aktin-Promotor in den transfizierten Zellen des sympathischen Grenzstrangs exprimiert werden. pCAGGS-GFP dient als Marker für transfizierte Zellen. Die Wahrscheinlichkeit einer Kotransfektion liegt bei 88% (Dityateva et al., 2003). Als

Kontrollbedingung dient ein pCAGGS-Plasmid ohne DNA-Insert. Die jeweiligen Expressionskonstrukte werden zusammen mit pCAGGS-GFP in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß im Verhältnis 2:1 vorbereitet. Bei Dreifachtransfektionen mit pCAGGS-GFP, einem Expressionskonstrukt und einer siRNA werden je 1 µg der Nukleotidlösungen verwendet. Die maximal applizierbare DNA-Menge liegt bei 3 µg. Für jede Elektroporation werden für manuelle Auszählungsexperimente 200.000 Zellen bzw. für RNA- und Proteinisolationsexperimente 400.000 Zellen eingesetzt. Die Transfektionseffizienz beträgt rund 50%. Anschließend werden die Zellen bei 150 g 10 min lang pelletiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen in 100 µl Chicken-Nucleofector Lösung resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension mit den Plasmiden vermengt und in die Elektroporationsküvette pipettiert.

Elektroporiert wird im Amaxa Nucleofector II Elektroporationsgerät mit dem Programm G-13, das laut Herstellerprotokoll eine hohe Transfektionseffizienz für Nervenzellen aufweist. Nach der Elektroporation werden über eine Dichtegradientenzentrifugation mit 3% BSA in MEM-Medium bei 60 g für 25 min die Zelltrümmer entfernt, anschließend das Pellet in 500 µl Medium resuspendiert und ausplattiert. Für Proliferationsexperimente werden dem Kulturmedium für festgelegte Zeitspannen die artifiziellen Nukleotide BrdU bzw. EdU (Roche bzw. Invitrogen) hinzugefügt. Diese Nukleotide werden von mitotischen Zellen während der S-Phase des Zellzyklus in ihre DNA inkorporiert und sind später immunzytochemisch nachweisbar.

### *PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG DES OBEREN ZERVICAL-UND DES STELLATGANGLIONS DER MAUS (DURCHGEFÜHRT VON AFSANEH MAJDAZARI)*

Ein bis drei Tage alte Mäuse (Postnatal 1-3) werden durch intraperitoneale Injektion von 100 µl Pentobarbital getötet. Der Brustkorb wird mit einer feinen Schere geöffnet, das Herz perforiert und das ausströmende Blut mit Papiertüchern aufgesaugt. Die Haut im Halsbereich wird aufgeschnitten und die Speicheldrüsen freigelegt. Durch das Entfernen der Speicheldrüse und

Muskelgewebe werden rechts und links der Luftröhre die Halsschlagadern (Arteria carotis communis) freigelegt. Unterhalb der Verzweigungsstelle der Halsschlagader liegt das obere Zervicalganglion. Mit einer Pinzette wird die Halsschlagader zur Seite geklappt, die drei abgehenden Nervenfasern des Ganglions mit einer zweiten Pinzette gekappt und das Ganglion herausgenommen (Higgins et al., 1991). Die zwei Zervicalganglien werden in Glukoselösung (2 mg/ml) gesammelt und anhaftendes Gewebe entfernt.

Die Stellarganglien liegen seitlich am ersten Brustrippenwirbel in unmittelbarer Nähe zum Thymus. Zur Präparation der Stellarganglien werden die Rippen und die inneren Organe des Brustbereiches entfernt. Kaudal werden die Ganglien durch Entfernen von Muskel- und Bindegewebe freigelegt. Anschließend werden die abgehenden Nervenfasern mit einer Pinzette gekappt und die Ganglien herausgenommen. Diese werden ebenfalls in die Glukoselösung überführt und anhaftendes Gewebe entfernt. Als Vorbereitung zum Trypsinverdau werden die Zervical- und Stellarganglien entweder zerrupft oder mit zwei Skalpell in je vier gleichgroße Teile geschnitten.

Das Gangliengewebe wird mit einer silikonisierten Pasteur-Pipette in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird der Überstand abgesaugt. Mit 18,9 U Trypsin/ml PBS und 22 U Kollagenase/ml PBS werden die Zell-Zell-Verbindungen bei 37°C für 45 min gelöst. Durch Zugabe von 10% BSA/ml PBS, Sojabohnentrypsininhibitor (0,02 mg/ml) und DNase I (0,2 mg/ml) in 1 ml Medium wird der Verdau abgestoppt und die unter Umständen freigesetzte genomische DNA verdaut.

Die Ganglienzellen werden zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und durch Triturieren mit einer rundgeschmolzenen, silikonisierten Pasteur-Pipette mechanisch vereinzelt. Die Zellzahl pro ml wird mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt und die gewünschte Zellzahl berechnet. Die sympathischen Neuronen werden nach der Transfektion mit dem Small Cell Number Nucleofector auf poly-DL-Ornithin/Kollagen beschichtete Kulturschalen ausgebracht und in serumfreiem Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.2.2 IMMUNZYTOCHEMIE

#### *IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG KULTIVierter ZELLEN (ERNSBERGER ET AL., 1989)*

Das Kulturmedium wird abgesaugt und die Zellen kurz in KRH-Puffer gewaschen. Die Zellen werden anschließend für 15 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Durch zweimaliges Waschen mit PBS wird das Fixativ entfernt. Eine 20-minütige Inkubation der Zellen in Färbepuffer permeabilisiert die Zellen und blockt unspezifische Bindungsstellen in den Zellen. Der Erstantikörper wird währenddessen auf Eis vorbereitet. Je nach Erstantikörper sind wie oben aufgeführt verschiedene Inkubationsbedingungen notwendig. Nach dem Blocken wird der Erstantikörper in einem Volumen von 60 µl pro Kulturareal mit den permeabilisierten Zellen inkubiert. Nach der Inkubation wird der Erstantikörper durch zweimaliges Waschen mit PBST entfernt. Der Zweitantikörper, der artspezifisch an den Erstantikörper bindet, ist bei der Immunfluoreszenzfärbung mit einem Fluorophor gekoppelt, das eine Auswertung am Fluoreszenzmikroskop ermöglicht. Pro Kulturareal werden 60 µl Zweitantikörperlösung für 30 min inkubiert. Zur Visualisierung des Nukleus wird Dapi (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Roche) zur Zweitantikörperlösung hinzugefügt. Anschließend werden ungebundene Antikörper und DAPI-Reagenz durch zweimaliges Waschen mit PBST und PBS entfernt. Abschließend werden die Kulturareale mit 10 mm Deckgläschen und einem Tropfen Aqua-Polymount eingedeckelt.

#### *IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG BRDU- BZW. EDU-MARKIERTER ZELLEN*

Die Fixierung und Permeabilisierung erfolgt wie bereits im vorherigen Absatz beschrieben. Bei BrdU-markierten Zellen ist eine Denaturierung der DNA mit 2N HCl für 5 min erforderlich. Die weitere Färbung der markierten Zellen erfolgt sowohl für BrdU als auch für EdU nach Herstellerprotokoll. Die Denaturierung der DNA mit HCl zieht ebenfalls eine weitgehende Denaturierung der in den

Zellen fixierten Proteine nach sich. Eine folgende Detektion niedrig exprimierter Proteine im Falle von BrdU-Markierung ist somit aufgrund fehlender Epitope für Antikörper erschwert. Eine Immunfluoreszenzfärbung nach EdU-Markierung ist jedoch problemlos möglich.

### *AUSWERTUNG UND AUFNAHME DER IMMUNFÄRBUNGEN AM FLUORESZENZMIKROSKOP*

Die statistische Auswertung der Immunfärbungen wird an einem Axiophot 2 Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss durchgeführt. Für Bildaufnahmen befindet sich eine Kamera der Firma Visitron Systems am Mikroskop, die mit einem PC verbunden ist. Mit dem Programm MetaMorph (Visitron Systems) werden die Daten dann weiterverarbeitet und gesichert. Die Gesamtzellzahl lässt sich anhand der DAPI-Färbung der Zellen bestimmen. Pro Kulturareal werden 10 Gesichtsfelder bei 20 facher Vergrößerung ausgezählt.

Um die Zahl der transfizierten Zellen zu bestimmen, werden in 10 Gesichtsfeldern bei 40facher Vergrößerung die GFP-positiven Zellen ausgezählt. Zur anteilmäßigen Auswertung proliferierender oder positiver Zellen für andere Marker werden ebenfalls GFP-positive transfizierte Zellen ausgezählt und der Anteil proliferierender oder Marker positiver Zellen bestimmt. Hierbei werden auf 10 Gesichtsfeldern GFP-positive Zellen bestimmt und auf ihre Färbung hin analysiert.

Aufnahmen der Immunfärbungen erfolgten entweder am bereits erwähnten Axiophot 2 Mikroskop oder an einem Zeiss Axio Imager 2 mit Apotome Zusatz und einer Axio-Cam (MRm)-Digitalkamera.

### *STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ROHDATEN*

Die statistische Auswertung der Rohdaten erfolgt am Computer in der Tabellenverarbeitung Microsoft Excel XP und dem Statistikprogramm InStat.

Für alle biologischen Grundgesamtheiten kann approximativ eine Normalverteilung angenommen werden. Zur Überprüfung, ob die Mittelwerte zweier Grundgesamtheiten differieren wurde deshalb der gepaarte Zweistichproben t-Test angewendet (Statistik für Fortgeschrittene, Seminarreihe gehalten von Prof. Dr. Gaby Schneider, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt). Angewendet auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente würde das bedeuten, dass die Grundgesamtheit der präparierten Neurone in den betrachteten Parametern normalverteilt ist und durch Transfektion spezifisch ein Parameter wie z.B. Phox2b-Proteinmenge durch Überexpression gegenüber einer Kontrollbedingung verändert wird.

Soweit nicht anders in der Abbildungslegende beschrieben wurden zur statistischen Analyse Mittelwerte dreier identisch durchgeführter Experimente verwendet.

### 2.2.3 **ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN**

#### *TRANSFORMATION ELEKTROKOMPETENTER BAKTERIEN (FIEDLER UND WIRTH, 1988)*

Bei der Elektroporation werden Bakterien kurzzeitig einem Elektroschock ausgesetzt. Wie auch bei der Transfektion mit dem Amaxa Kit, entstehen in der Plasmamembran kurzzeitig hydrophile Poren, durch die Plasmide eindringen können.

Die elektrokompetenten Bakterien (100 µl Aliquot) werden auf Eis aufgetaut und 2-50 ng/ml Plasmid-DNA hinzupipettiert. Die Bakterien/Plasmid-DNA-Lösung wird mit der Pipette gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Das Elektroporationsgerät „Gene Pulser“ (Biorad) wird auf 2,5 kV (Feldstärke 12,5 kV/cm) und 200 W (Pulse Controller) eingestellt. Mit der Kondensatorkapazität von 25 µF ergibt sich eine Pulsdauer von 5 ms ( $200W \times 25\mu F = 5ms$ ). Nach der Elektroporation werden 800µl LB-Medium zugegeben und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die

transformierten Bakterien werden für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend je nach Konzentration der verwendeten Plasmid-DNA-Lösung in unterschiedlichen Mengen auf Selektionsplatten ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### *TRANSFORMATION CHEMOKOMPETENTER BAKTERIEN*

Die chemokompetenten Bakterien werden ebenfalls auf Eis aufgetaut und 1-50 ng/ml Plasmid-DNA-Lösung hinzupipettiert. Die Bakterien/Plasmid-DNA-Lösung wird für 20 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock bei 42°C mit einer Dauer von 30 Sekunden im Wasserbad veranlasst die Bakterien, die Plasmid-DNA aufzunehmen. Anschließend werden die transformierten Bakterien in 200 µl LB-Medium erst für 10 min auf Eis und dann für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Sie werden dann je nach Konzentration der Plasmid-DNA-Lösung in unterschiedlichen Mengen auf Selektionsplatten ausgebracht und über Nacht inkubiert.

### *TRANSFORMATION VON NEB-HOCHKOMPETENTEN BAKTERIEN*

Die Transformation erfolgt wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben. Es kann jedoch eine erhöhte Plasmid-DNA-Lösungsmenge von bis zu 5 µl eingesetzt werden. Im Anschluss an die Transfektion werden die Bakterien in 500 µl SOC-Medium inkubiert.

### *BLAU-WEISS SELEKTION AUF LB-AGARPLATTEN*

Anhand der Antibiotikaresistenz können die Kolonien erkannt werden, die ein Plasmid aufgenommen haben. Es kann aber noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob in diesem Plasmid das zu klonierende DNA-Fragment enthalten ist. Der verwendete pGEM-Klonierungsvektor ist so konzipiert, dass in

der multiplen Klonierungsstelle (multiple cloning site; MCS) das lacZ-Gen integriert ist, welches für die  $\beta$ -Galaktosidase kodiert.

Für LB-Agarplatten mit Blau-Weiß-Selektion werden 4  $\mu$ l 0,1 M IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid) in H<sub>2</sub>O zu den Bakterien gegeben. IPTG aktiviert das Lactose Operon des lacZ-Gens. Die LB-Agarplatte wird mit 80  $\mu$ l 2% X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galaktopyranosid) in Dimethylsulfoxid (DMSO) bestrichen und für 10 min getrocknet. X-Gal ist ein nicht induzierendes Substrat, das durch die  $\beta$ -Galaktosidase zu Galaktose und einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. Befindet sich das DNA-Fragment in der multiplen Klonierungsstelle, ist das lacZ Gen unterbrochen, und die Kolonie auf der Platte bleibt weiß. Haben die Bakterien ein Plasmid ohne DNA-Fragment, setzen sie X-Gal durch die  $\beta$ -Galaktosidase in blauen Farbstoff um, und die Kolonie färbt sich blau.

### *VERMEHRUNG VON BAKTERIENSTÄMMEN FÜR PLASMID-PRÄPARATIONEN*

Eine einzelne Kolonie wird von den Selektionsplatten mit einer sterilen Impfnadel in LB-Medium mit Antibiotikum (3 ml für eine Mini-DNA-Präparation; 50 ml für eine Midi-DNA-Präparation) überführt und über Nacht bei 37° im Rundschüttler inkubiert.

### *PLASMID DNA-PRÄPARATION*

Für die Präparation der Plasmid DNA werden Säulen und Puffer der Firma Qiagen verwendet und nach deren Protokoll verfahren.

Zunächst wird das Nährmedium abzentrifugiert und das Pellet im alkalischen Lysisbuffer resuspendiert. Die durch die alkalische Lyse (Birnboim and Doly, 1979; Birnboim, 1983) entstandenen Zelltrümmer und die an die Plasmamembran gebundene genomische DNA werden durch Zentrifugation sedimentiert. Die Plasmid-DNA bindet an die Siliziumdioxid-Säulen, während

RNA und Proteine durch die Säule laufen. Nach mehrmaligem Waschen wird die DNA mit Wasser eluiert.

### *ETHANOL-FÄLLUNG VON NUKLEINSÄUREN (SHAPIRO, 1981)*

Durch Ethanol-Fällung lassen sich Nukleinsäuren aufreinigen und konzentrieren. Sie bilden in Gegenwart der einwertigen Kationen des Natriumacetats (3 M, pH 5,2) einen unlöslichen Niederschlag. Zur Fällung der DNA wird 10% Natriumacetat und das 2,5 fache Volumen reines Ethanol hinzugegeben. Die Präzipitation der DNA erfolgt dann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 60-90 min. Die gefällte DNA wird durch Zentrifugation bei 13000 U/min und  $4^{\circ}\text{C}$  pelletiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet wird mit 70% igem Ethanol bei 13000 U/min und  $4^{\circ}\text{C}$  gewaschen. Abschließend wird der Überstand abgesaugt, das Pellet an der Luft getrocknet und in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.

### *PHOTOMETRISCHE DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG*

Die photometrische Konzentrationsbestimmung wird mit einem Spektrometer der Firma Nanodrop durchgeführt. Prinzipiell funktioniert das Nanodrop-Spektrometer wie herkömmliche Photometer, indem es das Absorptionsmaximum der Probe bei 260 nm ( $\text{OD}_{260\text{nm}}$ ) gegenüber einer Blindprobe misst. Es kommt ohne Küvetten und mit nur 1,5  $\mu\text{l}$  Probenvolumen aus. Der Computer berechnet aus der Messung automatisch die DNA-Konzentration in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  und gibt diese auf dem Bildschirm aus.

Zusätzlich misst das Gerät das Absorptionsmaximum bei 280 nm ( $\text{OD}_{280\text{nm}}$ ). Der Quotient von  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  ergibt ein Verhältnis, mit dem Aussagen über die Reinheit der Probe getroffen werden können. Bei DNA-Proben liegt dieses Verhältnis meist bei 1,8-2,0.

### *AGAROSE-GELELEKTROPHORESE*

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Stränge nach ihrer Größe aufgetrennt, um sie im Vergleich mit bekannten Strängen zu bestimmen. Agarosepolymere werden hierzu zu einem Gel vernetzt. Die Größe der Poren im Netz ist von der Konzentration der Agarose abhängig und bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Stränge. Die Agarose wird durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und nach kurzem Abkühlen in den Gelschlitten gegossen. Der Gelschlitten besitzt eine Vorrichtung zum Einsetzen eines Kammes, mit dem man die Größe der Probenaschen bestimmt. Nach der Polymerisation der Agarose wird der Schlitten in die Gelkammer eingesetzt und die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel komplett überdeckt ist. Die Gelkammer ist mit zwei elektrischen Polen ausgestattet.

Die Proben werden mit Färbepuffer (1/6) vermischt und in die Probenaschen des Gels aufgetragen. Zusätzlich wird eine so genannte Leiter aus DNA-Strängen bekannter Größe aufgetragen. Die beiden Pole werden mit einem regelbaren Transformator verbunden, der auf eine Spannung von 120-160 V und 150 mA eingestellt werden kann.

Die aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladene DNA wandert zur Anode hin, wobei kleinere DNA-Fragmente schneller durch die Poren wandern. Der Färbepuffer erlaubt eine visuelle Kontrolle, wie weit das Gel gelaufen ist. Um die DNA für eine Auswertung unter ultraviolettem Licht sichtbar zu machen, legt man das Gel für 15 min in eine Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml). Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen und verändert so sein Anregungsspektrum (254 nm), so dass es im ultravioletten Licht stark fluoresziert. Zur Auswertung wird das Gel auf einem UV-Tisch fotografiert.

### *RESTRIKTIONSSPALTUNG VON DNA*

Zur Linearisierung und zur Überprüfung der DNA-Sequenz eines Plasmids kann dieser an definierten Stellen von Restriktionsenzymen gespalten werden. Für die Restriktionsspaltung kann, je nach Bedarf, eine variable Menge DNA eingesetzt werden. 1 Unit (U) eines Restriktionsenzym kann im vom Hersteller vorgeschriebenen Puffer bei 37°C pro Stunde 1 µg DNA spalten. Um die Spaltung eines DNA-Fragmentes oder Linearisierung eines Plasmids zu überprüfen, entnimmt man dem Verdau eine Probe und trennt sie durch Gelelektrophorese auf.

### *AUFREINIGEN VON DNA ÜBER EIN AGAROSEGEL*

Die Aufreinigung von DNA erfolgt über ein Agarosegel mit verbreiterten Taschen. Auf dem UV-Tisch wird das DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion geschieht über Säulen und Puffer der Firma Qiagen und wird nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zunächst wird das Gelstück mit Diffusionspuffer bei 50°C für 10 min inkubiert. Die Agarose geht in Lösung und der Inhalt des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wird auf eine Säule mit Silicagelmatrix aufgetragen. Bei der folgenden Zentrifugation wird die gelöste Agarose abgetrennt und nach zwei Waschrissen das DNA-Fragment mit H<sub>2</sub>O eluiert.

### *POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (SAIKI ET AL., 1988)*

Die Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase-chain-reaction“ PCR) dient zur selektiven Amplifikation bestimmter Nukleinsäuresequenzen.

Das Verfahren der PCR macht sich den Umstand zu Nutze, dass die DNA-Polymerase zum Synthesestart einen Primer benötigt. Die Primer haben meist eine Länge von 18-24 bp und können in beliebiger Sequenz hergestellt werden.

Um einen doppelsträngigen DNA-Abschnitt zu amplifizieren wird ein komplementärer Primer zur „sense“ (kodogenen) Richtung sowie ein komplementärer Primer zur „antisense“ (nicht kodogenen) Richtung gewählt.

Beim ersten Schritt der PCR wird der DNA-Doppelstrang bei einer Temperatur von 94°C denaturiert. Die beiden Stränge lösen sich voneinander, so dass im zweiten Schritt die Primer bei einer niedrigeren Temperatur an die komplementäre Sequenz am Einzelstrang hybridisieren können. Die Temperatur ergibt sich aus dem G-C und A-T Gehalt der Primer. Die DNA-Polymerase beginnt mit der Synthese des Stranges. Bei der PCR kommt eine spezielle DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium (*Thermus aquaticus*) zum Einsatz, die bei 94°C nur sehr langsam denaturiert. *Thermus aquaticus* lebt in Geysiren und heißen Quellen bei denen die Umgebungstemperatur bis 110°C betragen kann.

Ihre optimale Arbeitstemperatur beträgt 72°C. Durch die Elongation werden aus den Einzelsträngen wieder Doppelstränge. Beim nächsten Zyklus von Denaturierung der Doppelstränge, Hybridisierung der Primer und Elongation der DNA-Polymerase können die neu hinzugekommenen Stränge wieder als Matrize dienen, womit die Zahl der Stränge exponentiell ansteigt. Durch eine hohe Anzahl von Synthesesyklen können DNA Abschnitte bis zu 10<sup>9</sup>-fach vervielfältigt werden

### *LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN MIT DER T4-DNA-LIGASE*

Für eine Standard-Ligation werden 30-100 ng eines linearisierten Vektors und die 2-5 fache molare Menge des zu klonierenden DNA-Fragments benötigt. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 4°C mit den Pufferbedingungen des Herstellerprotokolls in einem 10 µl Ansatz mit 1 U T4-DNA-Ligase. Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Phosphodiesterbindungen von einer freien 5´-Phosphat-Gruppe und einer 3´-Hydroxyl-Gruppe (Bolivar et al., 1977). Als Co-Substrat benötigt sie dATP.

### *DNA-SEQUENZANALYSE*

Die DNA-Sequenzanalyse wird von der Firma MWG-Biotech durchgeführt. Hierfür muss ein  $\mu\text{g}$  der DNA in einer Vakuum-Zentrifuge lyophilisiert und für das Insert passende Primer ausgewählt werden.

### *MUTAGENESE*

Die Mutagenese Reaktionen zur Herstellung der Phox2b Mutanten wurden mit dem Quick Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. Hierbei wird eine Aminosäuresubstitution über die Veränderung der Template DNA (in diesem Fall Phox2b<sup>wt</sup>) auf Nukleinsäureebene erreicht. Dafür werden zwei Primer so geschaffen, dass sie die entsprechende Nukleinsäure als „Mismatch“ tragen. Die langen Überhänge garantieren eine Hybridisierung mit dem, durch bakterielle Expression methyliertem-, DNA-Template. Bei der PCR-Reaktion werden dann unmethylierte Nukleotide verwendet, so daß die amplifizierten Plasmide mit Mutationen unmethyliert sind. Über einen Dpn1-Verdau wird im Anschluss an die PCR-Reaktion methyliertes Template abgebaut. Nach dem Verdau wird die DNA dann wie bereits beschrieben in elektro- oder chemokompetente Bakterien transformiert.

### *RNA-ISOLIERUNG AUS ZELLKULTUREN UND GEWEBE SYMPATHISCHER GANGLIEN*

Zur Isolierung der RNA wird das RNeasy-Mini-Kit (Qiagen) verwendet. Zu Beginn wird der RLT-Lysispuffer mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Für die RNA-Isolation werden die adhärennten Zellen mit einem sterilen Zellkratzer vom Substrat gelöst und bei 150 g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wird in 350  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer resuspendiert und danach wird nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Das Zellsat wird auf Aufreinigungssäulen gegeben und schließlich in 30  $\mu\text{l}$  RNase-

freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Nicht unmittelbar zur cDNA-Synthese verwendete RNA wird bei -20°C gelagert.

### *REVERSE TRANSKRIPTION*

Die cDNA Synthese wird mit Hilfe des Enzyms Super Script III Reverse-Transkriptase Kit (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Es stellt einen doppelsträngigen RNA-/DNA-Hybrid her. Als Primer kommen Oligo-dT-Nukleotide zum Einsatz. Die Primerhybridisierung erfolgt bei 65°C für 5 min. Die reverse Transkription findet dann bei 55°C für eine Stunde im Wasserbad statt. Schließlich wird die reverse Transkriptase bei 72°C für 5 min inaktiviert. Die cDNA wird mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen) aufgereinigt, um anschließend in der semiquantitativen PCR-Reaktion verwendet zu werden.

### *SEMIQUANTITATIVE ANALYSE DER GENEXPRESSION*

Die semiquantitative Analyse der Genexpression wird mit durch reverse Transkription hergestellter cDNA durchgeführt. Mittels konventioneller PCR-Geräte (Eppendorf) wird die cDNA des Zielgens amplifiziert und nach unterschiedlichen Zykluszahlen wird eine Probe der PCR von 10µl entnommen. Per Agarosegelelektrophorese wird anschließend das Amplikon mit Ethidiumbromid visualisiert. Bei der Entnahme von Proben muss errechnet werden, ob sich die PCR in der exponentiellen Amplifikationsphase des Templates befindet. Anschließend wird eine Digitalfotografie des Agarosegels densitometrisch analysiert. Hier zu kommt die Software Scion Image 4.03 (Scion Corporation) zum Einsatz. Als Gleichladungskontrolle wurde die Expression der GAPDH untersucht und die Expression der verschiedenen Gene als Quotient der GAPDH-Expression über Excel (Microsoft) errechnet.

#### 2.2.4 **ARBEITEN MIT PROTEINEN**

##### *PROTEIN-ISOLATION AUS ZELLKULTUREN*

Die Zellen werden auf Eis mit kaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber (Fa. Greiner) von der Kulturschale abgelöst. Durch Zentrifugation für 10 min bei 150 g und 4°C werden die Zellen pelletiert. Das Zellpellet wird in RIPA-Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA, 1% Triton; 2,5 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM β-Glycerolphosphat; 1 mM PMSF; 1 µg/ml Leupeptin) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (13.000 x g, 10 min, 4°C) wird das Proteinlysate im Überstand von unlöslichen Zellbestandteilen im Pellet getrennt. Anschließend erfolgt eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry.

##### *PROTEIN-ISOLATION AUS GEWEBE*

Im Gegensatz zur Protein-Isolation aus Zellkulturen wird das Gewebe nach der Präparation mit einem Homogenisator (Xenox) in einem gekühlten Raum mechanisch aufgeschlossen. Der Aufsatz des Xenox-Homogenisators passt exakt in den konischen Teil eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes und garantiert so eine sehr gute Homogenisierung des Gewebes. Anschließend wird das Homogenat zentrifugiert, in RIPA-Lysispuffer aufgenommen und weiter verfahren wie im vorherigen Absatz.

##### *KOMPLEX-IMMUNPRÄZIPITATION (CO-IP)*

Bei der Co-IP werden Proteinkomplexe mittels spezifischen Antikörpern aus Proteinlysaten isoliert und über Agarose-Kugeln (Roche) in einem gekühlten Raum (4°C) aufgereinigt. Hierzu wird das gesamte Proteinlysate (RIPA Lysispuffer, Input Kontrolle) vorerst ohne Antikörper mit Protein-G-Agarose-

Kugeln inkubiert, um unspezifische Bindungen zwischen Proteinen des Lysats und der Protein-G-Agarose auszuschließen. Nach Zentrifugation wird der gereinigte Überstand (Überstand Kontrolle) zuerst über Nacht unter konstantem Schütteln mit dem Antikörper (anti-Hand2, Santa Cruz, USA, 1:1000, Kaninchen) inkubiert. Am zweiten Tag wird das Lysat mit den Protein-G-Agarose-Kugeln für 4 h unter konstantem Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Lysispuffer und PBS (Wasch-Kontrolle) und Abzentrifugieren wird der Überstand über den Agarose Kugeln verworfen. Anschließend können die Bestandteile der isolierten Komplexe per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert werden.

### *SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)*

Die Protein-Proben werden mit 4x-Probenpuffer (250 mM Tris/HCl pH 6.8, 8% SDS, 40% Glycerin, 0,04% Bromphenolblau, 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 94°C gekocht. Die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgt mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Laemmli, wobei die Proteine zunächst durch ein Sammelgel (1 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4% SDS, 8% Polyacrylamid) horizontal fokussiert werden, um dann mit Eintritt in das Trenngel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% SDS, 12% Polyacrylamid) der Größe nach separiert zu werden. Die Größenbestimmung erfolgt anhand eines Standards, welcher farblich markierte Proteine bekannter Größe enthält (Fermentas Spektra). Verwendet wird das Gelelektrophoresesystem Mini Protean II (BioRad). Die Separation der Proteine erfolgt bei 100 V Spannung für ca. 50 min. Als Laufpuffer wurde 0,25 M Tris, 0,96 M Glycin und 1% SDS verwendet.

### *TRANSFER VON PROTEINEN AUF MEMBRANEN (WESTERN-BLOT)*

Beim Western-Blotting werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Trenngel auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF, BioRad) oder Nitrocellulose-

Membran transferiert und dort immobilisiert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgt durch Anlegen eines elektrischen Feldes, das orthogonal zum Trenngel verläuft. Die negative Ladung der Proteine durch SDS überträgt die Proteine im elektrischen Feld aus dem Trenngel auf die jeweilige Membran. Die Bindungsstellen der PVDF-Membranen werden durch 5 minütiges Schwenken in Methanol aktiviert. Anschließend wird das Gel mit der jeweiligen Membran zwischen 2 Whatman Papieren in Transferpuffer (0,05 M Tris; 0,038 M Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol; pH 8,8) in korrekter Orientierung vertikal zwischen zwei sog. „scotch pads“ in die Wet-Blot Apparatur (BioRad) eingehängt. Der Proteintransfer erfolgt für 75 min bei 100 V und 4°C oder ÜN bei 10 V und Raumtemperatur (RT). Der Nachweis gebundener Proteine erfolgt immunzytochemisch.

### *IMMUNZYTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN AUF MEMBRANEN*

Der Nachweis von transferierten Proteinen auf PVDF- oder Nitrocellulose-Membranen erfolgt unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen das zu untersuchende Protein. Diese werden zunächst durch Inkubation mit 5% Magermilchpulver in TBS/Tween (TBST; 50 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 0,1% Tween-20) für eine Stunde bei RT geblockt. Anschließend wird der Antikörper (1:1.000-1:10.000) in TBST/5% Magermilchpulver über Nacht bei 4°C unter konstantem Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBST erfolgt die Inkubation mit einem speziesspezifischen Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Zweitantikörper (HRP von horseradish-peroxidase, 1:1000-1:100.000), welcher gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet ist. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST wird das zu untersuchende Protein durch Inkubation mit ECL-Reagenz (Amersham) nachgewiesen, die zur Emission von Chemilumineszenz des Zweitantikörpers führt. Diese wird in der Dunkelkammer mit speziellen Filmen (Agfa) nachgewiesen und mit einer Entwicklungsmaschine (Agfa) visualisiert. In der folgenden Tabelle sind alle im Western-Blot verwendeten Antikörper aufgelistet.

| Antikörper      | Verdünnung | Spezies   | Herkunft   |
|-----------------|------------|-----------|------------|
| anti-Phox2b     | 1:1000     | Kaninchen | C. Goridis |
| anti-Hand2      | 1:1000     | Kaninchen | Santa Cruz |
| anti-rabbit HRP | 1:30000    | Esel      | Diasorin   |

### 2.2.5 **REPORTERGENASSAYS**

#### *TRANSFEKTION VON DF1-ZELLEN BZW. HEK293T-ZELLEN*

Die Transfektion mit Effectene wird nach Vorschrift des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) vorgenommen. Auf eine Kulturschale mit 6cm Durchmesser kann max. 1 µg Plasmid DNA eingebracht werden. Die Transfektionseffizienz ist bei Fibroblasten mit rund 30% transfizierten Zellen relativ hoch.

#### *LUCIFERASE-REPORTERGEN-ASSAY*

Mit Reporter-gen-Systemen kann unter anderem der regulative Einfluss potentieller Transkriptionsfaktoren auf die Transaktivierung spezifischer Promotoren in vitro untersucht werden. Hierzu wird der zu untersuchende Promoter oder Promoterbereich vor ein so genanntes Reporter-gen kloniert, wodurch dessen Expression unter die genetische Kontrolle dieses Promoters gebracht wird. Das Enzym Luciferase ist ein häufig verwendetes Reporter-gen, da die Synthese der Luciferase durch Inkubation des Zelllysats mit deren Substrat Luciferin in einer Enzymreaktion resultiert, die luminometrisch bestimmt wird. Die Transaktivierung des Promoters kann somit indirekt quantifiziert werden. Für die durchgeführten Reporter-gen-Studien werden DF1-Huhn-fibroblasten verwendet, die mit einem Luciferase-Reporter-gen-Plasmid unter der Kontrolle eines 1 kb langen Fragments des DBH-Promotors (von J. Amiel) transfiziert werden. Die Renilla-Luciferase wird als Zellzahl- und

Transfektionskontrolle kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgt die Analyse mit dem DualGlo-Kit (Promega) in einem Luminometer (Promega). Im ersten Schritt wird hierbei die Aktivität der Luciferase bestimmt, in einem zweiten Schritt erfolgt die Messung der Renilla-Luciferase-Aktivität. Die Aktivität ergibt sich aus dem Quotienten der Renilla-Luciferase und der gemessenen Luciferase-Aktivität der einzelnen Proben, normalisiert an der Kontrollbedingung mit leerem Expressionsvektor.

