# Globale Analyse phosphotyrosinabhängiger Signaltransduktion im Neuroblastom

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, der Universität Hamburg

> vorgelegt von Dipl.-Biochem.

Malik Florian Amadeus KHENKHAR

Hamburg, 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. C. WAGENER Weiterer Gutachter der Dissertation: Priv.-Doz. Dr. H. LÜTHEN Tag der Disputation: 14. März 2014

Hamburg, den 27. Februar 2014

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie

## Inhaltsverzeichnis

| Einleitung   | 1               |  |
|--|-----------------|--|
| Das Neuroblastom   | 1               |  |
| Phosphotyrosinabhangige Signaitransduktion   | 4               |  |
| Phosphotyrosinabhängige Signaltransduktion im Neuroblastom   | 10              |  |
| Ansatz der vorliegenden Arbeit   | 13              |  |
| Methoden   | 15              |  |
| Präparation von SH2-Domänen  | 15              |  |
| Zellkultur   | 16              |  |
| Tumormaterial  | 16              |  |
| Präparation von Zelllysaten  | 17              |  |
| Far-Western Blot-Analysen  | 18              |  |
| Western Biot-Analysen  | 19              |  |
| RIN-ELIJA<br>Densitometrische Auswertung   | 20              |  |
| Clusteranalysen von SH2-Profilen   | 21              |  |
| Statistische Analysen  | 24              |  |
| Ergebnisse   | 25              |  |
| Far-Western Blot-Analyse von Neuroblastom-Zelllinien   | 25              |  |
| Clusteranalyse der SH2-Profile von Neuroblastom-Zelllinien   | 27              |  |
| Molekulare Charakterisierung von Neuroblastom-Tumorproben  | 31              |  |
| Far-Western Blot-Analyse von Neuroblastom-Tumorproben  | 39              |  |
| Ciusteranalyse der SH2-Profile von Neuroblastom-Tumorproben<br>Bestimmung differenziell phosphorylierter nV-Banden | 43<br>//8       |  |
|  | 40<br>E E       |  |
| SH2-Profiling im Neuroblastom  | <b>33</b><br>55 |  |
| RTK-Expression und Implikationen für die Therapie  | 58              |  |
| Ausblick und abschließende Überlegungen  | 62              |  |
| Zusammenfassung  | 67              |  |
| Summary  | 69              |  |
| Literaturverzeichnis   | 71              |  |
| Veröffentlichungen und Förderungen   | 83              |  |
| Danksagung   |                 |  |
| Eidesstattliche Erklärung  |                 |  |

## **Das Neuroblastom**

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor des peripheren sympathischen Nervensystems und macht mit etwa 130 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland ca. 7 % aller malignen Erkrankungen des Kindesalters aus<sup>1,2</sup>. Es geht aus neuroektodermalen Vorläuferzellen der Neuralleiste hervor, welche im Laufe der normalen Fötalentwicklung zu den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks sowie zu paravertebralen Ganglien des Grenzstranges ausdifferenzieren<sup>2,3</sup>. Primäre Neuroblastome treten entsprechend im Bereich der Nebennieren sowie beidseits entlang der gesamten Wirbelsäule auf, in etwa der Hälfte der Fälle werden darüber hinaus Metastasen in Knochenmark, Knochen, Lymphknoten, der Leber und/oder der Haut festgestellt<sup>4–6</sup>. Bei Kindern unter 15 Jahren stellt das Neuroblastom den am häufigsten vorkommenden, extrakranialen soliden Tumor dar, im ersten Lebensjahr ist es sogar die am häufigsten diagnostizierte Tumorerkrankung überhaupt<sup>4,5</sup>. Es wird im Median mit 14 Monaten diagnostiziert und ist verantwortlich für ca. 11 % der durch pädiatrische Tumorerkrankungen verursachten Todesfälle<sup>1,2</sup>.

Zur Ätiologie des Neuroblastoms ist bislang wenig bekannt, postnatale Umwelteinflüsse scheinen jedoch vermutlich keine entscheidende Rolle zu spielen<sup>4,7</sup>. Die überwiegende Mehrzahl der Neuroblastome tritt sporadisch auf, in lediglich 1 % der Fälle handelt es sich um hereditäre Formen, für welche Keimbahnmutationen in den Genen *ALK* und *PHOX2B* als Hauptursachen identifiziert wurden<sup>8-11</sup>. Für sporadische Neuroblastome wurden in genomweiten Assoziationsstudien einige DNA-Polymorphismen entdeckt, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert sind, gemeinsam jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Anfälligkeit für das Neuroblastom nehmen<sup>12-17</sup>. Darüber hinaus sind nur wenige wiederkehrende, somatische Mutationen für das Neuroblastom bekannt, so unter anderem Mutationen in den Genen *ALK*, *PTPN11*, *ATRX*, *MYCN*, *NRAS*, *ARID1A* und *ARID1B*, um die wichtigsten Vertreter anzuführen<sup>18-22</sup>.

Hinsichtlich des klinischen Verlaufs weist das Neuroblastom eine erstaunliche Heterogenität auf<sup>2,5</sup>. Das Spektrum reicht dabei von spontaner Regression ohne

jegliche therapeutische Intervention über die Ausdifferenzierung zu benignen Ganglioneuroblastomen und Ganglioneuromen bis hin zur persistenten und schließlich tödlichen Progression therapieresistenter Tumoren<sup>2,4,6</sup>. Während sich die Überlebensraten wohldefinierter Patientengruppen in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert haben, ist der Ausgang für Patienten mit Neuroblastomen eines aggressiven Phänotyps nahezu unverändert geblieben<sup>4,5</sup>. Es konnten jedoch im Laufe der Jahre zahlreiche biologische und molekulare Risikofaktoren identifiziert werden, welche den voraussichtlichen klinischen Verlauf eines Neuroblastoms gut vorherzusagen vermögen, und anhand derer sich die Tumoren Risikogruppen unterschiedlicher Prognosen zuordnen lassen<sup>2</sup>.

Das bekannteste und weltweit in der pädiatrischen Onkologie im Einsatz befindliche System zur Klassifikation von Neuroblastomen ist das INSS (International Neuroblastoma Staging System), nach welchem die Erkrankung in fünf Stadien eingeteilt wird<sup>23</sup>. Bei Neuroblastomen der Stadien 1 und 2 handelt es sich um lokale, meist vollständig resezierbare Tumoren ohne bzw. mit Beteiligung regionaler Lymphknoten, das Stadium 3 bezeichnet nicht vollständig resezierbare Tumoren, welche über die Körpermitte hinaus wachsen, das Stadium 4 wiederum solche Neuroblastome mit Metastasen in entfernten Lymphknoten und/oder anderen Organen<sup>23</sup>. Darüber hinaus wird in etwa 5 % der Fälle das Stadium 4S beobachtet<sup>5,23</sup>. Diese Patienten sind jünger als ein Jahr und weisen lokale Primärtumoren und Metastasen in Haut, Leber oder Knochenmark auf, welche bemerkenswerterweise nahezu immer spontan regredieren<sup>23</sup>.

Das INSS-Stadium ist signifikant mit dem klinischen Verlauf assoziiert, allerdings klassifiziert es Neuroblastome lediglich anhand der Tumorlast und -ausdehnung bzw. des Ausmaßes der Resektion, und vernachlässigt weitere bedeutsame Faktoren, welche in der Klinik zur besseren Risikostratifizierung ebenfalls berücksichtigt werden<sup>5,6,23,24</sup>. Ein wichtiger unabhängiger Risikofaktor ist das Alter bei Diagnose, welches, obwohl es in Bezug auf die Prognose eine kontinuierliche Variable darstellt, in der Klinik als dichotomer Risikofaktor verwendet wird; jüngere Patienten ( $\leq$  18 Monate) weisen dabei gegenüber älteren (> 18 Monate) eine bessere Prognose auf<sup>6,24,25</sup>. Weiterhin gibt es verschiedene chromosomale Aberrationen mit prognostischer Aussagekraft für Neuroblastom, wichtige das zwei

molekulargenetische Risikofaktoren sind z.B. die Status des MYCN-Gens und des Chromosomenabschnitts 1p<sup>24,26,27</sup>. Der Verlust von 1p, sowie insbesondere eine Amplifikation des MYCN-Gens sind hierbei jeweils mit einer schlechten Prognose assoziiert<sup>24</sup>. Die Integration von INSS-Stadium, Alter bei Diagnose, MYCN-Status und 1p-Status erlaubt bereits eine recht zuverlässige Risikostratifizierung des Neuroblastoms<sup>5,28</sup>. Anfang 2009 wurde schließlich von der international kollaborierenden INRG-Arbeitsgruppe (International Neuroblastoma Risk Group) ein anhand der Daten von 8800 Patienten überarbeitetes System zur Klassifikation des Neuroblastoms publiziert<sup>24,29</sup>. Dieses stellt eine Überarbeitung des INSS dar, welches unter Berücksichtigung der wichtigsten prognostischen Faktoren eine genauere Risikoeinteilung erlaubt, hat bislang jedoch nicht überall Einzug halten können.



**Abbildung 1. Überlebensraten von Neuroblastom-Patienten verschiedener Risikogruppen.** Zwischen 1986 und 2001 in den USA behandelte Neuroblastom-Patienten wurden, basierend auf klinischen und biologischen Eigenschaften der Tumoren, in Gruppen niedrigen, mittleren sowie hohen Risikos eingeteilt. Die ereignisfreien Überlebensraten der Risikogruppen sind in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Modifiziert nach Maris *et al.*<sup>5</sup>

Anhand der aufgeführten Risikofaktoren ergeben sich für das Neuroblastom drei Risikogruppen, die sich hinsichtlich des klinischen Verlaufs erheblich voneinander unterscheiden<sup>2,4,5</sup> (Abbildung 1). Etwa 30 % der Neuroblastome fallen in die Gruppe niedrigen Risikos mit exzellenter Prognose<sup>4</sup>. Bei diesen Patienten sind oftmals eine Beobachtung des Tumors bzw. eine Resektion desselben ausreichend, was auf die hohen Raten an spontaner Regression bzw. Ausdifferenzierung, die für das Neuroblastom beobachtet werden, zurückzuführen ist<sup>2,4–6</sup>. Patienten mittleren Risikos (ca. 20 % der Fälle) werden in der Regel zusätzlich chemotherapeutisch behandelt,

um eine Remission der Tumoren zu induzieren, und weisen dank häufig zu beobachtendem Ansprechen auf die Therapie, ähnlich wie Niedrigrisiko-Neuroblastome, recht gute Prognosen auf<sup>4,5</sup> (Abbildung 1). Bedauerlicherweise stellt sich die Situation für die verbleibenden 50 % der Patienten der Hochrisikogruppe erheblich schlechter dar; deren Langzeitüberlebensraten liegen trotz des Einsatzes intensiver, multimodaler Therapie seit Jahrzehnten unverändert bei unter 40 %<sup>4,5</sup>.

#### Phosphotyrosinabhängige Signaltransduktion

Die zelluläre Signaltransduktion umfasst die Übertragung und Weiterleitung interund intrazellulärer Signale und ist essentiell für die Koordination zahlreicher zellulärer Prozesse<sup>30</sup>. Die interzelluläre Kommunikation geschieht über Signalmoleküle, welche über die Bindung an entsprechende Rezeptoren auf den Oberflächen von Zielzellen Veränderungen der Aktivitäten cytosolischer Signalproteine vermitteln<sup>30</sup>. Intrazellulär werden die Signale sequentiell über zwischengeschaltete Proteine, die den jeweiligen Signalweg definieren, weitergeleitet und führen schließlich zur zellulären Antwort, zum Beispiel in Form von modifizierten Aktivitäten bzw. Funktionen von Zielproteinen sowie in Form veränderter Genexpressionsmuster<sup>30</sup>. In zahlreichen Signalwegen spielt die reversible Phosphorylierung spezifischer Serin-, Threonin- und Tyrosinreste eine entscheidende Rolle<sup>30,31</sup>. Insbesondere in der Regulation von Prozessen wie der Proliferation und der Differenzierung ist dabei die phosphotyrosinabhängige (pYabhängige) Signaltransduktion von großer Bedeutung<sup>32</sup>.

Dieses System zur Übertragung von Signalen, basierend auf der reversiblen Phosphorylierung von Tyrosinresten, ist vor etwa 600 Millionen Jahren, kurz vor dem Auftreten multizellulären Lebens, entstanden<sup>32,33</sup>. Aufgrund seiner wichtigen Rolle bei der Vermittlung von Wachstums- und Differenzierungssignalen, ist es häufig in die involviert<sup>32,34–37</sup>. Die Entstehung maligner Erkrankungen pY-abhängige wird funktionelle Signalübertragung durch drei Proteinmodule vermittelt; Tyrosinkinasen (TKs) phosphorylieren spezifisch Tyrosinreste in Zielproteinen und schreiben auf diese Weise, anschaulich formuliert, die Signalinformation, SH2-Domänen (Src Homology 2) sind in der Lage diese Phosphatreste zu binden und so die Information zu lesen bzw. zu interpretieren, während Phosphotyrosinphosphatasen (PTPs) die Modifikationen wieder entfernen und somit

die Information löschen und die Signalübertragung beenden<sup>32,38</sup> (Abbildung 2). Neben den SH2-Domänen sind einige sogenannte PTB-Domänen (phosphotyrosinebinding) dazu in der Lage, pY-Motive zu binden, die Mehrheit dieser bindet jedoch pY-unabhängig<sup>38,39</sup>. Es wird angenommen, dass im Laufe der Evolution zunächst wenige PTPs zur Korrektur fehlerhafter Phosphorylierung von Tyrosinresten durch serin-/threoninspezifische Kinasen entstanden sind, später einige SH2-Domänen hinzukamen, das System jedoch erst mit dem Auftreten spezifischer TKs seinen vollen Nutzen offenbarte, und infolgedessen in zunehmend komplexeren Organismen erheblich an Komponenten zunahm und diversifizierte<sup>38,40</sup>.



**Abbildung 2. Funktionelle Module pY-abhängiger Signaltransduktion.** TKs, PTPs und SH2-Domänen bilden die funktionelle Plattform zur Vermittlung zahlreicher zellulärer Signale. Das Signalsystem basiert auf der von TKs und PTPs vermittelten reversiblen Phosphorylierung von Tyrosinresten in Zielproteinen, sowie der kontextspezifischen Interpretation dieser Modifikation durch SH2-Domänen. Modifiziert nach Lim *et al.*<sup>32</sup>

Im humanen Genom sind 90 TKs, 107 PTPs und 120 SH2-Domänen kodiert<sup>38,41</sup>. Sie finden sich als funktionelle Module in verschiedenen Kombinationen untereinander sowie mit anderen Proteindomänen in 277 Proteinen diverser Funktionen wieder<sup>32,40–42</sup>. Das dynamische Zusammenspiel dieser Proteine bzw. funktionellen Module im Rahmen pY-abhängiger Signaltransduktion ermöglicht eine feinabgestimmte Vermittlung komplexer Signale zur Regulation vielzähliger zellulärer Aufgaben<sup>32,38</sup>. SH2-Domänen weisen bezüglich der Funktionen der sie beinhaltenden Proteine ein besonders hohes Maß an Vielfalt auf, sie finden sich nicht nur in cytosolischen TKs und PTPs, sondern darüber hinaus in Adapter- und Gerüstproteinen, Transkriptionsfaktoren oder Ubiquitinligasen, um nur einige

Beispiele zu nennen<sup>42</sup>. PTPs untergliedern sich, mit Ausnahme von acht Vertretern, in eine Gruppe von 38 pY-spezifischen PTPs, welche zu etwa gleichen Anteilen cytosolische und membranständige rezeptorähnliche PTPs enthalten, sowie eine heterogene Gruppe von 61 dual (sowohl pY- als auch phosphoserin- bzw. phosphothreonin-) spezifischen Phosphatasen<sup>43</sup>. Bei den 90 TKs handelt es sich um 58 sogenannte Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) sowie 32 cytosolische TKs, auch NRTKs (Nicht-RTKs) genannt<sup>31,44</sup>.

RTKs stehen am Anfang zahlreicher Wachstumsfaktor-Signalwege, und Mutationen, Amplifikationen sowie aberrante Fusionsereignisse von RTK-Genen werden in einer Vielzahl von Tumoren beobachtet<sup>31,34–37,44</sup>. Typischerweise wird bei RTKs durch die Bindung von Liganden eine Dimerisierung induziert, und es kommt zur Aktivierung der RTKs mittels Trans-Phosphorylierung; die im Cytosol befindlichen TK-Domänen der Rezeptor-Monomere phosphorylieren sich hierbei wechselseitig an mehreren Tyrosinresten der cytosolischen Anteile der Rezeptoren<sup>34,44</sup>. Auf diese Weise werden autoinhibitorische Wechselwirkungen aufgehoben sowie zahlreiche Bindungsmotive für diverse SH2-Proteine (Proteine mit SH2-Domänen) erzeugt, welche zur Bildung supramolekularer Signalkomplexe an die aktivierten RTKs rekrutiert werden<sup>44</sup>. Die Signalkomplexe interpretieren und vermitteln Signale auf hochdynamische Weise, es werden zum Beispiel NRTKs rekrutiert, welche zusätzliche Motive der RTKs bzw. weitere Signalproteine phosphorylieren, SH2-Proteine interagieren über andere Proteindomänen mit weiteren Proteinen und leiten auf diese Weise Signale weiter, beispielsweise in den überlebensrelevanten PI3K-Signalweg oder den pro-proliferativen MAPK-Signalweg, später hinzukommende PTPs gewährleisten eine adäquate Beendigung der Signalübertragung<sup>44-46</sup>. Neben der reversiblen Phosphorylierung zahlreicher der beteiligten Proteine ermöglichen weitere posttranslationale Modifikationen, die Konkurrenz um Bindungsmotive, sowie die zeitlich definierte bzw. gewebe- und zelltypspezifische Expression der beteiligten Signalproteine eine präzise Regulation der pY-abhängigen Signalübertragung<sup>44</sup>.

## SH2-Profiling

Da eine Vielzahl von Tumorerkrankungen häufig mitursächlich mit der Deregulation einer bzw. mehrerer Komponenten der pY-abhängigen Signaltransduktion

einhergeht, ist die Untersuchung dieses Signalsystems ein vielversprechender Ansatz zum besseren Verständnis der molekularen Grundlagen maligner Erkrankungen sowie zur Entwicklung adäguater Mittel für die Diagnose, Prognose bzw. Therapie derselben<sup>34–37,44</sup>. Dies wurde in den vergangenen Jahrzehnten unter anderem durch eindrucksvolle Erfolgsgeschichten in gezielten Therapie verschiedener der Tumorerkrankungen bestätigt, wie beispielsweise der Entwicklung des Tyrosinkinaseinhibitors (TKI) Imatinib für die Therapie der chronisch myeloischen Leukämie mit BCR-Abl-Fusionsprotein, sowie des therapeutischen Antikörpers Trastuzumab für die Behandlung des Mammakarzinoms mit HER2-Amplifikation<sup>47,48</sup>.

Häufig kommen für die phosphoproteomische Untersuchung pY-abhängiger Signalprozesse massenspektrometrische (MS-) Analysen und ortsspezifische anti-pY-Antikörper zum Einsatz<sup>49,50</sup>. Aufgrund der geringen Abundanz von pY-Proteinen ist im Vorfeld einer MS-Analyse jedoch ein Anreicherungsschritt der interessierenden pY-Proteine bzw. -Peptide notwendig, zum Beispiel mittels eines pY-spezifischen Antikörpers oder mit Hilfe von Titandioxid<sup>51</sup>. Aus diesem Grund werden für entsprechende MS-Analysen neben aufwändigen technischen Instrumenten noch immer recht hohe Mengen von bis zu 500 mg Gewebe pro Analyse benötigt<sup>52</sup>. Die Verwendung ortsspezifischer anti-pY-Antikörper, zum Beispiel in Form von antikörperbasierten Arrays, bietet grundsätzlich eine gute Alternative zur MS-Analyse, jedoch sind längst nicht für sämtliche pY-Motive Antikörper verfügbar, zudem ist die Spezifität der Antikörper in vielen Fällen nicht ausreichend<sup>49,53,54</sup>.

Ein komplementärer Ansatz zu den genannten Methoden ist die erstmals 2001 beschriebene Untersuchung globaler Zustände pY-abhängiger Signaltransduktion mit Hilfe von SH2-Domänen, kurz SH2-Profiling genannt<sup>53,55,56</sup>. Das SH2-Profiling bedient sich der Fähigkeit von SH2-Domänen, pY-abhängig vermittelte Signalinformationen über die Bindung an spezifische pY-Motive zu vermitteln<sup>53,56</sup>. SH2-Domänen sind etwa 100 Aminosäuren lang und falten sich meist unabhängig von anderen Proteindomänen zu einer Tertiärstruktur von einem β-Faltblatt, beidseitig flankiert a-Helix<sup>42</sup>. In ihrer Bindungstasche befindet ieweils einer von sich ein hochkonservierter Argininrest, welcher elektrostatisch mit dem negativ geladenen Phosphatrest eines gebundenen pY-Peptids wechselwirkt<sup>42</sup>. Die Selektivität der Bindung wird typischerweise von den drei bis fünf auf das pY folgenden Resten

vermittelt<sup>42,57,58</sup>. Bindungsereignisse zwischen SH2-Domänen und pY-Peptiden zeigen moderate Dissoziationskonstanten von 10<sup>-5</sup> bis 10<sup>-8</sup> M, weiterhin weisen SH2-Domänen häufig überlappende Bindungsspezifitäten auf, so dass im jeweiligen Kontext exprimierte SH2-Proteine hochflexibel und schnell fluktuierend um vorhandene pY-Bindungsmotive konkurrieren<sup>44,59,60</sup>.

Der Einsatz rekombinanter SH2-Domänen in in vitro-Bindungsexperimenten ermöglicht eine Darstellung und Quantifizierung von pY-Motiven bzw. den sie beinhaltenden pY-Proteinen in Zelllysaten und Gewebeproben<sup>53,55,56</sup>. Auf diese Weise erhobene Signale bzw. Signalprofile können die Beteiligung entsprechender SH2-Proteine im untersuchten Kontext bzw. die Anwesenheit bestimmter pY-Proteinspezies im Vergleich mehrerer Kontexte, zum Beispiel vor und nach Therapiebeginn, aufzeigen; ein SH2-Profiling kann somit funktionelle Informationen über pY-abhängige Signaltransduktionsnetzwerke liefern<sup>53,55,56</sup>. Es benötigt keine zusätzlichen Anreicherungsschritte sowie relativ geringe Probenmengen, darüber  $ab^{53}$ . hinaus deckt es das Tyrosinphosphoproteom unvoreingenommen Nichtsdestoweniger ist das SH2-Profiling als wertvolle Ergänzung einzuordnen, da für eine zweifelsfreie Identifizierung untersuchter pY-Motive bzw. pY-Proteine zusätzlich MS-Analysen oder spezifische Antikörper erforderlich sind<sup>53</sup>.

Die ursprünglich entwickelte Plattform des SH2-Profilings ist die Far-Western Blot-Analyse; hier werden zu untersuchende Gewebelysate gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Membranen immobilisiert und mit verschiedenen SH2-Sonden untersucht, deren Bindung an vorhandene pY-Motive bzw. pY-Proteine per Chemilumineszenz detektiert wird<sup>53,56</sup> (Abbildung 3). Auf diese Weise werden kontextspezifische globale Muster pY-abhängiger Signalprozesse der untersuchten Gewebeproben erhoben, die eine Integration der über sämtliche Zellen der Probe gemittelten Aktivitäten der im untersuchten Kontext aktiven Größen der pYabhängigen Signaltransduktion darstellen. So erhaltene globale pY-Signalmuster können in weiteren Schritten je nach Fragestellung ausgewertet werden<sup>53</sup>. Mit Hilfe von Far-Western Blot-Analysen konnten zum Beispiel interessante Einblicke in die pYabhängige Signaltransduktion von Lungenkarzinom-Zelllinien erhalten werden, weiterhin zeigten Untersuchungen an Original-Tumormaterial von Kolon- und



**Abbildung 3. SH2-Profiling mittels Far-Western Blot-Analyse. (A)** Schematische Darstellung des Konzepts: Zu untersuchende Proteinlysate werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Membranen immobilisiert, im Anschluss wird per Chemilumineszenz die Bindung markierter SH2-Domänen an vorhandene pY-Motive bzw. die zugehörigen pY-Proteine detektiert. Hier dargestellt ist die Far-Western Blot-Analyse eines Probenlysates mit vier verschiedenen SH2-Domänen. Modifiziert nach Machida *et al.*<sup>53</sup> **(B)** Beispiel einer Far-Western Blot-Analyse: Das Proteinlysat der Neuroblastom-Zelllinie LS wurde, wie in (A) schematisch dargestellt, viermal gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf separaten Membranen immobilisiert und mit vier SH2-Domänen (CRK, PIK3R1-N, GRB7 und SHP2-N) untersucht; auf diese Weise wurde ein spezifisches SH2-Profil erhoben, welches den globalen Zustand der pY-abhängigen Signaltransduktion der untersuchten Zelllinie abbildet.

Mammakarzinomen vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Unterscheidung von globalen pY-Signalmuster<sup>53,61</sup>. Patientenuntergruppen anhand ihrer Weitere Plattformen des SH2-Profilings sind unter anderem der sogenannte SH2-Rosette-Assay, in dem im 96-Vertiefungen-Plattenformat sehr geringe Mengen von jeweils bis zu 100 Proben pro Vertiefung punktförmig auf eine Membran aufgebracht und mit je SH2-Sonde je Vertiefung analysiert werden, sowie der OTM-Assay einer (Oligonucleotide-Tagged Multiplex), in welchem im 96-Vertiefungen-Plattenformat je eine Probe pro Vertiefung mit bis zu zehn differentiell mit Oligonukleotiden markierten SH2-Domänen in einem kompetetiven Bindungsexperiment analysiert wird<sup>53,62,63</sup>.

#### Phosphotyrosinabhängige Signaltransduktion im Neuroblastom

Auch in der Entstehung des Neuroblastoms hat sich die pY-abhängige Signaltransduktion in den vergangenen Jahrzehnten als eine entscheidende Komponente herausgestellt. Bereits 1992 und 1993 wurde gezeigt, dass die mRNA-TrkA (tropomyosine-receptor-kinase A) in primären Expression der RTK Neuroblastomen mit einer guten Prognose assoziiert ist<sup>64,65</sup>. TrkA, ein Mitglied der sogenannten Trk-Familie der RTKs, ist der Rezeptor für den Wachstumsfaktor NGF (nerve growth factor), welcher von sympathischen Neuroblasten zum Überleben benötigt wird und eine Differenzierung derselben induziert<sup>44,66</sup>. Kurz darauf wurden auch für die beiden verbleibenden neurotrophen RTKs der Trk-Familie, TrkB und TrkC, Zusammenhänge mit der Prognose des Neuroblastoms beschrieben. Dabei wies die mRNA-Expression von TrkC, welche gemeinsam mit TrkA im sich entwickelnden sympathischen Nervensystem exprimiert wird, ebenfalls eine Assoziation mit einer guten Prognose auf<sup>66,67</sup>. Die Expression von TrkB hingegen, welche in sympathischen Neuroblasten kaum exprimiert vorgefunden wird, war mit einer schlechten Prognose assoziiert<sup>66,68</sup>. Es wird folglich angenommen, dass TrkCsowie TrkA-exprimierende Neuroblastome dem natürlichen Verlauf der Entwicklung des sympathischen Nervensystems folgend zur Ausdifferenzierung neigen, während Tumoren unter anderem aufgrund der ektopischen Expression von TrkB eine schlechte Prognose aufweisen könnten<sup>66</sup>.

Auf Basis der beschriebenen Erkenntnisse wird intensiv an der Möglichkeit einer therapeutischen Inhibition Trk-vermittelter Signaltransduktion im Neuroblastom geforscht. 2009 wurde beispielsweise erstmals ein Breitband-TKI mit hoher Aktivität gegen die RTKs der Trk-Familie namens Lestaurtinib beschrieben, welcher in murinen Xenograft-Modellen des Neuroblastoms erfolgreich zu einer Verbesserung des Ansprechens auf eine Chemotherapie beitragen konnte, und dessen Verträglichkeit erst kürzlich in einer Phase 1-Studie an Patienten mit refraktären Neuroblastomen erprobt wurde<sup>69–72</sup>. Ungeachtet dessen ist die Rolle der Trk-Rezeptoren im Neuroblastom noch immer nicht abschließend aufgeklärt, in einer 2012 publizierten Untersuchung von 814 Neuroblastomen konnte zum Beispiel trotz bestätigter Assoziation mit einigen Risikofaktoren der Zusammenhang der Expression von TrkB mit einer schlechten Prognose nicht verifiziert werden, für TrkC wurde weiter keine

Assoziation mit relevanten Risikofaktoren gefunden<sup>73</sup>. Die tatsächliche Relevanz der Trk-Rezeptoren für die Entstehung bzw. Progression des Neuroblastoms müssen daher zukünftige Untersuchungen zeigen.

2002 wurden drei weitere Proteine der pY-abhängigen Signaltransduktion mit der Entstehung des Neuroblastoms in Zusammenhang gebracht. Eine Publikation zeigte, dass die NRTK Fyn in Neuroblastomen niedrigen Risikos deutlich höher exprimiert vorliegt als in Hochrisiko-Neuroblastomen, sowie dass die Expression dieser TK in Neuroblastom-Zelllinien zur Differenzierung und einem Wachstumsarrest der Zellen führt, woraus geschlossen wurde, dass der Verlust eines durch Fyn regulierten Differenzierungssignalweges an der Entstehung des Neuroblastoms beteiligt sein könnte<sup>74</sup>. In einer weiteren Arbeit wurde eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung des Adapterproteins Shc3 (SH2 domain contaning transforming protein 3) in einigen Neuroblastom-Zelllinien beobachtet, und die RTK ALK (anaplastic lymphoma kinase) als dafür verantwortlich identifiziert<sup>75</sup>. Während zur Rolle von Fyn für das Neuroblastom seit der Publikation 2002 keine weiteren Arbeiten erschienen sind, wurden zu Shc3 und ALK im Zusammenhang mit dem Neuroblastom in den folgenden Jahren zahlreiche weitere Arbeiten veröffentlicht.

Shc3 ist einer der vier Vertreter der Familie der Shc-Adapterproteine, welche jeweils eine PTB- sowie eine SH2-Domäne aufweisen, und über welche von aktivierten RTKs stammende Signale in den MAPK-Signalweg vermittelt werden, weiterhin handelt es sich bei Shc3 um ein im neuralen Kontext exprimiertes Shc-Protein<sup>42,76</sup>. Nach der ersten Beschreibung von Shc3 im Zusammenhang mit dem Neuroblastom im Jahre 2002 konnte 2005 sowie 2009 gezeigt werden, dass es, im Gegensatz zu zwei weiteren Vertretern der Shc-Familie, Shc1 und Shc2, in Hochrisiko-Neuroblastomen hoch exprimiert vorliegt und somit mit einer schlechten Prognose assoziiert ist77,78. Es wurde darüber hinaus gefunden, dass eine RNAivermittelte Herabregulation von Shc3 in Neuroblastom-Zellen zu einer Differenzierung der Zellen führt, was eine aberrante Inhibition der Differenzierung durch Shc3 in der Entstehung des Neuroblastoms impliziert, und Shc3 als ein mögliches Ziel für die gerichtete Therapie des Neuroblastoms andeutet<sup>77</sup>.

ALK, deren Name sich vom sogenannten anaplastischen großzelligen Lymphom ableitet, einer Tumorerkrankung, welche in mehr als der Hälfte der Fälle durch die

Expression eines ALK-Fusionsproteins mit dem nukleolaren Protein Nukleophosmin (NPM-ALK) gekennzeichnet ist, repräsentiert gemeinsam mit einem weiteren Vertreter eine Subfamilie der Insulinrezeptor-Superfamilie der RTKs und ist in die fötale Entwicklung des Nervensystems involviert<sup>79,80</sup>. 2008 wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass aktivierende Mutationen von ALK eine der Hauptursachen für hereditäre Formen des Neuroblastoms sind und darüber hinaus in etwa 10 % der sporadischen Neuroblastome beobachtet werden<sup>8,9,21,22</sup>. Kurz darauf wurde auch ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von ALK und einer schlechten Prognose untersuchter Neuroblastome beschrieben<sup>81,82</sup>. Anfang 2012 wurde weiter gezeigt, dass in neuronalen und Neuroblastom-Zelllinien durch die Aktivierung von wird<sup>83</sup>. **MYCN-Expression** stimuliert In ALK die einem *MYCN*-induzierten Zebrafischmodell des Neuroblastoms wurde über die simultane Expression konstitutiv aktiver ALK die Penetranz der Erkrankung verdreifacht, sowie die Entstehung der Tumoren deutlich beschleunigt, weiterhin konnte ebenfalls 2012 gezeigt werden, dass die Expression mutierter ALK auch in der Maus zur Entstehung von Neuroblastomen führt, und dass konstitutiv aktive ALK in Synergie mit MYCN einen früheren Ausbruch, eine höhere Penetranz, sowie eine erhöhte Letalität der Erkrankung verursacht<sup>84–86</sup>.

Die Datenlage spricht für eine wesentliche Rolle von ALK insbesondere in der Entstehung aggressiver Neuroblastome der Hochrisikogruppe. Darüber hinaus werden ALK-Aberrationen neben dem Neuroblastom und dem anaplastischen großzelligen Lymphom in zahlreichen weiteren malignen Erkrankungen beobachtet, beispielsweise im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom<sup>79</sup>. Aus diesem Grund steht ALK schon seit einiger Zeit als therapeutisches Ziel im Fokus intensiver Forschung. Bezüglich des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, welches in etwa 4 % der Fälle ALK-Translokationen aufweist, hat sich der Einsatz des ALK-Inhibitors Crizotinib in fortgeschrittenen ALK-positiven Tumoren bereits gegenüber der konventionellen Chemotherapie als überlegen dargestellt<sup>87</sup>. Crizotinib wurde weiterhin kürzlich in einer Phase 1-Studie in der Therapie refraktärer pädiatrischer Tumoren, unter anderem des Neuroblastoms, erprobt, und zeigte hierbei vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Behandlung ALK-positiver Tumoren<sup>88</sup>.

Neben den angeführten Beispielen sind in jüngster Zeit weitere Proteine der pY-

abhängigen Signaltransduktion mit dem Neuroblastom in Zusammenhang gebracht worden. So ist beispielsweise das *PTPN11*-Gen, welches für die PTP Shp2 kodiert, in etwa 3 % der Hochrisiko-Neuroblastome mutiert, weiterhin wurden zur Zeit der Niederschrift dieser Arbeit die SH2-Proteine Shf und Stat3 als in die ALK-vermittelte Signalübertragung involviert beschrieben<sup>18,89,90</sup>. Zusammengenommen scheint der pY-abhängigen Signaltransduktion der Datenlage nach eine erhebliche Rolle in der Entstehung bzw. Progression des Neuroblastoms zuzukommen, deren Untersuchung wahrscheinlich beträchtliche Fortschritte im Verständnis, der Risikostratifizierung, sowie der Therapie dieser komplexen Erkrankung bereithält.

#### Ansatz der vorliegenden Arbeit

Ungeachtet der dargelegten Relevanz pY-abhängiger Signalprozesse für das Neuroblastom, haben sich phosphoproteomische Untersuchungen diesbezüglich bislang auf kontextspezifische MS-Analysen an Zelllinien (zum Beispiel der Untersuchung von durch TrkA-Inhibition regulierten pY-Proteinen in der Zelllinie SK-N-MC) beschränkt<sup>90-93</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmalig eine umfassende Analyse globaler pY-abhängiger Signalprozesse im Neuroblastom durchgeführt.

Es wurden zunächst mittels SH2-Profiling nach der Methode der Far-Western Blot-Analyse globale Profile der pY-abhängigen Signaltransduktion in neun Neuroblastom-Zelllinien erhoben und analysiert. Dabei wurde mit Hilfe von Clusteranalysen untersucht, inwieweit sich die Zelllinien auf der Ebene globaler pY-Signalprofile voneinander unterscheiden, weiterhin wurde anhand der erhobenen Profile eine zweckdienliche Auswahl an SH2-Sonden zur Untersuchung der pY-abhängigen Signaltransduktion in Neuroblastom-Primärtumormaterial identifiziert.

Auf Basis der für die Zelllinien erhaltenen Resultate wurden anschließend in Farglobale Profile pY-abhängiger Signalprozesse in Western Blot-Analysen 21 Neuroblastom-Primärtumorproben verschiedener Risikogruppen erhoben und analysiert. Im Fokus hierbei standen die Darstellung und Analyse der pY-abhängigen der Neuroblastome mit Hilfe von Clusteranalysen sowie Signalprofile die Untersuchung möglicher Assoziationen der SH2-Profile bzw. auf deren Basis bestimmten Untergruppen der Tumoren mit klinischen Parametern. Ergänzt um die

Analyse ausgewählter, für das Neuroblastom relevanter Proteinspezies in Western Blot-Analysen, sowie um die semi-quantitative Bestimmung diverser RTKs im ELISA, wurden überdies potenziell wichtige Knotenpunkte der in den Tumoren aktiven Netzwerke pY-abhängiger Signaltransduktion in die Betrachtung miteinbezogen und eventuell vorhandene Zusammenhänge mit den erhobenen SH2-Profilen untersucht.