### 3 ERGEBNISSE

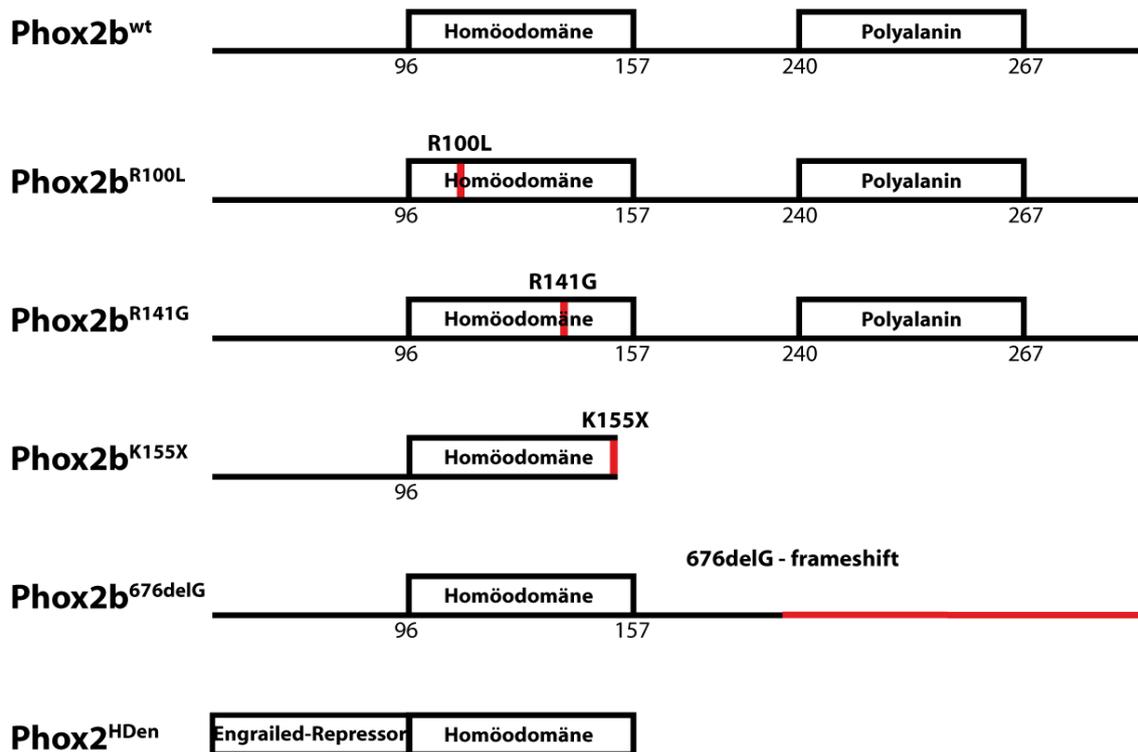
#### 3.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON PHOX2B UND NEUROBLASTOMA-PHOX2B-MUTATIONEN IN DER DIFFERENZIERUNG UND PROLIFERATION SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN

Der Homoödomänen Transkriptionsfaktor Phox2b spielt in der Entwicklung des autonomen Nervensystems eine essentielle Rolle. In Phox2b-defizienten Mäusen ist die Entwicklung aller sympathischen, parasympathischen und enterischen Ganglien gestört (Pattyn et al., 1999). Spätere Arbeiten lieferten Hinweise darauf, dass Phox2b zusätzlich eine Rolle in der Proliferationskontrolle einnehmen könnte (Dubreuil et al., 2002; Raabe et al., 2008). Sympathoadrenerge Neurone der paravertebralen sympathischen Grenzstränge nehmen bezüglich der Proliferation neuronaler Gewebe eine Sonderstellung ein, da sie trotz der Expression von neuronalen Differenzierungsmarkern weiterhin mitotisch sind (Rohrer und Thoenen, 1987, Tsarovina et al., 2008; Hendershot et al., 2008). Das NB ist ein neuroendokriner Tumor, der aus Zellen des autonomen Nervensystems entsteht. 65% der NB im Retroperitonealraum entstehen aus immaturren Zellen der paravertebralen sympathischen Grenzstränge oder der Nebenniere (Roy et al., 2009). Heterozygote Mutationen im Phox2b-Gen prädisponieren zur Entwicklung eines NBs. Um die Rolle des Transkriptionsfaktors Phox2b und der Mutationen im Phox2b-Gen zu untersuchen, wurden zunächst die NB-Phox2b-Mutationen durch Mutagenese hergestellt und später deren Rolle in der Differenzierung und Proliferation in immaturren sympathischen Neuronen des Huhnes analysiert.

##### 3.1.1 **HERSTELLUNG VON PHOX2B-MUTATIONEN DURCH MUTAGENESE**

Mutationen im Phox2b-Gen prädisponieren zur NB-Entwicklung. Um den Wirkungsmechanismus von Phox2b-Mutationen in unreifen sympathischen

Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden zunächst in der Literatur Mutationen von NB-Patienten im Phox2b-Gen gesucht. Die untersuchten Phox2b-Mutationen beruhen auf Einzelnukleotidaustausch (single-nucleotide-exchange, SNE) oder einer Leserasterverschiebung aufgrund einer Deletion. Die Phox2b<sup>R100L</sup>-, sowie die Phox2b<sup>R141G</sup>- und Phox2b<sup>K155X</sup>-Mutation beruhen auf SNE, die zu Veränderungen innerhalb der Homöodomäne führen (Trochet et al., 2004, Weese-Mayer, 2004). Bei R100L und R141G wird Arginin durch Leucin bzw. Glyzin substituiert, während die K155X Mutation zu einem trunkierten Protein führt, dem ein kleiner Teil der Homöodomäne und der komplette C-Terminus fehlt. Die Phox2b<sup>676delG</sup>-Mutante wird durch Deletion eines Nukleotids verursacht, welche zu einer Leserasterverschiebung (frameshift) führt (siehe Abb. 3.1).



**ABB. 3.1 PHOX2B KONSTRUKTE** Die schematisch dargestellten Phox2b Konstrukte wurden aus Neuroblastoma-Fallstudien selektiert. Über Mutagenese wurde die Nukleotidsequenz des murinen Phox2b<sup>wt</sup> so verändert, dass die entsprechenden Aminosäuren translatiert werden. Die Mutagenese wurde mit pCAGGS-Phox2b durchgeführt.

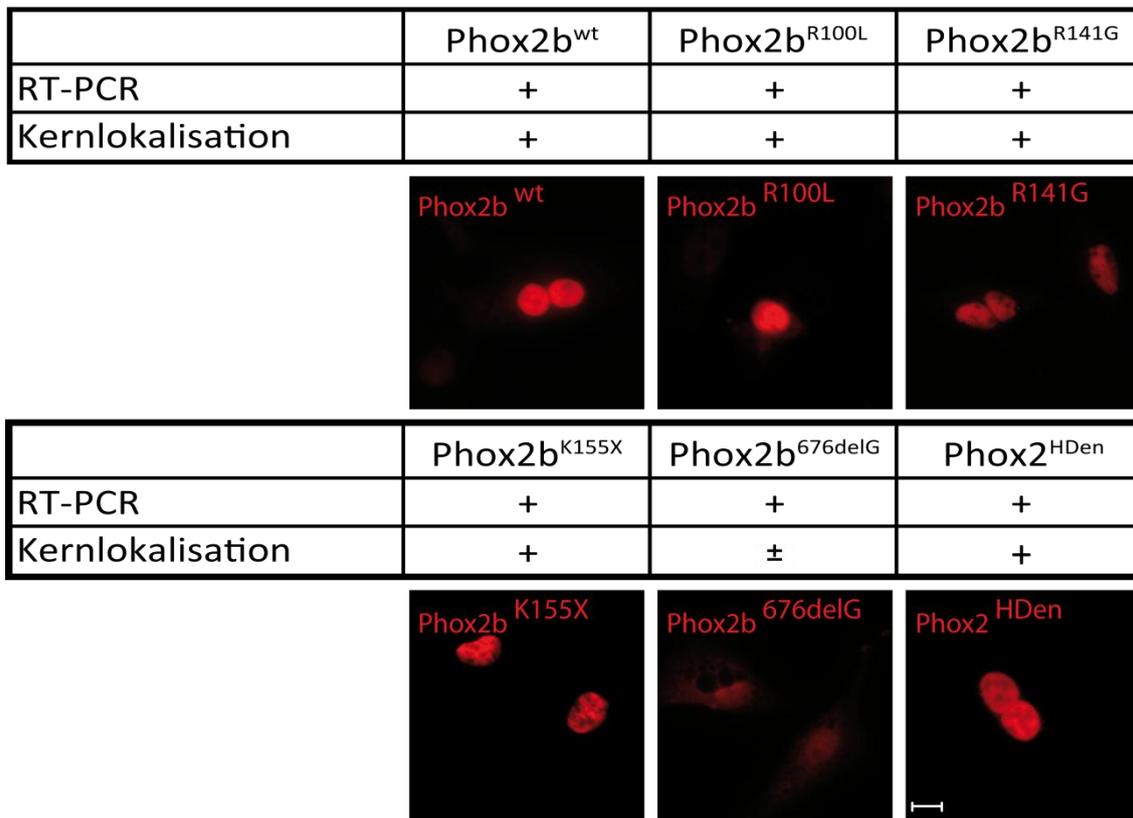
Durch ortsspezifische Mutagenese über Primer, welche die SNE oder die Deletion enthalten, wurden Mutationen in die murine Isoform von Phox2b im

pCAGGS-Vektor eingefügt. Die Interspezies-Sequenzhomologie wurde mit dem Programm ClustalX2 (Version 2.0.11) berechnet. Die Phox2b-Proteinsequenz ist bei *Homo sapiens sapiens* und *Mus musculus* zu mehr als 99% homolog. Die Proteinsequenzen der Homöodomäne und des N-Terminus sind von *Xenopus laevis* über *Gallus gallus*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* bis hin zum Menschen ebenfalls stark konserviert.

Phox2<sup>HDen</sup> ist ein Fusionsprotein der Phox2a-Homöodomäne mit dem *Drosophila melanogaster* Engrailed-Repressor (E. Binder, Frankfurt, siehe Abb. 3.1). Die Phox2a-Homöodomänen-Proteinsequenz ist identisch zur Sequenz der Phox2b-Homöodomäne. Eine Fusion von Transkriptionsfaktoren mit dem Engrailed-Repressor führt zu dominant-negativen Fusionsproteinen, die die Transkription der Zielgene blockieren (Vickers et al., 2002, Markel et al., 2002).

### 3.1.2 **EXPRESSIONSNACHWEIS DER PHOX2B MUTATIONEN IN FIBROBLASTEN**

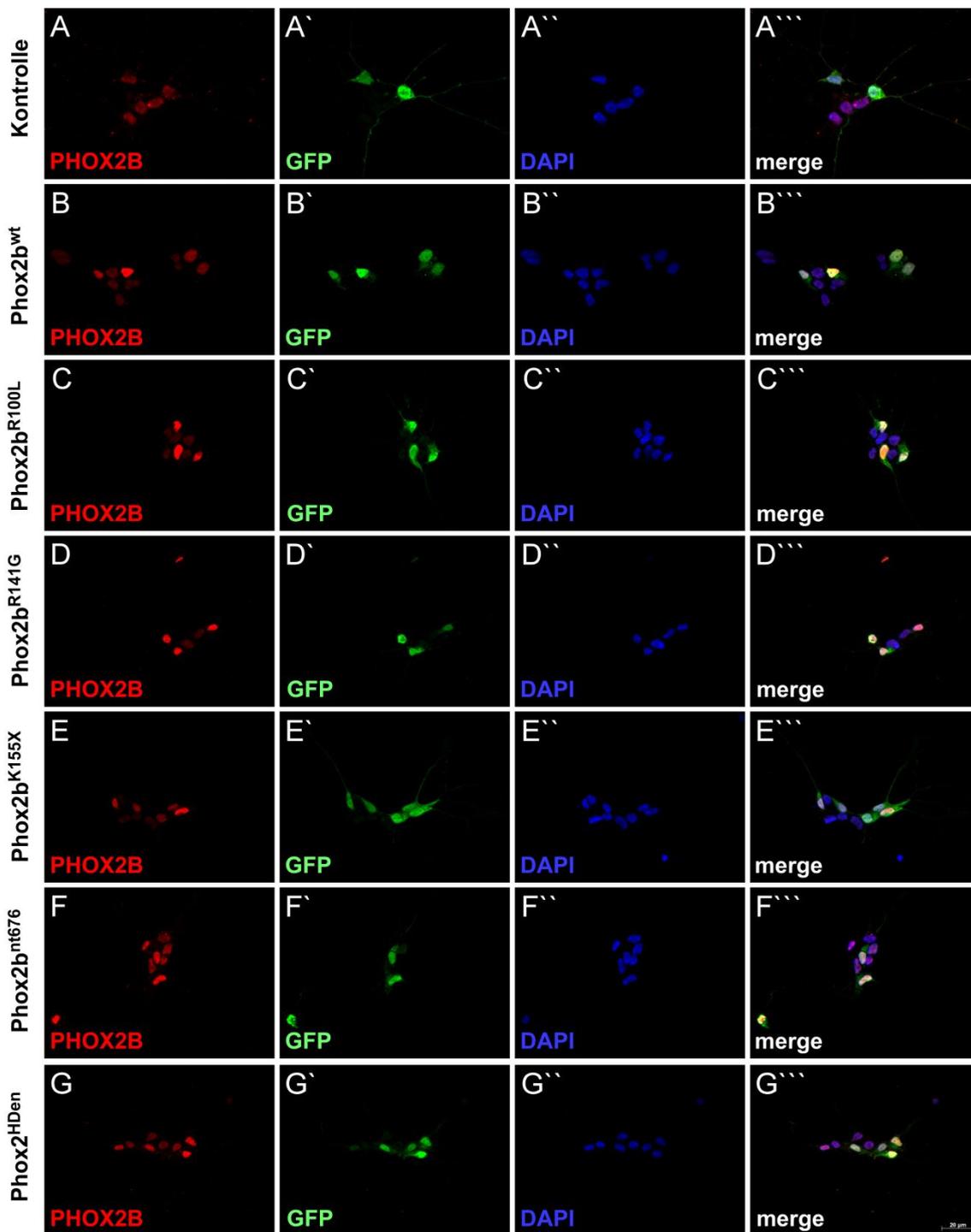
Um die Expression der Phox2b-Varianten zu verifizieren, wurden immortalisierte Huhnfibroblasten (DF1-Zellen) mit den pCAGGS-Phox2b Varianten transfiziert. DF1-Zellen exprimieren kein Phox2b. Nach 48 h in Kultur wurde die Expression sowohl auf mRNA per RT-PCR, als auch auf Proteinebene immunhistochemisch nachgewiesen. Nahezu alle transfizierten pCAGGS-Konstrukte konnten durch RT-PCR und Immunhistochemie nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2). Allerdings zeigte die Frameshiftmutante Phox2b<sup>nt676delG</sup> nur eine partielle Kernlokalisation. Die Intensität der Phox2b-Färbung war stärker als die Hintergrundfärbung nicht-transfizierter Zellen, jedoch deutlich schwächer als die Färbung der anderen Konstrukte.



**ABB. 3.2 EXPRESSIONSNACHWEIS IN DF1-ZELLEN** Huhnfibroblasten wurden mit den pCAGGS-Phox2b Varianten transfiziert und nach 48 h in Kultur wurde die Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen.

### 3.1.3 **EXPRESSIONSNACHWEIS DER PHOX2B MUTANTEN IN SYMPATHISCHEN NEURONEN**

Zusätzlich zum Expressionsnachweis in Huhnfibroblasten wurden paravertebrale sympathische Grenzstränge aus E7 Huhnembryos präpariert. Die paravertebralen sympathischen Grenzstränge bestehen in diesem Stadium der Entwicklung zu über 90% aus immaturren sympathischen Vorläuferzellen und einem geringen Anteil glialer Zellen (Rohrer und Thoenen, 1987). Zum Nachweis der Überexpression der Phox2b-Varianten in sympathischen Vorläuferzellen wurden diese durch Elektroporation mit den verschiedenen Phox2b-Varianten transfiziert. Zum Nachweis der Transfektion wurde pCAGGS-GFP koelektroporiert. Die Wahrscheinlichkeit einer Doppeltransfektion zweier verschiedener Expressionsvektoren liegt bei dieser Form der Elektroporation bei 88% (Dityateva et al., 2003).



**ABB. 3.3 EXPRESSIONSNACHWEIS DER PHOX2B-VARIANTEN IN IMMATUREN SYMPATHISCHEN NEURONEN DES EMBRYONALTAGS 7** Paravertebrale sympathische Grenzstränge von E7-Huhnembryonen wurden präpariert, dissoziiert und mit den Phox2b-Varianten transfiziert. Nach 48 h wurde die Expression immunhistochemisch untersucht. Alle Phox2b-Konstrukte (B-G) wiesen eine höhere Immunfluoreszenz auf als nicht-transfizierte (GFP/Phox2b<sup>+</sup>) oder Kontrollbedingungen (A). (A-G anti-Phox2b, A'-G' anti-GFP, A''-G'' DAPI, A'''-G''' Überlagerung der Farbkanäle (merge), Maßstab = 20 μm)

Die neuronale Identität der analysierten Zellen wurde morphologisch entweder über GFP-Färbung oder über Phasenkontrastmikroskopie ermittelt. Zur

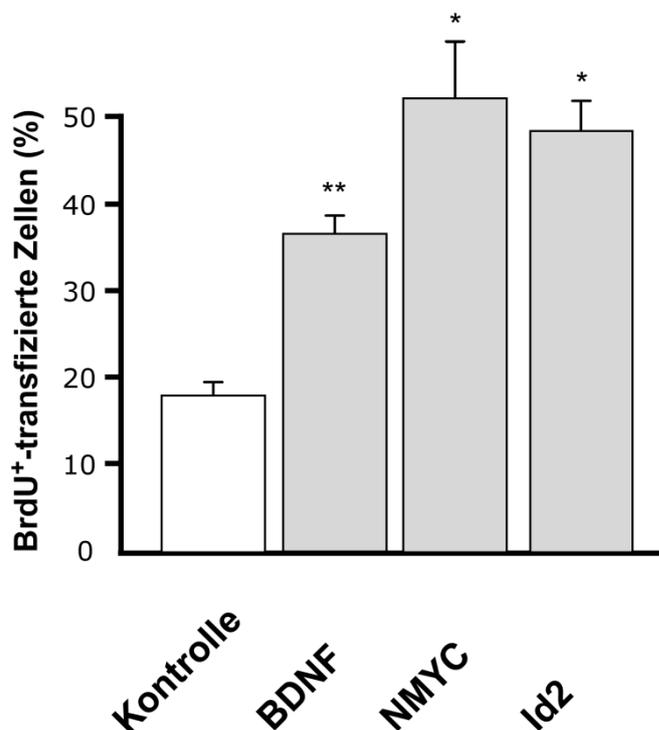
Feststellung der Gesamtzellzahl wurde mit dem Kernfärbereagenz DAPI histochemisch der Nukleus gefärbt. Eine immunhistochemische Markierung des Phox2b-Proteins über spezifische Antikörper zeigte in der Kontrolle eine deutliche Kernlokalisation (siehe Abb. 3.3, A). Diese Antikörper binden spezifisch an die Homöodomäne von Phox2b. Wurde eine der Phox2b-Varianten kotransfiziert, zeigte sich eine erhöhte Immunfluoreszenzintensität, die Rückschlüsse auf ein erhöhtes Vorkommen von Antikörper-markiertem Phox2b-Protein zulässt (siehe Abb. 3.3, B-G). Die Immunfluoreszenzintensität ist stärker als die Kontroll-transfizierter GFP<sup>+</sup>-Neurone (siehe Abb. 3.3, A) und GFP-negativer nicht-transfizierter Zellen (siehe Abb. 3.3, B-G). Diese Daten sowie auch die Daten aus der DF1-Zelltransfektion lassen sowohl auf eine korrekte Expression als auch auf eine Kernlokalisation der Phox2b-Varianten schließen.

#### **3.1.4 SYMPATHOADRENERGE VORLÄUFERZELLKULTUREN ALS MODELLSYSTEM FÜR PROLIFERATIONSKONTROLLE**

Sympathoadrenerge Neurone der paravertebralen sympathischen Grenzstränge aus E7-Huhnembryos proliferieren *in vitro* (Rohrer und Thoenen, 1987; Zackenfels et al., 1995). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Neurone in den SG die Rezeptortyrosinkinase trkB exprimieren. Aktivierung des trkB-Rezeptors mit dem Liganden BDNF führt zu einem starken Anstieg BrdU-inkorporierender sympathischer Vorläuferzellen in Kultur (Straub et al., 2007; siehe Abb. 3.4; 35,1% ± 2,5%). BrdU ist ein artifizielles Nukleotidanalogue, das während der S-Phase in die replizierende DNA eingebaut wird und nach Fixierung der Zellen immunhistochemisch über Antikörper nachgewiesen werden kann.

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass neuronale Stammzellen im Vorderhirn durch Überexpression von Id2 ein erhöhtes Proliferationspotential aufweisen (Jung et al., 2009). Id2, ebenso wie das bereits beschriebene MYCN sind in der Proliferationskontrolle im NB involviert (Jögi et al., 2002; Brodeur et al., 1984; Alam et al., 2009). Durch Überexpression wurde die Auswirkung von

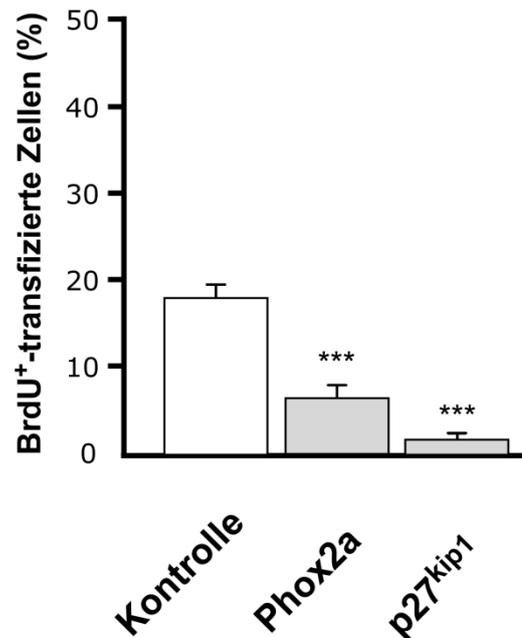
erhöhten MYCN- und Id2-Proteinmengen untersucht. Sowohl für MYCN (51,9%  $\pm$  7,8%) als auch für Id2 (46,1%  $\pm$  3,5%) wurde ein signifikanter Anstieg der Anzahl BrdU-inkorporierender transfizierter Zellen beobachtet (siehe Abb. 3.4). Primärkulturen E7-sympathischer Vorläuferzellen reagieren somit auf Stimuli, die auch in der Proliferationskontrolle von Neuroblastomzellen eine Rolle spielen.



**ABB. 3.4 BRDU-INKORPORATION IMMATURER SYMPATHISCHER NEURONENKULTUREN MIT UNTERSCHIEDLICHEN PROLIFERATIONSSSTIMULI** E7-sympathische Neurone wurden mit Expressionsvektoren für MYCN bzw. Id2 (pCAGGS-MYCN/pCAGGS-Id2) transfiziert oder mit erhöhter BDNF-Konzentration (50  $\mu$ M, Straub et al., 2007) kultiviert. Nach 48 h wurde die Anzahl BrdU<sup>+</sup>-transfizierter Zellen ausgewertet. Dargestellt ist die Proliferationsrate transfizierter Neurone durch die Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent. (signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p $\leq$ 0,05; \*\*-p $\leq$ 0,01; \*\*\*-p $\leq$ 0,001).

In Neuralleistenzellkulturen sowie in der noradrenergen CAD-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass Phox2a die Transkription der Zyklin-abhängigen Kinase p27<sup>kip1</sup> stimuliert. Als Folge davon verlassen die Zellen den Zellzyklus und beginnen zu differenzieren. Sowohl Knockdown von Phox2a als auch von p27<sup>kip1</sup> blockiert diesen Effekt (Paris et al., 2006). Durch Überexpression sollte die Rolle von Phox2a und p27<sup>kip1</sup> in der Proliferation sympathoadrenerger Vorläuferzellen untersucht werden. In Übereinstimmung mit den Daten aus der CAD-Zelllinie und den Neuralleistenzellkulturen zeigte die Überexpression von

Phox2a und p27<sup>kip1</sup> (5,64% ± 0,83% bzw. 1,45% ± 0,49% BrdU<sup>+</sup>-transfizierte Zellen) einen antiproliferativen Effekt. E7 sympathoadrenerge Vorläufer reagieren somit auch auf antiproliferative Stimuli und sind demnach ein geeignetes Testsystem für Proliferationsexperimente *in vitro*.



**ABB. 3.5 BRDU-INKORPORATION IMMATURER SYMPATHISCHER NEURONENKULTUREN NACH PHOX2A UND P27<sup>KIP1</sup> ÜBEREXPRESSION** E7-sympathische Neurone wurden mit Expressionsvektoren für Phox2a bzw. p27<sup>kip1</sup> (pCAGGS-Phox2a/pCAGGS-p27<sup>kip1</sup>) transfiziert. Nach 48 h wurde die Anzahl BrdU<sup>+</sup>-transfizierter Zellen ausgewertet. Dargestellt ist die Proliferationsrate transfizierter Neurone durch die Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent. (signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

### 3.1.5 **UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON PHOX2B UND NEUROBLASTOMA PHOX2B-MUTATIONEN IN DER PROLIFERATION SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN**

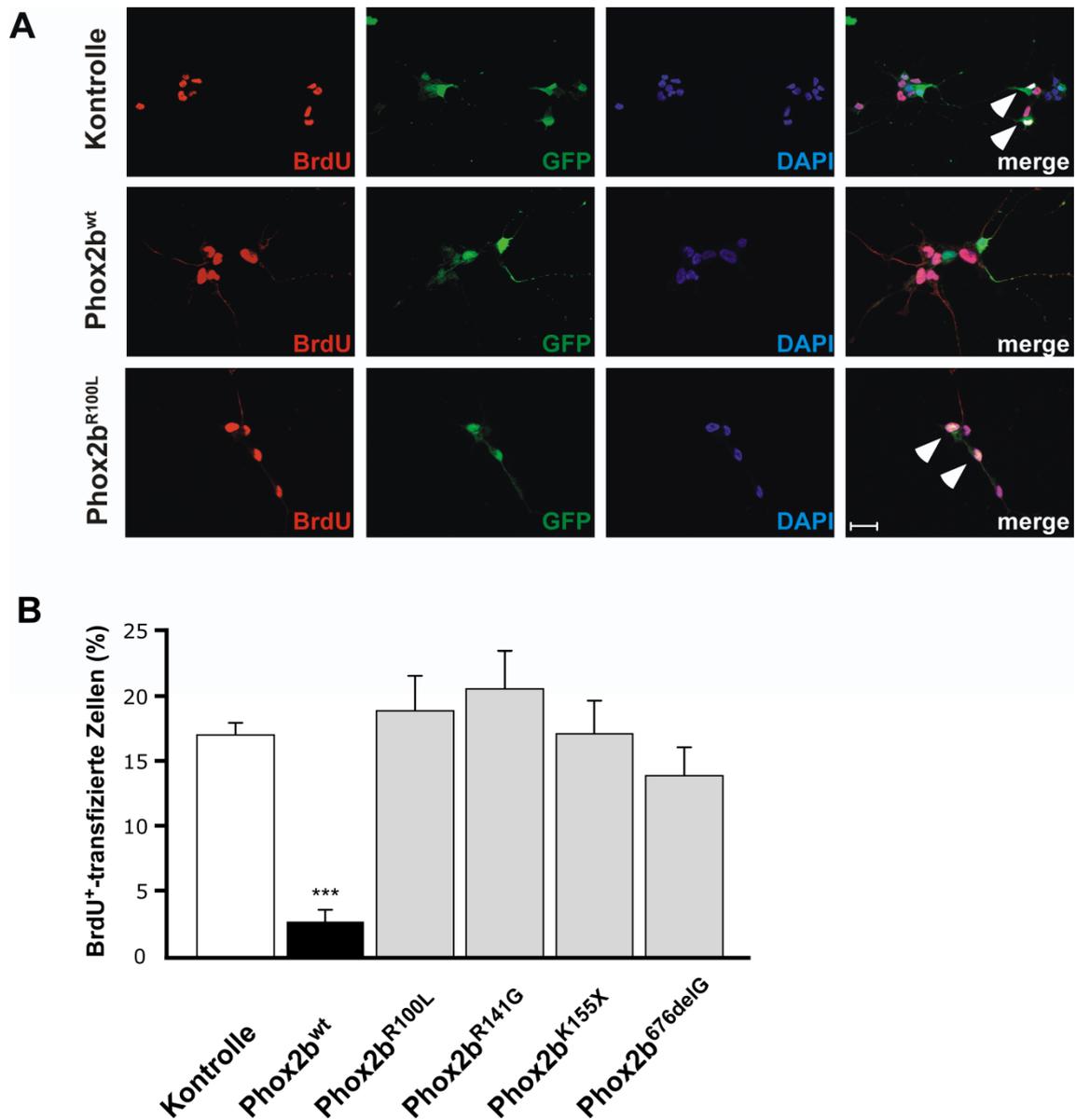
Die Funktion des Transkriptionsfaktors Phox2b in der frühen Differenzierung sympathoadrenerger Vorläuferzellen wurde bereits in früheren Arbeiten untersucht (Pattyn et al., 1999; Stanke et al., 1999). Zu einer möglichen Rolle in der Proliferationskontrolle früher autonomer Neurone ist bislang wenig bekannt. Überexpression von Phox2b im Neuralrohr des Huhnes führt zu einer verringerten Zahl BrdU- und PCNA-positiver Zellen (Dubreuil et al., 2000). PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ist ein Antikörper gegen ein Protein,

das an die  $\delta$ -DNA-Polymerase gebunden ist und kommt ausschließlich während der Zellteilung vor.

Parallel zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden Experimente mit den Neuroblastomzelllinien SK-N-AS und NLF veröffentlicht, in denen gezeigt wurde, dass Phox2b<sup>wt</sup> antiproliferativ wirkt und zwei ebenfalls in dieser Arbeit untersuchte Phox2b-Mutationen (Phox2b<sup>R100L</sup> und Phox2b<sup>nt676delG</sup>) einen verringert antiproliferativen Effekt aufweisen (Raabe et al., 2008). Es ist jedoch unklar, ob diese Daten von Neuroblastomzelllinien auf die initiale Entstehung von Tumorzellen übertragen werden können. Um die Rolle von Phox2b<sup>wt</sup> und Phox2b-Mutationen in den potentiellen Ursprungszellen des Neuroblastoms zu untersuchen, wurden sowohl immature sympathoadrenerge Vorläuferzellen der paravertebralen Grenzstränge aus E7-Huhnembryonen als auch proliferative SCG- (Superiores Zervikal Ganglion, superior cervical ganglion) und Stellarganglion- (ST) Vorläuferzellen aus E12,5 Mausembryonen mit Expressionsplasmiden für die Phox2b-Varianten transfiziert. (Wolf et al., 1999)

Die quantitative Analyse der Immunfärbungen erfolgte über die statistische Analyse der Anzahl BrdU<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>-positiver Neurone (siehe Abb. 3.6, A). Die Auswertung ergab einen antiproliferativen Effekt des Phox2b-Wildtypproteins sowohl in E7-Huhn- (siehe Abb. 3.6, B) als auch in E12,5-Maus-SCG/ST-Kulturen (siehe Abb. 3.7). Die Zahl der proliferierenden sympathoadrenergen Vorläuferzellen sinkt hierbei von 17,7%  $\pm$  1,4% bzw. 25,1%  $\pm$  1,6% in der Kontrolle auf 2,9%  $\pm$  0,8% bzw. 4,6%  $\pm$  0,9% bei Phox2b<sup>wt</sup>-Überexpression. Die untersuchten Phox2b-Mutationen zeigten keinen Effekt auf die Proliferationsrate (siehe Abb. 3.6, B; Abb. 3.7). Somit könnte die Tumorprädisposition durch Phox2b-Mutationen durch den Funktionsverlust eines Tumorsuppressors (Phox2b<sup>wt</sup>) erklärt werden.

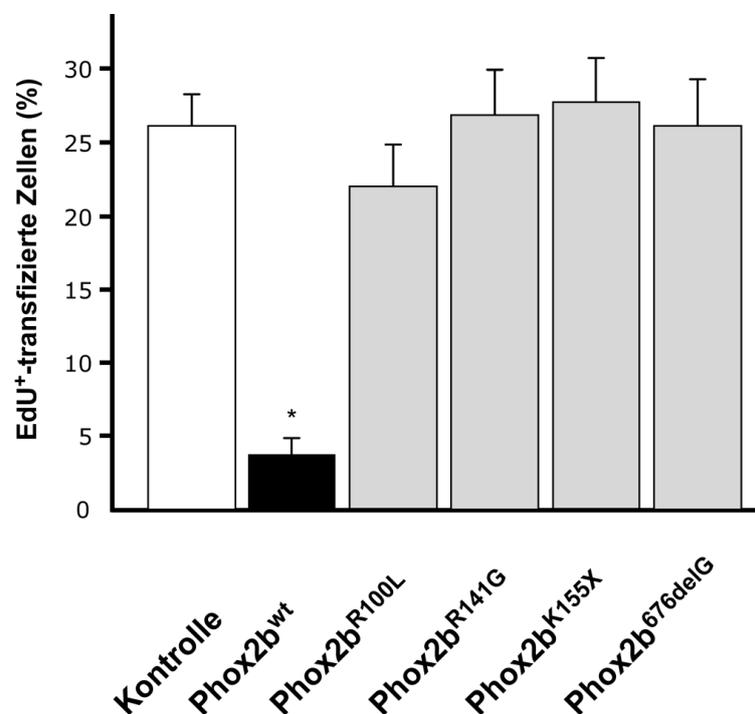
Allerdings wurden in diesen Experimenten die Phox2b-Mutationen zusätzlich zum endogenen Phox2b des normalen doppelten Chromosomensatzes überexprimiert. Das Experiment spiegelt also nicht die heterozygote Situation der Neuroblastoma-Patienten mit Phox2b-Mutationen wider, die ein gesundes



**ABB. 3.6 BRDU-INKORPORATION IMMATURER SYMPATHISCHER NEURONENKULTUREN NACH ÜBEREXPRESSION VON PHOX2B<sup>WT</sup> UND PHOX2B-MUTATIONEN.** E7-sympathische Neurone aus Huhnembryonen wurden mit Expressionsvektoren für Phox2b<sup>wt</sup> und Phox2b-Mutationen transfiziert. Nach 48 h wurde die Anzahl BrdU<sup>+</sup>-transfizierter Zellen immunhistochemisch untersucht (A) und statistisch analysiert (B). (A) zeigt exemplarisch eine Immunfärbung für BrdU, GFP und DAPI der Kontrollbedingung und der Überexpression von Phox2b<sup>wt</sup> und Phox2b<sup>R100L</sup>. Die Pfeilspitzen markieren proliferierende GFP<sup>+</sup>-Neurone. In (B) ist die Proliferationsrate transfizierter Neurone durch die Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent dargestellt. (signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

Phox2b<sup>wt</sup>- und ein mutiertes Phox2b-Allel haben. Ein möglicher proliferationsstimulierender Effekt der Phox2b-Mutationen könnte also durch endogenes proliferationshemmendes Phox2b verdeckt werden.

Um die heterozygote Situation in Neuroblastoma-Patienten nachzustellen wurde ein Herunterregulierungsansatz (Knockdown) auf mRNA-Ebene gewählt. Über small-interfering-RNA (siRNA), die spezifisch an die Phox2b-mRNA des Huhnes bindet, sollte die heterozygote genetische Situation in Neuroblastom-Patienten nachgestellt werden.

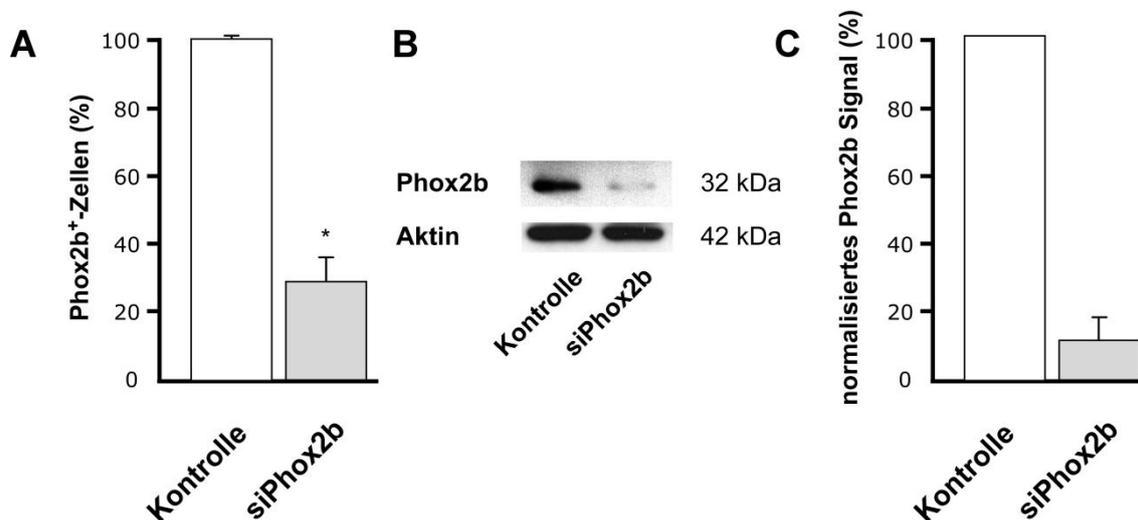


**ABB. 3.7 EDU-INKORPORATION IMMATURER SYMPATHISCHER NEURONENKULTUREN NACH ÜBEREXPRESSION VON PHOX2B<sup>WT</sup> UND PHOX2B-MUTATIONEN.** Maus E12,5-sympathische Neurone wurden mit Expressionsvektoren für Phox2b<sup>wt</sup> und Phox2b-Mutationen transfiziert. Nach 48 h wurde die Anzahl EdU<sup>+</sup>-transfizierter Zellen ausgewertet. Dargestellt ist die Proliferationsrate transfizierter Neurone durch die Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent. (signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

Die mRNA der Phox2b-Expressionsplasmide wird hierbei nicht degradiert, da die Nukleotidsequenz der siRNA gegen Phox2b spezifisch die Sequenz des Huhn homologs hybridisiert.

### 3.1.6 FUNKTIONSNACHWEIS DER siRNA GEGEN PHOX2B

Um das endogene Phox2b spezifisch herunterzuregulieren, wurden siRNA-Konstrukte synthetisiert (siPhox2b). Diese hybridisieren an eine Nukleotidsequenz, die für den C-Terminus von Phox2b kodiert. Im Vergleich verschiedener Spezies ist der C-Terminus sehr heterogen (siehe 3.1.1). Zum Funktionsnachweis der siPhox2b wurden E7-SG-Primärkulturen mit siPhox2b transfiziert. Der Knockdown von Phox2b wurde sowohl immunhistochemisch (siehe Abb. 3.8, A) als auch proteinbiochemisch untersucht (siehe Abb. 3.8, B, C).



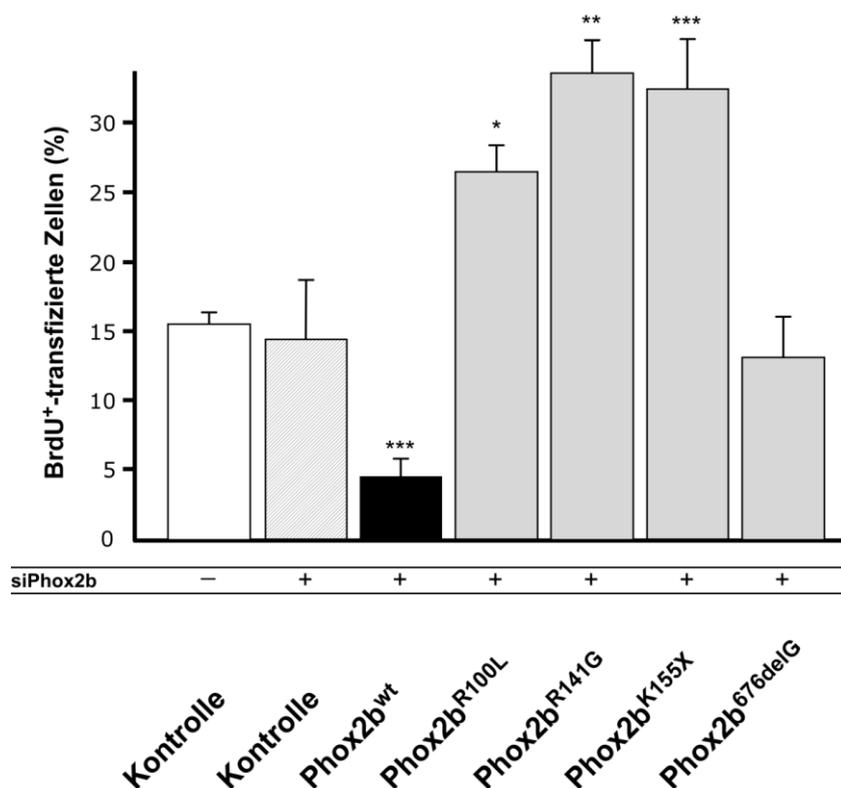
**ABB. 3.8 FUNKTIONSNACHWEIS DER SIRNA GEGEN PHOX2B** E7-sympathische Neurone aus Huhnembryonen wurden mit siPhox2b transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Phox2b (A) oder proteinbiochemisch (B,C) per Western-Blot analysiert. (A) zeigt die quantitative Analyse der Immunfärbungen mit Phox2b-Antikörpern. In mit siPhox2b transfizierten Kulturen ist die Zahl der Phox2b<sup>+</sup>-Neurone um  $73,4\% \pm 8,8\%$  ( $n=3$ ) reduziert. (B) zeigt Western-Blots mit Phox2b- und Aktin-Antikörpern von Kontroll- und siPhox2b-Lysaten. Die densitometrische Analyse des Bandensignals (C) ergab eine Reduktion des auf Aktin normalisierten Phox2b-Signals um  $88,2\% \pm 7,8\%$  ( $n=2$ ). (signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \* $-p \leq 0,05$ ; \*\* $-p \leq 0,01$ ; \*\*\* $-p \leq 0,001$ ).

Die immunhistochemische Analyse ergab eine Reduktion der Phox2b-positiven Neurone um  $73,4\% \pm 8,8\%$  (siehe Abb. 3.8, A,  $n=3$ ). Gleichzeitig wird durch siPhox2b das Überleben transfizierter Neurone in Kultur verringert ( $38\% \pm 0,7\%$ ). Zusätzlich erfolgte daher eine proteinbiochemische Analyse durch Western Blot-Analysen mit Kontroll- und siPhox2b-transfizierten Lysaten (siehe Abb. 3.8, B). Die Phox2b-Bandenintensität wurde mit Hilfe des Programms 1D-Gel-Analysis der Firma Amersham analysiert. Normalisierung auf Aktin ergab eine Reduktion des Phox2b-Signals um  $88,2\% \pm 7,8\%$  durch siPhox2b (siehe

Abb. 3.8, C). Diese Ergebnisse zeigen eine effiziente Reduktion des endogenen Phox2b-Proteinlevels nach siPhox2b-Transfektion.

### 3.1.7 PHOX2B-MUTANTEN STIMULIEREN DIE PROLIFERATION SYMPATHISCHER NEURONE

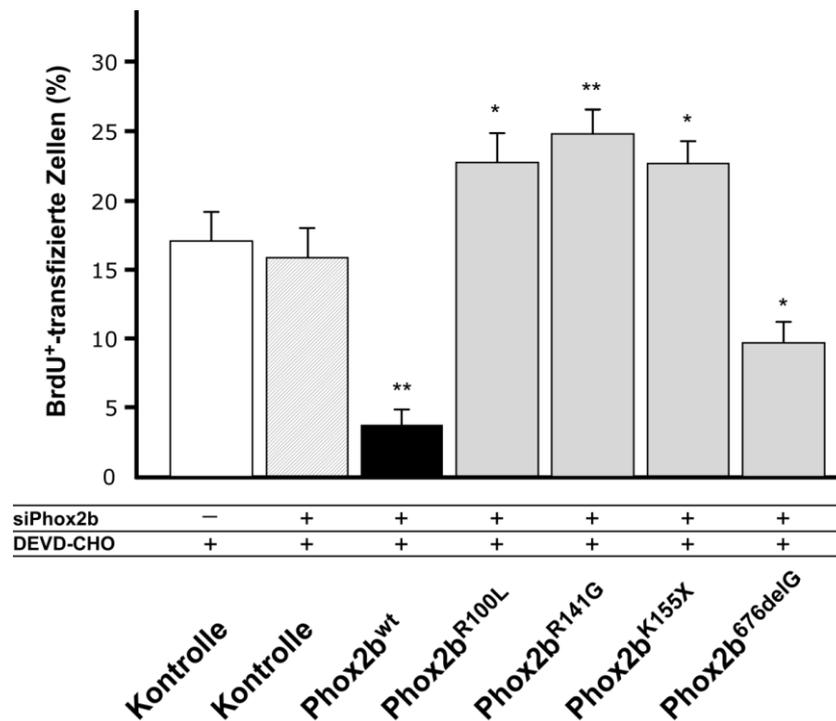
Neuroblastoma-Patienten mit Mutationen in Phox2b sind heterozygot und haben ein gesundes und ein mutiertes Phox2b-Allel. Um diese genetische Situation experimentell nachzustellen, wurde die endogene Phox2b-Protein Expression mit siPhox2b reduziert und die Phox2b-Varianten kotransfiziert.



**ABB. 3.9 BRDU-INKORPORATION IMMATURER SYMPATHISCHER NEURONENKULTUREN NACH SIMULTANER ÜBEREXPRESSION VON PHOX2B-VARIANTEN UND KNOCKDOWN DURCH SIPHOX2B.** E7-sympathische Neurone aus Huhnembryonen wurden mit Expressionsvektoren für Phox2b<sup>wt</sup>, Phox2b-Mutationen und siPhox2b kotransfiziert. Nach 48 h wurde die Anzahl BrdU<sup>+</sup>-transfizierter Zellen statistisch analysiert. Die Proliferationsrate transfizierter Neurone ist durch die Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent dargestellt. (signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen war bei mit siPhox2b und den Phox2b-Mutationen R100L, R141G und K155X kotransfizierten Kulturen signifikant erhöht. Eine Veränderung der Proliferationsrate durch siPhox2b wurde nicht festgestellt. Dasselbe gilt für Phox2b<sup>wt</sup> und Phox2b<sup>676delG</sup>.

Der Knockdown mit siPhox2b hat ebenfalls einen Effekt auf das Überleben der sympathischen Neuronen in Kultur (38% GFP<sup>+</sup>-Neurone verglichen mit Kontrollbedingungen). Die erhöhte Proliferationsrate könnte demnach durch einen Effekt auf das Zellüberleben erklärt werden. Dagegen spricht, dass der Überlebenseffekt weitestgehend durch Koexpression von Phox2b<sup>wt</sup>, Phox2b<sup>R100L</sup>, Phox2b<sup>R141G</sup> und Phox2b<sup>K155X</sup> kompensiert wird (87,3% ± 1,6%, 107% ± 2,8%, 101,8% ± 2,1% und 107,3% ± 4,1% GFP<sup>+</sup>-Neurone verglichen mit der Kontrollbedingung ohne siPhox2b).



**ABB. 3.10 BRDU-INKORPORATION IMMATURER SYMPATHISCHER NEURONENKULTUREN NACH ÜBEREXPRESSION VON PHOX2B-VARIANTEN, KNOCKDOWN DURCH SIPHOX2B UND APOPTOSE INHIBITION MIT DEVD-CHO.** E7-sympathische Neurone aus Huhnembryonen wurden mit Expressionsvektoren für Phox2b<sup>wt</sup>, Phox2b-Mutationen und siPhox2b kotransfiziert. Die Apoptose wurde mit DEVD-CHO (5 µM) blockiert. Nach 48 h wurde die Anzahl BrdU<sup>+</sup>-transfizierter Zellen statistisch analysiert. Die Proliferationsrate transfizierter Neurone ist durch die Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent dargestellt. (signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

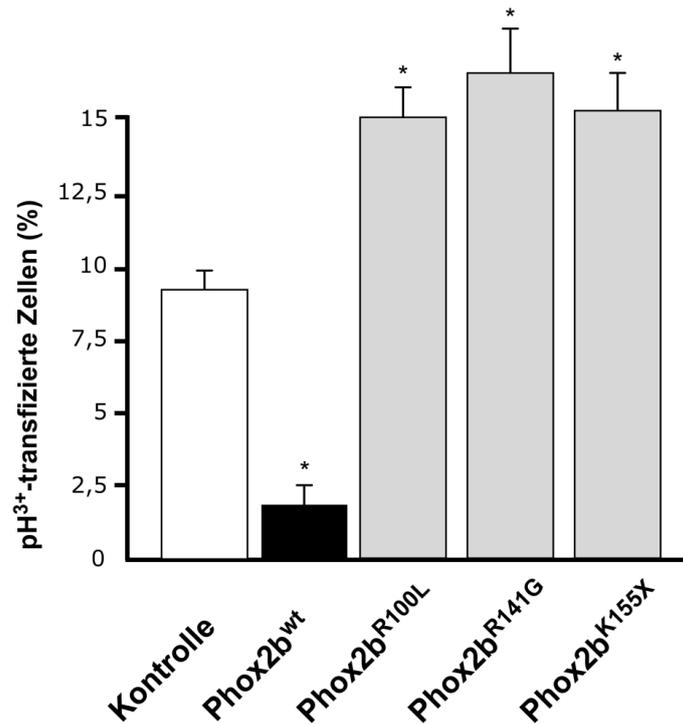
Weiterhin wurde das vorangegangene Experiment unter Apoptose-blockierenden Bedingungen wiederholt. Hierzu wurde DEVD-CHO ein zellpermeabler spezifischer Inhibitor der Caspase3 in einer Endkonzentration von 5 µM eingesetzt (Nicholson et al., 1995).

Die DEVD-CHO Applikation verminderte den siPhox2b-induzierten Effekt auf das Überleben weitestgehend auf 91,0% ± 8,1% (GFP<sup>+</sup>-Neurone). Der proliferationsstimulierende Effekt auf die Anzahl BrdU<sup>+</sup>-transfizierter Neurone

der Phox2b-Mutationen mit Veränderungen in der Homöodomäne (Phox2b<sup>HDmut</sup>) blieb jedoch erhalten (Phox2b<sup>R100L</sup>: 24,1% ± 2,5%, Phox2b<sup>R141G</sup>: 24,5% ± 1,7%, Phox2b<sup>K155X</sup>: 22,2% ± 1,7% zur Kontrolle: 15,9% ± 2,3%, siehe Abb. 3.10). Phox2b<sup>wt</sup> und Phox2b<sup>676delG</sup> zeigten signifikant erniedrigte Proliferationsraten (3,3% ± 0,9% und 8,6% ± 1,6%, siehe Abb. 3.10). Ein Überlebenseffekt als Ursache für den erhöhten Anteil an BrdU<sup>+</sup>-transfizierten Neuronen konnte durch diese Experimente weitestgehend ausgeschlossen werden.

BrdU markiert Zellen, die während der Dauer des BrdU-Pulses ihre DNA replizieren und sich somit in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Um auszuschließen, dass der Proliferationsanstieg durch Phox2b<sup>HDmut</sup> auf vermehrtem Zellzyklusarrest in der S-Phase beruht, wurde ein weiterer Marker proliferierender Zellen untersucht.

In der M-Phase des Zellzyklus werden bestimmte Aminosäuren (Ser<sup>10</sup>, Ser<sup>28</sup> und Thr<sup>11</sup>) des Histons H3 während der Chromosomenkonzentration phosphoryliert (Hendzel et al., 1997). Die Phosphorylierung des Histons 3 wurde immunhistochemisch mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Ser<sup>10</sup> an Histon 3 (pH<sup>3</sup>) nachgewiesen. Die Untersuchung von pH<sup>3</sup> als Marker für proliferierende Neurone in der M-Phase wurde unter denselben Bedingungen, wie in Abb. 3.10 beschrieben, durchgeführt. Die quantitative Analyse ergab ein ähnliches Profil. Phox2b<sup>HDmut</sup> erhöhen ebenfalls signifikant die Anzahl der pH<sup>3</sup>-positiven transfizierten sympathischen Vorläuferzellen (siehe Abb. 3.11). Eine Erhöhung der Zahl proliferierender Zellen durch Phox2b<sup>HDmut</sup> ist somit auch in der M-Phase nachzuweisen.



**ABB. 3.11 PROLIFERATION IMMATURER SYMPATHISCHER NEURONENKULTUREN NACH ÜBEREXPRESSION VON PHOX2B-VARIANTEN, KNOCKDOWN DURCH SIPHEROX2B UND APOPTOSE INHIBITION MIT DEVD-CHO.** E7-sympathische Neurone aus Huhnembryonen wurden mit Expressionsvektoren für Phox2b<sup>wt</sup>, Phox2b-Mutationen und siPhox2b kotransfiziert. Die Apoptose wurde mit DEVD-CHO (5 µM) blockiert. Nach 48 h wurde die Anzahl pH<sup>3+</sup>-transfizierter Zellen statistisch analysiert. Die Proliferationsrate transfizierter Neurone ist durch die Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent dargestellt. (signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

### 3.1.8 PROLIFERATIONSKONTROLLE IN SYMPATHISCHEN VORLÄUFERZELLEN

Neurogenese im ZNS und in einer Vielzahl der peripheren neuronalen Gewebe endet mit dem Austritt aus dem Zellzyklus (G<sub>0</sub>) und der Expression terminaler Differenzierungsgene. Die Neurone der paravertebralen sympathischen Grenzstränge des PNS bilden eine Ausnahme. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* teilen sich neuronale Vorläuferzellen trotz der Expression terminaler Differenzierungsgene (Rohrer und Thoenen, 1987; Tsarovina et al., 2008). Im zerebralen Kortex und in der Retina konnten zwei Zyklin-abhängige Kinase Inhibitoren (CKI), p27<sup>kip1</sup> und p57<sup>kip2</sup>, identifiziert werden, die zum Zellzyklusaustritt führen (Nguyen et al., 2006; Dyer und Cepko, 2001). Im PNS wurden bisher keine Untersuchungen zur Proliferationskontrolle durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Phox2a in Wachtel-Neuralleistenzellkulturen sowie in CAD-Zellen zusammen mit zyklischem AMP (cAMP) die Expression

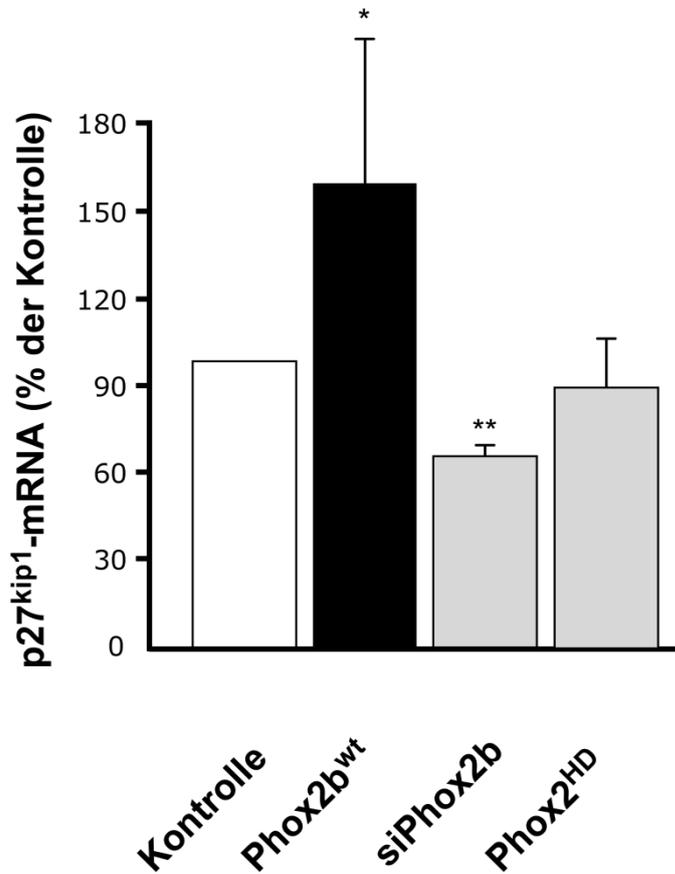
von  $p27^{kip1}$  stimuliert (Paris et al., 2006). Sowohl Phox2a- als auch  $p27^{kip1}$ -Überexpression führt in Kulturen paravertebraler sympathischer Neurone zu einer verringerten Anzahl BrdU-positiver Neurone (siehe Abb. 3.5). Zudem wirkt Phox2b antiproliferativ in NB-Zelllinien (Raabe et al., 2008).

Im Neuralrohr des Huhnes ist die Überexpression der Phox2-Homöodomäne ausreichend, um die Anzahl BrdU-positiver Zellen zu verringern (Dubreuil et al., 2000). Die Überexpression der Phox2-Homöodomäne wirkt in E7 SG-Kulturen mit siPhox2b-Knockdown antiproliferativ, während eine in die Phox2-Homöodomäne eingeführte Aminosäuren-Substitution gleich der R141G-Mutation weder antiproliferative noch proliferationsstimulierende Wirkung hat (Phox2<sup>HD</sup>: 3,4% ± 0,9%; Phox2<sup>HDR141G</sup>: 16,5% ± 1,5% zur Kontrolle: 15,2% ± 0,3% BrdU<sup>+</sup>-transfizierte Neurone). Der antiproliferative Effekt von Phox2b<sup>wt</sup> könnte auf einer antiproliferativen Wirkung der in Phox2a und Phox2b identischen Homöodomäne beruhen und zu erhöhter  $p27^{kip1}$ -Transkription führen (siehe Abb. 3.6, B). Um eine Regulation von  $p27^{kip1}$  auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurden semiquantitative RT-PCR Experimente durchgeführt. Hierfür wurde die mRNA mit Phox2b<sup>wt</sup>-, Phox2<sup>HD</sup>- oder siPhox2b-transfizierter Kulturen nach 48 h isoliert und mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA transkribiert.

Die Überexpression von Phox2b<sup>wt</sup> und der Knockdown mit siPhox2b zeigen einen reziproken Effekt auf die  $p27^{kip1}$ -Transkription. Phox2<sup>HD</sup> zeigt keinen Effekt auf die  $p27^{kip1}$ -Transkription (siehe Abb. 3.12) ebenso wie Überexpression der Phox2b<sup>K155X</sup>-Mutation (Daten nicht gezeigt). Da Phox2<sup>HD</sup> eine antiproliferative Wirkung auf E7 SG-Kulturen hat, ist der antiproliferative Effekt wahrscheinlich nicht durch  $p27^{kip1}$  vermittelt.

Der nah mit Phox2b verwandte Transkriptionsfaktor Phox2a reduziert ebenfalls stark die Proliferation in E7 SG-Kulturen (siehe Abb. 3.5). Mit RT-PCR und Immunfärbungen mit Phox2a-Antikörpern konnte jedoch keine Phox2a-Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In Folgeexperimenten wurde mit qPCR die Expression von Phox2a untersucht. Unter Verwendung derselben Primer und cDNA konnte nur sehr geringe Phox2a-Expression festgestellt werden (Ct<sub>Gapdh</sub>: 18 Zyklen, Ct<sub>Phox2a</sub>: 32 Zyklen). Auch Phox2b-Überexpression hatte keine signifikante Auswirkung auf die Phox2a-Expression

(Daten nicht gezeigt). Phox2a spielt demnach in der Proliferationskontrolle sympathischer Neurone keine Rolle.

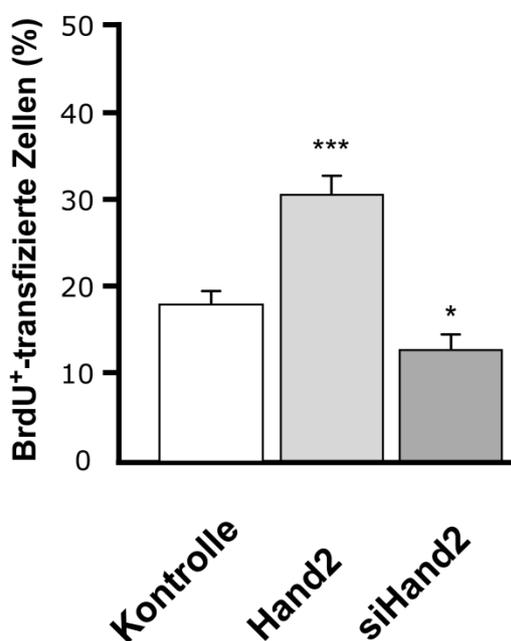


**ABB. 3.12 P27<sup>KIP1</sup>-MRNA-EXPRESSIONSLEVEL** E7 sympathische Neurone wurden mit pCAGGS-Phox2b<sup>wt</sup>, -Phox2b<sup>HD</sup> und siPhox2b transfiziert. Nach 48 h in Kultur wurde die mRNA isoliert und die Expressionslevel von p27<sup>kip1</sup> mit semiquantitativer RT-PCR durch Normalisieren auf GAPDH bestimmt. Das Expressionslevel der Kontrolltransfektion wurde auf 100% festgesetzt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent. (n=4; signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde während eines 12-wöchigen Praktikums das Projekt „The role of the transcription factor Phox2b in the proliferation control of sympathetic neurons“ von Sarah Melzer durchgeführt. Unter anderem war es Ziel dieses Projekts, Zellzyklusgene nach antiproliferativem Stimulus durch Phox2b-Überexpression zu untersuchen. Mit semiquantitativer RT-PCR wurde die Expression der Zykline D1, D2 und D3, sowie der Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p18, p21 und p57<sup>kip2</sup> in Kulturen sympathischer Vorläuferzellen nachgewiesen. Es konnten jedoch keine signifikant veränderten Expressionsniveaus nach Phox2b-Überexpression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt; siehe Praktikumsprotokoll Sarah Melzer).

### 3.1.9 DIE ROLLE VON HAND2 IN DER PROLIFERATION SYMPATHISCHER VORLÄUFERZELLEN

In Mäusen, bei denen der bHLH-Transkriptionsfaktor Hand2 konditionell in allen Neuralleistenabkömmlingen deletiert wird, ist die Anzahl proliferierender Neurone stark reduziert (Hendershot et al., 2008, Schmidt et al., 2009). Mit Hilfe von Überexpressions- und Knockdown-Experimenten wurde untersucht, ob Hand2 in die Proliferation immaturer sympathischer Neurone involviert ist.

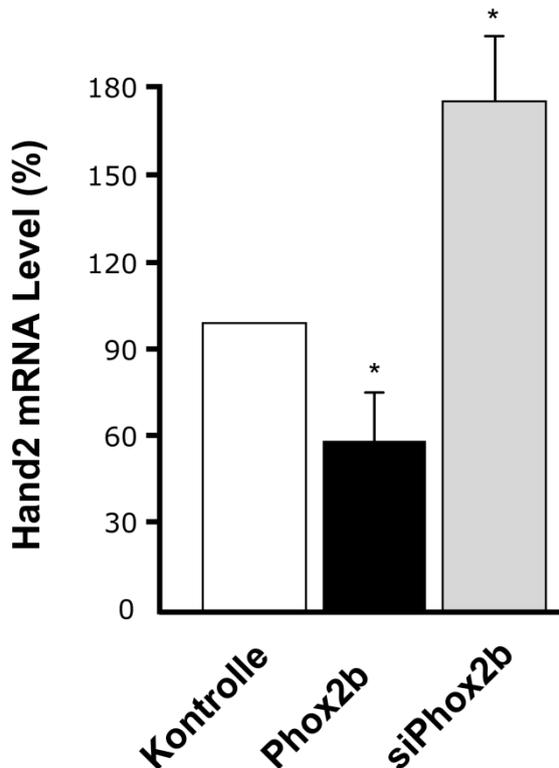


**ABB. 3.13 PROLIFERATION IMMATURER SYMPATHISCHER NEURONENKULTUREN NACH ÜBEREXPRESSION VON HAND2 UND KNOCKDOWN DURCH SIHAND2.** E7-sympathische Neurone aus Huhnembryonen wurden mit pCAGGS-Hand2 oder siHand2 transfiziert. Nach 48 h wurde die Anzahl BrdU<sup>+</sup>-transfizierter Neurone statistisch analysiert. Die Proliferationsrate transfizierter Neurone ist durch die Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent dargestellt. (signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

Hierfür wurden E7 SG nach der Präparation mit einem Überexpressionsvektor für Hand2 (pCAGGS-Hand2) oder mit Hand2-spezifischen siRNAs (siHand2) transfiziert. Die quantitative Analyse der BrdU-positiven transfizierten Neurone zeigte, dass die Proliferation von Hand2 abhängt. Nach Überexpression von Hand2 stieg die Anzahl proliferierender Neurone (30,1% ± 2,7%) und durch Reduktion der Hand2-Proteinlevel sank die Zahl auf 10,5 % ± 2,2%. Die Proliferation hängt somit von der Hand2-Proteinmenge ab (siehe Abb. 3.13).