Abschließend wurden die globalen Profile pY-abhängiger Signaltransduktion der untersuchten Neuroblastome auf mögliche Kandidaten-pY-Proteine analysiert, welche in Tumoren von hohem bzw. geringem Risiko differenziell phosphoryliert vorlägen, und somit aufgrund des für sie anzunehmenden Aktivitätsunterschiedes potenzielle Kandidaten für prognostisch bzw. therapeutisch bedeutsame Proteine darstellten.

## Methoden

## Präparation von SH2-Domänen

Die aus dem pGEX-System (GE Healthcare) stammenden GST-SH2-Konstrukte, zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Peter Nollau (Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf), waren in früheren Arbeiten in unserem Labor in den Vektor pAC4 (Avidity) umkloniert und in E. coli AVB100 (Avidity) eingebracht worden, um als C-terminal biotinylierte GST-SH2-Fusionsproteine exprimiert werden zu können. Hierzu wurden Kulturen in 500 mL LB-Medium (Life Technologies) bei 37 °C und 150 rpm herangezogen bis zu einer OD von 0,6, und nach Zugabe von IPTG (Sigma-Aldrich) zu 0,1 mM zur Induktion der SH2-Domäne, sowie L-Arabinose (Sigma-Aldrich) zu 0,2% (w/v) und D-Biotin (AppliChem) zu 50 µM zwecks Induktion der BirA-Biotinligase (Avidity) bzw. Bereitstellung des Kosubstrats, für weitere 3 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5000 g wurde das Bakterien-Pellet in 10 mL eiskaltem Lysepuffer (1 % Triton-X-100 [Sigma-Aldrich] in PBS [Life Technologies]), versetzt mit Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific), suspendiert, zweimal für je 2,5 min sonifiziert (5 Zyklen, 40 % Power; UW 2200 und HD 2200; Bandelin), und die Suspension erneut für 15 min bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit Lysepuffer äquilibrierte Matrix von 1 mL GSH Sepharose 4B (GE Healthcare), eingebettet in eine Poly-Prep-Chromatographie-Säule (Biorad), gegeben, und die Matrix dreimal mit je 4 mL Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurden die SH2-Domänen mit 2,5 mL GSH-Puffer (20 mM red. L-Glutathion [Sigma-Aldrich]; 100 mM Tris/HCl pH 8 [Sigma-Aldrich/Roth]; 0,1 % Triton-X-100) eluiert, über eine PD-10-Säule (GE Healthcare) umgepuffert in 3,5 mL Elutionspuffer (0,1 % Triton-X-100; 0,02 % NaN<sub>3</sub> [Sigma-Aldrich]; in PBS), und aliquotiert bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert; ein Aliquot wurde für eine zeitnah erfolgende Proteinbestimmung (Coomassie [Bradford] Protein Assay Kit; Thermo Scientific) zurückbehalten.

## Zellkultur

Die untersuchten Neuroblastom-Zelllinien (Tabelle 1) wurden zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Martin Horstmann (Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg, sowie Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Die Zellen wurden in RPMI Medium 1640 (Life Technologies), ergänzt zu 10 % fötalem Kälberserum (PAA Laboratories), 100 U/mL Penicillin (Life Technologies) und 0,1 mg/mL Streptomycin (Life Technologies), bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer humiden Atmosphäre kultiviert.

| Name     | INSS-Stadium | Alter / Monate | MYCN-Status  | 1p-Status          |
|----------|--------------|----------------|--------------|--------------------|
| IMR-32   | n.a.         | 13             | amplifiziert | deletiert/aberrant |
| KELLY    | n.a.         | n.a.           | amplifiziert | deletiert/aberrant |
| LA-N-1   | 4            | 24             | amplifiziert | deletiert/aberrant |
| LA-N-5   | n.a.         | 4              | amplifiziert | deletiert/aberrant |
| LS       | 3            | 16             | amplifiziert | normal             |
| SH-SY-5Y | 4            | 48             | normal       | normal             |
| SIMA     | 3            | 20             | amplifiziert | normal             |
| SK-N-AS  | 4            | 72             | normal       | deletiert/aberrant |
| SK-N-SH  | 4            | 48             | normal       | normal             |

Tabelle 1. Übersicht der untersuchten Neuroblastom-Zelllinien<sup>26,94–101</sup>.

## Tumormaterial

Die untersuchten Neuroblastom-Tumorproben (Tabelle 2) wurden von der zentralen Tumorbank für Tumor- und Normalgewebe der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (German Society of Pediatric Oncology and Hematology, GPOH) zur Verfügung gestellt. Die Proben waren jeweils innerhalb von 30 Minuten nach der operativen Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren worden und wurden bis zur weiteren Verwendung ebenso gelagert. Zu den Proben waren INSS-Stadien, Alter der Patienten bei Diagnose, sowie *MYCN*-Status bekannt; anhand dieser Daten wurde gemäß Protokoll der NB2004-Studie zur risikoangepassten Behandlung des Neuroblastoms<sup>28</sup> eine Einteilung der Proben in drei Risikogruppen vorgenommen, welche hier bezüglich ihrer Einteilung übereinstimmend waren mit den INSS-Stadien (Tabelle 2). Wenngleich das Kollektiv weder Proben der INSS-

Methoden

Stadien 2 bzw. 4S beinhaltete, so wies es doch mit acht Proben vom Stadium 1, sowie elf Proben vom Stadium 4 eine annähernd repräsentative Verteilung von Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen auf, zieht man die beobachteten Anteile der Risikogruppen an allen Neuroblastom-Erkrankungen als Referenz heran (Niedrigrisiko ~30 %, Hochrisiko ~50 %)<sup>4</sup>. Neuroblastome mittleren Risikos waren mit 10 % (zwei Proben) anstelle von etwa 20 % unterrepräsentiert, gleiches galt für Proben mit MYCN-Amplifikation<sup>4</sup>.

| Proben-ID | Name | INSS-Stadium | Alter / Monate | MYCN-Status  | Risikogruppe <sup>28</sup> |
|-----------|------|--------------|----------------|--------------|----------------------------|
| 1342126   | NB04 | 1            | 29             | normal       | gering                     |
| 850687    | NB08 | 1            | 31             | normal       | gering                     |
| 1343341   | NB10 | 1            | 5              | normal       | gering                     |
| 1344960   | NB18 | 1            | 1              | normal       | gering                     |
| 1344904   | NB19 | 1            | 0 <sup>*</sup> | normal       | gering                     |
| 1344988   | NB21 | 1            | 25             | normal       | gering                     |
| 1345135   | NB25 | 1            | 9              | normal       | gering                     |
| 609197    | NB28 | 1            | 31             | normal       | gering                     |
| 1359478   | NB31 | 3            | 305            | normal       | mittel                     |
| 1359579   | NB32 | 3            | 28             | normal       | mittel                     |
| 1266414   | NB41 | 4            | 31             | normal       | hoch                       |
| 1268043   | NB43 | 4            | 20             | normal       | hoch                       |
| 635965    | NB45 | 4            | 51             | normal       | hoch                       |
| 1268109   | NB47 | 4            | 70             | normal       | hoch                       |
| 905130    | NB48 | 4            | 76             | normal       | hoch                       |
| 1075765   | NB49 | 4            | 56             | normal       | hoch                       |
| 1269525   | NB50 | 4            | 72             | normal       | hoch                       |
| 1266976   | NB52 | 4            | 76             | normal       | hoch                       |
| 1360327   | NB54 | 4            | 45             | normal       | hoch                       |
| 841075    | NB60 | 4            | 35             | amplifiziert | hoch                       |
| 1360303   | NB62 | 4            | 28             | amplifiziert | hoch                       |

Tabelle 2. Übersicht der untersuchten Neuroblastom-Tumorproben.

## Präparation von Zelllysaten

Neuroblastom-Zelllinien wurden für die Herstellung von Zelllysaten in Zellkultur-Schalen (Sarstedt) bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert, zweimal

<sup>&</sup>lt;sup>\*</sup> Das Alter betrug hier drei Tage.

gewaschen mit ca. 0,1 mL/cm<sup>2</sup> eiskaltem PBS, und mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt) in 10  $\mu$ L/cm<sup>2</sup> KLB-Lysepuffer (25 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl [Sigma-Aldrich]; 10 % Glycerol [Sigma-Aldrich]; 1 % Triton X-100; 10 mM Natriumpyrophosphat [Sigma-Aldrich]; 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat [Sigma-Aldrich]), versetzt mit Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific), gesammelt. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert, währenddessen alle 10 min durch Schütteln durchmischt, und für 30 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Die so gewonnenen Zelllysate in Form der Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert; für die im Anschluss an die Lyse erfolgende Proteinbestimmung (Coomassie [Bradford] Protein Assay Kit; Thermo Scientific) wurde jeweils ein kleines Aliquot zurückbehalten. Primärtumorproben wurden unter flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill mechanisch zerkleinert, in ca. 10  $\mu$ L/mg Tumorgewebe KLB-Lysepuffer aufgenommen, und von hier an ebenso behandelt wie für die Zelllinien beschrieben; bei der Lyse der Primärtumorproben war Miguel Córdova (Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg) behilflich.

## Far-Western Blot-Analysen

Die Zelllysate der Neuroblastom-Zelllinien wurden zu je 50 µg/Spur für 55 min bei 200 V Spannung in NuPAGE<sup>®</sup> 4-12 % Bis-Tris-Gradientengelen (Life Technologies) aufgetrennt und im Tankblot-Verfahren für 3 h bei 4 °C und 400 mA Stromstärke auf Immobilon-P PVDF-Membranen (Millipore) transferiert. Als Molekulargewichtsmarker diente der Novex<sup>®</sup> Sharp Prestained Protein Standard (Life Technologies). Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C in 10 % Milchpulver (Spinnrad) in TBST (150 mM NaCl [Sigma-Aldrich]; 10 mM Tris/HCl pH 8; 0,1 % Tween 20 [Sigma-Aldrich]) blockiert. Am folgenden Tag wurde ein Komplex aus je 25 pmol SH2-Domäne (~ 1 µg) und 50 ng Streptavidin-HRP (Thermo Scientific) in 50 µL PBS für 30 min inkubiert, anschließend 1:20 in 1 mL TBST verdünnt und mit je einer der blockierten Membranen für 1 h inkubiert. Nach achtmaligem Waschen für je 5 min in 0,5 mL/cm<sup>2</sup> TBST wurden die gebundenen SH2-Sonden per Chemilumineszenz mit Hilfe eines ECL-Kits (GE Healthcare) auf Röntgenfilmen (GE Healthcare) detektiert, im Anschluss daran wurden die Membranen bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in TBST gelagert. Da die Neuroblastom-Tumorproben, wie bereits bei anderen

Tumorentitäten beobachtet<sup>53</sup>, deutlich schwächere pY-Signale aufwiesen, als für Neuroblastom-Zelllinien beobachtet, und weil aufgrund der Begrenztheit des Tumormaterials für die Gelelektrophorese hier lediglich 30 µg/Spur aufgetragen werden konnten, wurde ein optimiertes Protokoll für die Far-Western Blot Analyse entwickelt, dessen Unterschiede zum oben beschriebenen Protokoll im Folgenden aufgeführt sind: Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von je 30 µg/Spur für 110 min bei 100 V wurden die Proben über Nacht bei 4 °C und 14 V auf PVDF-Membranen transferiert und diese anschließend für 1 h in 10 % Milchpulver in TBST blockiert. Für die Komplexbildung wurden je 25 pmol SH2-Sonde (~ 1 µg) mit 136 ng Streptavidin-HRP in 5 µL PBS für 30 min inkubiert, und in einer Verdünnung von 1:2000 in TBST für 1 h mit je einer der Membranen inkubiert, im Anschluss wurde, wie oben beschrieben, fortgefahren. Unterschiede der SH2-Profile der drei sowohl im SH2-Profiling der Zelllinien als auch demjenigen der Primärtumorproben mitgeführten Zelllinien zwischen diesen beiden Experimenten waren auf das beschriebene, optimierte Protokoll zurückzuführen.

#### Western Blot-Analysen

Für die Western Blot-Analysen wurden die Far-Western Blot-Membranen für 15 min bei 60 °C in Stripping-Puffer (62 mM Tris/HCl pH 6,8; 2 % SDS [Sigma-Aldrich]) inkubiert, zweimal mit TBST gewaschen, erneut für 1 h in 10 % Milchpulver in TBST blockiert, anschließend mit den jeweiligen Primär-Antikörpern gemäß Herstellerangaben inkubiert, dreimal mit TBST gewaschen, für 1 h mit den passenden Sekundär-Antikörpern inkubiert, und erneut gewaschen und entwickelt, wie oben beschrieben. Folgende Primär-Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet: pY (mAb 4G10), MAPK 1/2 (Anti-Phosphotyrosine [4G10<sup>®</sup>] HRP conjugate, Anti-MAP Kinase 1/2 [Erk1/2] CT; Millipore), pAkt (S473), Akt, pMAPK 1/2 (T202/Y204), CD44, Fyn, Shc1, N-Myc, ALK, β-Actin (Phospho-Akt [Ser473] [D9E] XP<sup>™</sup> Rabbit mAb, Akt [pan] [11E7] Rabbit mAb, Phospho-p44/42 MAPK [Erk1/2] [Thr202/Tyr204] [197G2] Rabbit mAb, CD44 [8E2] Mouse mAb, Fyn Antibody, Shc Antibody, N-Myc Antibody, ALK [C26G7] Rabbit mAb, β-Actin [13E5] Rabbit mAb; Cell Signaling Technologies), Shc3 (SHC3 Polyclonal Antibody; Proteintech). Abweichend von den Herstellerangaben wurde der anti-pY-Antikörper in einer

#### Methoden

Verdünnung von 1:20000 in 5 % Milchpulver in TBST eingesetzt. Für die Western Blot-Analysen mit dem anti-Fyn- bzw. anti-N-Myc-Antikörper wurden abweichend von den verbleibenden Analysen gestrippte Membranen aus orientierenden Vorexperimenten mit abweichender Reihenfolge der Auftragung der Tumorproben verwendet; für die Analyse mit dem anti-N-Myc-Antikörper betrug die aufgetragene Probenmenge zudem lediglich 10 µg/Spur. Folgende Sekundär-Antikörper wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:50000 in TBST eingesetzt: Ziege anti-Kaninchen (goat anti-rabbit IgG-HRP SC-2004; Santa Cruz Biotechnology) und Kaninchen anti-Maus (Polyclonal Rabbit anti-Mouse Immunoglobulins/HRP; Dako).

## **RTK-ELISA**

Die experimentellen Arbeiten wurden, mit Ausnahme der in dieser Arbeit vorgenommenen Auswertung, von Miguel Córdova, Magdalena Trochimiuk und Dr. Kevin Dierck (Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg) durchgeführt. Folgende Antikörpersets wurden im Sandwich-ELISA verwendet: EGFR, HER2, HER3, HER4, EphB4, EphB6, IGF1R, KIT, PDGFR<sup>β</sup>, MET, RET, TrkA, TrkB, TrkC, Tyro3, VEGFR1 (DY231, DYC1129, DYC234, DYC1133, DYC3038, AF3384, DY391, DY332, DYC385, DY358, DYC1168, DYC175, DYC397, DYC373, DYC5600, DYC4347; R&D Systems). Fängerantikörper wurden gemäß Herstellerangaben in Bikarbonat-Puffer (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.3 [Sigma-Aldrich]) verdünnt, zu je 60 µL/Vertiefung in F8 Maxisorp-Streifen (Nunc) gegeben und verschlossen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Streifen wurden je dreimal mit 180 µL/Vertiefung TBS (150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 8) gewaschen, für 1 h mit 150 µL/Vertiefung Blocking Reagent (Roche) blockiert und erneut dreimal mit 180 µL/Vertiefung TBST gewaschen (Standard-Waschschritt). Es wurden je 10 bis 30 µg Zelllysat in 60 µL/Vertiefung zugegeben und für 2 h inkubiert, dreimal gewaschen, der jeweilige biotinylierte Detektionsantikörper nach Herstellerangaben (R&D Systems) konzentriert in 60 µL/Vertiefung zugegeben, für weitere 90 min inkubiert, anschließend achtmal gewaschen, 60 µL Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:5000 in TBST zugegeben, und erneut für 25 min inkubiert. Nach abschließendem zwölfmaligem Waschen wurden 100 µL TMB-Substrat (R&D Systems) zugegeben, und die Farbentwicklung bei 655 nm detektiert (Microplate Reader Infinite 200M; Tecan).

Nach 1 h oder, wenn bereits vorher eine OD von 1.2 erreicht worden war, wurde die Farbreaktion gestoppt durch Zugabe von 50 µL/Vertiefung 2 M Schwefelsäure (Roth) und die Extinktion bei 455 nm gegenüber einer Referenz von 575 nm gemessen. Die RTKs wurden im Duplikat bestimmt, von den gemittelten Werten wurde ein mittlerer Hintergrundwert plus der zweifachen Standardabweichung von diesem subtrahiert, schließlich wurden die Werte je RTK auf 100 % normalisiert.

#### **Densitometrische Auswertung**

Die densitometrische Auswertung der Filme wurde mit den Programmen ImageJ<sup>102</sup> und Microsoft Excel 2010 durchgeführt. Zu untersuchende Blots/Filme wurden zu einer Auflösung von 300 dpi in Graustufen eingescannt und als jpg-Datei mit invertierten Farben gespeichert (GNU Image Manipulation Program 2.8.6<sup>103</sup>). Für die Auswertung einzelner Banden wurde in ImageJ jeweils für ein kleines Rechteck innerhalb der interessierenden Bande der Mittelwert der Pixeldichte bestimmt. Zur Bestimmung des zu subtrahierenden Hintergrunds wurden Rechtecke zwischen den Banden vermessen, deren Mittelwert je Blot als Hintergrundwert für sämtliche auf diesem Blot vermessenen Banden (gleicher Laufhöhe) diente. Für den Fall, dass offensichtliche Artefakte zu beobachten waren, und, sofern das Signal hier höher war als der ermittelte Hintergrund, so wurden die Messwerte zusätzlich um die Differenz zwischen (höchstem) Artefakt-Signalwert und dem Hintergrund korrigiert. Die auf diese Weise digitalisierten Werte wurden im Anschluss auf 100 % normalisiert. Zur Digitalisierung zwecks der Auswertung von Far-Western Blots wurden diese in ImageJ mit Hilfe von 10 px breiten, vertikalen Linien vermessen (Abbildung 4), für die Neuroblastom-Zelllinien von 700 px, für die Primärtumorproben von 600 (ABL1, CRK, CSK, FYN, GAP-N, NCK2, SHC3, VAV2) bzw. 650 (EAT2, GRB2, GRB7, PIK3R1-N, PLCy1-C, SHP2-N, SHC1, SRC und pY [mAb 4G10]) px Länge. Im Fall offensichtlicher Artefakte wurde ein möglichst kleiner Bereich um das Artefakt herum korrigiert, entweder durch Werte der Messung einer Geraden mit geringem Versatz in horizontaler Richtung, oder, sofern es sich um ein Artefakt handelte, welches sich über die gesamte Breite der untersuchten Spur erstreckte, durch Werte, die über eine Geradengleichung ermittelt wurden, welche durch knapp ober- sowie unterhalb



**Abbildung 4. Darstellung der densitometrischen Auswertung von Far-Western Blots.** Die in der vorliegenden Arbeit angewandte densitometrische Auswertung ist am Beispiel der Far-Western Blot-Analyse von vier Neuroblastom-Zelllinien (KELLY, LA-N-5, LS und SH-SY5Y) gezeigt. Mit Hilfe von ImageJ<sup>102</sup> wurden, wie hier für das Lysat der Zelllinie SH-SY5Y dargestellt, die Pixeldichten einer entlang der Spur verlaufenden Messlinie (grün) bestimmt, der unspezifische Hintergrund (rot, Verbindungsgerade der vier Hintergrund-Medianwerte für diese x-Position) subtrahiert, nach weiteren Operationen wurde eine Datenmatrix erhalten, die ein digitales Abbild des zu untersuchenden Far-Western Blots darstellte, welche als Grundlage für weitere Analysen diente.

des Artefakts befindliche Werte bestimmt war. Zur Bestimmung des Hintergrunds wurden je zweimal drei horizontale Linien von 5 px Breite ober- sowie unterhalb der Signalbereiche vermessen und jeweils die Mediane aus den drei Werten bestimmt, sodass sich für jede Position x auf dem Blot vier Hintergrund-Medianwerte für vier y-Positionen ergaben (Abbildung 4). Anhand dieser wurde je Spur (x-Wert festgelegt über die jeweilige Messlinie) über die Geradengleichung, welche die Verbindung der jeweils zugehörigen vier Werte darstellte, der zu subtrahierende Hintergrund ermittelt (Abbildung 4). Nun wurden die 700, 650 bzw. 600 Werte zählenden Messwerttabellen auf jeweils 50 Werte gebracht, indem über die gesamte Länge der Tabelle jeweils 14, 13 bzw. 12 Werte gemittelt wurden. Auf diese Weise wurde jeder Far-Western Blot in 50 Zeilen von je einem Feld pro Probe unterteilt (Abbildung 4), um das Rauschen einzelner Messwerte im Pixelbereich zu reduzieren, die Auflösung jedoch nicht zu stark zu verringern. Im Anschluss wurde je SH2-Sonde das untere Quartil der Messwerte abgezogen, da insbesondere Schwankungen im Bereich

Methoden

niedriger Intensitäten recht fehlerträchtig sind<sup>61</sup>. Alle Werte wurden abschließend auf den höchsten gemessenen Wert je Far-Western Blot-Analyse normalisiert. In Folgeanalysen, in welchen Kandidaten-Felderzeilen erhoben wurden bzw. werden sollten, wurden nur solche als valide pY-Signale behandelt, die einen Wert von mindestens 40 % dieser höchsten gemessenen Signalstärke aufwiesen; dieser willkürlich festgelegte Signal-Schwellenwert hatte sich im Vorfeld als zweckmäßig erwiesen, um im Hinblick auf zukünftige Experimente die Anzahl falsch Positiver möglichst gering zu halten. Anders verhielt es sich wiederum mit den Clusteranalysen, für welche sämtliche Werte berücksichtigt wurden, da hier auch Signale, unabhängig schwächere von ihrer potenziell problematischen experimentellen Validierbarkeit, als wichtig im Sinne der globalen Analyse erachtet wurden. Um die Molekulargewichtsbereiche der je 50 Felderzeilen der Far-Western Blots möglichst korrekt zu ermitteln, wurde der je Blot zweifach mitgeführte (Novex<sup>®</sup> Molekulargewichtsmarker Sharp Prestained Protein Standard; Life Technologies) in ImageJ auf gleiche Weise vermessen wie für die Tumorproben beschrieben. Es wurden anhand der mittleren y-Positionen der Markerbanden auf den Blots und über die Logarithmen der vom Hersteller angegebenen Molekulargewichte dieser Banden die Molekulargewichte für sämtliche y-Positionen eines jeden Blots errechnet; hierbei wurde - dies hatte sich in Vorversuchen als am sinnvollsten erwiesen - jeder Wertebereich zwischen zwei Markerbanden separat bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden sinnvoll gerundet und in Form von Molekulargewichtsbereichen für die jeweils 50 Felderzeilen je Blot angegeben.

## **Clusteranalysen von SH2-Profilen**

Clusteranalysen wurden in TM4<sup>104</sup> durchgeführt. Bei der Normalisierung der Daten wurde wegen Problemen der Software im Umgang mit dem Wert 0<sup>†</sup> der Wert 1 x 10<sup>-9</sup> anstelle dessen verwendet; dies hatte keinen Einfluss auf die Resultate. Für die Far-Western Blot-Analyse von Neuroblastom-Zelllinien ergab sich eine Datenmatrix von insgesamt 15750 Werten (9 Zelllinien multipliziert mit 35 SH2-Profilen mit je 50

<sup>&</sup>lt;sup>†</sup> Es wurden für verschiedene Datenmatrices, erhalten über die Multiplikation der Original-Matrix mit beliebigen Faktoren, unterschiedliche Cluster-Zuordnungen beobachtet; dies war aufgrund des angewandten Cluster-Algorithmus (nach Spearman-Rangkorrelation) eigentlich nicht möglich, da hier nur mit Rängen gearbeitet wird, erübrigte sich jedoch durch die oben genannte Maßnahme.

Feldern = 1750 Felderzeilen von je 9 Werten), für diejenige der Neuroblastom-Tumorproben ergab sich eine Matrix von 19200 Werten (21 Tumore und 3 Zelllinien multipliziert mit 16 SH2-Profilen mit je 50 Feldern = 800 Felderzeilen von je 24 Werten). Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der aus den Profilen densitometrisch ermittelten Werte, und um auch nicht-lineare Zusammenhänge erfassen zu können, wurde zur Zuordnung der Proben bzw. Zelllinien zu Gruppen ähnlicher SH2-Profile der Cluster-Algorithmus nach Spearman-Rangkorrelation angewandt; zwecks der Bildung homogener Gruppen erfolgte hierbei die Cluster-Einteilung nach der Methode des entferntesten Nachbarn (complete linkage).

## Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden in IBM SPSS Statistics 20 durchgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl an Proben bzw. Zelllinien, der rechtsschiefen Verteilung der untersuchten Daten, sowie, um auch nicht-lineare Zusammenhänge zu erfassen, wurden ausschließlich nicht-parametrische Tests (Exakter Test nach Fisher, Mann-Whitney-Test) sowie Rangkorrelationen nach Spearman durchgeführt. Als Signifikanzniveau für sämtliche Analysen wurde a = 0,05 festgelegt.

## Ergebnisse

#### Far-Western Blot-Analyse von Neuroblastom-Zelllinien

einen Um sich ersten orientierenden Überblick über die pY-abhängige Signaltransduktion im Neuroblastom zu verschaffen, und darauf basierend die spätere Erhebung von SH2-Profilen in Neuroblastom-Primärtumorproben vorausschauend zu planen, wurden zunächst neun Neuroblastom-Zelllinien (siehe Methoden, Tabelle 1) in einer umfassenden Far-Western Blot-Analyse untersucht. Für dieses Experiment wurden die Proteinlysate der neun Zelllinien per Gelelektrophorese aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit 35 SH2-Domänen als Sonden analysiert. Die hohe Anzahl eingesetzter SH2-Sonden sollte über die zahlreichen verschiedenen Bindungsmotive die Erfassung eines möglichst breiten Spektrums unterschiedlicher, pY-abhängiger Signalzustände gewährleisten. Die auf diesem Wege erhobenen SH2-Profile zeigten zum Teil ähnliche, aber auch heterogene pY-vermittelter Signaltransduktion in den Neuroblastom-Zelllinien Zustände (Abbildung 5).

Während einige SH2-Domänen, wie zum Beispiel ABL1, ähnliche Profile offenbarten wie der zum Vergleich mitgeführte, pY-spezifische monoklonale Antikörper 4G10, unterschieden sich die Profile für viele SH2-Domänen erheblich von diesem; SH2-Domänen wie GRB2, PIK3R1-N, SHP2-N und VAV2, um einige Beispiele anzuführen, zeigten sowohl untereinander, als auch im Vergleich zu 4G10 beträchtlich abweichende Muster in der Verteilung der Intensitäten der erfassten pYdemonstrierten Signale (Abbildung 5), und damit eindrücklich den Informationszuwachs in der Analyse pY-abhängiger Signalprozesse, welcher mittels SH2-Profiling gegenüber der Analyse mit einem pY-spezifischen Antikörper erzielt wird. Ungeachtet der genannten Unterschiede war aus den SH2-Profilen ebenfalls die Bindungsspezifitäten verschiedener SH2-Domänen Überlappung der deutlich erkennbar, als Beispiele hierfür seien ABL1 und ABL2 bzw. MATK und SHP2-N angeführt (Abbildung 5).

Im Vergleich der pY-Signalzustände der Neuroblastom-Zelllinien untereinander



**Abbildung 5. Far-Western Blot-Analyse von Neuroblastom-Zelllinien.** Die Proteinlysate von neun Neuroblastom-Zelllinien wurden per Gelelektrophorese aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und im Anschluss mit 35 SH2-Sonden untersucht. Zum Vergleich wurden die Lysate zusätzlich mit einem anti-pY-Antikörper (mAb 4G10) untersucht, als Beladungskontrolle diente β-Actin.

wurde aus den SH2-Profilen überwiegend eine hohe Ähnlichkeit ersichtlich, veranschaulicht durch den erheblichen Anteil der von den SH2-Domänen erkannten pY-Banden, die in vielen der Neuroblastom-Zelllinien zu finden waren (Abbildung 5). Trotz dieser Ähnlichkeit war auf Ebene der Intensitäten einzelner pY-Banden ein nicht zu vernachlässigendes Maß an Heterogenität der pY-Signalzustände der Neuroblastom-Zelllinien zu beobachten (Abbildung 5). Dies wurde insbesondere für 15 der 35 eingesetzten SH2-Domänen (ABL1, ABL2, CRK, GAP-N, GRB2, GRB7, LYN, MATK, NCK2, PIK3R1-N, PLCγ1-C, SHC1, SHP2-N, SRC und VAV2) gefunden; andere SH2-Sonden, so zum Beispiel ITK oder SHIP1, zeigten nur ein geringes Maß an Heterogenität der pY-Signalzustände der Zelllinien (Abbildung 5).

Nachdem die Far-Western Blot-Analyse von neun Neuroblastom-Zelllinien mit 35 SH2-Domänen zum Teil ähnliche, im Detail jedoch durchaus heterogene pY-Signalzustände gezeigt hatte, war es im Folgenden von Interesse diese Resultate semi-quantitativ zu erfassen, und die Neuroblastom-Zelllinien bzw. die SH2-Sonden in Clusteranalysen basierend auf Gemeinsamkeiten und Unterschieden der erhaltenen SH2-Profile Gruppen hoher Ähnlichkeit zuzuordnen, um so die Durchführbarkeit eines SH2-Profilings in Neuroblastom-Tumorproben, deren Mengen begrenzt waren, besser einschätzen und umsetzen zu können.

#### Clusteranalyse der SH2-Profile von Neuroblastom-Zelllinien

Zur besseren Einschätzung und Planung eines SH2-Profilings in Primärtumorproben wurden die erhobenen SH2-Profile der Neuroblastom-Zelllinien semi-quantitativ erfasst, und mittels Clusteranalysen die aus Gemeinsamkeiten und Unterschieden resultierende Gruppenbildung der Zelllinien bzw. der SH2-Sonden untersucht. Die SH2-Profile wurden zu diesem Zweck mittels ImageJ-Software<sup>102</sup> densitometrisch in digitale Form überführt, so dass jede Spur des Profils einer gegebenen SH2-Domäne durch 50 einzelne Felder je eines pY-Signals wiedergegeben wurde (siehe



Abbildung 6. Hierarchische Clusteranalyse der SH2-Profile von Neuroblastom-Zelllinien. Die in der Far-Western Blot-Analyse erhobenen SH2-Profile von neun Neuroblastom-Zelllinien wurden digitalisiert und in nicht-supervidierten, hierarchischen Clusteranalysen nach Spearman-Rangkorrelation gruppiert. Dabei wurden die SH2-Profile sowohl bezüglich der SH2-Sonden (siehe Dendrogramm links), als auch bezüglich der Zelllinien (siehe Dendrogramm oben) gruppiert. Mit Hilfe von exakten Tests nach Fisher wurden anschließend Zusammenhänge der gefundenen Einteilung der Zelllinien mit klinischen Parametern analysiert (exakte Signifikanzen siehe P-Werte, signifikante Zusammenhänge sind rot markiert).

Methoden). Die erhaltenen Daten wurden zunächst zur semi-quantitativen Überprüfung der Beobachtungen der Far-Western Blot-Analyse herangezogen und im Anschluss einer nicht-supervidierten, hierarchischen Clusteranalyse unterzogen, um die resultierende Gruppeneinteilung der Neuroblastom-Zelllinien auf Zusammenhänge mit zu diesen bekannten, klinisch relevanten Parametern zu untersuchen. Anhand einer weiteren Clusteranalyse wurden die 35 SH2-Sonden nach Ähnlichkeit gruppiert, um für das zukünftige SH2-Profiling der in begrenzten Mengen vorhandenen Primärtumorproben eine kleinere Gruppe einzusetzender, möglichst informativer SH2-Sonden auswählen zu können. Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der erhaltenen Daten, und um auch nicht-lineare Zusammenhänge zu erfassen, wurde der Cluster-Algorithmus nach Spearman-Rangkorrelation angewandt; zur Bildung homogener Gruppen erfolgte die Cluster-Zuordnung nach der Methode des entferntesten Nachbarn (complete linkage). Die Clusteranalysen zeigten eine interessante Aufteilung der Neuroblastom-Zelllinien in zwei Gruppen, und resultierten in der Einteilung der SH2-Domänen in vier Hauptgruppen mit untereinander ähnlichen Profilen (Abbildung 6).

Im Einklang mit der in der Far-Western Blot-Analyse beschriebenen, relativ hohen, qualitativen Ähnlichkeit der pY-Signalzustände wurden in der Clusteranalyse für die SH2-Profile der Neuroblastom-Zelllinien untereinander recht starke Korrelationen gefunden (mittlerer Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $\rho = 0,89$ , Spannbreite 0,81 - 0,96; Abbildung 6). Dass dementsprechend ein überwiegender Anteil der erkannten pY-Banden in zahlreichen der Neuroblastom-Zelllinien zu beobachten war, konnte anhand der digitalisierten SH2-Profile semi-quantitativ bestätigt werden; tatsächlich gab es unter Anwendung der gewählten Kriterien kein pY-Signal, welches

ausschließlich in einer Zelllinie zu finden war, dagegen wurde ein beliebiges pY-Signal im Durchschnitt in sechs der neun Zelllinien beobachtet, etwa ein Drittel der pY-Banden sogar in sämtlichen Zelllinien.

Trotz relativ hoher Ähnlichkeit der SH2-Profile der Neuroblastom-Zelllinien wurde in der Clusteranalyse eine interessante Aufteilung in zwei Gruppen von vier bzw. fünf Zelllinien ähnlicher Profile erhalten (Abbildung 6). Die Einteilung war signifikant mit Neuroblastom der Verteilung von im prognostisch aussagekräftigen Alterskategorien<sup>25</sup> assoziiert (Alter bei Diagnose  $\leq$  18 Monate vs. > 18 Monate; P = 0,02; Exakter Test nach Fisher; Abbildung 6), und auch für MYCN- und 1p-Status war eine Tendenz zu beobachten, sich in ungleichem Maße auf die zwei Cluster zu verteilen (Abbildung 6). Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Zelllinien, und da es sich lediglich um von Primärtumoren abgeleitete Zelllinien handelt, ist die Relevanz dieser Beobachtungen jedoch mit Vorsicht einzustufen, insbesondere im Hinblick auf den signifikanten Zusammenhang mit dem Alter bei Diagnose.

Die separat durchgeführte Clusteranalyse der SH2-Profile bezüglich des Vergleichs der Sonden untereinander teilte die SH2-Domänen in vier Gruppen, sowie eine SH2-Domäne ein (GRB2), deren SH2-Profil mit keiner der anderen Sonden in ausgeprägtem Maße korrelierte (Abbildung 6). Die Einteilung spiegelte die in der Far-Western Blot-Analyse beobachtete, auf überlappenden Bindungsspezifitäten<sup>60</sup> basierende Ähnlichkeit der Profile verschiedener SH2-Domänen wider; es wurden dementsprechend ausnahmslos positive Korrelationen der Profile der SH2-Domänen untereinander erhalten (mittlerer Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $\rho = 0,68$ , Spannbreite 0,21 - 0,95; Abbildung 6). Nichtsdestoweniger zeigte die Einteilung ebenfalls die in der Far-Western Blot-Analyse beschriebene Heterogenität der SH2-Profile im Sinne beträchtlich voneinander abweichender Muster in der Verteilung der Intensitäten erfasster pY-Signale auf; als Beispiel hierfür seien erneut die im vorigen Abschnitt in diesem Zusammenhang genannten SH2-Domänen GRB2, PIK3R1-N, SHP2-N und VAV2 angeführt, welche sich jeweils in verschiedenen Clustern fanden (Abbildung 6).

Da, wie die Ergebnisse des SH2-Profilings mit 35 SH2-Domänen zeigten, in der Clusteranalyse der SH2-Profile von neun Neuroblastom-Zelllinien trotz hoher Ähnlichkeit eine interessante Gruppeneinteilung erhalten wurde, schienen folglich die
Profile der pY-Signalzustände der untersuchten Zelllinien tumorbiologisch relevante Informationen zu enthalten. Weil es sich weiter bei den hier analysierten Zelllinien ausschließlich um solche handelte, die von Hochrisiko-Neuroblastomen abgeleitet worden waren, stellte ein SH2-Profiling in Neuroblastom-Primärtumoren - unter denen sich auch Niedrigrisiko-Neuroblastome als separate Gruppe hinsichtlich des klinischen Verhaltens befänden – demnach interessante Resultate in Aussicht. Die in der Clusteranalyse der SH2-Sonden erhaltene Zuordnung nahezu sämtlicher SH2-Domänen in vier Gruppen ähnlicher Profile veranschaulichte erneut die bereits in der Blot-Analyse beobachtete Überlappung der Bindungsspezifitäten Far-Western verschiedener SH2-Domänen. Eine Verringerung der Anzahl einzusetzender SH2-Sonden für das geplante SH2-Profiling primärer Neuroblastome vor dem Hintergrund begrenzter Mengen **Tumormaterial** schien daher ohne erheblichen an Informationsverlust möglich. Vor der Durchführung dieses Experiments jedoch erfolgte zunächst eine Charakterisierung des zu untersuchenden Probenkollektivs primärer Neuroblastome hinsichtlich der Expression diverser Proteine mit beschriebener bzw. potenzieller Relevanz für das Neuroblastom, insbesondere solcher Proteine der pY-abhängingen Signaltransduktion.