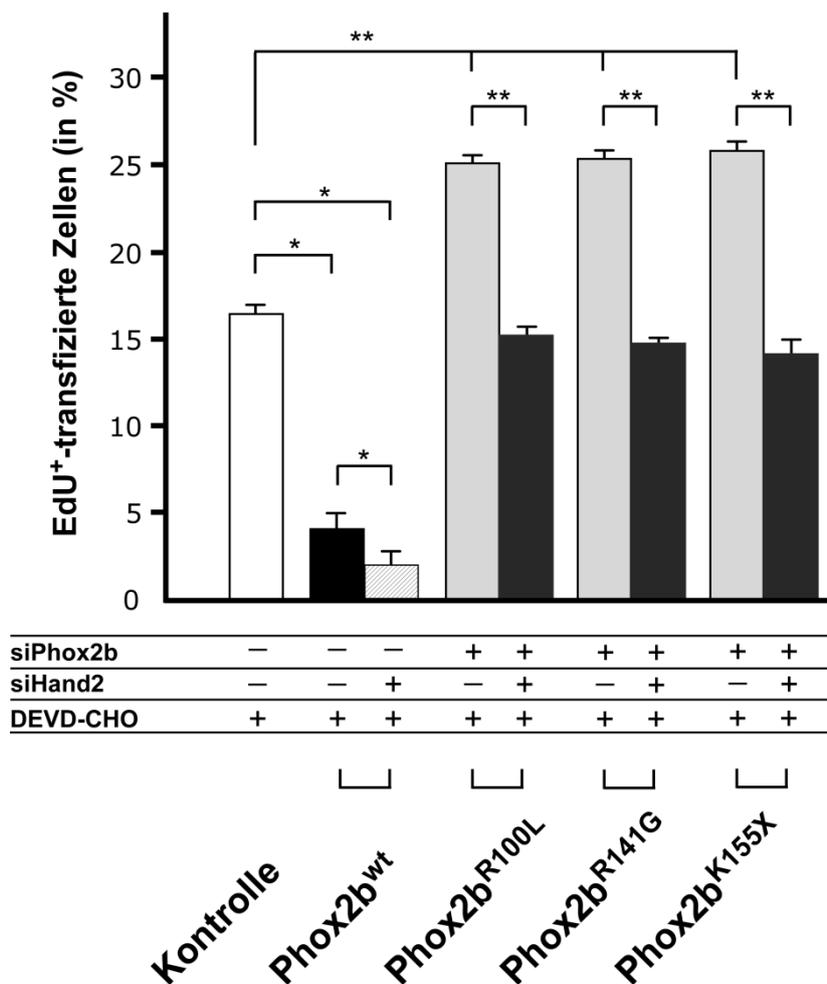
Es stellte sich die Frage, auf welcher Ebene die antagonistischen Effekte von Hand2 und Phox2b auf die Proliferation bewirkt werden. Diese Effekte könnten sowohl durch einen Antagonismus auf transkriptioneller Ebene als auch auf Wechselwirkungen beider Proteine entstehen. Um Veränderungen auf der

transkriptionellen Ebene zu verfolgen, wurden die mRNA-Level von *Hand2* nach Überexpression und Knockdown von *Phox2b* untersucht.



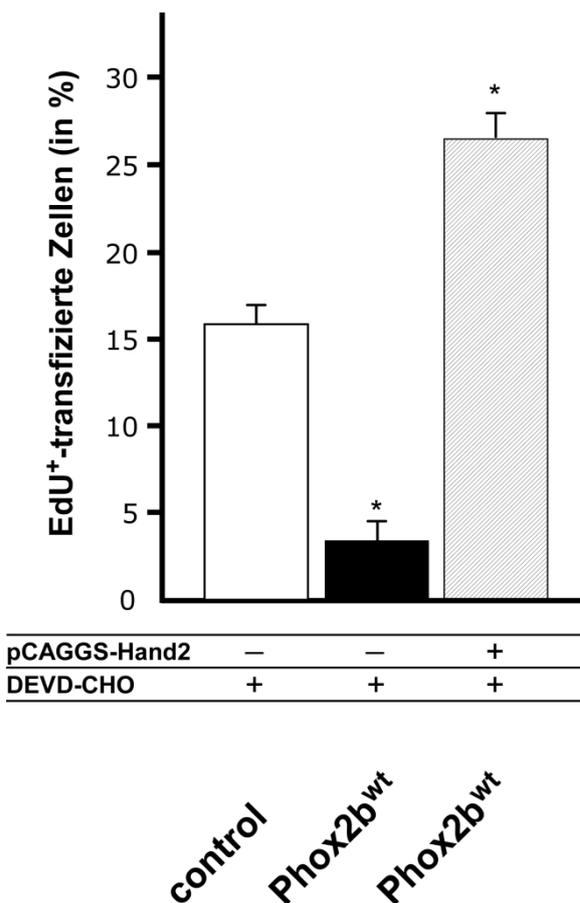
**ABB. 3.14 HAND2-MRNA-LEVEL** E7-sympathische Neurone wurden mit pCAGGS-Phox2b<sup>wt</sup> und siPhox2b transfiziert. Nach 48 h in Kultur wurde die mRNA isoliert und das Expressionslevel von *Hand2* mit semiquantitativer RT-PCR durch Normalisieren auf *Gapdh* bestimmt. Das Expressionslevel der Kontrolltransfektion wurde auf 100% festgesetzt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent. (n=5; signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

Überexpression von *Phox2b* hat verringerte *Hand2*-mRNA-Expression (59,9% ± 15,5%) zur Folge, während bei *Phox2b*-Knockdown das mRNA-Niveau von *Hand2* signifikant erhöht ist (172,0% ± 22,4%). Die Transkriptionsrate von *Hand2* ist somit invers abhängig vom *Phox2b*-Level. Jedoch zogen sowohl die Expression der antiproliferativ wirkenden *Phox2b*<sup>HD</sup> (92,4% ± 9,6%, p= 0,51) als auch die proliferationsstimulierende Expression von *Phox2b*<sup>K155X</sup> in Gegenwart von siPhox2b keine signifikanten Änderungen im *Hand2*-Expressionslevel nach sich (219,6% ± 59,4%, p= 0,18). Andererseits ist der proliferationsstimulierende Effekt der *Phox2b*<sup>HDmut</sup>, wie in Abb. 3.15 gezeigt, von *Hand2* abhängig. E7-sympathische Vorläuferzellen wurden sowohl mit siPhox2b, als auch mit *Phox2b*<sup>HDmut</sup> transfiziert (siehe Abb. 3.15, graue Balken). Die schwarzen Balken stellen den zusätzlichen Knockdown von *Hand2* mit siHand2 dar.



**ABB. 3.15 PROLIFERATION IMMATURER SYMPATHISCHER NEURONENKULTUREN NACH ÜBEREXPRESSION VON PHOX2B-VARIANTEN, KNOCKDOWN DURCH SIPHOX2B UND APOPTOSE INHIBITION MIT DEVD-CHO.** E7-sympathische Neurone aus Huhnembryonen wurden mit Expressionsvektoren für Phox2b<sup>wt</sup>, Phox2b-Mutationen siHand2 und siPhox2b kotransfiziert. Die Apoptose wurde mit DEVD-CHO (5µM) blockiert. Nach 48 h wurde die Anzahl EdU<sup>+</sup>-transfizierter Zellen statistisch analysiert. Die Proliferationsrate transfizierter Neurone ist durch die Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent dargestellt. (signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

Der ursprünglich proliferationsstimulierende Effekt der Phox2b<sup>HDmut</sup> in Kombination mit siPhox2b ist bei gleichzeitigem Hand2-Knockdown nicht mehr festzustellen. Zusätzlich verstärkt siHand2 den antiproliferativen Effekt von Phox2b<sup>wt</sup> (vergleiche Abb. 3.15, schwarze/hellgraue Balken). Aus diesem Experiment ergab sich die Fragestellung, ob verstärkte Hand2-Expression den antiproliferativen Effekt von Phox2b<sup>wt</sup> aufheben kann. Hierfür wurden E7 SG-Primärkulturen mit Expressionsplasmiden für Phox2b<sup>wt</sup> und Hand2 transfiziert und die Proliferation analysiert.

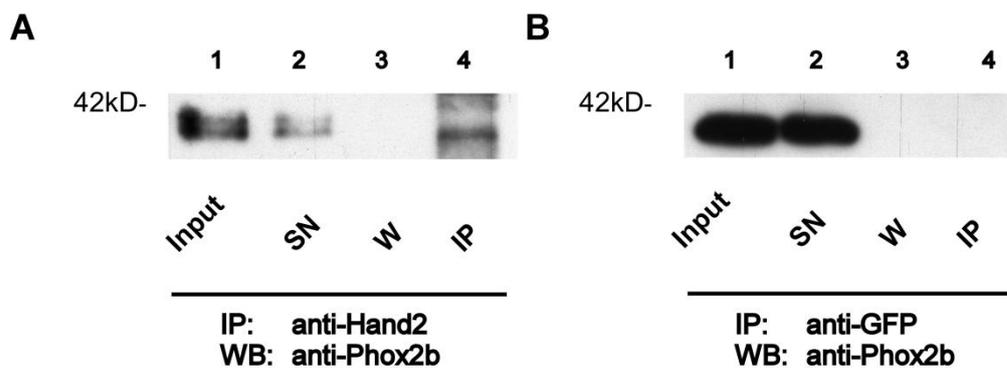


**ABB. 3.16 PROLIFERATION IMMATURER SYMPATHISCHER NEURONENKULTUREN NACH ÜBEREXPRESSION VON PHOX2B, HAND2 UND APOPTOSE INHIBITION MIT DEVD-CHO.** E7-sympathische Neurone aus Huhnembryonen wurden mit Expressionsvektoren für Phox2b<sup>wt</sup> und Hand2 transfiziert. Die Apoptose wurde mit DEVD-CHO (5 µM) blockiert. Nach 48 h wurde die Anzahl EdU<sup>+</sup>-transfizierter Zellen statistisch analysiert. Die Proliferationsrate transfizierter Neurone ist durch die Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent dargestellt. (signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001)

Die Transfektion einer vierfach höheren Konzentration an Hand2-Expressionsplasmiden (2 µg pCAGGS-Hand2 / 0,5 µg pCAGGS-Phox2b<sup>wt</sup>) zeigte einen signifikanten Proliferationsstimulus. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass sich die Effekte von Phox2b<sup>wt</sup> und Hand2 direkt Dosisabhängig antagonisieren (vergleiche Abb. 3.13, Abb. 3.15 und Abb. 3.16). Phox2b<sup>HDmut</sup> zeigen dagegen keinen antagonistischen Effekt auf die Proliferation sympathischer Vorläuferzellen, ihr proliferationsstimulierender Effekt hängt jedoch von der Hand2 Proteinmenge ab (siehe Abb. 3.15).

Für den zu Phox2b eng verwandten Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Phox2a konnte eine direkte Protein-Interaktion mit Hand2 nachgewiesen werden (Rychlik et al., 2003). Es sollte nun untersucht werden, ob die unterschiedlichen Effekte von Phox2b<sup>wt</sup>/Hand2 und Phox2b<sup>HDmut</sup>/Hand2 auf die Proliferation sympathischer Vorläuferzellkulturen auf veränderten Protein-Protein-Interaktionen beruhen. Hierfür wurde eine Kompleximmunpräzipitation von Phox2b und Hand2 durchgeführt. Lysate von SY5Y-Neuroblastomazellen

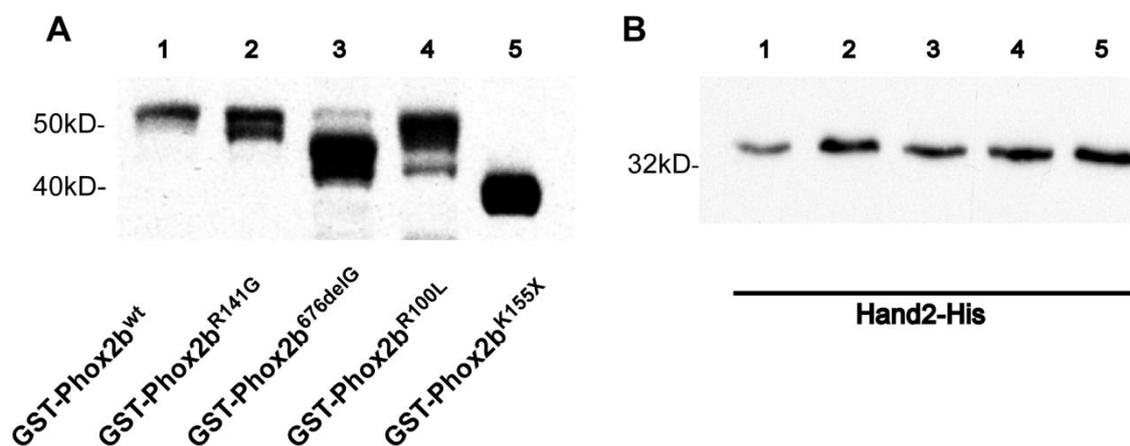
wurden über Nacht mit Hand2-Antikörpern inkubiert und kovalent an Protein-G-Agarose Kugeln gebunden (siehe Abb. 3.17, Input: Zelllysate, SN: Überstand nach Bindung an Protein-G-Agarose Kugeln, W: Überstand nach vier Waschschritten, IP: Immunopellet enthält über Hand2 gebundene Proteine).



**ABB. 3.17 KOMPLEXIMMUNOPRÄZIPITATION VON HAND2 UND PHOX2B** Lysate von SY5Y-Neuroblastomazellen wurden mit Hand2(A) bzw. GFP(B)-Antikörpern inkubiert und kovalent an Protein-G-Agarose Kugeln gebunden. Nach wiederholtem Waschen wurde über Western-Blot (A,B) überprüft, ob Phox2b im Immunopellet (IP) präzipitiert wurde. (Input: Zelllysate, SN: Überstand nach Bindung an Protein-G-Agarose Kugeln, W: Überstand nach 4 Waschschritten, IP: Immunopellet enthält über Hand2 gebundene Proteine)

Nach mehrmaligem Waschen der Protein-G-Agarose Kugeln erfolgte ein Western-Blot des Immunopellets und der Kontrollen für Input, SN und W mit Antikörpern gegen Phox2b (siehe Abb. 3.17, A). Als Negativkontrolle wurde parallel sowohl mit Protein-G-Agarose Kugeln allein (nicht gezeigt) als auch mit Antikörpern gegen GFP immunopräzipitiert (siehe Abb. 3.17, B) und ein Western-Blot mit Phox2b-Antikörpern durchgeführt. Im Immunopellet der Lysate, die mit Hand2 präzipitiert wurden, konnte Phox2b im Western-Blot über Antikörper nachgewiesen werden. Beide Negativkontrollen zeigten keine Phox2b-Immunreaktivität (nicht gezeigt bzw. siehe Abb. 3.17, B). Die Transkriptionsfaktoren Phox2b und Hand2 liegen demnach in einem Proteinkomplex in SY5Y-Neuroblastomazellen vor. Um eine putative direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen Phox2b und Hand2 zu untersuchen, wurden von Phox2b<sup>wt</sup> und Phox2b<sup>mut</sup> GST-Fusionskonstrukte (Glutathion-S-Transferase) in den pGEX5\_1-Vektor kloniert. Zusätzlich wurde Hand2 in den pRSETA-Vektor kloniert, der ein C-Terminales His-tag an das Hand2-Protein anhängt. Beide Vektoren erlauben die Expression von Proteinen in BL21-

Bakterien. Nach der Isolation der Proteine werden im Bindungsassay zunächst die GST-Fusionsproteine von Phox2b<sup>wt</sup> und Phox2b<sup>mut</sup> an Glutathion-beschichtete Kugeln gebunden und anschließend mit Hand2-His-Fusionsproteinen inkubiert.



**ABB. 3.18 GST-PULLDOWN VON PHOX2B-VARIANTEN UND HAND2** GST-Fusionsproteine verschiedener Phox2b-Varianten wurden erst an Glutathion-Kugeln gebunden und anschließend mit Hand2-His Fusionsproteinen inkubiert. Im Western-Blot wurde zunächst die Expression der GST-Fusionsproteine mit Hilfe von GST-Antikörpern untersucht (A) und anschließend die Bindung von Hand2 über Antikörper gegen His nachgewiesen (B).

Zuerst wurde die Expression der Phox2b-Varianten mit Hilfe von GST-Antikörpern im Western-Blot untersucht (siehe Abb. 3.18, A). Sämtliche GST-Phox2b-Varianten wurden exprimiert und zeigten korrekte Proteingrößen (GST: ~26kD, Phox2b: ~32kD). Die anschließende Analyse mit His-Tag-Antikörpern im Western-Blot zeigte, dass sämtliche GST-Phox2b-Fusionsproteine Hand2-His binden (siehe Abb. 3.18, B). Als Negativkontrollen dienten Glutathion-beschichtete Kugeln alleine und das reine GST-Protein an Glutathion-beschichteten Kugeln die mit Hand2-His Fusionsproteinen inkubiert wurden. Weder die Glutathion-Kugeln alleine noch GST-Protein zeigten Hand2-His Bindung in der Western Blot Analyse mit Hand2-Antikörpern (nicht gezeigt). In späteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass ein GST-Fusionsprotein, bestehend aus der Phox2-Homöodomäne und GST, ebenfalls in der Lage ist, Hand2 zu binden (nicht gezeigt).

Durch Komplex-Immünpräzipitation und GST-Pulldown konnte somit gezeigt werden, dass es eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen Phox2b und

Hand2 gibt. Diese Interaktion wird, zumindest zum Teil, zwischen der identischen Homöodomäne von Phox2a/b und Hand2 vermittelt. Die Interaktionsdomäne im Hand2-Protein ist unklar (Eigene Daten und Rychlik et al., 2003).

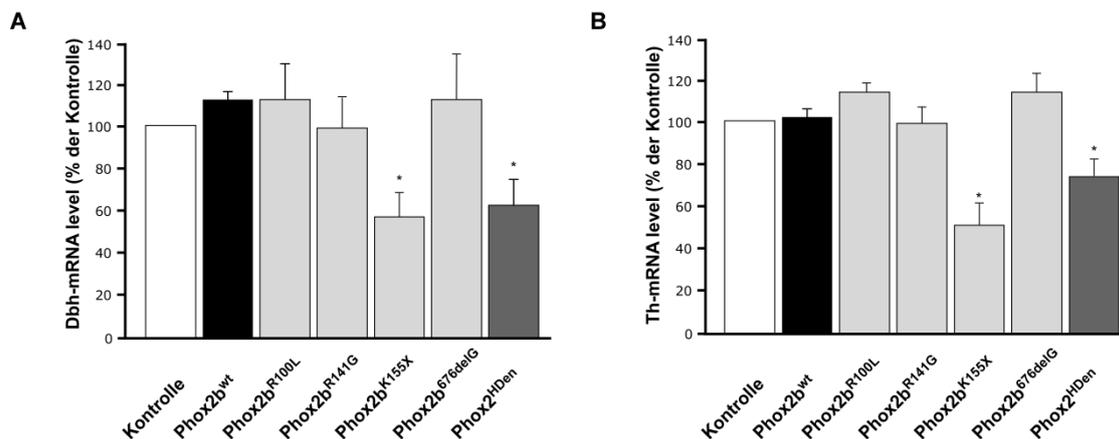
Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass Phox2b<sup>wt</sup> in E7 Huhn- und E12 Maus-Primärkulturen sympathischer Neurone stark antiproliferativ wirkt. Diesen Effekt haben alle NB-Phox2b Mutationen verloren. Bei gleichzeitigem Knockdown von endogenem Phox2b stimulieren Phox2b<sup>HDmut</sup> die Proliferation und dieser Effekt ist von dem Transkriptionsfaktor Hand2 abhängig. Überexpression von Hand2 wirkt proliferationsstimulierend, während Hand2-Knockdown die Proliferationsrate reduziert. Zudem konnte eine direkte Protein-Protein-Interaktion von Phox2b-Varianten und Hand2 nachgewiesen werden. Der Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor p27<sup>kip1</sup> und das eng mit Phox2b verwandte Phox2a scheinen in der Proliferationskontrolle von E7 SG-Neuronen keine Rolle zu spielen.

### 3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON PHOX2B UND NEUROBLASTOMA-PHOX2B-MUTATIONEN IN DER DIFFERENZIERUNG SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN

Frühe Arbeiten über die Funktion des Transkriptionsfaktors Phox2b beschäftigten sich hauptsächlich mit dessen Rolle in der frühen Differenzierung sympathoadrenerger Vorläuferzellen. So konnte gezeigt werden, dass Phox2b essentiell für die Entwicklung des autonomen Nervensystems ist und in sympathoadrenergen Vorläuferzellen die Expression der Differenzierungsmarker DBH und TH reguliert (Pattyn et al., 1999, Lo et al., 1999, Yang et al., 1998). NB zeigen eine sehr unterschiedliche Expression von Differenzierungsmarkern sympathoadrenerger Neurone. Interessanterweise korreliert eine niedrige DBH- und TH-Expression mit undifferenzierten, aggressiven Formen des NB (Bourdeaut et al., 2009). Es war daher von großem Interesse zu untersuchen, inwiefern Phox2b-Mutationen Einfluss auf die Expression dieser Differenzierungsmarker haben. Zusätzlich zu DBH und TH sollten weitere bekannte Phox2b-regulierte Gene untersucht werden. Ein weiteres Gen, das direkt von Phox2b reguliert wird, ist der Transkriptionsfaktor Tlx2 (Borghini et al., 2006). Tlx2 findet sich in Neuralleistenzellabkömmlingen und ist u.a. in enterischen Ganglien und parasymphatischen Ganglien des Herzens exprimiert (Shirasawa et al., 1997). Als weiteres Differenzierungsmerkmal sollten zwei weitere NB-relevante Marker untersucht werden. Eine erhöhte Expression der Neurotrophinrezeptoren p75 und trkA korreliert mit hohem Differenzierungsgrad des NB und somit einer guten Prognose von NB-Patienten (Nakagawara et al., 1993; Kogner et al., 1993).

Um die Effekte von Phox2b-Mutationen auf den Differenzierungsstatus immaturer, sympathischer Vorläuferzellen zu analysieren, wurden, wie für die Proliferationsuntersuchungen, E7 SG-Primärkulturen mit den unterschiedlichen Phox2b-Varianten transfiziert. Ursprünglich sollten die Auswirkungen der Phox2b-Mutationen sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene analysiert werden. Eine Untersuchung auf Proteinebene war jedoch aufgrund der geringen Menge an Zellmaterial nicht möglich. Im Folgenden werden die Analysen auf Transkriptomebene gezeigt. Nach der Transfektion wurden die immaturren, sympathischen Neurone für zwei Tage kultiviert. Auf die

Isolation der mRNA und cDNA-Transkription folgte die Genexpressionsanalyse mit semiquantitativer RT-PCR. Anschließend wurden die Banden anhand der Digitalfotographie des Agarosegels densitometrisch analysiert und auf die Gleichladungskontrolle *Gapdh* normalisiert. Zunächst wurde der noradrenerge Differenzierungsstatus untersucht.

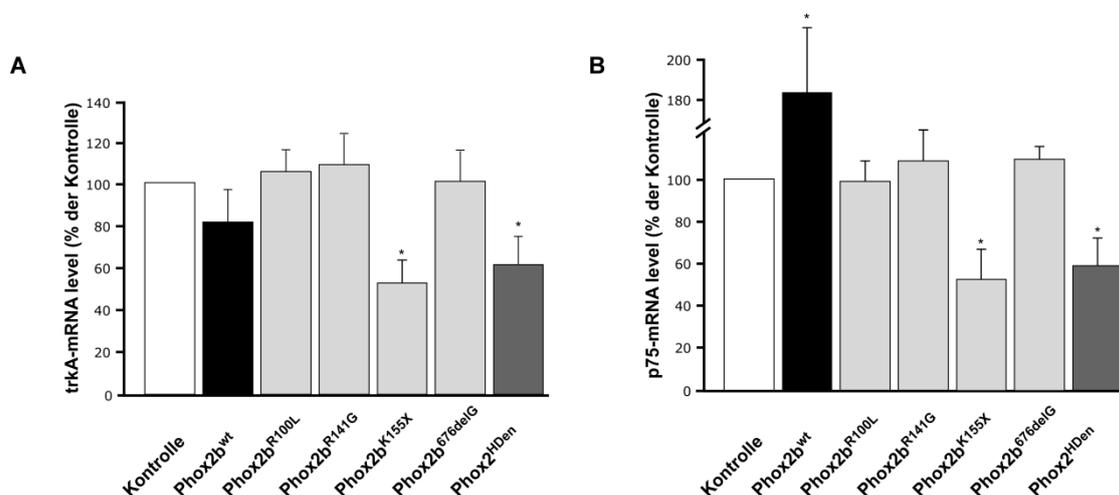


**ABB. 3.19 DBH- UND TH-MRNA-EXPRESSIONSLEVEL** E7 sympathische Neurone wurden mit pCAGGS-Phox2b<sup>wt</sup>, -Phox2b-Mutationen und Phox2<sup>HDen</sup> transfiziert. Nach 48 h in Kultur wurde die mRNA isoliert und die Expressionslevel von *Dbh* (A) und *Th* (B) mit semiquantitativer RT-PCR durch Normalisieren auf *Gapdh* bestimmt. Das Expressionslevel der Kontrolltransfektion (pCAGGS-eGFP) wurde auf 100% festgesetzt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent. (n=3; signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

Die trunkierte Phox2b<sup>K155X</sup>-Mutation reduziert die *Dbh*- und *Th*-mRNA-Level (siehe Abb. 3.19, A bzw. B). Diese Effekte sind vergleichbar mit denen von Phox2<sup>HDen</sup>, einem dominant-negativem Fusionsprotein, bestehend aus Phox2-Homöodomäne und dem Drosophila Engrailed-Repressor. Die Transfektion von Phox2b<sup>wt</sup> und der NB-Varianten Phox2b<sup>R100L, R141G</sup> und <sup>676delG</sup> hatte keinen Einfluss auf die Expression von *Dbh* und *Th*. Zusätzlich wurde TH mit Immunfluoreszenzfärbungen auf Proteinebene untersucht. Phox2b<sup>K155X</sup> und Phox2<sup>HDen</sup> reduzierten auch auf Proteinebene die Anzahl TH<sup>+</sup>-transfizierter Zellen (Phox2b<sup>K155X</sup>: 24,4% ± 4,4%; Phox2<sup>HDen</sup>: 32,3% ± 5,4%, n=3). Die Anzahl TH<sup>+</sup>-transfizierter Zellen blieb bei Phox2b<sup>wt</sup> und Phox2b<sup>R141G</sup>-Überexpression unverändert.

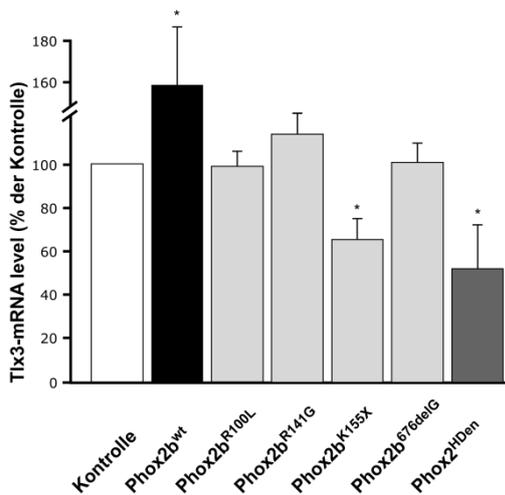
Im Anschluss wurde die Expression der NB-Markergene *trkA* und *p75* untersucht. Das Expressionsniveau des Neurotrophinrezeptors *trkA*, als auch

des *p75*-Rezeptors wird von *Phox2b*<sup>K155X</sup> und *Phox2*<sup>HDen</sup> signifikant reduziert (siehe Abb. 3.20, A bzw. B). Zusätzlich erhöht die Transfektion von *Phox2b*<sup>wt</sup> das *p75*-mRNA-Niveau (185,9% ± 35,0%, siehe Abb. 3.20, B).



**ABB. 3.20 *TRKA* UND *P75* MRNA-EXPRESSIONSLEVEL** E7 sympathische Neurone wurden mit pCAGGS-*Phox2b*<sup>wt</sup>, -*Phox2b*-Mutationen und *Phox2*<sup>HDen</sup> transfiziert. Nach 48 h in Kultur wurde die mRNA isoliert und die Expressionslevel von *trkA* (A) und *p75* (B) mit semiquantitativer RT-PCR durch Normalisieren auf *Gapdh* bestimmt. Das Expressionslevel der Kontrolltransfektion (pCAGGS-eGFP) wurde auf 100% festgesetzt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent. (n=3; signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

Schließlich wurde mit *Tlx3* ein bekanntes, direktes Zielgen von *Phox2b* analysiert. *Tlx3* im Huhn ist das orthologe Gen zu humanem *Tlx2*. Die Genexpressionsanalyse von *Tlx3* zeigte ein ähnliches Bild wie *p75*. *Phox2b*<sup>K155X</sup> sowie *Phox2*<sup>HDen</sup> reduzieren signifikant die Expression von *Tlx3*, und *Phox2b*<sup>wt</sup> steigert das *Tlx3*-Expressionslevel (156,0% ± 27,1%, siehe Abb. 3.21). Weiterhin soll, der Vollständigkeit halber hier erwähnt werden, dass die NB-Marker *trkB*, *trkC*, *Mina53*, *Ndr1* untersucht wurden (nicht gezeigt). Die Analysen durch semiquantitative RT-PCR blieben jedoch ohne signifikantes Resultat. Zudem wurde die Expression von *Id2* und dem Protoonkogen *MYCN* per RT-PCR untersucht. Beide Gene konnten in Kulturen sympathischer Vorläuferzellen nach 40 Zyklen nicht detektiert werden.

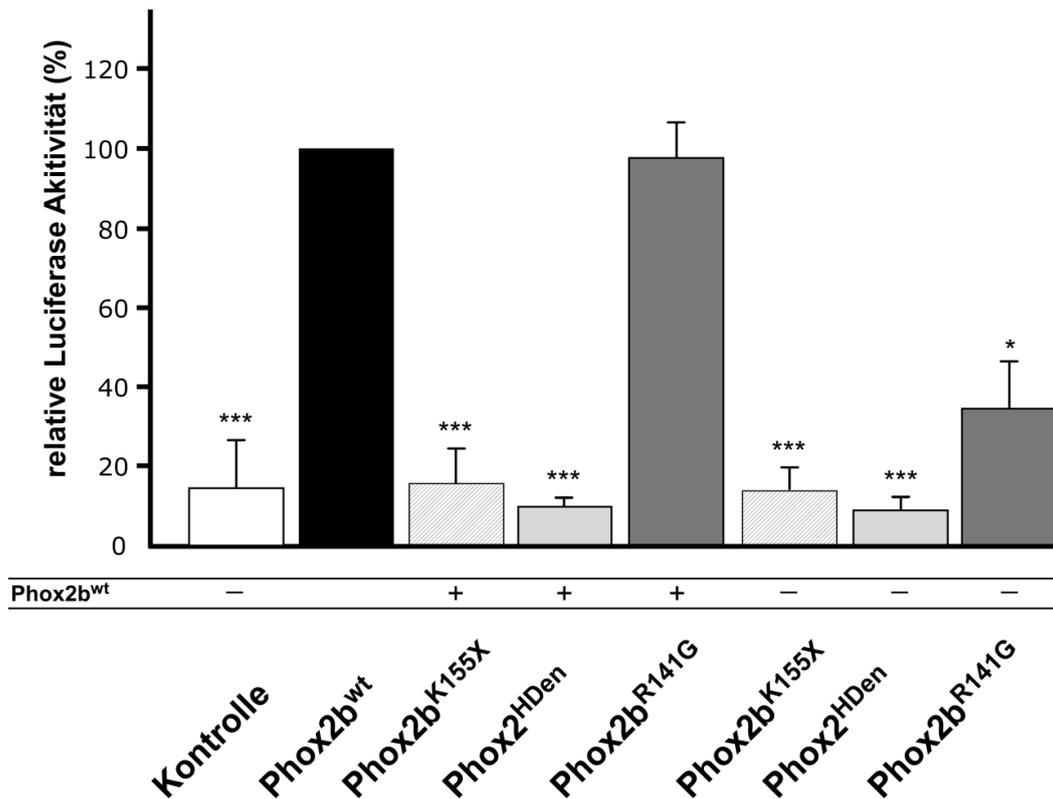


**ABB. 3.21 TLX3-MRNA-EXPRESSIONSLEVEL** E7 sympathische Neurone wurden mit pCAGGS-Phox2b<sup>wt</sup>, Phox2b-Mutationen und Phox2<sup>HDen</sup> transfiziert. Nach 48 h in Kultur wurde die mRNA isoliert und das Expressionslevel von *Tlx3* mit semiquantitativer RT-PCR durch Normalisieren auf *Gapdh* bestimmt. Das Expressionslevel der Kontrolltransfektion (pCAGGS-eGFP) wurde auf 100% festgesetzt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent. (n=3; signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

### TRANSAKTIVIERUNGSAKTIVITÄT AM PROMOTOR DER DBH

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen zusammengefasst eine dominant-negative Funktion von Phox2b<sup>K155X</sup> auf bestimmte Zielgene vergleichbar mit dem dominant-negativen Konstrukt Phox2<sup>HDen</sup>. Diese dominant-negative Funktion wurde in Luciferase-Assays weiter analysiert. Hierzu wurden DF1-Huhnfibroblasten mit den pCAGGS-Expressionsvektoren für Phox2b<sup>wt</sup>, Phox2b<sup>R141G</sup>, Phox2b<sup>K155X</sup> oder Phox2<sup>HDen</sup> und einem Promotorfragment der *Dbh* gekoppelt mit dem Luciferase-Gen transfiziert (Swanson et al., 2000). Als Negativkontrolle diente pCAGGS-eGFP. Die Transaktivierung des *Dbh*-Promotorfragments durch Phox2b-Varianten führt zur Transkription des Luciferase-Gens und zu, der Transaktivierungsaktivität entsprechenden, Mengen an Luciferase, die mit dem Glomax-Luminometer bestimmt werden.