#### Molekulare Charakterisierung von Neuroblastom-Tumorproben

Da ein SH2-Profiling von Neuroblastom-Zelllinien vielversprechende Ergebnisse gezeigt hatte, wurde nun mit den Vorarbeiten zu einem SH2-Profiling von Primärtumorproben begonnen; hierzu erfolgte eine molekulare Charakterisierung der zur Verfügung stehenden Neuroblastome bezüglich der Expression diverser Zielproteine (bzw. Proteinspezies). Das zu untersuchende Kollektiv umfasste 21 Neuroblastom-Primärtumorproben, zu denen jeweils INSS-Stadium, *MYCN*-Status sowie das Patientenalter bei Diagnose bekannt waren (siehe *Methoden*, Tabelle 2). Als zusätzlicher Bezugspunkt wurden drei der zuvor untersuchten Neuroblastom-Zelllinien mitanalysiert (IMR-32, LS und SK-N-SH). Eine unter Berücksichtigung der verfügbaren Parameter erfolgende Einteilung der 21 Tumoren in drei Risikogruppen<sup>28</sup> stimmte mit den INSS-Stadien der Neuroblastome überein (siehe *Methoden*, Tabelle 2), sodass auf diese redundante Einteilung verzichtet wurde; die INSS-Stadien 1, 3 und 4 werden aus diesem Grunde im Folgenden für das untersuchte Kollektiv

### Ergebnisse

synonym mit niedrigem, mittlerem, sowie hohem Risiko gebraucht. Um die Neuroblastome eingehend auf molekularer Ebene zu charakterisieren, wurden mittels Western Blot-Analysen und ELISA die relativen Expressionsspiegel (bzw. Aktivitätszustände) von 26 Proteinspezies in den Tumorproben bestimmt. Als Ausleseebene für die Untersuchung wurde der Proteinlevel gewählt, im Gegensatz zum mRNA-Level, um die interessierenden Größen auf dieser in der intrazellulären Abfolge späteren, und damit bezüglich der Aktivität dieser Größen zumeist aussagekräftigeren, Ebene zu bestimmen<sup>‡</sup>. Die Analyse umfasste sowohl die zentralen Knotenpunkte der kanonischen Pro-Überleben- bzw. pro-proliferativen Signalwege<sup>45,46</sup> Akt, Phospho-Akt, MAPK und Phospho-MAPK, auf die pY-vermittelte Signalkaskaden in der Regel konvergieren<sup>44,107,108</sup>, als auch die als relevant für das Neuroblastom beschriebenen Proteine CD44<sup>109-112</sup>, Fyn<sup>74</sup>, Shc3<sup>75,77,78,113</sup> sowie N- $Mvc^{83-86,114-121}$ . Zudem wurden die relativen Expressionsspiegel von 17 darunter Rezeptortyrosinkinasen bestimmt, im Zusammenhang mit dem Neuroblastom häufig beschriebene Vertreter wie ALK<sup>8,9,21,22,81–86,89,90,115,122,123</sup> und die Rezeptoren der Trk-Familie<sup>64,65,67,68,73,110,111,124–129</sup>. Hintergrund dessen war, neben der Bestimmung einiger, im Neuroblastom prognostisch aussagekräftiger RTKs, die Erfassung eines beträchtlichen Teils dieser höchsten Ebene der pY-vermittelten Signaltransduktion<sup>44</sup> zwecks späterem Abgleich mit den SH2-Profilen. Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen (Abbildung 7) wurden digitalisiert, anschließend wurden die Ergebnisse beider Plattformen (ELISA-Daten nicht gesondert dargestellt) je untersuchter Proteinspezies auf den Maximalwert normalisiert und zusammengefasst in einer *heatmap* dargestellt (Abbildung 8 A). Die erhaltenen Daten wurden weiterhin auf signifikante Unterschiede zwischen Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen untersucht; dabei wurden die Gruppe der Neuroblastome mittleren Risikos sowie die Neuroblastom-Zelllinien aufgrund ihrer jeweils geringen Anzahl, und, weil insbesondere Unterschiede zwischen Niedrigrisiko- und Hochrisiko-Neuroblastomen von hohem Interesse waren, nicht berücksichtigt. Es zeigte sich in diesen

<sup>&</sup>lt;sup>‡</sup> In vielen später zum Vergleich herangezogenen Arbeiten war die Expression der untersuchten Größen nur auf der mRNA-Ebene bestimmt worden; da mRNA- und Proteinspiegel generell zwar nur moderat, aber dennoch miteinander korreliert sind<sup>105,106</sup>, wurde für diese Vergleiche darauf verzichtet, im Detail zwischen den Ebenen zu unterscheiden.



**Abbildung 7. Western Blot-Analysen von Neuroblastom-Tumorproben.** Die Proteinlysate von 21 Neuroblastom-Tumorproben und drei Zelllinien wurden mit diversen Antikörpern auf die Expression von Proteinen/Proteinspezies mit beschriebener bzw. potenzieller Bedeutung für das Neuroblastom untersucht. Probe NB60 wies eine starke Überexpression von ALK auf, daher sind aus Gründen der besseren Darstellung zwei Exponate gezeigt. Als Beladungskontrolle diente β-Actin. Die Anordnung der Tumorproben in drei Gruppen (neben der Gruppe der Zelllinien) erfolgte nach ihrer Einteilung in drei Risikogruppen<sup>28</sup>, welche mit der Einteilung nach dem INSS-Stadium übereinstimmte; diese ist zusammen mit weiteren klinischen Parametern unterhalb der Western Blots gezeigt.

Untersuchungen, dass nur vier der untersuchten Proteinspezies, genauer gesagt Shc3, N-Myc, ALK und TrkA, signifikant verschieden in Niedrig- bzw. Hochrisiko-Neuroblastomen exprimiert waren, während viele der untersuchten RTKs zwar risikounabhängig, dafür jedoch in zahlreichen, einige sogar in sämtlichen der Neuroblastome exprimiert waren (Abbildungen 7 und 8 A und B).



В



Abbildung 8. Molekulare Charakterisierung von Neuroblastom-Tumorproben. (A) In Western Blot-Analysen und ELISA bestimmte relative Expressions- bzw. Aktivitätsspiegel von Proteinen mit beschriebener bzw. potenzieller Bedeutung für das Neuroblastom wurden jeweils auf den höchsten Messwert normiert und in einer Heatmap abgebildet (Rel. Expressionsspiegel = Relativer Protein-Expressionsspiegel). Zum Zwecke einer besseren Darstellung wurden einzelne, stark erhöhte Signale der Neuroblastom-Zelllinien, sowie das ebenfalls stark erhöhte Signal für ALK in Probe NB60 in ihrer Höhe auf 100 % begrenzt (pAkt/Akt – LS [141 %]; ALK – NB060 [531 %]; EGFR – IMR-32 und SK-N-SH [123 bzw. 196 %]; HER4 – IMR-32 [129 %]; EphB4 – LS und SK-N-SH [1357 bzw. 550 %]; IGF1R – sämtliche Zellinien [643, 202 bzw. 442 %]; KIT – IMR-32 und LS [303 bzw. 292 %]; PDGFRB - LS und SK-N-SH [203 bzw. 417 %]; MET - LS [293 %]; RET - SK-N-SH [265 %]; TrkB - IMR-32 und SK-N-SH [168 bzw. 169 %]; Tyro3 – sämtliche Zelllinien [167, 109 bzw. 299 %]). Unterhalb der Heatmap sind zu den Proben bekannte klinische Parameter dargestellt. Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastome wurden mittels Mann-Whitney-Test bezüglich ihrer relativen Expressions- bzw. Aktivitätsspiegel der untersuchten Proteine verglichen (exakte Signifikanzen siehe P-Werte, signifikante Unterschiede sind rot markiert). (B) In (A) dargestellte Proteine, welche sich bezüglich des relativen Expressionsspiegels signifikant in Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen unterschieden, sind in Punktwolken-Diagrammen mit Median und unter Angabe der exakten Signifikanzen (P-Werte) aus den Mann-Whitney-Tests dargestellt (INSS-Stadium 1 / Geringes Risiko n = 8; INSS-Stadium 3 / Mittleres Risiko – n = 2; INSS-Stadium 4 / Hohes Risiko – n = 11; Rel. Expr. = Relativer Proteinexpressionsspiegel).

Für Shc3, N-Myc und ALK wurde, wie in der Literatur beschrieben, eine höhere Expression in Hochrisiko-Neuroblastomen<sup>77,78,82,117,120,121</sup> gemessen, TrkA wurde ebenfalls entsprechend der Literatur<sup>64,65,73,110,111,124–126,129</sup> als höher in Niedrigrisiko-Neuroblastomen exprimiert gefunden (Hoch- vs. Niedrigrisiko-Neuroblastome; P < 0,001, P = 0,020, P = 0,005 bzw. P = 0,020; Mann-Whitney-Test; Abbildungen 8 A und B; Western Blots siehe Abbildung 7). Die Expression von N-Myc war nicht erkennbar mit dem Amplifikationsstatus des dafür kodierenden MYCN-Gens korreliert. N-Myc war vielmehr in nahezu allen (20 von 21) Neuroblastom-Tumorproben exprimiert, ohne signifikante Unterschiede zwischen Patientenproben mit MYCN-Amplifikation und den verbleibenden Proben (Abbildungen 7 und 8 A). Nichtsdestoweniger war N-Myc in den Hochrisiko-Neuroblastomen im Median mehr als doppelt so hoch exprimiert wie in den Niedrigrisiko-Neuroblastomen (Abbildung 8 B). N-Myc wies überdies eine starke Korrelation mit dem ebenfalls in der Mehrheit Proben (18 von 21) exprimierten Protein der Shc3 auf (Spearman-

Rangkorrelationskoeffizient  $\rho = 0.84$ ), ein Zusammenhang, welcher auf Proteinebene beschrieben ist, wohl aber zwischen Shc3-Proteinspiegel und noch nicht Amplifikationsstatus des MYCN-Gens<sup>77,78</sup>. Die Expression von Shc3 in Hochrisiko-Neuroblastomen lag im Median ca. zwölfmal höher als in Niedrigrisiko-Neuroblastomen (Abbildung 8 B), und stellte damit den erheblichsten Unterschied zwischen Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen dar, welcher für die hier untersuchten Größen beobachtet wurde. Dies bestätigte die offenbar wichtige biologische Rolle von Shc3 für das Neuroblastom<sup>75,77,78,113</sup>. Auch ALK wurde in einem großen Teil der Neuroblastome exprimiert (15 von 21), und wies im Median, ähnlich wie N-Myc, in Hochrisiko-Neuroblastomen einen gegenüber den Niedrigrisiko-Proben um das etwa Dreifache erhöhten Expressionsspiegel auf (Abbildung 8 B). Eine Besonderheit stellte die Probe hohen Risikos NB60 dar; für sie wurde eine außerordentlich starke Überexpression von ALK beobachtet, etwa 20fach erhöht gegenüber den verbleibenden Proben (Abbildungen 7 und 8 B). Es stellte sich daher die Frage, ob und inwieweit sich Probe NB60 im SH2-Profil von den anderen Neuroblastomen unterscheiden würde. TrkA schließlich wurde in sämtlichen Niedrigrisiko-Neuroblastomen, jedoch nur in vier der elf Hochrisiko-Proben detektiert, und obgleich die höchste Expression in einem der Hochrisiko-Neuroblastome gemessen wurde (Abbildungen 8 A und B), so lag die mediane Expression von TrkA in Niedrigrisiko-Neuroblastomen doch substanziell höher als in Hochrisiko-Tumorproben (Abbildung 8 B). Außer den vier beschriebenen Kandidaten war lediglich für Fyn eine in der Literatur beschriebene<sup>74</sup> Tendenz erkennbar, in Niedrigrisiko-Neuroblastomen in höherem Maße exprimiert zu sein als in Hochrisiko-Neuroblastomen, wenngleich dieser Zusammenhang keine statistische Signifikanz erreichte (P = 0.051; Mann-Whitney-Test; Abbildungen 7 und 8 A). Interessant war in dieser Hinsicht auch die beobachtete starke Korrelation zwischen Fyn und TrkA (Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $\rho = 0.67$ ), die einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen in der Vermittlung von Differenzierungssignalen für Niedrig-Risiko-Neuroblastome vermuten ließ, welcher bereits für die neuronale Differenzierung beschrieben wurde<sup>130,131</sup>.

Sämtliche der 20 verbleibenden untersuchten Proteinspezies waren heterogen exprimiert und stochastisch auf die beiden Neuroblastom-Risikogruppen verteilt

(Abbildung 8 A). Die Aktivitäten von Akt und MAPK beispielsweise, bestimmt über den Quotienten der aktiven, phosphorylierten Form und des Gesamtproteins (Abbildung 7), wiesen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen auf (Abbildung 8 A). Shc1, welches im Gegensatz zu Shc3 in allen seinen drei Isoformen beobachtet wurde (Shc3 wurde nur in der 52 kD-Isoform detektiert), war, ebenfalls im Gegensatz zu Shc3, zufällig auf die beiden Risikogruppen verteilt (Abbildung 8 A), ein Befund, der mit den in der Literatur veröffentlichten Resultaten<sup>77,78</sup> übereinstimmt. Für den Oberflächenmarker CD44 konnte ein beschriebener, signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Hoch-und Niedrigrisiko-Neuroblastomen<sup>109–112</sup> nicht bestätigt werden (Abbildung 8 A).

Hinsichtlich der untersuchten RTKs unterschieden sich, wie bereits dargelegt, Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastome bezüglich des Expressionsspiegels lediglich für ALK und TrkA signifikant. Die Expressionsspiegel der verbleibenden 15 RTKs hingegen waren stochastisch auf die beiden Risikogruppen verteilt (Abbildung 8 A). Dieses Resultat entsprach grundsätzlich bislang publizierten Daten<sup>73,124,129,132–136</sup>, einige Unterschiede zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen gab es jedoch. Interessant waren in diesem Zusammenhang die RTKs TrkB und TrkC; beide sind in einigen Arbeiten als mit schlechter bzw. guter Prognose assoziiert beschrieben<sup>67,68,127</sup>, und in vielen, auch neueren Übersichtsarbeiten<sup>2,7,137</sup> als prognostische Faktoren angeführt. Eine aktuelle Arbeit hingegen, in der eine hohe Anzahl an Neuroblastomen (n = 814) auf die mRNA-Expression der Trk-Rezeptoren untersucht worden war, hatte im Einklang mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen (Abbildung 8 A) keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von TrkB oder TrkC mit dem Risiko bzw. dem Verlauf der Erkrankung festgestellt<sup>73</sup>. Die in einem anderen Artikel beschriebene Assoziation der Expression von HER2 mit einem geringen Risiko<sup>138</sup> konnte hier ebenfalls nicht bestätigt werden (Abbildung 8 A), ebenso wenig fanden sich Hinweise auf diesen Zusammenhang in einigen älteren Arbeiten, welche die Expression von HER2 in Neuroblastomen untersucht hatten<sup>132,135,136</sup>. Auch für KIT waren in der Literatur kontroverse Ergebnisse zu finden; neben der Abwesenheit eines signifikanten Zusammenhanges<sup>139</sup>, waren sowohl eine Assoziation mit einem geringen Risiko<sup>140,141</sup>, als auch eine Assoziation mit einem hohen Risiko publiziert<sup>142</sup>. Die hier erhaltenen

Daten sprachen für Ersteres (Abbildung 8 A), die Frage konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden. Dies trifft auch für PDGFR $\beta$  und VEGFR1 zu, welche nicht, wie in einzelnen Arbeiten beschrieben<sup>140,143</sup>, als mit geringem bzw. hohem Risiko assoziiert bestätigt werden konnten (Abbildung 8 A).

Es zeigte sich eine ausgeprägte Heterogenität hinsichtlich der Expressionsmuster der zahlreichen RTKs; trotz vereinzelter Beobachtungen ähnlicher RTK-Expressionsprofile – als Beispiel seien diejenigen von Patient NB08 und Patient NB28 angeführt (Abbildung 8 A) – wurden keine beständigen Muster in der Expression der 17 untersuchten RTKs beobachtet (Abbildung 8 A). Auffällig war hingegen die hohe Anzahl exprimierter RTKs; ein Neuroblastom exprimierte im Mittel 13 der untersuchten 17 RTKs (76 %), maximal wurden 16 RTKs (94 %; n = 5) als exprimiert gefunden, mindestens jedoch acht von 17 RTKs (47 %; n = 2). Dieser Befund stimmte mit entsprechenden Ergebnissen der Messung von RTKs in den neun Neuroblastom-Zelllinien überein, in welchen im Mittel je 17 von 21 untersuchten RTKs (76 %) exprimiert waren (Daten nicht gezeigt), und bestätigte die für andere Tumorentitäten bzw. Tumorzelllinien beschriebene simultane Expression zahlreicher RTKs<sup>144–146</sup>. Die Resultate waren auch umgekehrt betrachtet sehr interessant. So waren EGFR, IGF1R, KIT und PDGFRß in sämtlichen Neuroblastomen exprimiert, auch für Tyro3 und VEGFR1 traf dies mit Ausnahme jeweils einer Probe zu. Dies stimmte für die Mehrheit der genannten RTKs weitgehend mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein<sup>132,136,140,143,147,148</sup>, mit Ausnahme von Tyro3, für welche bisher keine Expressionsdaten im Neuroblastom beschrieben waren, und KIT, für die bislang, wie bereits erwähnt, nur kontroverse Ergebnisse publiziert waren<sup>139–</sup> <sup>142,149</sup>. Weiter lag der durchschnittliche Anteil an Neuroblastomen, in welchen eine gegebene RTK exprimiert war, bei 75 % (16 von 21 Neuroblastomen), und mit Ausnahme von HER4 wurde jede der hier untersuchten RTKs in nicht weniger als zehn Neuroblastom-Tumorproben exprimiert.