Die Transaktivierungsaktivität von Phox2b<sup>wt</sup> wurde in Abb. 3.22 (schwarzer Balken) auf 100% festgelegt. Phox2b<sup>K155X</sup> und Phox2<sup>HDen</sup> reprimieren den von Phox2b<sup>wt</sup> induzierten Transaktivierungseffekt. Die Phox2b<sup>R141G</sup>-Mutation kann diesen Effekt nicht antagonisieren. Ohne Kotransfektion von Phox2b<sup>wt</sup> zeigen Phox2b<sup>K155X</sup>, Phox2<sup>HDen</sup>, Phox2b<sup>R141G</sup> (siehe Abb. 3.22), Phox2b<sup>R100L</sup> und Phox2b<sup>676delG</sup> eine geringe Transaktivierungsaktivität am *Dbh*-Promotor (Phox2b<sup>R100L</sup>: 70,8%, Phox2b<sup>676delG</sup>: 38,3%, Daten nicht gezeigt). Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits in vorherigen Studien erzielt (Trochet et al., 2009).



**ABB. 3.22 RELATIVE DBH-LUCIFERASE-AKTIVITÄT VON PHOX2B VARIANTEN** DF1-Huhnfibroblasten wurden mit pCAGGS-eGFP, -Phox2b<sup>wt</sup>, -Phox2b<sup>K155X</sup>, -Phox2<sup>HDen</sup> oder -Phox2b<sup>R141G</sup> und Dbh-Luciferase kotransfiziert. Um den dominant-negativen Effekt von Phox2b<sup>K155X</sup> und Phox2<sup>HDen</sup> zu analysieren, wurde Phox2b<sup>wt</sup> (Säule 3,4 und 5) in äquivalenter Menge kotransfiziert. Die Transaktivierungsaktivität von Phox2b<sup>wt</sup> wurde auf 100% festgesetzt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Prozent. (n≥4; signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*-p≤0,05; \*\*-p≤0,01; \*\*\*-p≤0,001).

Zusammengefasst konnte durch Luciferase-Assays und semiquantitative RT-PCRs gezeigt werden, dass alle untersuchten NB-Phox2b-Mutationen die transaktivierende Eigenschaft von Phox2b<sup>wt</sup> verloren haben (siehe Abb. 3.20 (B), Abb. 3.21, Abb. 3.22). Darüber hinaus reduziert die Phox2b<sup>K155X</sup>-Mutation die Expression der noradrenergen Marker *Th* und *Dbh*, der Neuroblastomamarker *trkA* und *p75* und die Expression des direkten Phox2b-Zielgens *Tlx3* im selben Umfang wie ein dominant-negatives Phox2-Konstrukt.

## 4 DISKUSSION

Das Neuroblastom (NB) ist ein neuroendokriner Tumor, der von Zellen des autonomen Nervensystems abstammt. NB entstehen meist entlang der paravertebralen, sympathischen Grenzstränge oder in der Nebenniere (Roy et al., 2009). Mutationen im Gen des Homöodomänen-Transkriptionsfaktors Phox2b prädisponieren zur Karzinogenese des NB (Mosse et al., 2004, Amiel et al., 2003, Garcia-Barcelo et al., 2003). Phox2b spielt in der Entwicklung autonomer Nervenzellen eine essentielle Rolle. In Phox2b-defizienten Mäusen wird die Entwicklung aller sympathischen, parasympathischen und enterischen Ganglien vollständig unterbunden (Pattyn et al., 1999). Spätere Arbeiten im embryonalen Neuralrohr des Huhns zeigten, dass Phox2b zusätzlich eine Rolle in der Proliferationskontrolle einnimmt (Dubreuil et al., 2002; Raabe et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Kulturen sympathischer Vorläuferzellen die molekularen Konsequenzen von Phox2b-Mutationen auf Proliferations- und Differenzierungsverhalten dieses Zelltyps untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in der Phox2b-Homöodomäne zu proliferationsstimulierenden Isoformen führen. Dementgegen wirkt das Wildtyp-Protein antiproliferativ. Ein genereller Einfluss der Phox2b-Mutationen auf das Differenzierungsverhalten konnte nicht festgestellt werden. Das Transaktivierungsvermögen aller Phox2b-Mutanten ist jedoch stark vermindert. Eine C-terminal trunke Phox2b-Mutante führte zur Dedifferenzierung sympathischer Vorläuferzellen, vergleichbar mit den molekularen Konsequenzen eines dominant-negativen Phox2b-Fusionsproteins.

#### 4.1 PRIMÄRKULTUREN SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN ALS MODELLSYSTEM FÜR PROLIFERATIONSUNTERSUCHUNGEN

Die Untersuchungen zur Rolle von Phox2b und NB-Phox2b-Mutationen wurden in Primärkulturen paravertebraler, sympathischer Grenzstränge des Huhns durchgeführt. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sympathische Vorläuferzellen aus E7-Huhnembryonen *in vitro* proliferieren und auf Proliferationsstimuli reagieren (Rohrer und Thoenen, 1987; Zackenfels et al., 1995, Straub et al., 2007). Untersuchungen von Proliferationseffekten anhand von Primärkulturen haben gegenüber den häufig in der Onkologie eingesetzten Tumorzelllinien entscheidende Vorteile. Zum Einen werden die Primärkulturen paravertebraler, sympathischer Vorläuferzellen direkt *ex vivo* präpariert und stellen die Ausgangszellpopulation des Neuroblastoms dar (Alam et al., 2009). Zum Anderen handelt es sich bei Tumorzelllinien um bereits entartete Zellen, die meist aus sekundärem Tumorgewebe entnommen wurden. So sind diese Zellen immortalisiert, d.h. essentielle Mechanismen der Proliferationskontrolle sind bereits nicht mehr funktionstüchtig oder verändert. Zusätzlich ist auch die Genexpression von Differenzierungsmarkern in den häufig verwendeten NB-Zelllinien sehr unterschiedlich. Beispielsweise ist Phox2a, für das eine Rolle in der Proliferationskontrolle der noradrenergen CAD-Zelllinie gezeigt wurde, nicht in allen NB-Zelllinien exprimiert (Paris et al., 2006; de Pontual et al., 2007; J. Amiel, CCHS-Meeting, Sestri Levante). Über die Analyse der BrdU-Inkorporation nach Phox2a-Überexpression konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Primärkulturen sympathischer Vorläuferzellen Phox2a antiproliferativ wirkt. Zeigen Faktoren die in der NB-Progression und –Proliferation involviert sind ebenfalls Proliferationseffekte in primären sympathischen Vorläuferzellen? Proliferationsstimulierende Effekte konnten für das Neurotrophin BDNF sowie MYCN und Id2 nachgewiesen werden. BDNF ist der Ligand des trkB-Rezeptors und wurde bereits in einer früheren Arbeit als proliferationsfördernder Stimulus in Kulturen sympathischer Vorläuferzellen identifiziert (Straub et al., 2007). Interessanterweise haben trkB-exprimierende NB häufig MYCN-Amplifikation und exprimieren BDNF, welches parakrin oder autokrin zum Überleben, zur Arzneimittelresistenz und zur Angiogenese dieser Tumore beiträgt (Brodeur et

al., 2009). Das Expressionsniveau von *trkB* ist in Kulturen sympathoadrenerger Vorläuferzellen nicht betroffen. Die Expression von BDNF wurde nicht untersucht. MYCN ist ein in aggressiven NB amplifiziertes Protoonkogen und korreliert mit fortgeschrittenem Stadium und schneller Tumorprogression (Rubie et al., 1997). Mäuse, in denen MYCN zelltypspezifisch unter dem TH-Promotor verstärkt exprimiert wird, entwickeln allein durch diese artifizielle MYCN-Amplifikation Neuroblastome (Weiss et al., 1997). Über die molekularen Konsequenzen der MYCN-Amplifikation ist wenig bekannt. Ein bislang kontrovers diskutiertes Thema ist die Rolle des HLH-Proteins Id2. MYCN aktiviert direkt den Id2-Promotor und die Id2-Überexpression führt zu erhöhter Proliferation. Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich eine direkte Interaktion von Id2 mit dem Retinoblastom-(Rb) Tumor-Suppressor, die wiederum eine Interaktion mit den E2F-Transkriptionsfaktoren verhindert. Weiterhin konnte in 47 NB-Patienten mit schlechter Prognose erhöhte Id2-Expression festgestellt werden (Lasorella et al., 2000, 2002). Dementgegen konnte von Wang et al. in einer Kohorte von 131 NB-Tumoren keine Korrelation zwischen Id2-mRNA- oder Protein-Level und einer MYCN-Amplifikation gefunden werden (Wang et al., 2003). Die erhöhte Proliferation, sowohl nach MYCN- als auch nach Id2-Überexpression in sympathischen Vorläuferzellkulturen, könnte jedoch artifiziell sein, da weder MYCN, noch Id2 in RT-PCR-Experimenten detektiert werden konnten (siehe Kapitel 3.2).

Zusammengefasst stellen Kulturen sympathoadrenerger Vorläuferzellen nicht nur die mutmaßliche Ausgangszellpopulation des NB dar, sondern reagieren zusätzlich sowohl auf pro- als auch antiproliferative Stimuli, u.a. auch auf Faktoren die bei der NB-Entstehung und –Progression impliziert sind.

#### 4.2 EFFEKTE VON WILDTYP-PHOX2B UND NB-PHOX2B-MUTATIONEN AUF DIE PROLIFERATION SYMPATHISCHER VORLÄUFERZELLEN

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, durch welchen Mechanismus NB-Phox2b-Mutationen zur Entstehung des NB beitragen. Zwei Kennzeichen tumorartigen Wachstums sind die Entartung von Zellen und deren

ungehinderte Proliferation. Zur Untersuchung der Auswirkungen auf die Proliferation wurden E7-sympathische Vorläuferzellen des Huhns mit Expressionsplamiden für Phox2b<sup>wt</sup> und NB-Phox2b-Mutationen transfiziert und die Proliferationsrate der transfizierten Neurone nach zwei Tagen in Kultur (2 DIV) analysiert. Die Überexpression von Phox2b<sup>wt</sup> hatte eine Abnahme der Anzahl proliferierender, transfizierter Neurone zur Folge. Keine der NB-Phox2b-Mutationen zeigte einen antiproliferativen Effekt. Vergleichbare Resultate wurden mit Kulturen proliferierender sympathischer Vorläuferzellen aus E12-Maus SCG und ST erzielt. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit Daten, die mit der Überexpression von Phox2b<sup>wt</sup> und zweier NB-Phox2b-Mutationen (Phox2b<sup>R100L</sup> und Phox2b<sup>676delG</sup>) in der SK-N-AS NB-Zelllinie erhoben werden konnten (Raabe et al., 2008).

Eine Erklärung für die NB-Prädisposition durch Phox2b-Mutationen könnte der dosisabhängige Verlust einer Tumor-Suppressorfunktion von Phox2b durch Haploinsuffizienz sein. Gegen eine durch Haploinsuffizienz verursachte Prädisposition durch Phox2b sprechen jedoch Daten aus einer HSCR-Patientin. Der Erkrankung dieser Patientin liegt eine Translokation des Chromosomenabschnitts 4p12-4p14 und eine dadurch bedingte heterozygote Deletion des Phox2b-Genlokus zugrunde. Diese Patientin entwickelte kein NB (Benailly et al., 2003). Zusätzlich wurde in Untersuchungen der Phox2b-heterozygoten Maus kein NB gefunden und ein, gegenüber Wildtyp-Mäusen, verringertes Atemvolumen als Antwort auf Hyperkapnie festgestellt (Dauger et al., 2003; Dubreuil et al., 2008). Der Hypoventilationsphänotyp des ebenfalls heterozygoten CCHS-Mausmodells ist dagegen, aufgrund der gestörten Entwicklung des retrotrapezoiden Nukleus, sehr viel stärker (Dubreuil et al., 2008). CCHS-Phox2b-Mutationen im Polyalanin-Abschnitt von Phox2b bringen dominant-negative Phox2b-Proteine hervor, die zur Aggregation von sowohl mutiertem- als auch Wildtyp-Phox2b im Cytoplasma führen. (Trochet et al., 2005). Diese im CCHS-Kontext gewonnenen Daten sind zwar nicht direkt auf die Rolle von Phox2b im NB übertragbar, legen aber nahe, dass ein Funktionsgewinn (Gain-of-Function), wie z.B. eine dominant-negative Wirkung der NB-Phox2b-Mutationen möglich wäre. Die Resultate aus der heterozygoten Patientin und heterozygot Phox2b-defizienten Mäusen lassen vermuten, dass ein Gain-of-function der NB-Phox2b-Mutationen wahrscheinlicher ist als ein

einfacher Verlust der Tumor-Suppressorfunktion aufgrund von Haploinsuffizienz.

Ein möglicher Funktionsgewinn der NB-Phox2b-Mutationen bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Proliferation sympathischer Vorläuferzellen könnte durch den Aufbau der initialen Experimente „maskiert“ d.h. nicht detektierbar gewesen sein. So wurden die NB-Phox2b-Mutationen ektopisch in der Gegenwart des homozygoten Chromosomensatzes der Wirtszellen exprimiert. Die NB-Patienten sind dagegen heterozygot und haben vermutlich eine um rund 50% reduzierte Phox2b<sup>wt</sup>-Expression. Nach siRNA-Knockdown des endogenen Phox2b-Proteinlevels konnte ein Proliferationsstimulus derjenigen Phox2b-Mutationen nachgewiesen werden, die eine Mutation innerhalb der DNA-bindenden Homöodomäne tragen (Phox2b<sup>HDmut</sup>). Durch Blockade der Apoptose wurde ein Überlebenseffekt als Ursache dieses Proliferationsstimulus ausgeschlossen. Diese Experimente werfen, neben der Frage wie die Phox2b<sup>HDmut</sup> diesen Proliferationsstimulus vermitteln, zwei weitere wichtige Fragen auf (siehe Abb. 3.9 und Abb. 3.10).

Zum Einen, warum die Reduktion der endogenen Phox2b<sup>wt</sup>-Level alleine nicht ausreicht, die Proliferation zu stimulieren, und zum Anderen, warum die ebenfalls in einem NB-Patienten beschriebene Phox2b<sup>676delG</sup>-Mutation keinen proliferationsstimulierenden Effekt hat. Letzteres könnte dadurch erklärt werden, dass Phox2b<sup>676delG</sup> in DF1-Fibroblasten nicht in den Nukleus transloziert wurde. Dementgegen stehen die Ergebnisse aus der immunzytochemischen Markierung von Phox2b in Kulturen E7-sympathischer Vorläuferzellen, in denen Phox2b<sup>676delG</sup> eine mit anderen Phox2b-Varianten vergleichbare Immunfluoreszenzintensität aufwies. Bei Blockade der Apoptose mit DEVD-CHO führte die Expression von Phox2b<sup>676delG</sup> zu einer signifikant verringerten Anzahl proliferierender Neurone. Die bei dieser Frameshift-Mutante intakte Homöodomäne und eine gegenüber Phox2b<sup>wt</sup> verminderte Phox2b<sup>676delG</sup>-Nukleustranslokation könnten für diese verringert-antiproliferativen Effekte verantwortlich sein. Um dies exakter zu quantifizieren, könnten Western-Blots durchgeführt werden, in denen die Phox2b-Proteinmengen der zytoplasmatischen- und der nukleären Fraktion von DF1-Fibroblasten und E7-SG Neuronen verglichen werden.

Die Fragestellung warum die Reduktion des endogenen Phox2b<sup>wt</sup>-Levels mit siPhox2b nicht zur Stimulation der Proliferation führt, könnte durch eine indirekte Funktion von Phox2b erklärt werden. Phox2b-Überexpression könnte die Aktivität eines proliferationsregulierenden Proteins verändern, der Knockdown mit siPhox2b jedoch keine Auswirkungen auf dessen Kontrolle haben. Eine naheliegende Möglichkeit ist, dass das nach dem Knockdown verbleibende endogene Phox2b<sup>wt</sup>-Niveau ausreichend ist, um weiter antiproliferativ zu wirken. Eine weitere Erklärung ist, dass die Phox2b-Aktivität posttranslational durch Phosphorylierung gesteuert wird, wie bereits für Phox2a demonstriert wurde. Phox2a und Phox2b werden *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert. Bisher wurde nur die phosphorylierungsabhängige Aktivität von Phox2a sowohl am DBH- als auch am p27<sup>kip1</sup>-Promotor untersucht (Adachi et al., 2002). Aktivierung des cAMP-Signalwegs führt zur Dephosphorylierung von Phox2a am Serin 206 und ermöglicht so dessen DNA-Bindung und Transkriptionsaktivität am p27<sup>kip1</sup>-Promotor. Zur Inaktivierung der DNA-Bindefähigkeit werden die Serine 202 und 208 dephosphoryliert und über Protein-Kinase-A das Serin 153 phosphoryliert. Auch am Promotor der DBH zeigt dephosphoryliertes Phox2a eine höhere Transaktivierung (Shin et al., 2009; Adachi et al., 2000).



**ABB. 4.1 AUSSCHNITT DER PROTEINSEQUENZ VON PHOX2A UND PHOX2B** Dargestellt ist die Phox2a-Sequenz von aa152 bis aa223 und die komplementäre Sequenz von Phox2b. Beide Alanine (aa152) gehören noch zum homologen Bereich der Phox2-Homöodomäne. Ser206, eine der von Shin et al. in Phox2a gezeigten Phosphorylierungsstellen, ist auch in Phox2b vorhanden (Alignment mit ClustalX2).

Abb. 4.1 zeigt eine Gegenüberstellung der murinen Phox2a- und Phox2b-Aminosäuresequenz durch das Programm ClustalX2. Das für die DNA-Bindung von Phox2a dephosphorylierte Serin 206 ist auch in der Phox2b-Sequenz vorhanden. Die für die Deaktivierung der DNA-Bindefähigkeit von Shin et al. beschriebenen Serine 202, 208 und 153 sind jedoch in Phox2b nicht vorhanden. NetPhos 2.0, ein Programm mit dem in Aminosäuresequenzen mögliche Phosphorylierungsstellen vorhergesagt werden können, berechnet für

das murine Phox2b insgesamt 16 Serin-, 7 Threonin- und 5 Tyrosin-Phosphorylierungsstellen.

Vorausgesetzt, die Phox2b-Aktivität wäre wie bei Phox2a durch Phosphorylierung gesteuert, bedeutet eine Überexpression von Phox2b eine erhöhte Anzahl transkriptionell aktiver Proteine, die für den antiproliferativen Effekt verantwortlich sind. Bei Knockdown des endogenen Phox2b-Niveaus mit siPhox2b, könnte vorhandenes Phox2b dephosphoryliert werden und somit den proliferationsstimulierenden Effekt kompensieren. Der genaue Zusammenhang zwischen antiproliferativ wirkender Phox2b-Expression und ausbleibendem Proliferationsstimulus im Phox2b-Knockdown bleibt jedoch unklar, ebenso wie die Frage welcher der diskutierten Mechanismen wirklich zutrifft. Die wichtigste Frage, die sich aus den Proliferationsexperimenten ergab, ist jedoch, wie der proliferationsstimulierende Effekt der Phox2b<sup>HDmut</sup> erklärt werden kann (siehe Abb. 3.9 und Abb. 3.10).

### 4.3 STRUKTURELLE KONSEQUENZEN DER NEUROBLASTOMA-PHOX2B-MUTATIONEN

Die Untersuchung der Proliferation sympathoadrenerger Vorläuferzellkulturen ergab, dass drei der vier untersuchten NB-Phox2b-Mutationen nach Knockdown des endogenen Phox2b-Niveaus eine proliferationsstimulierende Wirkung zeigten. Dieser Effekt trat nur bei Mutationen innerhalb der Phox2b-Homöodomäne auf (Phox2b<sup>R100L</sup>, Phox2b<sup>R141G</sup> und Phox2b<sup>K155X</sup>). Da die Überexpression der Phox2-Homöodomäne antiproliferativ wirkt (siehe 3.1.8), könnten die beobachteten Effekte auf einer eingeschränkten Funktion der Homöodomäne der Phox2b<sup>HDmut</sup> beruhen. Nach Veröffentlichung des humanen Genoms wurden Transkriptionsfaktoren als eine von vier Hauptgruppen von funktionellen Proteinen identifiziert, deren Keimbahn-Mutationen zu bekannten Krankheiten führen (Jimenez-Sanchez et al., 2001). Der UCSC-Human Genom Browser listet insgesamt 155 Homöodomänen-Proteine. Eine Vielzahl von genetisch bedingten Krankheiten, die von Entwicklungsabnormalitäten bis hin zu Stoffwechselerkrankungen reichen, wird durch Mutationen in

Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren hervorgerufen (zusammengefasst in D'Elia et al., 2001). Diese Mutationen führen entweder zu abnormer Transkriptionskontrolle oder zum Zusammenbruch der Transkriptionsmaschinerie durch Funktionsverlust des veränderten Proteins. Als Mechanismus kommen sowohl Haploinsuffizienz als auch dominant-negative Funktionen in Betracht (Seidman und Seidman, 2002). Relativ einfach nachvollziehbar sind krankheitsverursachende Mutationen, die zu Leserasterverschiebungen oder trunkierten Proteinen führen. Substitutionen einzelner Aminosäuren (Missense-Mutationen; Single Amino-Acid Substitution, SAS), wie sie bei Phox2b<sup>R100L</sup> und Phox2b<sup>R141G</sup> vorliegen, erfordern das Verständnis der Aufgabe dieser einzelnen, mutierten Aminosäure. Die Veränderung einer Aminosäure kann Auswirkungen auf Expressionslevel, Proteinstabilität, -faltung und -lokalisierung, posttranslationale Modifikationen und auf die Interaktionsfähigkeit mit anderen Proteinen und DNA haben (Wang und Moulton, 2001). In einer weiteren Studie wurden insgesamt 119 unabhängige Missense-Mutationen in 26 verschiedenen Genen zusammengetragen und untersucht, ob bestimmte SAS gehäuft vorkommen. Die Untersuchungen ergaben, dass u.a. in Phox2b<sup>R100L</sup> eine sog. Kernaminosäure (Core-Residue) der Homöodomäne mutiert ist. Arg5, das in der Homöodomäne von Phox2b<sup>R100L</sup> mutiert ist, bindet die „kleinen Furchen“ (Minor-Grooves) der Ziel-DNA und bildet Wasserstoffbindungen mit den Desoxyribonukleinsäuren aus. Die DNA und im Besonderen die Minor-Grooves stellen eine stark negative Ladung dar, während die Homöodomäne positiv geladen ist und über elektrostatische Wechselwirkungen zunächst einen schwachen unspezifischen Kontakt zur DNA herstellt. Die Neutralisation der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA durch positiv geladene Gruppen der HD führt anschließend zur spezifischen Interaktion der HD mit der DNA (Chirgadze et al., 2009). In Phox2b<sup>R141G</sup> ist das Arg44 der Homöodomäne mutiert. Bisher ist keine nähere Funktion dieser Aminosäure beschrieben. Es existieren jedoch weitere Arg44-Mutationen z.B. in HNF1 $\alpha$ , dessen Mutationen zu Diabetes führen (Chi et al., 2005). Der trunkierten Phox2b<sup>K155X</sup>-Mutante fehlen zwei Aminosäuren am Ende der dritten Helix. Untersuchungen an Pax6, einem weiteren HD-Transkriptionsfaktor, zeigten eine essentielle Rolle der dritten Helix in der Zielfindung dieses HD-Proteins sowohl für DNA-, als auch Protein-Interaktionen. Diese Daten

suggestieren, dass bei Phox2b<sup>K155X</sup> ebenfalls eine Störung in der DNA-Bindung vorliegen könnte (Bruun et al., 2005). Zudem weisen die untersuchten NB-Phox2b-Mutationen in Luciferase-Assays verringerte Transaktivierungsaktivität am DBH-Promotor auf (Trochet et al., 2005, eigene Daten).

#### 4.4 DIE ROLLE VON PHOX2B UND NB-PHOX2B-MUTANTEN IN DER PROLIFERATIONSKONTROLLE SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN

Aufgrund der Proliferationseffekte von Phox2b<sup>wt</sup> und Phox2b<sup>HDmut</sup> wurde eine putative Rolle von Phox2b in der Kontrolle des Zellzyklus vermutet. Ein naheliegender Kandidat war der Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor p27<sup>kip1</sup>. In der noradrenergen CAD-Zelllinie aktiviert Phox2a die Transkription von p27<sup>kip1</sup> und führt zu Zellzyklusaustritt und Differenzierung (Paris et al., 2006). In Kulturen sympathoadrenerger Vorläuferzellen führten Überexpression und Knockdown von Phox2b zu erhöhtem bzw. erniedrigtem p27<sup>kip1</sup>-mRNA-Niveau. Weiterhin wirken die Überexpression von Phox2a und p27<sup>kip1</sup> antiproliferativ. Es wurde gezeigt, dass Phox2b sowohl den Phox2a-Promotor als auch autoregulatorisch den eigenen Promotor aktiviert (Flora et al., 2001; Cargnin et al., 2005). Phox2b könnte somit indirekt über Aktivierung von Phox2a und folglich p27<sup>kip1</sup> seinen antiproliferativen Effekt ausüben (siehe Abb. 4.3). Gegen eine Rolle von p27<sup>kip1</sup> bei der Vermittlung der Effekte auf die Proliferation von Phox2b-Varianten spricht jedoch, dass sich das p27<sup>kip1</sup>-Expressionsniveau nach Überexpression der ebenfalls antiproliferativ wirkenden Phox2<sup>HD</sup> nicht veränderte. Das p27<sup>kip1</sup>-Expressionsniveau scheint demnach nicht strikt an die Proliferation sympathischer Vorläuferzellen gekoppelt zu sein, obwohl forcierte Überexpression von p27<sup>kip1</sup> antiproliferativ wirkt. Die p27<sup>kip1</sup>-Expression nach Phox2a-Überexpression in Kulturen sympathischer Vorläuferzellen wurde bisher nicht untersucht. Phox2a ist jedoch in sympathischen Vorläuferzellkulturen gar nicht oder nur sehr gering exprimiert und wird nicht signifikant nach Phox2b-Überexpression hochreguliert. Trotzdem lässt sich ein zumindest teilweiser Beitrag von Phox2a-vermittelter p27<sup>kip1</sup>-Expression nach Phox2b-Überexpression am antiproliferativen Effekt von Phox2b nicht ganz ausschließen. Für die Vermittlung des antiproliferativen Effekts von Phox2<sup>HD</sup>

muss jedoch ein anderer Mechanismus existieren, der entweder von der DNA-Bindfähigkeit oder Protein-Protein-Interaktionen der Phox2-Homöodomäne abhängt. Es stellt sich dadurch die Frage, ob auch die Effekte von Phox2b<sup>HDmut</sup> unabhängig vom p27<sup>kip1</sup>-Expressionslevel bewirkt werden. Ein interessantes Experiment wäre in diesem Zusammenhang zu untersuchen, inwiefern sich die Proliferationsrate sympathoadrenerger Vorläuferzellkulturen nach p27<sup>kip1</sup>-Knockdown verändert.

Effekte der Phox2-Homöodomäne wurden bereits bei Arbeiten im Neuralrohr des Huhns beobachtet. Überexpression von Phox2<sup>HD</sup> führt zu einer Verringerung der Hes5- und Id2-Expression (Dubreuil et al., 2002). E7 sympathische Neurone haben jedoch bereits die Notch-Signalweg-abhängige Hes5-Expression verloren und exprimieren kein Id2 (Tsarovina et al., 2008; eigene Daten). Hes5 und Id2 sind daher nicht in den antiproliferativen Effekt involviert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde während eines 12-wöchigen Praktikums von Sarah Melzer die Rolle weiterer Zellzyklusgene untersucht. Mit semiquantitativer RT-PCR wurde die Expression der Zykline D1, D2 und D3, sowie der Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p18, p21 und p57<sup>kip2</sup> in Kulturen sympathischer Vorläuferzellen nachgewiesen. Es konnten jedoch keine signifikant veränderten Expressionsniveaus nach Phox2b-Überexpression festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass sowohl der antiproliferative Effekt von Phox2b als auch der proliferationsstimulierende Effekt der Phox2b<sup>HDmut</sup> vermutlich durch den Transkriptionsfaktor Hand2 vermittelt werden. Diese Hypothese wird durch folgende Argumente unterstützt: Hand2 spielt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine essentielle Rolle in der Proliferation sympathoadrenerger Vorläuferzellen (Hendershot et al., 2008; Schmidt et al., 2009; eigene Daten). Ferner sind der proliferationsstimulierende Effekt der Phox2b<sup>HDmut</sup> und der antiproliferative Effekt von Phox2b<sup>wt</sup> von Hand2 abhängig und alle untersuchten Phox2b-Varianten und Hand2 zeigen direkte Protein-Protein-Interaktion. Weiterhin ist das *Hand2*-Expressionsniveau invers abhängig vom Phox2b-Proteinlevel. Ein weiterer interessanter Befund ist, dass NB nicht in parasymphatischen Ganglien entstehen, die per se kein Hand2 exprimieren

(Müller und Rohrer, 2002). Andere Effekte der Phox2b-Mutanten sind aber offensichtlich von Hand2 unabhängig, wie z.B. Strabismus und Defekte in der Kontrolle der Pupillen, die Konsequenzen fehlerhafter parasymphatischer Innervation darstellen (J. Amiel, Konferenz Sestri Levante 2007).

Als mögliche mechanistische Erklärungen, wie Phox2b<sup>wt</sup>, Phox2b<sup>HDmut</sup> und Hand2 die Proliferation in sympathoadrenergen Vorläuferzellen regulieren, kommen verschiedene Modelle in Betracht.

#### MODELL 1:

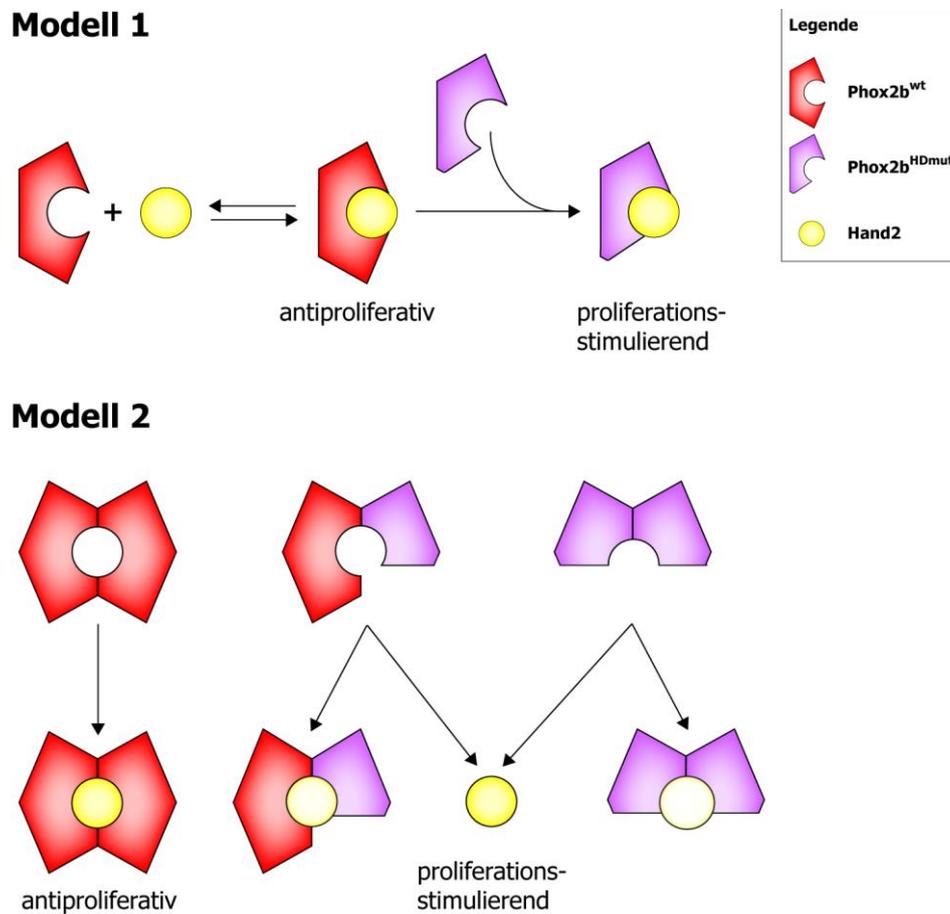
Die Phox2b<sup>HDmut</sup> konkurrieren mit endogenem Phox2b<sup>wt</sup> um Hand2-Bindung und wirken dem antiproliferativen Effekt von Phox2b<sup>wt</sup> entgegen. Die Mutationen in der Homöodomäne führen zu einer Konformationsänderung im Phox2b-Protein, die ebenfalls die Interaktion mit Hand2 beeinflusst. Die Interaktion zwischen Phox2b und Hand2 könnte von einer antagonistischen Funktion in der Steuerung der Proliferation zu einer synergistischen, proliferationsstimulierenden Funktion der Phox2b<sup>HDmut</sup>/Hand2-Komplexe verändert sein (siehe Abb. 4.2). Weiterhin existieren Komplexe aus Phox2<sup>HD</sup>, Phox2b<sup>676delG</sup> und Phox2<sup>HDR141G</sup>. Komplexe aus Phox2-Homöodomäne und Hand2 wirken antiproliferativ wie Phox2b<sup>wt</sup>-Hand2-Komplexe. Da Phox2a und Hand2 Komplexe bilden, lässt sich durch diese Vorstellung ebenfalls deren antiproliferativer Effekt erklären (Adachi et al., 2000). Der ausbleibende antiproliferative Effekt von Phox2b<sup>676delG</sup> kann durch eine verringerte Kerntranslokation dieser Mutante erklärt werden. Einen Schwachpunkt dieses Modells zeigen die Daten zu Phox2<sup>HDR141G</sup>. Diese Variante zeigt Interaktion mit Hand2 in GST-Pulldown-Experimenten und trägt eine Mutation in der Homöodomäne. Phox2<sup>HDR141G</sup> hat jedoch keinen Effekt auf die Proliferation. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine verringerte Affinität zu Hand2 sein, wenn für maximale Bindungsstabilität die Interaktionsdomänen in N- und C-Terminus von Phox2b benötigt werden. Da die C-terminal verkürzte Phox2b<sup>K155X</sup>-Mutation die Proliferation stimuliert, ist vermutlich der Phox2b-N-Terminus für die proliferationsstimulierende Interaktion verantwortlich. Der N-

Terminus enthält die Transaktivierungsdomäne und eine Reihe hochkonservierter Phosphorylierungsstellen, die wie bei Phox2a für Aktivitätsregulation verantwortlich sein könnten (Adachi et al. 2000; Trochet et al., 2009; eigene Daten). Weiterhin enthält der N-Terminus von Phox2b eine Bindungsstelle für den Koaktivator CBP, der, wie am DBH-Promotor für Phox2a gezeigt wurde, eine Brücke zur allgemeinen Transkriptionsmaschinerie darstellt (Phox2b CBP-Bindungsstelle im N-Terminus: Aminosäuren 69-83; Swanson et al., 2000).