Ein zusätzlicher bemerkenswerter Befund war die oftmals deutlich höhere Expression von RTKs in den Neuroblastom-Zelllinien im Vergleich mit den Tumorproben, welche für zwölf der 17 untersuchten RTKs (70 %) beobachtet wurde, beispielsweise für sämtliche der soeben genannten, ubiquitär im Neuroblastom exprimierten RTKs (EGFR, IGF1R, KIT, PDGFR $\beta$ ; P  $\leq$  0,011; Mann-Whitney-Test;

siehe auch Abbildung 8 A). Für diese vier RTKs wurden im Median sieben- bis 42fach höhere Expressionsspiegel in den Neuroblastom-Zelllinien gemessen. Dies veranschaulichte nicht zu vernachlässigende Unterschiede zwischen Neuroblastom-Zelllinien und Primärtumoren im Hinblick auf ihre pY-Signalzustände, und verdeutlichte, dass bei Schlussfolgerungen von *in vitro*-Experimenten auf die Situation *in vivo* Vorsicht geboten ist.

Im Gesamten betrachtet demonstrierte die molekulare Charakterisierung der 21 Neuroblastom-Primärtumorproben, dass zahlreiche der untersuchten Proteinspezies auf heterogene Art in vielen der Proben exprimiert waren, gleichzeitig aber nur wenige bekannte Größen signifikant verschieden auf die beiden Gruppen von Neuroblastomen niedrigen bzw. hohen Risikos verteilt exprimiert waren (Shc3, N-Myc, ALK, TrkA, und eventuell Fyn). Die Resultate bezüglich dieser bekannten Größen legten nahe, dass das Kollektiv hier untersuchter Neuroblastome repräsentativ war. Im Hinblick auf die RTKs stellte sich heraus, dass die Mehrheit dieser in einem Großteil der Neuroblastome, einige Kandidaten (EGFR, IGF1R, KIT, PDGFRβ, vermutlich auch Tyro3 und VEGFR1) sogar ubiquitär exprimiert waren. Als Nächstes stand nun das SH2-Profiling der Neuroblastome an, in welchem untersucht werden sollte, ob und welche Unterschiede es zwischen Neuroblastomen verschiedener Risikogruppen hinsichtlich ihrer pY-Signalzustände gab, und inwiefern sich die SH2-Profile in Zusammenhang mit den hier erhaltenen Resultaten, insbesondere bezüglich der bestimmten RTKs, bringen lassen würden.

### Far-Western Blot-Analyse von Neuroblastom-Tumorproben

Im Anschluss an die Charakterisierung der 21 Neuroblastom-Primärtumorproben bezüglich der Expression von 24 Zielproteinen (bzw. Proteinspezies) wurden in einer Far-Western Blot-Analyse die SH2-Profile der Primärtumoren erhoben und analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Proteinlysate der 21 Neuroblastome per Gelelektrophorese aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit 16 SH2-Sonden analysiert. Diese gegenüber der Far-Western Blot-Analyse der Neuroblastom-Zelllinien aufgrund von begrenztem Tumormaterial verringerte Auswahl an eingesetzten SH2-Domänen orientierte sich sowohl an der zuvor durchgeführten



Abbildung 9. Far-Western Blot-Analyse von Neuroblastom-Tumorproben. Die Proteinlysate von 21 Neuroblastom-Tumorproben und drei Neuroblastom-Zelllinien wurden per Gelelektrophorese aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit 16 SH2-Sonden untersucht. Zum Vergleich wurden die Lysate zusätzlich mit einem anti-pY-Antikörper (mAb 4G10) untersucht, als Beladungskontrolle diente  $\beta$ -Actin. Unterhalb der Blots sind zu den Tumoren verfügbare klinische Parameter gezeigt.

Analyse der SH2-Profile der Zelllinien (siehe oben) als auch an der über die Literatur vermuteten Relevanz der SH2-Domänen (bzw. der zugehörigen Proteine) für das Neuroblastom. Zwölf SH2-Domänen (ABL1, CRK, GAP-N, GRB2, GRB7, NCK2, PIK3R1-N, PLCy1-C, SHC1, SHP2-N, SRC, VAV2) stellten hierbei eine vielseitige Auswahl an SH2-Sonden dar, welche zahlreiche Signalwege und Proteinfunktionen, sowie zugleich drei der vier im SH2-Profiling der Zelllinien erhaltenen Gruppen von Sonden ähnlicher SH2-Profile (und GRB2; Abbildung 6) repräsentierten. Das verbleibende Cluster enthielt ausschließlich SH2-Domänen, für die in der Analyse der Zelllinien Profile von geringer Heterogenität hinsichtlich der erfassten pY-Signalzustände beobachtet worden waren (Abbildungen 5 und 6). Um dennoch zumindest eine SH2-Sonde aus dieser Gruppe mitzuführen, wurde EAT2 ausgewählt, da diese in früheren Analysen anderer Tumorentitäten interessante Profile gezeigt hatte<sup>53</sup>. Die SH2-Domänen FYN und SHC3 wurden vorwiegend wegen der in der Literatur beschriebenen<sup>74,75,77,78,113</sup> und in der vorliegenden Arbeit bestätigten (Abbildung 8) Relevanz der zugehörigen Proteine Fyn und Shc3 für das Neuroblastom der Auswahl hinzugefügt, sowie darüber hinaus die zwischenzeitlich zur Verfügung stehende SH2-Sonde CSK, welche, da sie innerhalb des Repertoires zur Verfügung stehender SH2-Sonden eine neue Funktionsklasse (Regulation von Kinasen der Src-Familie durch Csk) repräsentierte, ebenfalls ausgewählt wurde, wenngleich für sie keine Daten aus dem SH2-Profiling der Zelllinien vorhanden waren. Diese Auswahl an insgesamt 16 SH2-Sonden sollte idealerweise das Auffinden sämtlicher, potenziell risikorelevanter, pY-abhängiger Signalzustände in den Neuroblastom-Tumorproben möglichst geringem Probenverbrauch gewährleisten. Auch für diese unter Untersuchung wurden zum Vergleich die drei Neuroblastom-Zelllinien IMR-32, LS und SK-N-SH mitgeführt. Die auf diese Weise erhobenen SH2-Profile zeigten global ähnliche, im Detail heterogene Zustände pY-vermittelter Signaltransduktion in den

Neuroblastom-Tumorproben (Abbildung 9).

Auch in dieser Far-Western Blot-Analyse zeigten die SH2-Domänen im Vergleich untereinander verschiedene pY-Profile, die sichtlich mehr spezifische pY-Signale abzugreifen vermochten, als der zum Vergleich mitgeführte, pY-spezifische Antikörper 4G10 (Abbildung 9). Dennoch ließen vorwiegend ähnliche sowie übereinstimmende Muster der Intensitäten zahlreicher pY-Banden im Vergleich zwischen den Profilen verschiedener SH2-Domänen erneut eine nicht unerhebliche Überlappung der Bindungsspezifitäten der SH2-Sonden erkennen (Abbildung 9), als Beispiel hierfür sei die pY-Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 110 kD in den Profilen von ABL1, CRK, sowie – etwas schwächer in der Intensität – von PIK3R1-N und VAV2 angeführt (Abbildung 9). Auffallend waren die beträchtlich schwächeren pY-Profile, welche für die Neuroblastom-Tumorproben und einige der SH2-Sonden im Vergleich zu den Zelllinien beobachtet wurden, so zum Beispiel besonders ausgeprägt für EAT2 und SHP2-N (Abbildung 9). Dies stellte ein wiederkehrendes Phänomen dar, das in Far-Western Blot-Analysen bereits für andere Tumorentitäten beobachtet worden war<sup>53</sup> und nochmals anschaulich verdeutlichte, wie unterschiedlich die pY-Signalsituation in vitro von derjenigen in vivo ist. Nichtsdestoweniger war ebenfalls ersichtlich, dass es sich bei den Unterschieden in der Hauptsache um Unterschiede quantitativer Art handelte; die beobachteten stärkeren pY-Signalintensitäten der SH2-Profile der Zelllinien waren nicht durch zusätzliche pY-Banden, sondern durch in den Zelllinien wesentlich stärker phosphorylierte Banden bedingt (Abbildung 9). Es war in diesem Kontext sehr interessant, dass in der molekularen Charakterisierung der Neuroblastome für sieben RTKs gleichermaßen deutlich höhere Expressionsspiegel in den Zelllinien gemessen worden waren, was einen Zusammenhang nahelegte (Daten nicht gezeigt).

Im Vergleich der SH2-Profile der Neuroblastom-Tumorproben untereinander wurde eine ausgeprägte Ähnlichkeit beobachtet (Abbildung 9). Diese hohe Ähnlichkeit der pY-Signalzustände der Neuroblastome – offensichtlich fiel auch die im letzten Abschnitt erwähnte Probe NB60 mit ca. 20facher ALK-Überexpression nicht durch maßgebliche Unterschiede von den anderen Tumoren auf – war erstaunlicherweise auch für den Vergleich von Niedrigrisiko- und Hochrisiko-Neuroblastomen zu beobachten, obwohl es zuweilen Unterschiede zwischen einzelnen Proben gab

(Abbildung 9). Es wurden jedoch augenscheinlich keine pY-Signale exklusiv in der Niedrig- oder der Hochrisiko-Gruppe der Neuroblastome detektiert. Selbst für eine pY-Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 20 kD, welche von der SH2-Domäne CRK erkannt wurde und nahezu ausschließlich in Neuroblastomen mittleren und hohen Risikos phosphoryliert schien, war ein entsprechendes, gleichwohl schwächeres pY-Signal in Probe NB10 erkennbar (Abbildung 9). Die SH2-Profile von Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen unterschieden sich demnach ausschließlich in guantitativer Art voneinander, gualitative Unterschiede wurden nur vereinzelt und unabhängig von den Risikogruppen beobachtet. Anders formuliert bedeutete dies, dass sich die hier untersuchten Niedrig- von Hochrisiko-Neuroblastome auf der ausgelesenen Ebene der globalen pY-Signalsituation entgegen den Erwartungen nicht über verschiedene Proteine und Signalwege zu unterscheiden schienen, sondern über das Ausmaß der Phosphorylierungszustände der vermeintlich gleichen Signalproteine<sup>§</sup>. Dieses Resultat war im Hinblick auf das vollkommen unterschiedliche klinische Verhalten von Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen sehr überraschend. Es war im nächsten Schritt von hohem Interesse, inwiefern sich mit Hilfe von Clusteranalysen der SH2-Profile ein besserer Einblick in die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Neuroblastome auf der Ebene ihrer globalen pY-Signalzustände verschaffen lassen würde.

### Clusteranalyse der SH2-Profile von Neuroblastom-Tumorproben

Nachdem die Far-Western Blot-Analyse von 21 Neuroblastom-Tumorproben SH2-Profile von unerwartet hoher Ähnlichkeit gezeigt hatte, war es nun von Interesse, die Profile genauer auf darin enthaltene Informationen zu untersuchen. Es wurden zu diesem Zweck die SH2-Profile densitometrisch digitalisiert, so dass jede Spur des Profils einer SH2-Sonde durch 50 Felder je eines pY-Signals wiedergegeben wurde (siehe *Methoden*). Die Daten wurden auf Korrelationen mit den Expressionsspiegeln der in der molekularen Charakterisierung der Tumorproben bestimmten Proteinspezies untersucht, simultan dazu wurden die in der Far-Western Blot-Analyse

<sup>&</sup>lt;sup>§</sup> Ob es sich bei pY-Signalen gleicher apparenter Molekulargewichte tatsächlich um die gleichen Proteine handelte, vermochte das in der vorliegenden Arbeit durchgeführte SH2-Profiling nicht zu klären. Dieser Punkt wird in der *Diskussion* im Kontext möglicher, fortführender Arbeiten noch einmal behandelt.

### Ergebnisse

gemachten Beobachtungen quantitativ überprüft. Im Anschluss wurden die digitalisierten SH2-Profile einer nicht-supervidierten, hierarchischen Clusteranalyse unterzogen und die erhaltene Aufteilung der Tumorproben auf Zusammenhänge mit zu den Proben bekannten, klinisch relevanten Parametern (Risiko bzw. INSS-Stadium, MYCN-Status, Patientenalter bei Diagnose) untersucht. Auch hier wurde aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der Daten, und um nicht-lineare Zusammenhänge erfassen zu können, der Cluster-Algorithmus nach Spearman-Rangkorrelation mit einer Cluster-Zuordnung nach der Methode des entferntesten Nachbarn (complete linkage) angewandt. Nachdem keine nennenswerten Korrelationen den SH2-Profilen der molekularen zwischen und den in Charakterisierung der Neuroblastome bestimmten Proteinspiegeln gefunden, und die Beobachtungen der Far-Western Blot-Analyse des vorangegangenen Abschnitts bestätigt worden waren, zeigte die Clusteranalyse eine signifikant mit dem Risiko Patientenalter bei Diagnose assoziierte Gruppeneinteilung sowie dem der Neuroblastom-Tumorproben anhand ihrer SH2-Profile (Abbildung 10).

Es konnten zunächst anhand der digitalisierten SH2-Profildaten einige der in der Far-Western Blot-Analyse erhaltenen Resultate quantitativ bestätigt werden. Die von den verschiedenen SH2-Domänen erhobenen Profile zum Beispiel waren einander relativ ähnlich (mittlerer Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $\rho = 0.76$ , Spannbreite 0,42 - 0,97), zurückzuführen auf überlappende Bindungsspezifitäten. Weiter waren Neuroblastom-Zelllinien und die Unterschiede zwischen Primärtumorproben tatsächlich ausschließlich quantitativer Natur; unter den angelegten Kriterien wurden exklusiv für Neuroblastom-Zelllinien oder keine pY-Signale Primärtumoren beobachtet. Stattdessen konnte die signifikant höhere, über die je 50 Felder gemittelte Gesamtphosphorylierung in den Zelllinien im Vergleich zu den Primärtumoren für sämtliche SH2-Domänen, mit Ausnahme von GAP-N und VAV2, bestätigt werden ( $P \le 0,007$ ; Mann-Whitney-Test; siehe zum Vergleich Abbildung 9). Der Vergleich der mittleren Gesamtphosphorylierung von Neuroblastomen niedrigen mit derjenigen von Neuroblastomen hohen Risikos dagegen zeigte keine signifikanten Unterschiede; einzig für EAT2 wurde ein nicht zu vernachlässigender Unterschied beobachtet (P = 0,033; Mann-Whitney-Test). Es konnte weiter guantitativ bestätigt werden, dass, wie im Vergleich zwischen Zelllinien und Primärtumoren,

gleichermaßen zwischen Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen keine qualitativen Unterschiede bestanden, auch hier wurden keine pY-Signale ausschließlich in einer der beiden Gruppen beobachtet.

Die Suche nach Korrelationen zwischen Felderzeilen bzw. davon repräsentierten pY-Proteinen aus den SH2-Profilen und den zwecks molekularer Charakterisierung der Tumoren bestimmten Expressionsspiegeln verschiedener Proteinspezies blieb ohne Erfolg. Lediglich ein vermeintliches Protein schwachen pY-Signals von ca. 23 bis 29 kD, zu beobachten in den Profilen der SH2-Domänen FYN und SHC3, wies starke Korrelationen mit den Expressionsspiegeln der Proteine Shc3 und N-Myc auf (Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten  $\rho = 0.80$  und  $\rho = 0.83$  für Shc3, bzw.  $\rho =$ 0,79 und  $\rho = 0.86$  für N-Myc); die Signale dieser pY-Banden waren jedoch zu gering, als dass sie als valide pY-Signale im Sinne der festgelegten Kriterien (siehe *Methoden*) gewertet werden konnten. Nichtsdestoweniger war es interessant, dass dieses pY-Protein – da die beiden pY-Banden untereinander sehr stark korrelierten (Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $\rho = 0.96$ ), wurde angenommen, dass es sich sehr wahrscheinlich um das gleiche pY-Protein handelte – mit einem für Adapterproteine wie beispielweise Grb2 typischen Molekulargewicht von ca. 25 kD in den Profilen der SH2-Domänen der Proteine Shc3 und Fyn zu beobachten war, welche für das Neuroblastom als relevante Faktoren beschrieben sind<sup>74,75,77,78,113</sup>. Die erhaltenen Resultate legten nahe, dass, wenngleich die vermuteten Korrelationen, beispielsweise zwischen RTKs sowie Substraten dieser in Form von pY-Signalen in SH2-Profilen, im Vorfeld durchaus denkbar waren, die tatsächlichen den Zusammenhänge zwischen SH2-Profilen und den sie bedingenden Größen wesentlich komplexer waren.

Die Clusteranalyse resultierte in einer signifikant mit dem Risiko assoziierten Zuordnung der Proben zu vier Gruppen ähnlicher SH2-Profile (Abbildung 10). Es trennten sich zunächst die Neuroblastom-Zelllinien als Cluster von den Primärtumorproben (Abbildung 10); nichtsdestoweniger war die Ähnlichkeit der SH2-Profile der Neuroblastom-Zelllinien mit denjenigen der Primärtumoren, erfasst über ihre Korrelation, recht hoch (mittlerer Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $\rho = 0,63$ , Spannbreite 0,49 - 0,75; Abbildung 10). Explizit zu betonen ist in diesem



Abbildung 10. Hierarchische Clusteranalyse der SH2-Profile von Neuroblastom-Tumorproben. Die in der Far-Western Blot-Analyse erhaltenen SH2-Profile von 21 Neuroblastomen und drei Zelllinien wurden digitalisiert und in einer nicht-supervidierten, hierarchischen Clusteranalyse nach Spearman-Rangkorrelation gruppiert. Mit Hilfe von exakten Tests nach Fisher wurden anschließend Zusammenhänge der gefundenen Gruppenbildung der primären Neuroblastome mit klinischen Parametern analysiert (exakte Signifikanzen siehe P-Werte, signifikante Zusammenhänge sind rot markiert).

Kontext, Neuroblastom-Primärtumoren dass sich sämtlicher Risikogruppen, ungeachtet des drastisch unterschiedlichen, klinischen Verlaufs, auf der Ebene globaler pY-Signalprofile untereinander wesentlich stärker ähnelten (mittlerer Spearman-Rangkorrelationskoeffizient hier  $\rho = 0,89$ , Spannbreite 0,71 - 0,97), als den Neuroblastom-Zelllinien; dies bestätigte den in der Far-Western Blot-Analyse gewonnenen Eindruck. Die verbleibenden 21 Neuroblastom-Primärtumorproben spalteten sich weiter auf in drei Cluster ähnlicher Profile; zunächst ein Cluster von fünf Niedrigrisiko-Neuroblastomen, weiter eines von fünf Hochrisiko-Neuroblastomen, sowie eines von elf, verschiedenen Risikogruppen zugehöriger Neuroblastome (Abbildung 10); diese Cluster werden im Folgenden als Niedrigrisiko-, Hochrisikosowie Misch-Cluster bezeichnet. Die Aufteilung entsprach prinzipiell einer Erweiterung der Gruppe der Neuroblastome mittleren Risikos um Proben sowohl aus der Gruppe der Niedrig- (n = 3) als auch der Hochrisiko-Neuroblastome (n = 6). Überdies war die erhaltene Cluster-Zuordnung signifikant mit dem INSS-Stadium bzw. dem Risiko assoziiert (P = 0,003; Exakter Test nach Fisher; Abbildung 10). Gleiches galt für das Patientenalter bei Diagnose ( $\leq$  18 Monate vs. > 18 Monate; P = 0,02; Exakter Test nach Fisher); sämtliche Patientenproben, für deren Alter bei Diagnose mit weniger als 18 Monaten eine damit verbundene gute Prognose bestand, waren dabei im Niedrigrisiko-Cluster zu finden (Abbildung 10). Lediglich der MYCN-Status stand nicht in statistisch signifikanter Beziehung zur Cluster-Zuordnung der Neuroblastome, obgleich sich beide Neuroblastom-Proben mit MYCN-Amplifikation im Hochrisiko-Cluster fanden (Abbildung 10). Wie bereits für die ursprünglichen Risikogruppen beobachtet, wurden trotz Verschiebung der imaginären Grenzen der Gruppen durch die erhaltene Cluster-Einteilung keine qualitativen Unterschiede zwischen dem Niedrig- und dem Hochrisiko-Cluster festgestellt.

Die Clusteranalyse demonstrierte, dass die Neuroblastom-Primärtumoren anhand ihrer SH2-Profile Gruppen zugeordnet werden konnten, welche signifikant mit dem Risiko bzw. INSS-Stadium sowie dem Patientenalter bei Diagnose assoziiert waren. Obwohl zwischen dem Niedrig- und dem Hochrisiko-Cluster nur quantitative Unterschiede in der Phosphorylierung vermutlich gleicher Proteine bestanden, schien ein gegebenes SH2-Profil, und damit die globale pY-Signalsituation eines gegebenen Neuroblastoms, deutlich mit dem klinischen Verhalten des Tumors in Zusammenhang zu stehen. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob der Cluster-Einteilung zugrunde liegende pY-Banden bestimmt werden konnten, welche in Hochund Niedrigrisiko-Neuroblastomen in unterschiedlichem Maße phosphoryliert waren.

## Bestimmung differenziell phosphorylierter pY-Banden

Da die hierarchische Clusteranalyse der SH2-Profile von Neuroblastom-Tumorproben in einer signifikant mit dem Risiko zusammenhängenden Einteilung der Proben resultierte, wurden nun für fortführende Experimente potenziell interessante, der Einteilung zugrunde liegende Kandidaten-pY-Signale gesucht. Von hohem Interesse war hierbei der Vergleich zwischen primären Neuroblastomen niedrigen und denen hohen Risikos. Im Detail betrachtet wurde jedoch, wie bereits erwähnt und auch für die Risikogruppen zutreffend, weder bestimmte pY-Signale ausschließlich in einem der Cluster beobachtet, noch waren für die Cluster-Zuordnung maßgeblich bestimmende pY-Signale offensichtlich. Es war weiterhin aus theoretischen Überlegungen heraus ersichtlich, dass Letzteres aufgrund des angewandten Cluster-Algorithmus (nach Spearman-Rangkorrelation) und der hohen Ähnlichkeit der SH2-Profile nur in äußerst geringem Maße möglich war\*\*. Um dennoch tumorbiologisch relevante Kandidaten zu identifizieren, wurde gezielt in der der Clusteranalyse zugrunde liegenden Datenmatrix nach differenziell phosphorylierten pY-Banden gesucht. Da die Clusteranalyse gezeigt hatte, dass einige Neuroblastome hohen und niedrigen Risikos anhand ihrer pY-Signalsituation dem Misch-Cluster zugeordnet

<sup>&</sup>lt;sup>\*\*</sup> Es mussten aus den angeführten Gründen genau genommen zahlreiche verschiedene pY-Signale je Probe in ihrer Kombination maßgebend sein für die Cluster-Zuordnung. Die Bestimmung relevanter Kombinationen von pY-Signalen ging über das hinaus, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, der Punkt wird jedoch in der *Diskussion* im Kontext möglicher, fortführender Arbeiten noch einmal kurz aufgegriffen.

worden waren, wurden, um sicherzustellen, dass für die gezielte Suche nach pY-Kandidaten ausschließlich Neuroblastome mit zweifelsfrei geringem bzw. hohem Risiko berücksichtigt werden, das Niedrig- und das Hochrisiko-Cluster auf signifikante Unterschiede in der Verteilung von pY-Signalen untersucht. Dabei erhaltene Kandidaten-Felderzeilen wurden, sofern mindestens eines der darin enthaltenen pY-Signale einen festgelegten Signal-Schwellenwert (siehe Methoden) erreichte, zur Kontrolle über die Original-Far-Western Blots bestätigt. Dies war notwendig, weil sich aufgrund der hohen Auflösung der Datenmatrix zahlreiche pY-Banden über mehrere Felder(zeilen) erstreckten, und bedeutete, dass besagte Felderzeilen zur Kontrolle gemittelt und erneut statistisch getestet wurden. Auf diese Weise bestätigte pY-Banden wurden schließlich erneut spezifisch densitometrisch vermessen und statistisch getestet. Die Anwendung solch harter Kriterien sollte gewährleisten, dass die Anzahl falsch positiver Kandidaten möglichst gering gehalten wird. Über die Analyse wurden schließlich sieben pY-Banden erhalten, welche aufgrund signifikant differenzieller Phosphorylierung in Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen relevante Kandidaten für fortführende Untersuchungen darstellten.

Es wurden zunächst 120 Kandidaten-Felderzeilen erhalten, von denen 29 den geforderten Schwellenwert für die Signalhöhe erreichten; von diesen 29 konnten wiederum lediglich neun eindeutig als in Hoch- und Niedrigrisiko-Cluster signifikant verschiedene pY-Banden in den Original-Far-Western Blots bestätigt werden. Nach erneuter densitometrischer Bestimmung und statistischer Überprüfung, verfehlten weitere zwei Kandidaten knapp die statistische Signifikanz<sup>††</sup>, so dass schließlich Vergleich zwischen Hoch- und Niedrigrisiko-Cluster sieben im signifikant unterschiedlich stark phosphorylierte pY-Banden verblieben (P ≤ 0,032; Mann-Whitney-Test; Abbildungen 11 A und B); die pY-Proteine unterschieden sich hierbei hinsichtlich des Ausmaßes an Phosphorylierung im Median um das Zwei- bis Zehnfache. Diese sieben pY-Banden verteilten sich auf die SH2-Profile der fünf SH2-Domänen ABL1, GAP-N, GRB7, SHC1 und VAV2, wobei die Profile von GAP-N und

<sup>&</sup>lt;sup>††</sup> Bei einem dieser Kandidaten handelte es sich genau genommen um eine pY-Bande aus dem SH2-Profil der Sonde EAT2, welche aufgrund der im vorangegangenen Abschnitt (*Clusteranalyse der SH2-Profile von Neuroblastom-Tumorproben*) beschriebenen, signifikanten Unterschiede im Vergleich der mittleren Gesamtphosphorylierung von Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen für EAT2 von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde.



В



Abbildung 11. Bestimmung differenziell phosphorylierter pY-Banden in Neuroblastom-Tumorproben. (A) Die digitalisierten Daten der Far-Western Blot-Analyse wurden mit Hilfe von Mann-Whitney-Tests auf signifikante Unterschiede in der Verteilung von pY-Signalen auf die in der Clusteranalyse erhaltenen Niedrig- und Hochrisiko-Cluster analysiert (links; nicht berücksichtigtes Misch-Cluster sowie Zelllinien ausgeblendet bzw. nicht gezeigt). Kandidaten-Felderzeilen ausreichender pY-Signalstärke wurden über die Original-Far-Western Blots bestätigt und erneut densitometrisch vermessen und im Mann-Whitney-Test überprüft. Auf der rechten Seite abgebildet sind die auf diese Weise ermittelten sieben pY-Banden aus den Original-Far Western Blots, mit Angabe der jeweiligen SH2-Sonde und des apparenten Molekulargewichtsbereiches sowie der zugehörigen klinischen Parameter unterhalb der pY-Banden. (B) Darstellung der sieben pY-Banden aus (A) in Punktwolken-Diagrammen mit Median unter Angabe der exakten Signifikanzen (P-Werte) der Mann-Whitney-Tests (ohne im Misch-Cluster enthaltene Proben; INSS-Stadium 1 / Niedrigrisiko-Cluster – n = 5; INSS-Stadium 4 / Hochrisiko-Cluster – n = 5).

VAV2 je zwei signifikante pY-Proteine aufwiesen (Abbildungen 11 A und B). Aus den Profilen der verbleibenden elf SH2-Sonden hatten sich, mit Ausnahme von CSK und FYN, zwar ebenfalls jeweils einige Felderzeilen unter den eingangs 120 ermittelten Kandidaten befunden, jedoch waren, wie bereits erwähnt, sämtliche dieser Kandidaten bereits am zuvor festgelegten Schwellenwert bzw. der Überprüfung in den Original-Far-Western Blots gescheitert.

In den SH2-Profilen von ABL1, GAP-N und VAV2 wurden drei differenzielle pY-Banden beobachtet, welche sich im gleichen apparenten Molekulargewichtsbereich von ca. 160 bis 240 kD befanden (ABL1 [160-220 kD], GAP-N [170-240 kD], VAV2 [170-210 kD]; P = 0,032; Mann-Whitney-Test; Abbildungen 11 A und B), ein Bereich, in dem RTKs im Allgemeinen zu finden sind. Da die drei pY-Banden untereinander stark korrelierten (mittlerer Spearman-Rangkorrelationskoeffizient unter sehr Berücksichtigung aller 21 Neuroblastome  $\rho = 0.91$ , Spannbreite 0.85 - 0.94), wurde angenommen, dass es sich sehr wahrscheinlich um das gleiche pY-Protein handelte. Wenngleich spekulativ, so war die Annahme doch vor dem Hintergrund der beschriebenen<sup>60</sup> und bereits des Öfteren in dieser Arbeit gezeigten, sich überlappenden Bindungsspezifitäten von SH2-Domänen durchaus adäguat. Darüber hinaus war es denkbar, dass besagtes Protein an verschiedenen Tyrosinresten und somit auch von SH2-Domänen unterschiedlicher phosphoryliert war, Bindungsspezifitäten gleichermaßen gebunden werden konnte. Unabhängig davon

zeigte das pY-Protein im Niedrigrisiko-Cluster im Median ein etwa drei- bis sechsfach stärkeres pY-Signal als im Hochrisiko-Cluster (sechsfach für ABL1 [160-220 kD], dreifach für GAP-N [170-240 kD] bzw. fünffach für VAV2 [170-210 kD]; Abbildungen 11 A und B). In den Neuroblastom-Tumorproben wurde folglich von den SH2-Domänen ABL1, GAP-N und VAV2 wahrscheinlich ein einziges pY-Protein von ca. 160 bis 240 kD (eventuell eine RTK) erkannt, dessen Ausmaß an Phosphorylierung mit einem geringen Risiko assoziiert war. Da es sich bei der pY-Bande um eine RTK handeln konnte, TrkA jedoch bereits in Bezug auf das Molekulargewicht auszuschließen war, wurden die Korrelationen der pY-Bande mit den verbleibenden, zuvor untersuchten RTKs analysiert, was jedoch ohne nennenswertes Ergebnis blieb (Daten nicht gezeigt).

Ein vergleichbarer Befund wie für die pY-Bande(n) von ca. 160 bis 240 kD wurde für zwei pY-Banden gefunden, welche in einem apparenten Molekulargewichtsbereich von 110 bis 160 kD in den SH2-Profilen der Sonden GRB7 und VAV2 beobachtet wurden (GRB7 [110-150 kD], VAV2 [120-160 kD]; P = 0,008; Mann-Whitney-Test; Abbildungen 11 A und B). Auch diese pY-Banden stellten aufgrund einer sehr hohen Korrelation (Spearman-Rangkorrelationskoeffizient unter Berücksichtigung aller 21 Neuroblastome  $\rho$  = 0,89) bei gleichem apparentem Molekulargewicht wahrscheinlich ein einziges pY-Protein dar, welches auf ganz ähnliche Weise wie das im letzten Absatz beschriebene pY-Protein im Niedrigrisiko-Cluster der Neuroblastome in erhöhter Menge phosphoryliert vorlag, im Median hier jedoch nur etwa doppelt so hoch wie im Hochrisiko-Cluster (Abbildungen 11 A und B). Eine recht hohe Korrelation dieser pY-Bande mit derjenigen von ca. 160 bis 240 kD war offensichtlich (mittlerer Spearman-Rangkorrelationskoeffizient unter Berücksichtigung aller 21 Neuroblastome  $\rho$  = 0,71, Spannbreite 0,54 - 0,81; Abbildung 11 A) und könnte auf eine gemeinsame Regulation der beiden pY-Proteine hindeuten.

Zwei weitere signifikant im Niedrig- und Hochrisiko-Cluster der Neuroblastome differenziell phosphorylierte Banden von 47 bis 54 bzw. 35 bis 39 kD wurden in den SH2-Profilen der Sonden GAP-N und SHC1 beobachtet (GAP-N [47-54 kD], SHC1 [35-39 kD]; P = 0,032; Mann-Whitney-Test; Abbildungen 11 A und B). Ein erhöhter Phosphorylierungsgrad dieser beiden pY-Banden war, anders als für die bisher beschriebenen pY-Banden, signifikant mit einem hohen Risiko assoziiert; im Median

waren die pY-Proteine im Hochrisiko-Cluster um das Drei- bzw. Zehnfache stärker phosphoryliert als im Niedrigrisiko-Cluster (Abbildungen 11 A und B). Die beiden pY-Proteine wiesen eine hohe Korrelation auf (Spearman-Rangkorrelationskoeffizient unter Berücksichtigung aller 21 Neuroblastome  $\rho = 0.85$ ), was für einen Zusammenhang bezügliche der Regulation der pY-Proteine sprechen könnte.

Die pY-Banden aus den Profilen der SH2-Domänen GAP-N und SHC1 (GAP-N [47-54 kD], SHC1 [35-39 kD]) zeigten auch dann eine signifikant differenzielle Phosphorylierung, wenn sämtliche Neuroblastome hohen und niedrigen Risikos (bzw. äquivalent dazu der INSS-Stadien 1 und 4), anstelle der beiden Cluster, miteinander verglichen wurden (P = 0,020 bzw. P = 0,041; Mann-Whitney-Test; Daten nicht gezeigt), so dass bei diesen pY-Banden davon ausgegangen werden konnte, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um relevante Kandidaten-pY-Proteine mit differenzieller Phosphorylierung in Niedrigbzw. Hochrisiko-Neuroblastomen handelte. Für die verbleibenden pY-Banden (ABL1 [160-220 kD], GAP-N [170-240 kD], VAV2 [170-210 kD], GRB7 [110-150 kD], VAV2 [120-160 kD]) waren die Unterschiede der Phosphorylierung im Vergleich sämtlicher der untersuchten Hochund Niedrigrisiko-Neuroblastome nicht mehr statistisch signifikant, folgten jedoch nach wie vor jeweils dem gleichen Trend, wie für den Vergleich der Cluster beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die nach der Clusteranalyse der 16 SH2-Profile von 21 Neuroblastom-Tumorproben erfolgte Bestimmung von differenziell zwischen Niedrig- und Hochrisiko-Cluster phosphorylierten Banden ergab sieben pY-Banden, erkannt von fünf SH2-Sonden. Fünf dieser pY-Banden stellten dabei wahrscheinlich lediglich zwei pY-Proteine mit apparenten Molekulargewichten von 160 bis 240 bzw. 110 bis 160 kD dar, welche von den vier SH2-Domänen ABL1, GAP-N, GRB7 und VAV2 erkannt wurden, und deren Phosphorylierungsgrad mit einem geringen Risiko assoziiert war. Dem gegenüber standen die zwei signifikant in unterschiedlichem Ausmaß phosphorylierten pY-Banden von 47 bis 54 kD bzw. 35 bis 39 kD aus den Profilen der SH2-Sonden GAP-N und SHC1, deren Phosphorylierungsgrad signifikant mit einem hohen Risiko assoziiert war. Entsprechend dieser Resultate wurden für die mit niedrigem Risiko assoziierten pY-Banden positive, jedoch schwache Korrelationen mit den in der Charakterisierung der Neuroblastom-Tumorproben bestimmten Proteinen Fyn und TrkA beobachtet, während die mit hohem Risiko assoziierten pY-Banden schwach positive Korrelationen mit den Proteinen Shc3, N-Myc und ALK aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

# Diskussion

### SH2-Profiling im Neuroblastom

Obwohl sich über die letzten Jahre in vielen Arbeiten zahlreiche der für das Neuroblastom relevanten Faktoren als Proteine pY-vermittelter Signaltransduktion herausstellten (ALK<sup>8,9,21,22,81–86,89,90,115,122,123</sup>, TrkA<sup>64,65,73,91,110,111,124–129</sup>, Shc3<sup>75,77,78,113</sup>, Fyn<sup>74</sup>, Shp2-N<sup>18</sup>, Shf<sup>89</sup> und Stat3<sup>90</sup>), haben sich phosphoproteomische Analysen der Signaltransduktion im Neuroblastom bislang ausschließlich auf einzelne Kandidaten in *in vitro*-Experimenten beschränkt<sup>90–93</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde eine umfassende Analyse der globalen Zustände pY-abhängiger Signaltransduktion im Neuroblastom durchgeführt. Ausgehend von vielversprechenden Experimenten in Neuroblastom-Zelllinien wurde dazu mit einer Auswahl von 16 SH2-Domänen ein Kollektiv von 21 Neuroblastomen mittels SH2-Profiling nach der Methode der Far-Western Blot-Analyse untersucht. Das Kollektiv wurde überdies auf die Expression von etwa einem Drittel der humanen RTKs und weiterer Neuroblastom-relevanter Proteine untersucht, um sich ein möglichst umfangreiches Bild von der pYvermittelten Signalsituation im Neuroblastom machen zu können. Es zeigte sich, dass die primären Neuroblastome entgegen den Erwartungen, wie auch für die Zelllinien beobachtet, überwiegend relativ ähnliche SH2-Profile aufwiesen (Abbildungen 5, 6, 9 und 10). Neuroblastome niedrigen und hohen Risikos, gekennzeichnet durch ein drastisch unterschiedliches klinisches Verhalten<sup>6</sup>, zeigten untereinander keine qualitativen Unterschiede im Sinne exklusiver pY-Signale; derartige Unterschiede wurden nur sporadisch und unabhängig vom Risiko beobachtet (Abbildungen 9 und 10). Dennoch wurden über eine hierarchische Clusteranalyse, anhand quantitativer Unterschiede in der Phosphorylierung vermutlich gleicher pY-Proteine, signifikant mit dem Risiko, dem INSS-Stadium, sowie dem Patientenalter bei Diagnose assoziierte Gruppen ähnlicher SH2-Profile erhalten (Abbildung 10). Es war zudem möglich, anhand der Gruppen interessante Kandidaten-pY-Banden für eine mögliche Untersuchung in weiterführenden Experimenten zu bestimmen (Abbildung 11). Auf der Ebene der Abundanz verschiedener für das Neuroblastom relevanter Faktoren konnten, mit einer Ausnahme (CD44<sup>112</sup>), im untersuchten Kollektiv einige beschriebene Zusammenhänge mit dem Risiko bestätigt werden (Shc3<sup>77,78</sup>, N-Myc<sup>117,120,121</sup>, ALK<sup>82</sup>, TrkA<sup>64,65,73,110,111,124–126,129</sup>, tendenziell auch Fyn<sup>74</sup>; Abbildungen 7 und 8). Von den verbleibenden 15 untersuchten RTKs war keine weitere in signifikantem Maß unterschiedlich auf die Niedrig- und Hochrisikogruppe der Neuroblastome verteilt, stattdessen wurde gefunden, dass nicht wenige RTKs in einer Vielzahl, einige Vertreter sogar in sämtlichen (EGFR, IGF1R, KIT, PDGFRβ) bzw. nahezu sämtlichen (VEGFR1, Tyro3) Neuroblastome exprimiert vorlagen (Abbildung 8).