#### MODELL 2:

Der Proliferationsstimulus von Phox2b<sup>HDmut</sup> ist ein indirekter Effekt aufgrund des erhöhten Niveaus von ungebundenem Hand2-Protein, das aufgrund verringerter Bindungsaffinität von Phox2b<sup>HDmut</sup> enthaltenden Komplexen zu Stande kommt (siehe Abb. 4.2). Radioaktiv markierte *in vitro* translatierte Phox2b- oder Phox2a-His markierte Fusionsproteine bilden Homo- und Heterodimere (Adachi et al., 2000). Phox2b-Dimerbildung wurde in den GST-Pulldown Experimenten nicht beobachtet. Mögliche Ursache hierfür könnte eine sterische Hinderung der Homodimerbildung durch die Struktur des Fusionsproteins aus Phox2b und GST sein. Es könnte auch durch ein Artefakt der bakteriellen Proteinexpression aufgrund fehlender, zur Homodimerbildung notwendigen, Proteinmodifikationen erklärt werden. Eine Domäne, die für Homo- und Heterodimerbildung in Phox2-Proteinen verantwortlich ist, wurde bisher nicht beschrieben. Die Interaktion mit Hand2 wird durch die Phox2-Homöodomäne vermittelt (Rychlik et al., 2003; eigene Daten). Heterodimere aus Phox2b<sup>HDmut</sup>- und Phox2b<sup>wt</sup>-Proteinen und Homodimere aus Phox2b<sup>HDmut</sup> könnten in den Vorläuferzellen eine verringerte Affinität zu Hand2 aufweisen und somit die Anzahl der ungebundenen Hand2-Proteine erhöhen (siehe Abb. 4.2). Die Erhöhung des Hand2-Protein-Niveaus durch Überexpression führte in sympathoadrenergen Vorläuferzellkulturen zu signifikant erhöhter Proliferation. Für die Proliferationseffekte von Phox2<sup>HD</sup> und Phox2b<sup>676delG</sup> würden dieselben Erklärungen gelten wie bei Modell 1. Komplexe aus Phox2<sup>HDR141G</sup> und Phox2b<sup>wt</sup>

könnten aufgrund fehlender Proteininteraktionsdomänen in N- und C-Terminus in ihrer Hand2-Bindefähigkeit limitiert sein.



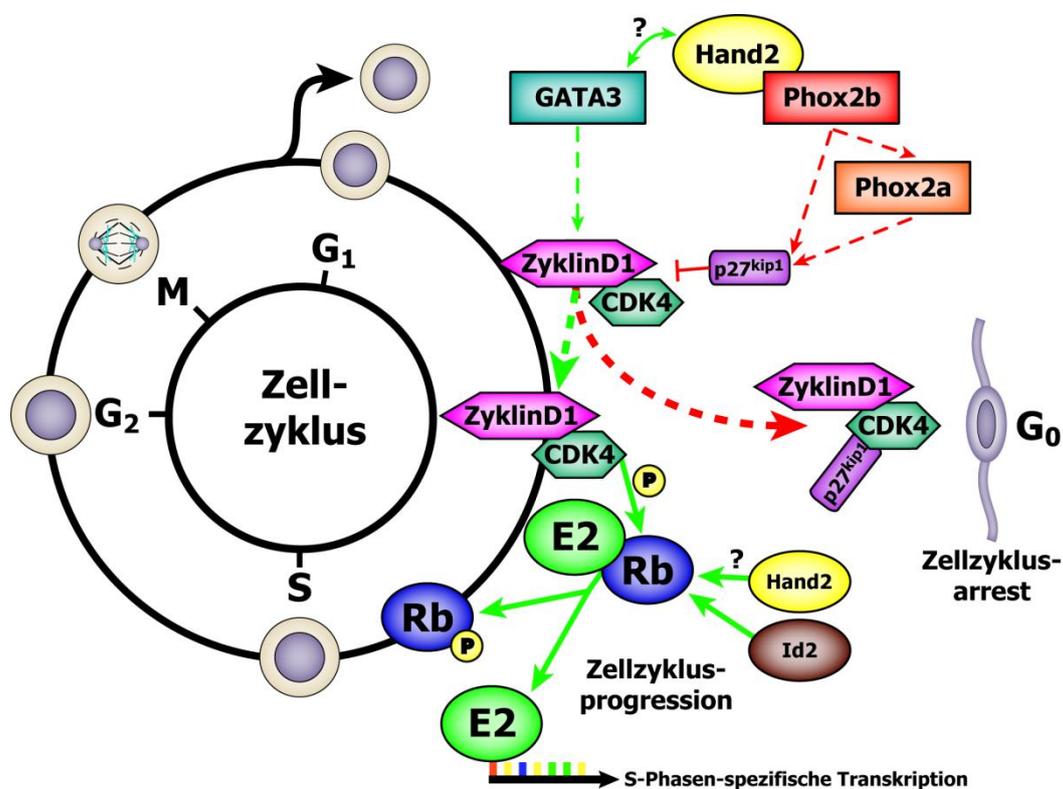
**ABB. 4.2 MODELLE DER INTERAKTIONEN ZWISCHEN PHOX2B<sup>WT</sup>, PHOX2B<sup>HDMUT</sup> UND HAND2 IN DER PROLIFERATIONSKONTROLLE SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN** Modell 1: Komplexe aus Phox2b<sup>wt</sup> und Hand2 wirken antiproliferativ, während durch eine Konformationsänderung Komplexe aus Phox2b<sup>HDmut</sup> und Hand2 die Proliferation stimulieren; Modell 2: Phox2b<sup>wt</sup>-Homodimere haben eine starke Hand2-Bindungsaffinität, während Heterodimere aus Phox2b<sup>wt</sup> und Phox2b<sup>HDmut</sup>, sowie Phox2b<sup>HDmut</sup>-Homodimere eine verringerte Hand2-Bindungsaffinität aufweisen und somit ungebundenes Hand2 die Proliferation stimuliert.

### 4.5 DIE ROLLE VON HAND2 IM NB UND IN DER PROLIFERATIONSKONTROLLE SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN

Modell 2 und die Daten der Hand2-Überexpressionsexperimente werfen die Frage auf, wie der proliferationsstimulierende Effekt von Hand2 zustande kommt. Hand2 ist in NB exprimiert, es konnte jedoch keine Korrelation der Hand2-Expression mit dem Tumorstadium festgestellt werden (Gestblom et al., 1999; Voth et al., 2009). Die Fragestellung, ob Hand2 die Transkription von Zellzyklusregulatoren beeinflusst oder ob möglicherweise direkte Interaktionen mit Zellzyklusregulatoren bestehen wurde bisher nicht untersucht.

Hand2 bildet Heterodimere mit Klasse A- und B-bHLH-Transkriptionsfaktoren (Murakami et al., 2004; Firulli et al., 2005). Die HLH Id-Protein-Familie (Inhibitors of Differentiation oder Inhibitors of DNA-Binding) besteht aus insgesamt 4 Mitgliedern, von denen Id1-3 im NB exprimiert sind. Id1-3 besitzen keine DNA-Bindedomäne und gelten als dominant-negative Inhibitoren in der Zellzykluskontrolle. Durch Bindung an E-Proteine verhindern sie deren Bindung an gewebsspezifische bHLH-Proteine und könnten dadurch die Tumorzellen in einem undifferenzierten Status halten. Id-Proteine haben jedoch auch direkte Effekte auf Zellzyklusregulatoren. Id2 interagiert mit hypophosphoryliertem Rb und stört so dessen Bindung an E2F-DP1 (siehe Abb. 4.3). Dies führt zur Transkription S-Phasen-spezifischer Gene und Zellzyklusprogression. Eine direkte Interaktion zwischen Hand2 und Id-Proteinen wurde nicht festgestellt (Jögi et al., 2001). Möglicherweise hat Hand2 jedoch eine vergleichbare Funktion in der Zellzykluskontrolle wie die Id-Proteinfamilie. Interessanterweise können viele Funktionen von Hand2 auch durch Hand2-Varianten ausgelöst werden, die keine basische Domäne aufweisen und deshalb nicht an DNA binden können (Xu et al., 2003). Id2 und Hand2 binden u.a. an das E-Protein E2A (Murakami et al., 2004; Rothschild et al., 2006). Das E2A-Gen kodiert für zwei Splicevarianten: E12 und E47. Für E2A wurden in früheren Arbeiten verschiedenste Rollen in der Zellzykluskontrolle diskutiert. So verhindert die Überexpression von E2A in der NIH-3T3-Fibroblastenzelllinie die serumstimulierte Proliferation (Peverali et al., 1994). Kontrovers dazu wurde in B-Zellen eine proliferationsstimulierende Rolle von E2A durch Stimulation der ZyklinD3-Transkription beschrieben (Song et al., 2004; Zhao et al., 2001). In

den Neuroblastomazelllinien SK-N-SH und IMR-32 führt die Überexpression von E12 und E47 zu verringerter Proliferation und aktiviert die Transkription der Zyklin-abhängigen Kinase  $p57^{kip2}$ . Reziprok dazu sinkt das  $p57^{kip2}$ -mRNA-Niveau nach Id2-Überexpression (Rothschild et al., 2006). Die Überexpression von Hand2 könnte zu einer erhöhten Anzahl an E2A/Hand2-Komplexen führen. Diese Komplexe könnten einerseits die Transkription von  $p57^{kip2}$  oder anderen Zellzyklusarrest-Genen reduzieren oder andererseits stimulierend auf die ZyklinD3-Transkription wirken (diese Möglichkeit ist in Abb. 4.3 nicht dargestellt).



**ABB. 4.3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MÖGLICHEN FUNKTIONEN UND INTERKATIONSPARTNER DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN PHOX2B UND HAND2 IN DER PROLIFERATIONSKONTROLLE SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN** Der Einfluss von Phox2b auf die Transkription des CKI  $p27^{kip1}$  könnte einerseits direkt oder andererseits indirekt über die Transaktivierung des Phox2a-Promotors erfolgen. Bindung von  $p27^{kip1}$  an den ZyklinD1/CDK4-Komplex führt zu Zellzyklusarrest ( $G_0$ ). Für Hand2 sind zwei der in diesem Kapitel beschriebenen möglichen Funktionen in diesem Schema dargestellt. (1) Hand2 nimmt über einen Komplex mit Gata3, welches wiederum direkt ZyklinD1-Transkription steuert Einfluss auf den Zellzyklus. (2) Hand2 kompetitiert wie Id2 mit E2 um Bindung an Rb und führt somit zu Zellzyklusprogression. (grün: proliferationsstimulierend; rot: antiproliferativ; dünne gestrichelte Pfeile: transkriptionelle Kontrolle; dicke gestrichelte Pfeile: Zellschicksal; durchgezogene Pfeile: Veränderungen auf Proteinebene)

Ein weiterer Interaktionspartner von Hand2 in der Proliferation könnten die Zinkfingerdomänen-Transkriptionsfaktoren der Gata-Familie sein. Eine direkte Interaktion zwischen Gata4 und Hand2 konnte bereits gezeigt werden und findet in der C-terminalen Zinkfingerdomäne statt (Dai et al., 2002). Die

Sequenz der Zinkfingerdomäne ist innerhalb der Gata-Transkriptionsfaktorenfamilie hochkonserviert. Die Familie umfasst insgesamt sechs Mitglieder, von denen Gata2-6 im ZNS exprimiert werden (Agnihotri et al., 2009). Im peripheren Nervensystem wurden bisher Gata2 und Gata3 beschrieben. Bei der Untersuchung Gata3-defizienter Mäuse wurde sowohl eine verringerte Proliferation sympathoadrenerger Neurone, als auch ein Effekt auf das Zellüberleben festgestellt (Tsarovina et al., 2004; Tsarovina et al., eingereicht). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigt, dass Gata3 in NB-Zelllinien den ZyklinD1-Promotor aktiviert und die Proliferation von IMR-32-NB-Zellen reduziert ist (Molenaar et al., 2010; siehe Abb. 4.3). In konditionell Hand2-defizienten Mäusen konnte durch Gene-Array-Analysen von Herz-mRNA-Isolationen eine starke Reduktion der *Insm1*-Expression (Insulinoma associated 1) festgestellt werden (Kristen et al., 2010). *Insm1*-defiziente Mäuse zeigen, wie Hand2-defiziente Mäuse, eine starke Reduktion der Proliferation sympathoadrenerger Vorläuferzellen (Wildner et al., 2008; Hendershot et al., 2008). *Insm1* bindet direkt an ZyklinD1 und konkurriert mit ZyklinD1 um CDK4-Bindung (Liu et al., 2006). Die Interaktion zwischen ZyklinD1 und CDK4 ist wiederum notwendig für die Phosphoryllierung von Rb und Zellzyklusprogression von G<sub>0</sub> zu G<sub>1</sub> (Zhang et al., 2009). Hand2 könnte demnach einerseits auf transkriptioneller Ebene über die Expression von *Insm1* und dessen Interaktion mit ZyklinD1- oder andererseits über eine Interaktion mit Gata3 und dessen Einfluss auf den ZyklinD1-Promotor Einfluss auf die Proliferation sympathoadrenerger Vorläuferzellen nehmen.

Interessanterweise ist Gata4 in aggressiven NB hochreguliert und korreliert mit MYCN-Amplifikation. In der Entwicklung sympathoadrenerger Neurone wird Gata4 jedoch nicht exprimiert (Hoene et al., 2009). Gata4 induziert in Astrozyten die Transkription der Zyklin-abhängigen Kinase p15<sup>INK4B</sup> und inhibiert deren Proliferation (Agnihotri et al., 2009). Ein synergistischer Effekt von Hand2- und Gata4-Komplexen wird in Kardiomyozyten beschrieben (Dai et al., 2002). Das nach Überexpression erhöhte Hand2-Niveau könnte zur Inhibition von Gata4-Zielgenen wie p15<sup>INK4B</sup> führen. Denkbar ist auch ein synergistischer Effekt von Hand2/Gata4-Komplexen auf proliferationsstimulierende Zielgene, eine proliferationsstimulierende Rolle von Gata4 wurde jedoch bisher nicht beschrieben.

Der Mechanismus, wie NB-Phoxb-Mutationen und Phox2b<sup>wt</sup> über Hand2 Einfluss auf die Proliferation sympathoadrenerger Vorläuferzellen nehmen, bleibt somit weitestgehend unklar. Es existieren jedoch Anhaltspunkte aus Arbeiten in anderen Geweben, die auf eine Verbindung z.B. zu den E-Proteinen oder ZyklinD1 hindeuten.

#### 4.6 DER EINFLUSS VON PHOX2B<sup>WT</sup> UND NB-PHOX2B-VARIANTEN AUF DIE DIFFERENZIERUNG SYMPATHOADRENERGER VORLÄUFERZELLEN

Das NB ist ein ausgesprochen heterogener Tumor und zeigt ein breites Spektrum klinischen Verhaltens. Die Aggressivität des Tumors und somit die Prognose hängen unter anderem vom Differenzierungsstatus der Tumorzellen ab. NB mit niedrigem Differenzierungsstatus korrelieren eng mit hoher Tumoraggressivität und schlechter Prognose (Bourdeaut et al., 2009). Die ersten Untersuchungen zur Funktion von Phox2b beschränkten sich auf dessen Rolle in der initialen Differenzierung peripherer und zentraler noradrenerger Neurone. In Phox2b-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass Phox2b essentiell für die Differenzierung peripherer autonomer Neurone ist und keine autonomen und enterischen Ganglien gebildet werden (Pattyn et al., 1999). Durch Überexpression von Phox2b können in Neuronen des Brachialnervs Eigenschaften noradrenerger Neurone induziert werden (Stanke et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen veränderter Phox2b-Proteinvarianten auf den Differenzierungsstatus sympathoadrenerger Vorläuferzellen untersucht werden. Die Untersuchungen fanden ebenfalls in Primärkulturen dissoziierter, paravertebraler, sympathischer Ganglien des siebten Embryonaltags (E7) des Huhns statt. In diesem Entwicklungsstadium haben diese unreifen Neurone bereits Eigenschaften noradrenerger Neurone erworben und exprimieren sowohl *Dbh* als auch *Th* (Ernsberger et al., 1995, 2000). Die Expression der Neurotrophinrezeptoren *p75* und *trkA* war von besonderem Interesse, da ihre Expression mit guter Prognose von NB-Patienten korreliert (Kogner et al., 1993, Nakagawara et al., 1993). *Tlx3* ist das Huhn-Ortholog zu *Tlx2* im Säuger und stellt ein direktes Phox2b-Zielgen dar

(Borghini et al., 2006). Zur Analyse der Auswirkungen von NB-Phox2b-Varianten auf die Differenzierung wurden sympathoadrenerge Vorläuferzellen mit Phox2b-Varianten transfiziert und nach zwei Tagen in Kultur die mRNA isoliert. Mit semiquantitativer RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die C-terminal trunkierte Phox2b<sup>K155X</sup>-Mutation die Expression der analysierten Gene signifikant reduziert. Ein dominant-negatives Fusionsprotein aus Phox2-Homöodomäne und der Drosophila engrailed-Repressor-Domäne zeigte vergleichbare Auswirkungen auf die *Dbh*, *Th*, *p75*, *trkA* und *Tlx3*-Expression. Mit Luciferase-Assays konnte am DBH-Promotor die dominant-negative Wirkung von Phox2b<sup>K155X</sup> und Phox2<sup>HDeN</sup> in einem weiteren Versuchsaufbau direkt demonstriert werden. Die DBH-Promotor-Transaktivierung von den untersuchten Phox2b-Varianten war vergleichbar mit früheren Arbeiten (Trochet et al., 2009). Die Überexpression von Phox2b<sup>wt</sup> führte zu signifikant erhöhter *p75*- und *Tlx3*-Expression, jedoch nicht zu einem Anstieg von *Th*, *Dbh* oder *trkA*. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass das endogene Phox2b-Niveau für *Th*, *Dbh* und *trkA* an den Promotoren dieser Gene zur vollständigen Promotoraktivierung ausreicht, während *p75* und *Tlx3* durch zusätzliches Phox2b<sup>wt</sup> vermehrt transkribiert werden.

Phox2b<sup>R100L</sup>, Phox2b<sup>R141G</sup> und Phox2b<sup>676delG</sup> zeigten keine signifikanten Effekte auf die Expression von *Dbh*, *Th*, *p75*, *trkA* und *Tlx3*, jedoch reduzierte Transaktivierung am DBH-Promotor (Trochet et al., 2009, eigene Daten). Die Experimente am DBH-Promotor offenbarten, dass die untersuchten NB-Phox2b-Mutationen die Transaktivierungsfähigkeit von Phox2b<sup>wt</sup> verloren haben. Der ausbleibende Effekt auf die Transkriptionsrate der in semiquantitativen RT-PCRs untersuchten Gene kann durch Überexpression in Gegenwart von endogenem Phox2b<sup>wt</sup> erklärt werden. Nur Phox2b-Varianten mit dominant-negativem Effekt auf Phox2b<sup>wt</sup> zeigten hier einen Effekt. Die sich daraus ergebende Frage ist nun, welche Eigenschaft Phox2b<sup>K155X</sup> von den anderen untersuchten NB-Phox2b-Mutationen unterscheidet.

Die Phox2b<sup>K155X</sup>-Mutation führt zum Verlust des gesamten C-Terminus und der beiden letzten Aminosäuren der Homöodomäne. Der C-Terminus beinhaltet einen Polyalanin-Bereich und eine weitere CBP-Interaktionsdomäne (Trochet et al., 2005, Wu et al., 2009). Mutationen des Polyalanin-Bereichs führen zum

kongenitalen, zentralen Hypoventilationssyndrom (CCHS). CCHS-  
verursachende Phox2b-Mutationen, die eine Verlängerung oder Verkürzung  
des Polyalanin-Bereichs verursachen, führen jedoch nicht zwangsläufig zu  
verminderter Transkriptionsaktivität. Desweiteren konnte in einem  
Kompetitionsassay gezeigt werden, dass Polyalanin-Mutanten mit Phox2b<sup>wt</sup>  
interagieren (Trochet et al., 2005). Die Homodimerisierung von Phox2b ist  
demnach nicht von einem intakten Polyalanin-Bereich abhängig. Zudem wurde  
bisher in keinem NB-Patienten eine Verlängerung im Phox2b-Polyalanin-  
Bereich beschrieben. Die CBP-Bindedomäne im N-Terminus bildet eine Brücke  
zur allgemeinen Transkriptionsmaschinerie (Swanson et al., 2000). Der C-  
Terminus von Phox2b<sup>wt</sup> bindet ebenfalls CBP und die Koexpression zeigt einen  
synergistischen Effekt am DBH-Promotor. Interessanterweise zeigen Phox2b-  
Mutationen, die zu einem verlängerten Polyalanin-Bereich führen keinen  
synergistischen Effekt bei Koexpression von CBP (Wu et al., 2009). Aufgrund  
dieser Daten ist eine Konformationsänderung von Phox2b-Polyalanin-  
Mutationen wahrscheinlich. Der Polyalanin-Bereich wird als flexible Domäne  
beschrieben, die für die Proteinkonformation, Protein-Protein-Interaktionen und  
DNA-Bindung verantwortlich ist (Albrecht et al., 2004; Brown et al., 2004;  
Albrecht und Mundlos, 2005). Das Fehlen dieser Domäne in der Phox2b<sup>K155X</sup>-  
Mutante könnte zu einer Konformation führen, die im Gegensatz zu den  
anderen untersuchten NB- und CCHS-Phox2b-Mutationen dominant-negativ mit  
Phox2b<sup>wt</sup> interagiert. Über Konformationsänderungen der Mutanten und die  
Phox2b<sup>wt</sup>-Konformation bei der Interaktion mit CBP könnte letztendlich eine  
Kristallstruktur Auskunft geben.

#### 4.7 NEUROBLASTOMA-PRÄDISPOSITION DURCH MUTATIONEN IN PHOX2B

Das Neuroblastom entsteht aus Zellen der embryonalen Neuralleiste, die nicht  
vollständig differenziert sind. Die ausgesprochene Heterogenität des NB,  
sowohl auf klinischer, als auch auf molekularer Ebene, lässt verschiedene  
Rückschlüsse zu. Die Unterbrechung normaler Differenzierungsprozesse spielt  
eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung. Genetische Analysen identifizierten  
mehrere Prädispositions-Loci, was darauf hinweist, dass vermutlich

oligogenetische Veränderungen zur Onkogenese des NB notwendig sind (Maris et al., 2007). Es gibt, abgesehen von der relativ häufigen MYCN-Amplifikation, keinen spezifischen genetischen Marker für NB (Serra et al., 2007). Phox2b-Mutationen finden sich in nur 1-2% familiär-vererbter NB. Somatische Phox2b-Mutationen wurden bisher nur in zwei Fällen nachgewiesen (van Limpt et al., 2004). Kürzlich konnte mit der Rezeptor-Tyrosin-Kinase ALK ein weiteres NB-Prädispositionsgen identifiziert werden, das sowohl in sporadischem als auch vererbtem NB eine Rolle spielt. Die Häufigkeit von ALK-Mutationen liegt bei familiärem NB bei rund 57% und bei rund 9,6% bei sporadischen NB (Eng et al., 2008). Die tumorigene Wirkung von ALK beruht auf erhöhten ALK-Expressionsniveaus durch genomische Amplifikation oder Mutationen im ALK-Gen, die zu einer konstitutiven Kinaseaktivität führen (Janoueix-Lerosey et al., 2008). Zusätzlich sind Mutationen im ALK-Promotor denkbar, die zu erhöhter Expression führen könnten (Eng et al., 2008). Der siRNA-vermittelte Knockdown oder die pharmakologische Blockade von ALK führen zu verminderter Proliferation in NB-Zelllinien (Chen et al., 2008; Li et al., 2008). Beide bisher identifizierten NB-Prädispositionsgene sind in die Proliferationskontrolle involviert und könnten einen ähnlichen Prädispositionsmechanismus aufweisen. Die Verlängerung der proliferativen Phase der Neurogenese durch Phox2b- bzw. Alk-Mutationen könnte die Empfänglichkeit für eine weitere, somatische Mutation verlängern. Diese Mutation könnte beispielsweise die Aktivierung eines Proto-Onkogens oder die Deaktivierung eines Tumorsuppressorgens zur Folge haben. Diese Art der Tumorentstehung, die aufgrund einer weiteren Mutation zusätzlich zu einer vererbten Prädisposition basiert, wurde bereits 1953 von Carl Nordling postuliert und 1971 von Alfred Knudson als Two-Hit- oder auch Knudson-Hypothese ausformuliert (Nordling, 1953; Knudson, 1971). In Regressionsanalysen von NB konnte gezeigt werden, dass bei vererbten NB das mittlere Diagnosealter bei neun Monaten liegt, während in nicht genetisch vorbelasteten Patienten das NB nach rund 18 Monaten diagnostiziert wird. Die Two-Hit-Hypothese ist demnach bei NB zutreffend (Maris und Matthay, 1999).

Ein zweiter Befund dieser Arbeit ist, dass zumindest die Phox2b<sup>K155X</sup>-Mutation dominant-negativ auf die Expression charakteristischer Markergene wirkt, die einerseits sympathoadrenerge Neurone spezifizieren und andererseits mit

mildem Krankheitsverlauf assoziiert sind. Dedifferenzierung von Zellen wird beispielsweise in Hepatokarzinomen als Bestandteil der Tumorgenese diskutiert (Sell et al., 1993). Eine kürzlich durchgeführte Studie in einem NB-Mausmodell zeigt, dass Phox2b<sup>+</sup>/TH<sup>-</sup>-Neuroblasten die Tumogründerzellen darstellen (Alam et al., 2009). In menschlichen Föten werden bis zum Zeitpunkt der Geburt Neuroblastenknoten gefunden, die nach der Geburt regressieren (Brodeur et al., 2003). Mutationen im Phox2b-Gen könnten dazu beitragen, dass diese Neuroblastenknoten über einen längeren Zeitraum in einem undifferenzierten Status gehalten werden und somit die Empfänglichkeitsphase für weitere Tumor-initiiierende Ereignisse verlängert wird.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass NB-Phox2b-Mutationen sowohl über proliferationsstimulierende als auch dedifferenzierende Effekte zur Karzinogenese des NB beitragen könnten.

### 4.8 AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Phox2b<sup>HDmut</sup> proliferationsstimulierende und dedifferenzierende Effekte auf sympathoadrenerge Vorläuferzellen zeigen und so zur Entstehung des Neuroblastoms beitragen könnten. An der Vermittlung des Proliferationsstimulus ist der Transkriptionsfaktor Hand2 beteiligt. Eine direkte Beteiligung von Hand2 an der Kontrolle des Zellzyklus ist bisher nicht bekannt. Untersuchungen bekannter Zellzyklusregulatoren wie ZyklinD1-3 und der Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p18, p21 und p57<sup>kip2</sup> mit quantitativer PCR könnten Aufschluss darüber bringen, inwiefern sich Hand2-Knockdown und Überexpression auf das Expressionsniveau dieser Gene in sympathoadrenergen Vorläuferzellen auswirkt. Weitere Zielgene von Hand2 und Phox2b, unter denen sich neben proliferationsregulierenden- auch differenzierungsregulierende-Gene befinden könnten, wäre durch ChIP on Chip möglich. Hierbei würde über Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) durch Hand2 oder Phox2b gebundene DNA isoliert und durch Hybridisieren auf einem Microarray identifiziert.

Mit GST-Fusionsproteinen ist die Identifikation weiterer Interaktionspartner von Phox2b bzw. Hand2 möglich. Neben naheliegenden Kandidaten wie Gata2/3, wäre es denkbar, bisher unbekannte Interaktionspartner über eine massenspektrometrische Analyse (Maldi-Tof) zu identifizieren. Eine wichtige Anforderung der Massenspektrometrie ist eine relativ hohe Menge an Proteinen, die z.B. aus der SY5Y-Neuroblastomazelllinie gewonnen werden könnte. Das Lysat würde mit GST-Phox2b oder GST-Hand2 inkubiert und könnte über GST-Beads aufgereinigt werden. Durch SDS-PAGE und anschließendes Silver-Staining könnten dann sichtbare Proteinbanden der putativen Interaktionspartner ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert werden.

Die von Wu et al. untersuchte CCHS-Phox2b-Mutation (Phox2b<sup>+5Ala</sup>), die zu einem Phox2b-Protein mit verlängertem Polyalanin-Bereich führt, zeigte eine im Vergleich zu Phox2b<sup>wt</sup> verringerte Transaktivierungsaktivität erst bei Kotransfektion von CBP (Wu et al., 2009). Ein der physiologischen Situation eher entsprechender Versuchsaufbau eines Transaktivierungsassays mit Phox2b-Varianten, Kotransfektion von CBP und/oder Hand2 und dem Promotor der DBH könnte neue Hinweise zu strukturellen Konsequenzen der Phox2b-Mutationen erbringen.

Die Untersuchungen der Konsequenzen von Phox2b-Mutationen auf die Differenzierung sympathoadrenerger Vorläuferzellen sollten unter der heterozygoten, genetischen Situation durchgeführt werden, die den Bedingungen im Patienten entspricht. Mögliche Loss-of-Function-Effekte der Phox2b-Mutanten könnten durch das normale Komplement an endogenem Phox2b maskiert sein, welches, wie in den Proliferationsexperimenten gezeigt, mit siPhox2b reduziert werden könnte. Mit diesem experimentellen Ansatz sollte auch die Expressionsanalyse der Zellzyklusregulationsgene erneut durchgeführt werden, da bislang nur Daten in Gegenwart des normalen Phox2b-Komplements vorliegen. Zusätzlich wäre mit qPCR-Light-Cyclern eine präzisere Analyse der Expressionsniveaus der untersuchten Gene möglich.

Der wohl wichtigste Punkt ist die Überprüfung der *in vivo*-Relevanz der in dieser Arbeit gewonnenen *in vitro*-Daten. Die Kulturbedingungen für sympathoadrenerge Vorläuferzellen könnten z.B. durch das Fehlen oder das übermäßige

Vorhandensein trophischer Faktoren in den im Medium vorhandenen Pferde- und Kälberserum einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten haben. Zur Untersuchung der Konsequenzen von Phox2b-Varianten *in vivo* bietet sich die virale Infektion von Huhnembryonen mit RCAS-Viren an. Die Vorbereitungen dieser Versuche wurden zum Ende dieser Arbeit hin bereits abgeschlossen. Die Phox2b-Varianten wurden gemeinsam mit einer shRNA gegen Huhn-Phox2b in den für das RCAS-Virus-kodierenden RCAS-Vektor kloniert (Das et al., 2006). Neuralleistenzellen von E2-Huhnembryonen wurden mit RCAS-Viren infiziert und an E4,5 für drei Stunden mit EdU markiert, in 4% Paraformaldehyd fixiert und am Kryostat geschnitten. Durch Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen TH und EdU-Fluoreszenzfärbung wurden der Anteil proliferierender Zellen im paravertebralen Grenzstrang und die Gangliengröße bestimmt. Vorläufige Ergebnisse zeigen bei Infektion mit Phox2b<sup>R100L</sup>-, Phox2b<sup>R141G</sup>- und Phox2b<sup>K155X</sup>-Viren eine signifikant erhöhte Anzahl TH<sup>+</sup>-prolierender Zellen gegenüber der Kontrollinfektion mit RCAS-Virus ohne DNA-Insert. Die Gangliengröße ist in diesem Stadium nicht signifikant verändert. Die Analyse der Infektion mit Phox2b<sup>wt</sup> zeigte einen signifikanten, antiproliferativen Effekt. Zukünftige Experimente könnten beispielsweise einige Hypothesen dieser Arbeit weiter untermauern. Die Untersuchung von RCAS-Phox2b<sup>HDmut</sup>-shPhox2b infizierten Embryonen am Embryonaltag 8 könnte beispielweise Aufschluss darüber bringen, ob diese Embryonen tatsächlich eine verlängerte Neurogenese aufweisen, da in der Embryonalentwicklung des Huhns zu diesem Zeitpunkt sympathoadrenerge Neurone postmitotisch werden. Weiterhin könnte durch virusvermittelte Hand2-Überexpression die Rolle von Hand2 in der Proliferation sympathoadrenerger Vorläuferzellen zusätzlich zu den bereits bekannten Effekten aus Hand2-defizienten Mäusen näher untersucht werden

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Neuroblastom ist ein Tumor, der sich von sympathoadrenergen Vorläuferzellen ableitet und die häufigste solide Krebsform im Kindesalter darstellt. Das breite klinische Spektrum dieses Tumors, das von spontaner Regression zu fataler Progression reicht, spiegelt die außerordentliche biologische und genetische Heterogenität dieses Tumors wider. Polyploidie und Genexpressionsanalysen werden auf klinischer Seite zur Risiko- und Therapieeinschätzung eingesetzt. Genomweite Screeninganalysen identifizierten den Transkriptionsfaktor Phox2b als erstes Prädispositionsgen für NB.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Phox2b absolut essentiell für die Entstehung aller Ganglien des autonomen NS aus Neuralleistenzellen ist. Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der NB-assoziierten Phox2b-Mutationen auf Proliferations- und Differenzierungsverhalten sympathoadrenerger Vorläuferzellen zu untersuchen. Hierzu wurden paravertebrale, sympathische Grenzstränge aus Huhnembryonen des Embryonaltags 7 präpariert, dissoziiert und mit Expressionsplasmiden für Phox2b<sup>wt</sup> und NB-Phox2b-Mutationen transfiziert. Nach zwei Tagen in Kultur wurden mit molekularbiologische Methoden Veränderungen des Proliferations- und Differenzierungsverhalten untersucht.

Die Analyse des Proliferationsverhaltens transfizierter Neurone mit BrdU-Proliferationsassays und Phospho-Histon-3-Antikörpern offenbarte einen stark antiproliferativen Effekt des Phox2b<sup>wt</sup>-Proteins, den die untersuchten NB-Phox2b-Mutationen nicht aufwiesen. NB-Phox2b-Patienten sind heterozygot, d.h. Träger eines gesunden und eines mutierten Phox2b-Allels. Um die genetische Situation im NB-Patienten nachzuahmen, wurde mit spezifischen siRNAs das endogene Phox2b-Protein-Niveau herunter reguliert. NB-Phox2b-Mutationen mit mis- oder nonsense Mutation in der Homöodomäne zeigten unter Phox2b-Knockdown-Bedingungen einen proliferationsstimulierenden Effekt. Diese Experimente warfen die Frage auf, über welche Mechanismen

Phox2b und NB-Phox2b-Mutationen Einfluss auf die Zellzykluskontrolle nehmen. Die quantitative Analyse der Expression bekannter Zellzyklusregulatoren wie *Zyklin D1*, *D2* und *D3* und der Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren *p18*, *p21* und *p57<sup>kip2</sup>* verlief ergebnislos. Die Überexpression des Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitors *p27<sup>kip1</sup>* wirkte antiproliferativ auf Kulturen sympathoadrenerger Vorläuferzellen und das *p27<sup>kip1</sup>*-Expressionsniveau korrelierte mit dem Phox2b-Proteinniveau. *P27<sup>kip1</sup>* scheidet jedoch als alleiniger Vermittler des antiproliferativen Effekts von Phox2b aus, da die ebenfalls antiproliferativ wirkende Phox2-Homöodomäne keinen Einfluss auf das *p27<sup>kip1</sup>*-Expressionsniveau besitzt. Vielmehr wurde der bHLH-Transkriptionsfaktor Hand2 als Mediator der Proliferationseffekte von Phox2b identifiziert. Die Proliferation sympathoadrenerger Vorläuferzellen ist abhängig von der Hand2-Proteinmenge, und Hand2-Überexpression ist ausreichend, den antiproliferativen Effekt von Phox2b aufzuheben. Damit im Einklang geht der proliferationsstimulierende Effekt der Phox2b<sup>HDmut</sup> bei siRNA-vermitteltem Hand2-Knockdown verloren. Weiterhin führt Phox2b-Überexpression zu verringertem *Hand2*-Expressionsniveau und Phox2b-Knockdown zu vermehrter *Hand2*-Transkription. In Protein-Protein-Interaktionsexperimenten konnte eine direkte Bindung von Hand2 an Phox2b<sup>wt</sup> und die untersuchten NB-Phox2b-Mutanten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Hand2 in der Vermittlung der Phox2b-Proliferationseffekte auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene involviert ist. Der Wirkungsmechanismus dieser Phox2b-Varianten / Hand2-Komplexe konnte nicht endgültig geklärt werden und wird in Form verschiedener Modelle diskutiert.

In NB-Patienten korreliert ein hohes Expressionsniveau von Differenzierungsmarkern mit mildem Krankheitsverlauf. Die Rolle von Phox2b als Schlüsselgen in der Entstehung und Differenzierung autonomer Neurone und die genetische Heterogenität des NB legen eine Funktion von NB-Phox2b-Mutationen auf den Differenzierungsstatus sympathoadrenerger Vorläuferzellen nahe. In quantitativen Analysen wurde die Expression von Phox2b-Zielgenen und in NB-Diagnostik involvierten Genen untersucht. Phox2b<sup>K155X</sup>, eine C-terminal trunke NB-Phox2b-Mutation, wirkte dominant-negativ auf die Expression der noradrenergen Markergene *Th* und *Dbh*, *Tlx3* und die

Neurotrophinrezeptoren *trkA* und *p75*, deren reduzierte Expression mit schlechter Prognose und damit aggressiven NB-Formen korreliert ist.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NB-Phox2b-Mutationen in sympathoadrenergen Vorläuferzellen, den potentiellen Tumorentstehungszellen des NB, proliferationsstimulierend wirken und zumindest die C-terminal trunkeierte Phox2b<sup>K155X</sup>-Mutation zur Dedifferenzierung dieser Zellen führt. Hereditäre Mutationen in Phox2b könnten im Patienten nicht nur die terminale Differenzierung sympathischer Neurone stören, sondern auch durch eine verlängerte Phase der Neurogenese die Empfänglichkeit für weitere Tumor-initiiierende Mutation erhöhen.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|             |  |
|-------------|--|
| Abb.        | Abbildung  |
| bHLH        | basic Helix-Loop-Helix   |
| BMP         | Bone Morphogenetic Protein   |
| Bp          | Basenpaare   |
| BSA         | Bovine serum albumine  |
| c, ch, gg   | Huhn (chicken, <i>gallus gallus</i> )                                  |
| °C          | Grad Celsius   |
| Cash        | Chicken achaete-scute homologue  |
| cDNA        | komplementäre DNA  |
| dA          | dorsale Aorta  |
| DBH         | Dopamin-beta-Hydroxylase   |
| DF1         | Huhn Fibroblasten Zelllinie DF1  |
| dHand/Hand2 | deciduum, Heart, Autonomic Nervous System and Neural Crest Derivatives |
| DNA         | Desoxyribonukleinsäure   |
| DNase       | Desoxyribonuklease   |
| dNTP        | Desoxyribonukleotidtriphosphat   |
| DRG         | Hinterwurzelganglion (Dorsal Root Ganglion)                            |
| DTT         | Dithiotreitol  |
| E           | Embryonaltag   |
| EDTA        | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| FCS         | fötales Kälberserum  |
| G           | Gramm/Erdbeschleunigungskonstante                                      |
| HH          | Hamburger/Hamilton   |
| Kb          | Kilobasenpaare   |

|          |   |
|----------|---|
| kD       | Kilodalton  |
| Mash     | Mammalian achaete-scute homologue   |
| NBT      | Nitroblauaxolium  |
| N        | Notochord   |
| NB       | Neuroblastom  |
| NF       | Neurofilament   |
| NR       | Neuralrohr  |
| PBS      | phosphatgepufferte Salzlösung   |
| PCR      | Polymerase Ketten (chain) Reaktion  |
| Phox2a/b | paired like homeodomain containing protein a/b  |
| PNS      | peripheres Nervensystem   |
| RCAS-BP  | Replication competent, ALV LTR (Avian Leucosis virus-Long terminal repeat), Splice acceptor, Bryan Hight Titer Polymerase |
| RT       | reverse Transkriptase   |
| SCG10    | superior cervical ganglion clone 10   |
| SG       | sympathisches Ganglion  |
| St.      | Stadium   |
| TH       | Tyrosinhydroxylase  |
| U        | Unit  |
| upm      | Umdrehungen pro Minute  |
| Vol.     | Volumen   |
| v/v      | Volumen pro Volumen   |
| w/v      | Gewicht pro Volumen   |
| ZNS      | zentrales Nervensystem  |

## 6 LITERATURANGABEN

Adachi, M., Browne, D. & Lewis, E.J. (2000), "*Paired-like homeodomain proteins Phox2a/Arix and Phox2b/NBPhox have similar genetic organization and independently regulate dopamine beta-hydroxylase gene transcription.*", in DNA Cell Biol. Sep 2000. Volume 19(9), pp. 539-554. [\[DOI\]](#)

Adachi, M. & Lewis, E.J. (2002), "*The paired-like homeodomain protein, Arix, mediates protein kinase A-stimulated dopamine beta-hydroxylase gene transcription through its phosphorylation status.*", in J Biol Chem. Jun 2002. Volume 277(25), pp. 22915-22924. [\[DOI\]](#)

Agnihotri, S., Wolf, A., Picard, D., Hawkins, C. & Guha, A. (2009), "*GATA4 is a regulator of astrocyte cell proliferation and apoptosis in the human and murine central nervous system.*", in Oncogene. Aug 2009. Volume 28(34), pp. 3033-3046. [\[DOI\]](#)

Alam, G., Cui, H., Shi, H., Yang, L., Ding, J., Mao, L., Maltese, W.A. & Ding, H.-F. (2009), "*MYCN Promotes the Expansion of Phox2B-Positive Neuronal Progenitors to Drive Neuroblastoma Development.*", in Am J Pathol. Jul 2009. [\[DOI\]](#)

Albrecht, A. & Mundlos, S. (2005), "*The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders.*", in Curr Opin Genet Dev. Jun 2005. Volume 15(3), pp. 285-293. [\[DOI\]](#)

Albrecht, A.N., Kornak, U., Böddrich, A., Süring, K., Robinson, P.N., Stiege, A.C., Lurz, R., Stricker, S., Wanker, E.E. & Mundlos, S. (2004), "*A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions.*", in Hum Mol Genet. Oct 2004. Volume 13(20), pp. 2351-2359. [\[DOI\]](#)

Alonso, M.C. & Cabrera, C.V. (1988), "*The achaete-scute gene complex of Drosophila melanogaster comprises four homologous genes.*", in EMBO J. Aug 1988. Volume 7(8), pp. 2585-2591.

Alvarez-Rodríguez, R. & Pons, S. (2009), "*Expression of the proneural gene encoding Mash1 suppresses MYCN mitotic activity.*", in J Cell Sci. Feb 2009. [\[DOI\]](#)

Amiel, J., Laudier, B., Attié-Bitach, T., Trang, H., de Pontual, L., Gener, B., Trochet, D., Etchevers, H., Ray, P., Simonneau, M., Vekemans, M., Munnich, A., Gaultier, C. & Lyonnet, S. (2003), "*Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central*

*hypoventilation syndrome.*", in Nat Genet. Apr 2003. Volume 33(4), pp. 459-461. [\[DOI\]](#)

Amiel, J. & Lyonnet, S. (2001), "*Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review.*", in J Med Genet. Nov 2001. Volume 38(11), pp. 729-739.

Amiel, J., Trochet, D., Clément-Ziza, M., Munnich, A. & Lyonnet, S. (2004), "*Polyalanine expansions in human.*", in Hum Mol Genet. Oct 2004. Volume 13 Spec No 2, pp. R235-R243. [\[DOI\]](#)

Apostolova, G. & Dechant, G. (2009), "*Development of neurotransmitter phenotypes in sympathetic neurons.*", in Auton Neurosci. Sep 2009. [\[DOI\]](#)

Bagatell, R., Beck-Popovic, M., London, W.B., Zhang, Y., Pearson, A.D.J., Matthay, K.K., Monclair, T., Ambros, P.F., Cohn, S.L. & Group, I.N.R. (2009), "*Significance of MYCN amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database.*", in J Clin Oncol. Jan 2009. Volume 27(3), pp. 365-370.

Banerjee-Basu, S., Moreland, T., Hsu, B.J., Trout, K.L. & Baxevanis, A.D. (2003), "*The Homeodomain Resource: 2003 update.*", in Nucleic Acids Res. Jan 2003. Volume 31(1), pp. 304-306.

Banerjee-Basu, S., Ryan, J.F. & Baxevanis, A.D. (2000), "*The homeodomain resource: a prototype database for a large protein family.*", in Nucleic Acids Res. Jan 2000. Volume 28(1), pp. 329-330.

Banerjee-Basu, S., Sink, D.W. & Baxevanis, A.D. (2001), "*The Homeodomain Resource: sequences, structures, DNA binding sites and genomic information.*", in Nucleic Acids Res. Jan 2001. Volume 29(1), pp. 291-293.

BECKWITH, J.B. & PERRIN, E.V. (1963), "*IN SITU NEUROBLASTOMAS: A CONTRIBUTION TO THE NATURAL HISTORY OF NEURAL CREST TUMORS.*", in Am J Pathol. Dec 1963. Volume 43, pp. 1089-1104.

Benailly, H.K., Lapierre, J.M., Laudier, B., Amiel, J., Attié, T., Blois, M.C.D., Vekemans, M. & Romana, S.P. (2003), "*PMX2B, a new candidate gene for Hirschsprung's disease.*", in Clin Genet. Sep 2003. Volume 64(3), pp. 204-209.

Benfante, R., Flora, A., Lascio, S.D., Cargnin, F., Longhi, R., Colombo, S., Clementi, F. & Fornasari, D. (2007), "*Transcription factor PHOX2A regulates the human alpha3 nicotinic receptor subunit gene promoter.*", in J Biol Chem. May 2007. Volume 282(18), pp. 13290-13302. [\[DOI\]](#)

Berry-Kravis, E.M., Zhou, L., Rand, C.M. & Weese-Mayer, D.E. (2006), "*Congenital central hypoventilation syndrome: PHOX2B mutations and*

*phenotype.*", in Am J Respir Crit Care Med. Nov 2006. Volume 174(10), pp. 1139-1144. [\[DOI\]](#)

Bolande, R.P. (1997), "*Neurocristopathy: its growth and development in 20 years.*", in *Pediatr Pathol Lab Med*. Volume 17(1), pp. 1-25.

Borghini, S., Bachetti, T., Fava, M., Duca, M.D., Cargnin, F., Fornasari, D., Ravazzolo, R. & Ceccherini, I. (2006), "*The TLX2 homeobox gene is a transcriptional target of PHOX2B in neural-crest-derived cells.*", in *Biochem J*. Apr 2006. Volume 395(2), pp. 355-361. [\[DOI\]](#)

Bourdeaut, F., Janoueix-Lerosey, I., Lucchesi, C., Paris, R., Ribeiro, A., de Pontual, L., Amiel, J., Lyonnet, S., Pierron, G., Michon, J., Peuchmaur, M. & Delattre, O. (2009), "*Cholinergic switch associated with morphological differentiation in neuroblastoma.*", in *J Pathol*. Aug 2009. [\[DOI\]](#)

Brodeur, G.M. (2003), "*Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma.*", in *Nat Rev Cancer*. Mar 2003. Volume 3(3), pp. 203-216. [\[DOI\]](#)

Brodeur, G.M., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Iyer, R., Varela, C.R., Light, J.E., Kolla, V. & Evans, A.E. (2009), "*Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas.*", in *Clin Cancer Res*. May 2009. Volume 15(10), pp. 3244-3250. [\[DOI\]](#)

Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. & Bishop, J.M. (1984), "*Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage.*", in *Science*. Jun 1984. Volume 224(4653), pp. 1121-1124.

Brown, L.Y. & Brown, S.A. (2004), "*Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats.*", in *Trends Genet*. Jan 2004. Volume 20(1), pp. 51-58.

Bruun, J.-A., Thomassen, E.I.S., Kristiansen, K., Tylden, G., Holm, T., Mikkola, I., Bjørkøy, G. & Johansen, T. (2005), "*The third helix of the homeodomain of paired class homeodomain proteins acts as a recognition helix both for DNA and protein interactions.*", in *Nucleic Acids Res*. Volume 33(8), pp. 2661-2675. [\[DOI\]](#)

Cargnin, F., Flora, A., Lascio, S.D., Battaglioli, E., Longhi, R., Clementi, F. & Fornasari, D. (2005), "*PHOX2B regulates its own expression by a transcriptional auto-regulatory mechanism.*", in *J Biol Chem*. Nov 2005. Volume 280(45), pp. 37439-37448. [\[DOI\]](#)

Chen, Y., Takita, J., Choi, Y.L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., Wang, L., Soda, M., Kikuchi, A., Igarashi, T., Nakagawara, A., Hayashi, Y., Mano, H. & Ogawa, S. (2008), "*Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma.*", in *Nature*. Oct 2008. Volume 455(7215), pp. 971-974. [\[DOI\]](#)

- Chi, Y.-I. (2005), "*Homeodomain revisited: a lesson from disease-causing mutations.*", in Hum Genet. May 2005. Volume 116(6), pp. 433-444. [\[DOI\]](#)
- Chirgadze, Y.N., Zheltukhin, E.I., Polozov, R.V., Sivozhelezov, V.S. & Ivanov, V.V. (2009), "*Binding Regularities in Complexes of Transcription Factors with Operator DNA: Homeodomain Family.*", in J Biomol Struct Dyn. Jun 2009. Volume 26(6), pp. 687-700.
- Coppola, E., Pattyn, A., Guthrie, S.C., Goridis, C. & Studer, M. (2005), "*Reciprocal gene replacements reveal unique functions for Phox2 genes during neural differentiation.*", in EMBO J. Dec 2005. Volume 24(24), pp. 4392-4403. [\[DOI\]](#)
- Cotterman, R. & Knoepfler, P.S. (2009), "*N-Myc Regulates Expression of Pluripotency Genes in Neuroblastoma Including lif, klf2, klf4, and lin28b.*", in PLoS ONE. Volume 4(6), pp. e5799. [\[DOI\]](#)
- D'Elia, A.V., Tell, G., Paron, I., Pellizzari, L., Lonigro, R. & Damante, G. (2001), "*Missense mutations of human homeoboxes: A review.*", in Hum Mutat. Nov 2001. Volume 18(5), pp. 361-374. [\[DOI\]](#)
- Dai, Y.-S., Cserjesi, P., Markham, B.E. & Molkentin, J.D. (2002), "*The transcription factors GATA4 and dHAND physically interact to synergistically activate cardiac gene expression through a p300-dependent mechanism.*", in J Biol Chem. Jul 2002. Volume 277(27), pp. 24390-24398. [\[DOI\]](#)
- Das, R.M., Hateren, N.J.V., Howell, G.R., Farrell, E.R., Bangs, F.K., Porteous, V.C., Manning, E.M., McGrew, M.J., Ohyama, K., Sacco, M.A., Halley, P.A., Sang, H.M., Storey, K.G., Placzek, M., Tickle, C., Nair, V.K. & Wilson, S.A. (2006), "*A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon.*", in Dev Biol. Jun 2006. Volume 294(2), pp. 554-563. [\[DOI\]](#)
- Dauger, S., Pattyn, A., Lofaso, F., Gaultier, C., Goridis, C., Gallego, J. & Brunet, J.-F. (2003), "*Phox2b controls the development of peripheral chemoreceptors and afferent visceral pathways.*", in Development. Dec 2003. Volume 130(26), pp. 6635-6642. [\[DOI\]](#)
- Diskin, S.J., Hou, C., Glessner, J.T., Attiyeh, E.F., Laudenslager, M., Bosse, K., Cole, K., Mossé, Y.P., Wood, A., Lynch, J.E., Pecor, K., Diamond, M., Winter, C., Wang, K., Kim, C., Geiger, E.A., McGrady, P.W., Blakemore, A.I.F., London, W.B., Shaikh, T.H., Bradfield, J., Grant, S.F.A., Li, H., Devoto, M., Rappaport, E.R., Hakonarson, H. & Maris, J.M. (2009), "*Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma.*", in Nature. Jun 2009. Volume 459(7249), pp. 987-991. [\[DOI\]](#)
- Dityateva, G., Hammond, M., Thiel, C., Ruonala, M.O., Delling, M., Siebenkotten, G., Nix, M. & Dityatev, A. (2003), "*Rapid and efficient*

*electroporation-based gene transfer into primary dissociated neurons.*", in *J Neurosci Methods*. Nov 2003. Volume 130(1), pp. 65-73.

Dubreuil, V., Hirsch, M.R., Pattyn, A., Brunet, J.F. & Goidis, C. (2000), "*The Phox2b transcription factor coordinately regulates neuronal cell cycle exit and identity.*", in *Development*. Dec 2000. Volume 127(23), pp. 5191-5201.

Dubreuil, V., Hirsch, M.-R., Jouve, C., Brunet, J.-F. & Goidis, C. (2002), "*The role of Phox2b in synchronizing pan-neuronal and type-specific aspects of neurogenesis.*", in *Development*. Nov 2002. Volume 129(22), pp. 5241-5253.

Dubreuil, V., Ramanantsoa, N., Trochet, D., Vaubourg, V., Amiel, J., Gallego, J., Brunet, J.-F. & Goidis, C. (2008), "*A human mutation in Phox2b causes lack of CO<sub>2</sub> chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons.*", in *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 2008. Volume 105(3), pp. 1067-1072. [\[DOI\]](#)

Dyer, M.A. & Cepko, C.L. (2001), "*Regulating proliferation during retinal development.*", in *Nat Rev Neurosci*. May 2001. Volume 2(5), pp. 333-342. [\[DOI\]](#)

Dyer, M.A. & Cepko, C.L. (2000), "*Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury.*", in *Nat Neurosci*. Sep 2000. Volume 3(9), pp. 873-880. [\[DOI\]](#)

Dyer, M.A. & Cepko, C.L. (2000), "*p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina.*", in *Development*. Aug 2000. Volume 127(16), pp. 3593-3605.

Eckerle, I., Muth, D., Batzler, J., Henrich, K.-O., Lutz, W., Fischer, M., Witt, O., Schwab, M. & Westermann, F. (2009), "*Regulation of BIRC5 and its isoform BIRC5-2B in neuroblastoma.*", in *Cancer Lett*. Jun 2009. [\[DOI\]](#)

Eiden, L.E. (2009), "*Timing the Phox-Trot: Duration of Phox2a-Dependent Transcription Is Controlled by an Intramolecular Dephosphorylation/Phosphorylation Clock.*", in *Mol Cell Biol*. Jul 2009. [\[DOI\]](#)

Enomoto, H. (2009), "*Death comes early: apoptosis observed in ENS precursors.*", in *Neurogastroenterol Motil*. Jul 2009. Volume 21(7), pp. 684-687. [\[DOI\]](#)

Ernsberger, U. (2008), "*The role of GDNF family ligand signalling in the differentiation of sympathetic and dorsal root ganglion neurons.*", in *Cell Tissue Res*. Jul 2008. [\[DOI\]](#)

Ernsberger, U., Edgar, D. & Rohrer, H. (1989), "*The survival of early chick sympathetic neurons in vitro is dependent on a suitable substrate but independent of NGF.*", in *Dev Biol*. Oct 1989. Volume 135(2), pp. 250-262.

- Ernsberger, U., Patzke, H. & Rohrer, H. (1997), "*The developmental expression of choline acetyltransferase (ChAT) and the neuropeptide VIP in chick sympathetic neurons: evidence for different regulatory events in cholinergic differentiation.*", in Mech Dev. Nov 1997. Volume 68(1-2), pp. 115-126.
- Ernsberger, U., Patzke, H., Tissier-Seta, J.P., Reh, T., Goridis, C. & Rohrer, H. (1995), "*The expression of tyrosine hydroxylase and the transcription factors cPhox-2 and Cash-1: evidence for distinct inductive steps in the differentiation of chick sympathetic precursor cells.*", in Mech Dev. Jul 1995. Volume 52(1), pp. 125-136.
- Ernsberger, U., Reissmann, E., Mason, I. & Rohrer, H. (2000), "*The expression of dopamine beta-hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and Phox2 transcription factors in sympathetic neurons: evidence for common regulation during noradrenergic induction and diverging regulation later in development.*", in Mech Dev. Apr 2000. Volume 92(2), pp. 169-177.
- Ernsberger, U. & Rohrer, H. (1996), "*The development of the noradrenergic transmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons.*", in Neurochem Res. Jul 1996. Volume 21(7), pp. 823-829.
- Ernsberger, U., Sendtner, M. & Rohrer, H. (1989), "*Proliferation and differentiation of embryonic chick sympathetic neurons: effects of ciliary neurotrophic factor.*", in Neuron. Mar 1989. Volume 2(3), pp. 1275-1284.
- Firulli, B.A., Howard, M.J., McDaid, J.R., McIlreavey, L., Dionne, K.M., Centonze, V.E., Cserjesi, P., Virshup, D.M. & Firulli, A.B. (2003), "*PKA, PKC, and the protein phosphatase 2A influence HAND factor function: a mechanism for tissue-specific transcriptional regulation.*", in Mol Cell. Nov 2003. Volume 12(5), pp. 1225-1237.
- Firulli, B.A., Krawchuk, D., Centonze, V.E., Vargesson, N., Virshup, D.M., Conway, S.J., Cserjesi, P., Laufer, E. & Firulli, A.B. (2005), "*Altered Twist1 and Hand2 dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities.*", in Nat Genet. Apr 2005. Volume 37(4), pp. 373-381. [\[DOI\]](#)
- Firulli, B.A., Redick, B.A., Conway, S.J. & Firulli, A.B. (2007), "*Mutations within helix I of Twist1 result in distinct limb defects and variation of DNA binding affinities.*", in J Biol Chem. Sep 2007. Volume 282(37), pp. 27536-27546. [\[DOI\]](#)
- Firulli, B.A., Virshup, D.M. & Firulli, A.B. (2004), "*Phosphopeptide mapping of proteins ectopically expressed in tissue culture cell lines.*", in Biol Proced Online. Volume 6, pp. 16-22. [\[DOI\]](#)
- Flora, A., Lucchetti, H., Benfante, R., Goridis, C., Clementi, F. & Fornasari, D. (2001), "*Sp proteins and Phox2b regulate the expression of the human Phox2a gene.*", in J Neurosci. Sep 2001. Volume 21(18), pp. 7037-7045.

Garcia-Barceló, M., Sham, M.H., Lui, V.C.H., Chen, B.L.S., Ott, J. & Tam, P.K.H. (2003), "*Association study of PHOX2B as a candidate gene for Hirschsprung's disease.*", in Gut. Apr 2003. Volume 52(4), pp. 563-567.

George, R.E., Sanda, T., Hanna, M., Fröhling, S., Luther, W., Zhang, J., Ahn, Y., Zhou, W., London, W.B., McGrady, P., Xue, L., Zozulya, S., Gregor, V.E., Webb, T.R., Gray, N.S., Gilliland, D.G., Diller, L., Greulich, H., Morris, S.W., Meyerson, M. & Look, A.T. (2008), "*Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma.*", in Nature. Oct 2008. Volume 455(7215), pp. 975-978. [\[DOI\]](#)

Gestblom, C., Grynfeld, A., Ora, I., Ortoft, E., Larsson, C., Axelson, H., Sandstedt, B., Cserjesi, P., Olson, E.N. & Pålman, S. (1999), "*The basic helix-loop-helix transcription factor dHAND, a marker gene for the developing human sympathetic nervous system, is expressed in both high- and low-stage neuroblastomas.*", in Lab Invest. Jan 1999. Volume 79(1), pp. 67-79.

Ghysen, A. & Dambly-Chaudière, C. (1988), "*From DNA to form: the achaete-scute complex.*", in Genes Dev. May 1988. Volume 2(5), pp. 495-501.

Goo, H.W. (2009), "*Whole-body MRI of neuroblastoma.*", in Eur J Radiol. Sep 2009. [\[DOI\]](#)

Groves, A.K., George, K.M., Tissier-Seta, J.P., Engel, J.D., Brunet, J.F. & Anderson, D.J. (1995), "*Differential regulation of transcription factor gene expression and phenotypic markers in developing sympathetic neurons.*", in Development. Mar 1995. Volume 121(3), pp. 887-901.

Gui, H., Li, S. & Matise, M.P. (2007), "*A cell-autonomous requirement for Cip/Kip cyclin-kinase inhibitors in regulating neuronal cell cycle exit but not differentiation in the developing spinal cord.*", in Dev Biol. Jan 2007. Volume 301(1), pp. 14-26. [\[DOI\]](#)

Guillemot, F. & Joyner, A.L. (1993), "*Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system.*", in Mech Dev. Aug 1993. Volume 42(3), pp. 171-185.

Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, A., Anderson, D.J. & Joyner, A.L. (1993), "*Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons.*", in Cell. Nov 1993. Volume 75(3), pp. 463-476.

HAMBURGER, V. (1952), "*Development of the nervous system.*", in Ann N Y Acad Sci. Aug 1952. Volume 55(2), pp. 117-132.

Hendershot, T.J., Liu, H., Clouthier, D.E., Shepherd, I.T., Coppola, E., Studer, M., Firulli, A.B., Pittman, D.L. & Howard, M.J. (2008), "*Conditional deletion of Hand2 reveals critical functions in neurogenesis and cell type-specific gene*

*expression for development of neural crest-derived noradrenergic sympathetic ganglion neurons.*", in Dev Biol. Jul 2008. Volume 319(2), pp. 179-191. [\[DOI\]](#)

Hendershot, T.J., Liu, H., Sarkar, A.A., Giovannucci, D.R., Clouthier, D.E., Abe, M. & Howard, M.J. (2007), "*Expression of Hand2 is sufficient for neurogenesis and cell type-specific gene expression in the enteric nervous system.*", in Dev Dyn. Jan 2007. Volume 236(1), pp. 93-105. [\[DOI\]](#)

Henzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Hooser, A.V., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P. & Allis, C.D. (1997), "*Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation.*", in Chromosoma. Nov 1997. Volume 106(6), pp. 348-360.

Hirsch, M.R., Tiveron, M.C., Guillemot, F., Brunet, J.F. & Goriadis, C. (1998), "*Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system.*", in Development. Feb 1998. Volume 125(4), pp. 599-608.

Hoene, V., Fischer, M., Ivanova, A., Wallach, T., Berthold, F. & Dame, C. (2009), "*GATA factors in human neuroblastoma: distinctive expression patterns in clinical subtypes.*", in Br J Cancer. Oct 2009. Volume 101(8), pp. 1481-1489. [\[DOI\]](#)

Howard, M., Foster, D.N. & Cserjesi, P. (1999), "*Expression of HAND gene products may be sufficient for the differentiation of avian neural crest-derived cells into catecholaminergic neurons in culture.*", in Dev Biol. Nov 1999. Volume 215(1), pp. 62-77. [\[DOI\]](#)

Howard, M.J., Stanke, M., Schneider, C., Wu, X. & Rohrer, H. (2000), "*The transcription factor dHAND is a downstream effector of BMPs in sympathetic neuron specification.*", in Development. Sep 2000. Volume 127(18), pp. 4073-4081.

Hsieh, M.M., Lupas, G., Rychlik, J., Dziennis, S., Habecker, B.A. & Lewis, E.J. (2005), "*ERK1/2 is a negative regulator of homeodomain protein Arix/Phox2a.*", in J Neurochem. Sep 2005. Volume 94(6), pp. 1719-1727. [\[DOI\]](#)

Huber, K. & Ernsberger, U. (2006), "*Cholinergic differentiation occurs early in mouse sympathetic neurons and requires Phox2b.*", in Gene Expr. Volume 13(2), pp. 133-139.

Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugières, L., Ribeiro, A., de Pontual, L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., Valteau-Couanet, D., Frebourg, T., Michon, J., Lyonnet, S., Amiel, J. & Delattre, O. (2008), "*Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma.*", in Nature. Oct 2008. Volume 455(7215), pp. 967-970. [\[DOI\]](#)

- Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G. & Delattre, O. (2010), "*Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors.*", in *Oncogene*. Jan 2010. [\[DOI\]](#)
- Jasoni, C.L., Walker, M.B., Morris, M.D. & Reh, T.A. (1994), "*A chicken achaete-scute homolog (CASH-1) is expressed in a temporally and spatially discrete manner in the developing nervous system.*", in *Development*. Apr 1994. Volume 120(4), pp. 769-783.
- Jimenez-Sanchez, G., Childs, B. & Valle, D. (2001), "*Human disease genes.*", in *Nature*. Feb 2001. Volume 409(6822), pp. 853-855. [\[DOI\]](#)
- Jung, S., Park, R.-H., Kim, S., Jeon, Y.-J., Ham, D.-S., Jung, M.-Y., Kim, S.-S., Lee, Y.-D., Park, C.-H. & Suh-Kim, H. (2009), "*Id proteins facilitate self renewal and proliferation of neural stem cells.*", in *Stem Cells Dev*. Sep 2009. [\[DOI\]](#)
- Jögi, A., Persson, P., Grynfeld, A., Pålman, S. & Axelson, H. (2002), "*Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation.*", in *J Biol Chem*. Mar 2002. Volume 277(11), pp. 9118-9126. [\[DOI\]](#)
- Kalcheim, C. & Douarin, N.M.L. (1986), "*Requirement of a neural tube signal for the differentiation of neural crest cells into dorsal root ganglia.*", in *Dev Biol*. Aug 1986. Volume 116(2), pp. 451-466.
- Khan, A., Sarnat, H.B. & Spaetgens, R. (2008), "*Congenital muscle fiber-type disproportion in a patient with congenital central hypoventilation syndrome due to PHOX2B mutations.*", in *J Child Neurol*. Jul 2008. Volume 23(7), pp. 829-831. [\[DOI\]](#)
- Kim, H.S., Seo, H., Yang, C., Brunet, J.F. & Kim, K.S. (1998), "*Noradrenergic-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene requires synergy of multiple cis-acting elements including at least two Phox2a-binding sites.*", in *J Neurosci*. Oct 1998. Volume 18(20), pp. 8247-8260.
- Knudson, A.G. (1971), "*Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.*", in *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 1971. Volume 68(4), pp. 820-823.
- Kogner, P. (1995), "*Neuropeptides in neuroblastomas and ganglioneuromas.*", in *Prog Brain Res*. Volume 104, pp. 325-338.
- Kulesa, P.M., Lefcort, F. & Kasemeier-Kulesa, J.C. (2009), "*The migration of autonomic precursor cells in the embryo.*", in *Auton Neurosci*. Sep 2009. [\[DOI\]](#)
- Lasorella, A., Boldrini, R., Dominici, C., Donfrancesco, A., Yokota, Y., Inserra, A. & Iavarone, A. (2002), "*Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-myc in human neuroblastoma.*", in *Cancer Res*. Jan 2002. Volume 62(1), pp. 301-306.

Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y. & Iavarone, A. (2000), "*Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins.*", in Nature. Oct 2000. Volume 407(6804), pp. 592-598. [\[DOI\]](#)

Leon, T.Y.Y., Ngan, E.S.W., Poon, H.-C., So, M.-T., Lui, V.C.H., Tam, P.K.H. & Garcia-Barcelo, M.M. (2009), "*Transcriptional regulation of RET by Nkx2-1, Phox2b, Sox10, and Pax3.*", in J Pediatr Surg. Oct 2009. Volume 44(10), pp. 1904-1912. [\[DOI\]](#)

Li, R. & Morris, S.W. (2008), "*Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) small-molecule inhibitors for cancer therapy.*", in Med Res Rev. May 2008. Volume 28(3), pp. 372-412. [\[DOI\]](#)

van Limpt, V., Schramm, A., van Lakeman, A., Sluis, P., Chan, A., van Noesel, M., Baas, F., Caron, H., Eggert, A. & Versteeg, R. (2004), "*The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas.*", in Oncogene. Dec 2004. Volume 23(57), pp. 9280-9288. [\[DOI\]](#)

Liu, N., Barbosa, A.C., Chapman, S.L., Bezprozvannaya, S., Qi, X., Richardson, J.A., Yanagisawa, H. & Olson, E.N. (2009), "*DNA binding-dependent and -independent functions of the Hand2 transcription factor during mouse embryogenesis.*", in Development. Feb 2009. [\[DOI\]](#)

Liu, W.-D., Wang, H.-W., Muguira, M., Breslin, M.B. & Lan, M.S. (2006), "*INSM1 functions as a transcriptional repressor of the neuroD/beta2 gene through the recruitment of cyclin D1 and histone deacetylases.*", in Biochem J. Jul 2006. Volume 397(1), pp. 169-177. [\[DOI\]](#)

Lo, L., Morin, X., Brunet, J.F. & Anderson, D.J. (1999), "*Specification of neurotransmitter identity by Phox2 proteins in neural crest stem cells.*", in Neuron. Apr 1999. Volume 22(4), pp. 693-705.

Longo, L., Borghini, S., Schena, F., Parodi, S., Albino, D., Bachetti, T., Prato, L.D., Truini, M., Gambini, C., Tonini, G.P., Ceccherini, I. & Perri, P. (2008), "*PHOX2A and PHOX2B genes are highly co-expressed in human neuroblastoma.*", in Int J Oncol. Nov 2008. Volume 33(5), pp. 985-991.

Lucas, M.E., Müller, F., Rüdiger, R., Henion, P.D. & Rohrer, H. (2006), "*The bHLH transcription factor hand2 is essential for noradrenergic differentiation of sympathetic neurons.*", in Development. Oct 2006. Volume 133(20), pp. 4015-4024. [\[DOI\]](#)

Macleod, K. (1999), "*pRb and E2f-1 in mouse development and tumorigenesis.*", in Curr Opin Genet Dev. Feb 1999. Volume 9(1), pp. 31-39.

Maris, J.M. & Matthay, K.K. (1999), "*Molecular biology of neuroblastoma.*", in J Clin Oncol. Jul 1999. Volume 17(7), pp. 2264-2279.

Markel, H., Chandler, J. & Werr, W. (2002), "*Translational fusions with the engrailed repressor domain efficiently convert plant transcription factors into dominant-negative functions.*", in *Nucleic Acids Res.* Nov 2002. Volume 30(21), pp. 4709-4719.

Martín-Bermudo, M.D., Martínez, C., Rodríguez, A. & Jiménez, F. (1991), "*Distribution and function of the lethal of scute gene product during early neurogenesis in Drosophila.*", in *Development.* Oct 1991. Volume 113(2), pp. 445-454.

McGaughey, D.M., Stine, Z.E., Huynh, J.L., Vinton, R.M. & McCallion, A.S. (2009), "*Asymmetrical distribution of non-conserved regulatory sequences at PHOX2B is reflected at the ENCODE loci and illuminates a possible genome-wide trend.*", in *BMC Genomics.* Volume 10, pp. 8. [\[DOI\]](#)

Molenaar, J.J., Ebus, M.E., Koster, J., Santo, E., Geerts, D., Versteeg, R. & Caron, H.N. (2010), "*Cyclin D1 is a direct transcriptional target of GATA3 in neuroblastoma tumor cells.*", in *Oncogene.* Feb 2010. [\[DOI\]](#)

Moriguchi, T., Takako, N., Hamada, M., Maeda, A., Fujioka, Y., Kuroha, T., Huber, R.E., Hasegawa, S.L., Rao, A., Yamamoto, M., Takahashi, S., Lim, K.-C. & Engel, J.D. (2006), "*Gata3 participates in a complex transcriptional feedback network to regulate sympathoadrenal differentiation.*", in *Development.* Oct 2006. Volume 133(19), pp. 3871-3881. [\[DOI\]](#)

Morin, X., Cremer, H., Hirsch, M.R., Kapur, R.P., Goidis, C. & Brunet, J.F. (1997), "*Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene Phox2a.*", in *Neuron.* Mar 1997. Volume 18(3), pp. 411-423.

Mossé, Y.P., Wood, A. & Maris, J.M. (2009), "*Inhibition of ALK signaling for cancer therapy.*", in *Clin Cancer Res.* Sep 2009. Volume 15(18), pp. 5609-5614. [\[DOI\]](#)

Murakami, M., Kataoka, K., Tominaga, J., Nakagawa, O. & Kurihara, H. (2004), "*Differential cooperation between dHAND and three different E-proteins.*", in *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 2004. Volume 323(1), pp. 168-174. [\[DOI\]](#)

Murphy, D.M., Buckley, P.G., Bryan, K., Das, S., Alcock, L., Foley, N.H., Prenter, S., Bray, I., Watters, K.M., Higgins, D. & Stallings, R.L. (2009), "*Global MYCN Transcription Factor Binding Analysis in Neuroblastoma Reveals Association with Distinct E-Box Motifs and Regions of DNA Hypermethylation.*", in *PLoS One.* Volume 4(12), pp. e8154. [\[DOI\]](#)

Müller, F. & Rohrer, H. (2002), "*Molecular control of ciliary neuron development: BMPs and downstream transcriptional control in the parasympathetic lineage.*", in *Development.* Dec 2002. Volume 129(24), pp. 5707-5717.

Nagahama, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nagata, M., Tomita, K. & Nakayama, K. (2001), "*Spatial and temporal expression patterns of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 during mouse development.*", in *Anat Embryol (Berl)*. Feb 2001. Volume 203(2), pp. 77-87.

Nakagawara, A., Arima, M., Azar, C.G., Scavarda, N.J. & Brodeur, G.M. (1992), "*Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas.*", in *Cancer Res*. Mar 1992. Volume 52(5), pp. 1364-1368.

Nakajima, T., Ota, M. & Ito, K. (2008), "*Differentiation of autonomic neurons by BMP-independent mechanisms.*", in *Cell Tissue Res*. Apr 2008. Volume 332(1), pp. 25-35. [\[DOI\]](#)

Nakamura, Y., Ozaki, T., Koseki, H., Nakagawara, A. & Sakiyama, S. (2003), "*Accumulation of p27 KIP1 is associated with BMP2-induced growth arrest and neuronal differentiation of human neuroblastoma-derived cell lines.*", in *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 2003. Volume 307(1), pp. 206-213.

Nguyen, L., Besson, A., Roberts, J.M. & Guillemot, F. (2006), "*Coupling cell cycle exit, neuronal differentiation and migration in cortical neurogenesis.*", in *Cell Cycle*. Oct 2006. Volume 5(20), pp. 2314-2318.

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M. & Lazebnik, Y.A. (1995), "*Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.*", in *Nature*. Jul 1995. Volume 376(6535), pp. 37-43. [\[DOI\]](#)

NORDLING, C.O. (1953), "*A new theory on cancer-inducing mechanism.*", in *Br J Cancer*. Mar 1953. Volume 7(1), pp. 68-72.

Oehme, I., Deubzer, H.E., Wegener, D., Pickert, D., Linke, J.-P., Hero, B., Kopp-Schneider, A., Westermann, F., Ulrich, S.M., von Deimling, A., Fischer, M. & Witt, O. (2009), "*Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis.*", in *Clin Cancer Res*. Jan 2009. Volume 15(1), pp. 91-99. [\[DOI\]](#)

Paris, M., Wang, W.-H., Shin, M.-H., Franklin, D.S. & Andrisani, O.M. (2006), "*Homeodomain transcription factor Phox2a, via cyclic AMP-mediated activation, induces p27Kip1 transcription, coordinating neural progenitor cell cycle exit and differentiation.*", in *Mol Cell Biol*. Dec 2006. Volume 26(23), pp. 8826-8839. [\[DOI\]](#)

Passoni, L., Longo, L., Collini, P., Coluccia, A.M.L., Bozzi, F., Podda, M., Gregorio, A., Gambini, C., Garaventa, A., Pistoia, V., Grosso, F.D., Tonini, G.P., Cheng, M., Gambacorti-Passerini, C., Anichini, A., Fossati-Bellani, F., Nicola, M.D. & Luksch, R. (2009), "*Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients.*", in *Cancer Res*. Sep 2009. Volume 69(18), pp. 7338-7346. [\[DOI\]](#)

Pattyn, A., Goridis, C. & Brunet, J.F. (2000), "*Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b.*", in *Mol Cell Neurosci.* Mar 2000. Volume 15(3), pp. 235-243. [\[DOI\]](#)

Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C. & Brunet, J.F. (1999), "*The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives.*", in *Nature.* May 1999. Volume 399(6734), pp. 366-370. [\[DOI\]](#)

Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C. & Brunet, J.F. (1997), "*Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis.*", in *Development.* Oct 1997. Volume 124(20), pp. 4065-4075.

Perri, P., Bachetti, T., Longo, L., Matera, I., Seri, M., Tonini, G.P. & Ceccherini, I. (2005), "*PHOX2B mutations and genetic predisposition to neuroblastoma.*", in *Oncogene.* Apr 2005. Volume 24(18), pp. 3050-3053. [\[DOI\]](#)

Peverali, F.A., Ramqvist, T., Saffrich, R., Pepperkok, R., Barone, M.V. & Philipson, L. (1994), "*Regulation of G1 progression by E2A and Id helix-loop-helix proteins.*", in *EMBO J.* Sep 1994. Volume 13(18), pp. 4291-4301.

Plaza, S., Prince, F., Adachi, Y., Punzo, C., Cribbs, D.L. & Gehring, W.J. (2008), "*Cross-regulatory protein-protein interactions between Hox and Pax transcription factors.*", in *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 2008. Volume 105(36), pp. 13439-13444. [\[DOI\]](#)

de Pontual, L., Trochet, D., Bourdeaut, F., Thomas, S., Etchevers, H., Chompret, A., Minard, V., Valteau, D., Brugieres, L., Munnich, A., Delattre, O., Lyonnet, S., Janoueix-Lerosey, I. & Amiel, J. (2007), "*Methylation-associated PHOX2B gene silencing is a rare event in human neuroblastoma.*", in *Eur J Cancer.* Nov 2007. Volume 43(16), pp. 2366-2372. [\[DOI\]](#)

Raabe, E.H., Laudenslager, M., Winter, C., Wasserman, N., Cole, K., LaQuaglia, M., Maris, D.J., Mosse, Y.P. & Maris, J.M. (2008), "*Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma.*", in *Oncogene.* Jan 2008. Volume 27(4), pp. 469-476. [\[DOI\]](#)

Reissmann, E., Ernsberger, U., Francis-West, P.H., Rueger, D., Brickell, P.M. & Rohrer, H. (1996), "*Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons.*", in *Development.* Jul 1996. Volume 122(7), pp. 2079-2088.

young Roh, T., Wei, G., Farrell, C.M. & Zhao, K. (2007), "*Genome-wide prediction of conserved and nonconserved enhancers by histone acetylation patterns.*", in *Genome Res.* Jan 2007. Volume 17(1), pp. 74-81. [\[DOI\]](#)

Rohrer, H. & Ernsberger, U. (1998), *"The differentiation of the neurotransmitter phenotypes in chick sympathetic neurons."*, in Adv Pharmacol. Volume 42, pp. 891-895.

Rohrer, H., Henke-Fahle, S., el Sharkawy, T., Lux, H.D. & Thoenen, H. (1985), *"Progenitor cells from embryonic chick dorsal root ganglia differentiate in vitro to neurons: biochemical and electrophysiological evidence."*, in EMBO J. Jul 1985. Volume 4(7), pp. 1709-1714.

Rohrer, H. & Thoenen, H. (1987), *"Relationship between differentiation and terminal mitosis: chick sensory and ciliary neurons differentiate after terminal mitosis of precursor cells, whereas sympathetic neurons continue to divide after differentiation."*, in J Neurosci. Nov 1987. Volume 7(11), pp. 3739-3748.

Rohrer, T., Trachsel, D., Engelcke, G. & Hammer, J. (2002), *"Congenital central hypoventilation syndrome associated with Hirschsprung's disease and neuroblastoma: case of multiple neurocristopathies."*, in Pediatr Pulmonol. Jan 2002. Volume 33(1), pp. 71-76.

Rothenberg, A., Berdon, W., D'Angio, G., Yamashiro, D. & Cowles, R. (2008), *"Neuroblastoma-remembering the three physicians who described it a century ago: James Homer Wright, William Pepper, and Robert Hutchison."*, in Pediatr Radiol. Nov 2008. [\[DOI\]](#)

Rothman, T.P., Gershon, M.D. & Holtzer, H. (1978), *"The relationship of cell division to the acquisition of adrenergic characteristics by developing sympathetic ganglion cell precursors."*, in Dev Biol. Aug 1978. Volume 65(2), pp. 322-341.

Rothschild, G., Zhao, X., Iavarone, A. & Lasorella, A. (2006), *"E Proteins and Id2 converge on p57Kip2 to regulate cell cycle in neural cells."*, in Mol Cell Biol. Jun 2006. Volume 26(11), pp. 4351-4361. [\[DOI\]](#)

Roy, N.V., Preter, K.D., Hoebeek, J., Maerken, T.V., Pattyn, F., Mestdagh, P., Vermeulen, J., Vandesompele, J. & Speleman, F. (2009), *"The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assessment and targeted therapy."*, in Genome Med. Jul 2009. Volume 1(7), pp. 74. [\[DOI\]](#)

Rubie, H., Hartmann, O., Michon, J., Frappaz, D., Coze, C., Chastagner, P., Baranzelli, M.C., Plantaz, D., Avet-Loiseau, H., Bénard, J., Delattre, O., Favrot, M., Peyroulet, M.C., Thyss, A., Perel, Y., Bergeron, C., Courbon-Collet, B., Vannier, J.P., Lemerle, J. & Sommelet, D. (1997), *"N-Myc gene amplification is a major prognostic factor in localized neuroblastoma: results of the French NBL 90 study. Neuroblastoma Study Group of the Société Française d'Oncologie Pédiatrique."*, in J Clin Oncol. Mar 1997. Volume 15(3), pp. 1171-1182.

Rychlik, J.L., Gerbasi, V. & Lewis, E.J. (2003), "*The interaction between dHAND and Arx at the dopamine beta-hydroxylase promoter region is independent of direct dHAND binding to DNA.*", in J Biol Chem. Dec 2003. Volume 278(49), pp. 49652-49660. [\[DOI\]](#)

Rychlik, J.L., Hsieh, M., Eiden, L.E. & Lewis, E.J. (2005), "*Phox2 and dHAND transcription factors select shared and unique target genes in the noradrenergic cell type.*", in J Mol Neurosci. Volume 27(3), pp. 281-292. [\[DOI\]](#)

Rüdiger, R., Binder, E., Tsarovina, K., Schmidt, M., Reiff, T., Stubbusch, J. & Rohrer, H. (2009), "*In vivo role for CREB signaling in the noradrenergic differentiation of sympathetic neurons.*", in Mol Cell Neurosci. Oct 2009. Volume 42(2), pp. 142-151. [\[DOI\]](#)

Schmidt, M., Lin, S., Pape, M., Ernsberger, U., Stanke, M., Kobayashi, K., Howard, M.J. & Rohrer, H. (2009), "*The bHLH transcription factor Hand2 is essential for the maintenance of noradrenergic properties in differentiated sympathetic neurons.*", in Dev Biol. May 2009. Volume 329(2), pp. 191-200. [\[DOI\]](#)

Schneider, C., Wicht, H., Enderich, J., Wegner, M. & Rohrer, H. (1999), "*Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons.*", in Neuron. Dec 1999. Volume 24(4), pp. 861-870.

Seidman, J.G. & Seidman, C. (2002), "*Transcription factor haploinsufficiency: when half a loaf is not enough.*", in J Clin Invest. Feb 2002. Volume 109(4), pp. 451-455. [\[DOI\]](#)

Sell, S. (1993), "*Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest?*", in Environ Health Perspect. Dec 1993. Volume 101 Suppl 5, pp. 15-26.

Seo, H., Hong, S.J., Guo, S., Kim, H.-S., Kim, C.-H., Hwang, D.-Y., Isacson, O., Rosenthal, A. & Kim, K.-S. (2002), "*A direct role of the homeodomain proteins Phox2a/2b in noradrenaline neurotransmitter identity determination.*", in J Neurochem. Mar 2002. Volume 80(5), pp. 905-916.

Serra, A., Häberle, B., König, I.R., Kappler, R., Suttorp, M., Schackert, H.K., Roesner, D. & Fitze, G. (2008), "*Rare occurrence of PHOX2b mutations in sporadic neuroblastomas.*", in J Pediatr Hematol Oncol. Oct 2008. Volume 30(10), pp. 728-732. [\[DOI\]](#)

Shah, N.M., Groves, A.K. & Anderson, D.J. (1996), "*Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members.*", in Cell. May 1996. Volume 85(3), pp. 331-343.

Shin, M.H., Mavila, N., Wang, W.-H., Alvarez, S.V., Hall, M.C. & Andrisani, O.M. (2009), "*Time-dependent activation of Phox2a by the cyclic AMP pathway*

*modulates onset and duration of p27Kip1 transcription.*", in Mol Cell Biol. Sep 2009. Volume 29(18), pp. 4878-4890. [\[DOI\]](#)

Shirasawa, S., Yunker, A.M., Roth, K.A., Brown, G.A., Horning, S. & Korsmeyer, S.J. (1997), "*Enx (Hox11L1)-deficient mice develop myenteric neuronal hyperplasia and megacolon.*", in Nat Med. Jun 1997. Volume 3(6), pp. 646-650.

Sholler, G.L.S., Brard, L., Straub, J.A., Dorf, L., Illeyne, S., Koto, K., Kalkunte, S., Bosenberg, M., Ashikaga, T. & Nishi, R. (2009), "*Nifurtimox induces apoptosis of neuroblastoma cells in vitro and in vivo.*", in J Pediatr Hematol Oncol. Mar 2009. Volume 31(3), pp. 187-193. [\[DOI\]](#)

Skeath, J.B. & Carroll, S.B. (1992), "*Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the Drosophila embryo.*", in Development. Apr 1992. Volume 114(4), pp. 939-946.

Song, S., Cooperman, J., Letting, D.L., Blobel, G.A. & Choi, J.K. (2004), "*Identification of cyclin D3 as a direct target of E2A using DamID.*", in Mol Cell Biol. Oct 2004. Volume 24(19), pp. 8790-8802. [\[DOI\]](#)

Stanke, M., Geissen, M., Götz, R., Ernsberger, U. & Rohrer, H. (2000), "*The early expression of VAcHT and VIP in mouse sympathetic ganglia is not induced by cytokines acting through LIFRbeta or CNTFRalpha.*", in Mech Dev. Mar 2000. Volume 91(1-2), pp. 91-96.

Stanke, M., Junghans, D., Geissen, M., Golidis, C., Ernsberger, U. & Rohrer, H. (1999), "*The Phox2 homeodomain proteins are sufficient to promote the development of sympathetic neurons.*", in Development. Sep 1999. Volume 126(18), pp. 4087-4094.

Stanke, M., Stubbusch, J. & Rohrer, H. (2004), "*Interaction of Mash1 and Phox2b in sympathetic neuron development.*", in Mol Cell Neurosci. Mar 2004. Volume 25(3), pp. 374-382. [\[DOI\]](#)

Stoica, G.E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D.J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A.T. & Wellstein, A. (2001), "*Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin.*", in J Biol Chem. May 2001. Volume 276(20), pp. 16772-16779. [\[DOI\]](#)

Stoica, G.E., Kuo, A., Powers, C., Bowden, E.T., Sale, E.B., Riegel, A.T. & Wellstein, A. (2002), "*Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types.*", in J Biol Chem. Sep 2002. Volume 277(39), pp. 35990-35998. [\[DOI\]](#)

Straub, J.A., Sholler, G.L.S. & Nishi, R. (2007), "*Embryonic sympathoblasts transiently express TrkB in vivo and proliferate in response to brain-derived neurotrophic factor in vitro.*", in BMC Dev Biol. Volume 7, pp. 10. [\[DOI\]](#)

Swanson, D.J., Adachi, M. & Lewis, E.J. (2000), "*The homeodomain protein Arx promotes protein kinase A-dependent activation of the dopamine beta-hydroxylase promoter through multiple elements and interaction with the coactivator cAMP-response element-binding protein-binding protein.*", in J Biol Chem. Jan 2000. Volume 275(4), pp. 2911-2923.

Thattaliyath, B.D., Firulli, B.A. & Firulli, A.B. (2002), "*The basic-helix-loop-helix transcription factor HAND2 directly regulates transcription of the atrial natriuretic peptide gene.*", in J Mol Cell Cardiol. Oct 2002. Volume 34(10), pp. 1335-1344.

Trochet, D., Bourdeaut, F., Janoueix-Lerosey, I., Deville, A., de Pontual, L., Schleiermacher, G., Coze, C., Philip, N., Frébourg, T., Munnich, A., Lyonnet, S., Delattre, O. & Amiel, J. (2004), "*Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma.*", in Am J Hum Genet. Apr 2004. Volume 74(4), pp. 761-764. [\[DOI\]](#)

Trochet, D., Hong, S.J., Lim, J.K., Brunet, J.-F., Munnich, A., Kim, K.-S., Lyonnet, S., Goridis, C. & Amiel, J. (2005), "*Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction.*", in Hum Mol Genet. Dec 2005. Volume 14(23), pp. 3697-3708. [\[DOI\]](#)

Trochet, D., Mathieu, Y., de Pontual, L., Savarirayan, R., Munnich, A., Brunet, J.-F., Lyonnet, S., Goridis, C. & Amiel, J. (2009), "*In Vitro studies of non poly alanine PHOX2B mutations argue against a loss-of-function mechanism for congenital central hypoventilation.*", in Hum Mutat. Feb 2009. Volume 30(2), pp. E421-E431. [\[DOI\]](#)

Trochet, D., O'Brien, L.M., Gozal, D., Trang, H., Nordenskjöld, A., Laudier, B., Svensson, P.-J., Uhrig, S., Cole, T., Niemann, S., Munnich, A., Gaultier, C., Lyonnet, S. & Amiel, J. (2005), "*PHOX2B genotype allows for prediction of tumor risk in congenital central hypoventilation syndrome.*", in Am J Hum Genet. Mar 2005. Volume 76(3), pp. 421-426. [\[DOI\]](#)

Trochet, D., de Pontual, L., Estêvão, M.H., Mathieu, Y., Munnich, A., Feingold, J., Goridis, C., Lyonnet, S. & Amiel, J. (2008), "*Homozygous mutation of the PHOX2B gene in congenital central hypoventilation syndrome (Ondine's Curse).*", in Hum Mutat. May 2008. Volume 29(5), pp. 770. [\[DOI\]](#)

Trochet, D., de Pontual, L., Keren, B., Munnich, A., Vekemans, M., Lyonnet, S. & Amiel, J. (2007), "*Polyalanine expansions might not result from unequal crossing-over.*", in Hum Mutat. Oct 2007. Volume 28(10), pp. 1043-1044. [\[DOI\]](#)

Trochet, D., de Pontual, L., Straus, C., Gozal, D., Trang, H., Landrieu, P., Munnich, A., Lyonnet, S., Gaultier, C. & Amiel, J. (2008), "*PHOX2B germline and somatic mutations in late-onset central hypoventilation syndrome.*", in *Am J Respir Crit Care Med.* Apr 2008. Volume 177(8), pp. 906-911. [\[DOI\]](#)

Tsarovina, K., Pattyn, A., Stubbusch, J., Müller, F., van der Wees, J., Schneider, C., Brunet, J.-F. & Rohrer, H. (2004), "*Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development.*", in *Development.* Oct 2004. Volume 131(19), pp. 4775-4786. [\[DOI\]](#)

Tsarovina, K., Schellenberger, J., Schneider, C. & Rohrer, H. (2008), "*Progenitor cell maintenance and neurogenesis in sympathetic ganglia involves Notch signaling.*", in *Mol Cell Neurosci.* Jan 2008. Volume 37(1), pp. 20-31. [\[DOI\]](#)

Urist, M.R. (1965), "*Bone: formation by autoinduction.*", in *Science.* Nov 1965. Volume 150(698), pp. 893-899.

Varley, J.E. & Maxwell, G.D. (1996), "*BMP-2 and BMP-4, but not BMP-6, increase the number of adrenergic cells which develop in quail trunk neural crest cultures.*", in *Exp Neurol.* Jul 1996. Volume 140(1), pp. 84-94. [\[DOI\]](#)

Vickers, E.R. & Sharrocks, A.D. (2002), "*The use of inducible engrailed fusion proteins to study the cellular functions of eukaryotic transcription factors.*", in *Methods.* Mar 2002. Volume 26(3), pp. 270-280. [\[DOI\]](#)

Vidal, A. & Koff, A. (2000), "*Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause.*", in *Gene.* Apr 2000. Volume 247(1-2), pp. 1-15.

Vogel-Höpker, A. & Rohrer, H. (2002), "*The specification of noradrenergic locus coeruleus (LC) neurones depends on bone morphogenetic proteins (BMPs).*", in *Development.* Feb 2002. Volume 129(4), pp. 983-991.

Voth, H., Oberthuer, A., Simon, T., Kahlert, Y., Berthold, F. & Fischer, M. (2009), "*Co-regulated expression of HAND2 and DEIN by a bidirectional promoter with asymmetrical activity in neuroblastoma.*", in *BMC Mol Biol.* Volume 10, pp. 28. [\[DOI\]](#)

Wang, Q., Hii, G., Shusterman, S., Mosse, Y., Winter, C.L., Guo, C., Zhao, H., Rappaport, E., Hogarty, M.D. & Maris, J.M. (2003), "*ID2 expression is not associated with MYCN amplification or expression in human neuroblastomas.*", in *Cancer Res.* Apr 2003. Volume 63(7), pp. 1631-1635.

Wang, Z. & Moulton, J. (2001), "*SNPs, protein structure, and disease.*", in *Hum Mutat.* Apr 2001. Volume 17(4), pp. 263-270. [\[DOI\]](#)

- Weiss, W.A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B.G. & Bishop, J.M. (1997), "*Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice.*", in EMBO J. Jun 1997. Volume 16(11), pp. 2985-2995. [DOI](#)
- Wilzén, A., Nilsson, S., Sjöberg, R.-M., Kogner, P., Martinsson, T. & Abel, F. (2009), "*The Phox2 pathway is differentially expressed in neuroblastoma tumors, but no mutations were found in the candidate tumor suppressor gene PHOX2A.*", in Int J Oncol. Mar 2009. Volume 34(3), pp. 697-705.
- Wolf, E., Black, I.B. & DiCicco-Bloom, E. (1999), "*Mitotic sympathetic neuroblasts initiate axonal pathfinding in vivo.*", in J Neurobiol. Sep 1999. Volume 40(3), pp. 366-374.
- Wu, H.-T., Su, Y.-N., Hung, C.-C., Hsieh, W.-S. & Wu, K.-J. (2009), "*Interaction between PHOX2B and CREBBP mediates synergistic activation: mechanistic implications of PHOX2B mutants.*", in Hum Mutat. Feb 2009. [DOI](#)
- Xu, H., Firulli, A.B., Zhang, X. & Howard, M.J. (2003), "*HAND2 synergistically enhances transcription of dopamine-beta-hydroxylase in the presence of Phox2a.*", in Dev Biol. Oct 2003. Volume 262(1), pp. 183-193.
- Yang, C., Kim, H.S., Seo, H., Kim, C.H., Brunet, J.F. & Kim, K.S. (1998), "*Paired-like homeodomain proteins, Phox2a and Phox2b, are responsible for noradrenergic cell-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene.*", in J Neurochem. Nov 1998. Volume 71(5), pp. 1813-1826.
- Yokoyama, M., Watanabe, H. & Nakamura, M. (1999), "*Genomic structure and functional characterization of NBPhox (PMX2B), a homeodomain protein specific to catecholaminergic cells that is involved in second messenger-mediated transcriptional activation.*", in Genomics. Jul 1999. Volume 59(1), pp. 40-50. [DOI](#)
- Zackenfels, K., Oppenheim, R.W. & Rohrer, H. (1995), "*Evidence for an important role of IGF-I and IGF-II for the early development of chick sympathetic neurons.*", in Neuron. Apr 1995. Volume 14(4), pp. 731-741.
- Zellmer, E., Zhang, Z., Greco, D., Rhodes, J., Cassel, S. & Lewis, E.J. (1995), "*A homeodomain protein selectively expressed in noradrenergic tissue regulates transcription of neurotransmitter biosynthetic genes.*", in J Neurosci. Dec 1995. Volume 15(12), pp. 8109-8120.
- Zhao, F., Vilardi, A., Neely, R.J. & Choi, J.K. (2001), "*Promotion of cell cycle progression by basic helix-loop-helix E2A.*", in Mol Cell Biol. Sep 2001. Volume 21(18), pp. 6346-6357.

ERKLÄRUNG

Die Präparationen der SCG- und ST-Ganglien aus E12,5 Mausembryonen wurden von Afsaneh Majdazari durchgeführt (siehe Seite 31).

Die virale Infektion von E2-Huhnembryonen mit RCAS-Viruspartikeln wurde von Sabine Stanzel durchgeführt (siehe Seite 99).

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt am Main, den 15. März 2010

---

Tobias Reiff