Die erhaltenen Ergebnisse waren sehr überraschend; wenngleich für die Expression der vielfach als relevant für das Neuroblastom beschriebenen Proteine ALK, Shc3, TrkA und Fyn als typische Mediatoren pY-basierter Signaltransduktion wesentliche Unterschiede zwischen Hoch- und Niedrigrisiko-Neuroblastomen in unterschiedliche Richtungen gefunden wurden, unterschieden sich die erhobenen SH2-Profile der Neuroblastome auf qualitativer Ebene nicht, und selbst auf quantitativer Ebene nur geringfügig und nicht eindeutig in dem Sinne, dass kaum pY-Signale ausschließlich in einer der Risikogruppen höher oder niedriger als in der anderen gelegen hätten. Trotzdem enthielten die SH2-Profile bzw. die globalen pY-Signalzustände der Tumoren Informationen über die Zugehörigkeit zu verschiedenen Risikogruppen, belegt durch die in der Clusteranalyse anhand der SH2-Profile erhaltene, signifikant mit dem Risiko assoziierte Gruppenzuordnung der Neuroblastome. Diese Informationen schienen sich auf nicht offensichtliche Weise in der Kombinatorik einer Vielzahl von pY-Proteinen je Tumorprobe zu manifestieren. Dies deutet auf ein hohes Maß an Komplexität der pY-Signalzustände hin und veranschaulicht, dass im Neuroblastom auf der hier abgegriffenen Ebene pYvermittelter Signaltransduktion zahlreiche geringe Unterschiede in ihrer Kombinatorik beträchtliche Unterschiede im prognostizierten klinischen Verlauf widerzuspiegeln scheinen. Die erhaltenen Resultate demonstrieren eindrücklich die Leistungsfähigkeit des SH2-Profilings im Sinne einer Integration der pY-Signalzustände in primären Neuroblastomen bezüglich prognostisch relevanter Größen. Es wäre nun in zukünftigen Arbeiten geboten, die erhaltenen Ergebnisse an einem unabhängigen, wenn möglich, größeren Kollektiv von Neuroblastomen zu validieren.

Hinsichtlich der in der Clusteranalyse der SH2-Profile erhaltenen

Diskussion

Gruppenzuordnung wurde festgestellt, dass die beobachteten Cluster, trotz signifikanter Assoziation, nicht deckungsgleich waren mit den ursprünglichen, unter Einbezug von INSS-Stadium, MYCN-Status und Alter bei Diagnose, festgestellten Risikogruppen<sup>28</sup> (hier übereinstimmend mit dem INSS-Stadium); die Clusteranalyse der SH2-Profile ordnete wesentlich mehr Neuroblastome dem Misch-Cluster zu (Abbildung 10), was auf einen deutlich höheren Anteil an hinsichtlich des Risikos nicht eindeutig einzuordnenden Proben hindeutete. Interessant war in diesem Kontext der offensichtliche Zusammenhang der im SH2-Profiling erhaltenen Cluster-Einteilung mit dem Patientenalter bei Diagnose, welches relativ deutlich zwischen Niedrigrisiko-Cluster auf der einen und Misch- und Hochrisiko-Cluster auf der anderen Seite zu diskriminieren schien (Abbildung 10). Dieser Effekt war sowohl für die üblichen dichotomen Alterskategorien<sup>25</sup> ( $\leq$  18 Monate vs. > 18 Monate) als auch unter Verwendung der tatsächlichen Werte für das Alter bei Diagnose signifikant (P = 0,001 bzw. P = 0,002; Exakter Test nach Fisher bzw. Mann-Whitney-Test; Abbildung 10), und auch für die Neuroblastom-Zelllinien war eine Assoziation mit dem Patientenalter beobachtet worden (P= 0,018 bzw. P = 0,036; Exakter Test nach Fisher bzw. Mann-Whitney-Test mit den tatsächlichen Werten für das Alter; Abbildung 6). Dies legte die Vermutung nahe, dass sich die pY-abhängige Signaltransduktion im Neuroblastom wesentlich mit dem Patientenalter verändert. Eine plausible Erklärung für die nachfolgende Auftrennung der Proben des Mischund des Hochrisiko-Clusters war nicht ohne weiteres offensichtlich (Abbildung 10), jedoch zeigte sich, dass Shc3 im Hochrisiko-Cluster signifikant höher exprimiert vorlag als im Misch-Cluster (P = 0,038; Mann-Whitney-Test), daher wird ein grundlegender Zusammenhang angenommen. Dieser müsste allerdings, ebenso wie der Zusammenhang der pY-Signalzustände der Neuroblastome mit dem Patientenalter, in fortführenden Experimenten genauer untersucht werden, um eventuell dahintersteckende Mechanismen aufklären, und somit klare Aussagen diesbezüglich formulieren zu können.

Es bleibt im Hinblick auf die Inkongruenz zwischen der Gruppeneinteilung nach SH2-Profiling und den Risikogruppen darauf hinzuweisen, dass die Risikostratifizierung im Neuroblastom komplex ist und zahlreiche, miteinander interagierende, unabhängig voneinander prognostisch aussagekräftige

### Diskussion

Risikofaktoren<sup>24</sup> beinhaltet. Obwohl in der vorliegenden Arbeit anhand der verfügbaren Informationen eine Risikoeinteilung gemäß aktuellem Kenntnisstand<sup>28</sup> vorgenommen wurde, so waren dennoch wichtige zusätzliche Informationen, beispielsweise 1p-Status, histologische Kriterien, 11q-Aberrationen oder Plodie<sup>24</sup>, zum Zeitpunkt der Niederschrift der Arbeit für die untersuchten Neuroblastome nicht bekannt, mit Hilfe derer die im SH2-Profiling erhaltenen Grenzen eventuell hätten besser erklärt werden können bzw. mit deren Kenntnis eingangs andere, möglicherweise besser zu den Daten aus dem SH2-Profiling passende Grenzen zwischen den Risikogruppen gezogen worden wären. In diesem Kontext wäre auch die Verknüpfung der erhaltenen Daten mit Informationen aus der Verlaufskontrolle Nachsorge der Patienten, zum Beispiel der ereignisfreien oder der bzw. Gesamtüberlebensrate, interessant. In zukünftigen Experimenten wäre es darüber hinaus interessant zu beobachten, wie Neuroblastome des INSS-Stadiums 4S, von denen für die hier durchgeführten Experimente leider keine Proben verfügbar waren, anhand ihrer SH2-Profile in der Clusteranalyse eingeordnet würden, ob sie beispielsweise in ein eigenes Cluster gruppiert, oder in das Niedrigrisiko-Cluster integriert würden.

### **RTK-Expression und Implikationen für die Therapie**

Wie in der Darstellung der molekularen Charakterisierung der Neuroblastome bezüglich der Expression diverser Proteinkandidaten ausgeführt, war in der Vergangenheit in zahlreichen Arbeiten die Expression einzelner bzw. weniger RTKs im Neuroblastom untersucht worden, deren Ergebnisse überwiegend – insbesondere, hier ie aktueller die \_ den erhaltenen Resultaten Arbeiten gut mit übereinstimmten<sup>64,65,73,82,110,111,124–126,129,132–136</sup>. Nichtsdestoweniger hatte keine der zitierten Arbeiten ein so umfangreiches Bild der Expression verschiedener RTKs im Neuroblastom, insbesondere auf Proteinniveau, aufgezeigt, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen. Bezüglich der untersuchten RTKs war die hohe Anzahl, zumeist unabhängig vom Risiko, und ausgeprägt heterogen exprimierter Kandidaten erstaunlich. Einige RTKs wurden dabei in sämtlichen (EGFR, IGF1R, KIT, PDGFR $\beta$ ) bzw. nahezu sämtlichen (Tyro3 und VEGFR1) der untersuchten Neuroblastome exprimiert (Abbildung 8). ALK und TrkA hingegen waren jeweils nur in ca. 70 % der

Neuroblastome, jedoch risikoabhängig exprimiert (Abbildung 8). Zusammen mit den darüber hinaus als unterschiedlich hoch in Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen exprimiert gefundenen Proteinen Fyn, N-Myc und Shc3 (Abbildung 8), und unter Berücksichtigung der Resultate des SH2-Profilings (Abbildungen 9 und 10) sowie der relevanten Literatur<sup>73–75,77,78,83–86,91,113,115,117–121,130,131</sup> lässt sich ein grobes Gesamtbild Signalprozesse im Neuroblastom pY-vermittelter skizzieren (Abbildung 12); Neuroblastome hohen und niedrigen Risikos scheinen sich im Wesentlichen in der Aktivität der zwei konkurrierenden Haupt-Signalachsen ALK/Shc3/N-Myc (vorwiegend PI3K/Akt-vermittelt<sup>118,119</sup>) und TrkA/Fyn (vorwiegend MAPK-vermittelt<sup>91,131</sup>) zu unterscheiden, hierbei scheint in der Entstehung des Neuroblastoms das feinregulierte Gleichgewicht dieser entgegengesetzten Signalachsen zugunsten der pro-proliferativen ALK/Shc3/N-Myc-Achse gestört zu sein, was in etwa einem Drittel der Fälle durch einen verzögerten Erfolg der TrkA/Fyn- über die ALK/Shc3/N-Myc-Ausdifferenzierung und/oder Apoptose Achse spontan zur der entarteten Neuroblasten führt, sich in etwa der Hälfte aller Fälle jedoch in einer Festigung bzw. Verstärkung des ursprünglichen, pro-proliferativen Ungleichgewichts zu manifestieren scheint (Abbildung 12). Verschiedene, in dieser Arbeit ermittelte pY-Proteine liegen in den über das SH2-Profiling erhaltenen Gruppen von Neuroblastomen hohen und niedrigen Risikos differenziell phosphoryliert vor (Abbildung 11) und könnten in die Pathogenese des Neuroblastoms involviert sein (Abbildung 12), ihre Rolle bedarf jedoch noch der Aufklärung in zukünftigen Experimenten (siehe unten). Unabhängig vom Risiko sind weiterhin einige RTKs in sämtlichen, viele jedoch zumindest in einem Großteil der Neuroblastome exprimiert (Abbildung 12). Dies spiegelt vermutlich den gering differenzierten Zustand der Neuroblasten des sich entwickelnden peripheren, sympathischen Nervensystems wider, welche ein hohes Maß an Vielfältigkeit bezüglich ihres Differenzierungspotentials zu verschiedenen Zelltypen und den im Verlauf der Embryogenese auftretenden Interaktionen mit Zellen anderer Gewebe, sowie ein hohes Maß an Mobilität im Zusammenhang mit ihrer Kapazität für die über weite Entfernungen aufweisen<sup>3</sup>, und ist weiter in Teilen Migration wahrscheinlich auch mit der neuroektodermalen Abstammung der Neuroblasten zu erklären; in den verwandten Zellen des zentralen Nervensystems und in von diesen





**Abbildung 12. pY-abhängige Signaltransduktion im Neuroblastom.** Diese Abbildung zeigt die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich der pY-abhängigen Signaltransduktion im Neuroblastom (NB) in einem Gesamtüberblick unter Berücksichtigung der relevanten Literatur. Im Wesentlichen scheinen sich Neuroblastome niedrigen und hohen Risikos in der Aktivität der entgegengesetzten ALK/Shc3/N-Myc- und TrkA/Fyn-Signalachsen zu unterscheiden. Vorerst ungeklärt bleibt, welchen Einfluss weitere RTKs bzw. in der vorliegenden Arbeit ermittelte Kandidaten-pY-Proteine auf die Pathogenese des Neuroblastoms nehmen.

abgeleiteten Tumoren beispielsweise sind im Durchschnitt zwischen 40 und 50 verschiedene RTKs exprimiert<sup>150</sup>.

Es erscheint folglich, insbesondere vor dem Hintergrund der geringen Anzahl wiederkehrender Mutationen im Neuroblastom<sup>18-20</sup> sowie des erhöhten Risikos sekundärer maligner Erkrankungen durch den Einsatz ungerichteter, mutagener Chemotherapeutika<sup>151,152</sup>, ausdrücklich sinnvoll, die Bemühungen fortzusetzen, in einer zielgerichteten Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms die ALK/Shc3/N-Myc-Achse zu inhibieren. Es konnte diesbezüglich in einer Phase 3-Studie bereits die Überlegenheit der gezielten ALK-Inhibition mit Crizotinib gegenüber der Standardfortgeschrittenen, ALK-positiven, Chemotherapie im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom gezeigt werden<sup>87</sup>, darüber hinaus war erst kürzlich für eben diesen niedermolekularen Inhibitor in einer Phase 1-Studie eine ausgeprägte Antitumor-Aktivität bei einigen Krebserkrankungen des Kindesalters, unter anderem Neuroblastomen mit ALK-Mutation, demonstriert worden<sup>88</sup>. Und auch für andere

Knotenpunkte aus der ALK/Shc3/N-Myc-Signalachse sind in der Vergangenheit vielversprechende Inhibitoren beschrieben worden<sup>114,116,118,153–160</sup>, deren Aktivität in Patienten voraussichtlich in naher Zukunft in klinischen Studien untersucht wird. Ausgehend von den Resultaten der vorliegenden Arbeit jedoch, und im Hinblick auf die Beobachtung, dass die Redundanz der Expression mehrerer RTKs möglicherweise zu erheblichen Einschränkungen in der Therapierbarkeit maligner Erkrankungen führt<sup>145,146</sup>, scheint es dringend notwendig, in der Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms mindestens die Expression der RTKs EGFR, IGF1R, KIT, PDGFR<sup>β</sup>, Tyro3 und VEGFR1 zu berücksichtigen, um nur diejenigen Kandidaten zu nennen, welche in der vorliegenden Arbeit in nahezu sämtlichen Neuroblastomen exprimiert vorgefunden wurden (Abbildung 8). Einige Arbeiten, in welchen die Inhibition von einzelnen der genannten RTKs in vitro und zum Teil auch in vivo untersucht wurde, sind bereits publiziert<sup>139,142,161–173</sup>. In Anbetracht der hohen Anzahl der im Neuroblastom exprimierten RTKs, welche in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde (Abbildung 8), sind vermutlich jedoch insbesondere Inhibitionsstrategien, die sich Breitband-Kinaseinhibitoren, wie beispielsweise Sorafenib oder Sunitinib<sup>174,175</sup>, solche, die verschiedene niedermolekulare bedienen, und/oder Inhibitoren kombinieren, als Ergänzung der gezielten Inhibition der ALK/Shc3/N-Myc-Achse erfolgversprechend für die Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms. In einer 2010 veröffentlichten Arbeit wurden diesbezüglich vielversprechende Ergebnisse, sowohl in vitro als auch in einem Xenograft-Modell des Neuroblastoms, für den Einsatz von Sorafenib und Sunitinib beschrieben<sup>170</sup>, um ein interessantes Beispiel zu zitieren.

Weniger sinnvoll erscheint hingegen aus verschiedenen Gründen, insbesondere auf Basis der Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen, das bereits in einigen Arbeiten vorangetriebene Vorhaben, die RTK TrkB zu inhibieren<sup>69–72</sup>. Zum einen konnte TrkB weder in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektiv (Abbildung 8), noch in einer relativ aktuellen, umfangreichen Untersuchung an einem wesentlich größeren Kollektiv (n = 814)<sup>73</sup>, als signifikant mit dem Risiko assoziiert exprimiert bestätigt werden. Zum anderen ist TrkB evolutionär nah verwandt mit TrkA<sup>176</sup>, welche, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt (Abbildung 8), einen essentiellen Bestandteil der oben genannten, differenzierenden/pro-apoptotischen TrkA/Fyn-Signalachse darzustellen scheint, und deren nicht zu verhindernde,

aleichzeitige Inhibition<sup>72</sup> infolgedessen vermieden werden sollte. Dass nun der für die Inhibition von TrkB im Einsatz befindliche niedermolekulare Inhibitor Lestaurtinib ungeachtet der soeben erörterten Kontraindikation vielversprechende Ergebnisse zu liefern scheint<sup>69-71</sup>, legt im Hinblick auf die Resultate dieser Arbeit die Vermutung nahe, dass dies nicht aus der Inhibition von TrkB resultiert, sondern tatsächlich eventuell der Tatsache geschuldet sein könnte, dass Lestaurtinib ein potenter Breitband-Kinaseinhibitor ist<sup>72</sup>; es wäre interessant, diese Vermutung im Rahmen fortführender Arbeiten zu überprüfen. Mit Rücksicht auf die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse scheint es überdies ratsam, anstelle des Versuchs, TrkB zu inhibieren, die therapeutische Stimulation der differenzierenden/pro-apoptotischen TrkA/Fyn-Signalachse für das Neuroblastom stärker in den Fokus zu rücken. Eine solche Art der zielgerichteten Therapie wäre eventuell eine gute Ergänzung zur Standardtherapie bzw. könnte dazu beitragen, diese hinsichtlich eines reduzierten ungerichteter Therapeutika zu verbessern. Ein Beispiel für Einsatzes den erfolgreichen Einsatz eines analog wirkenden Therapeutikums im Neuroblastom stellt die 13-cis-Retinsäure dar; diese wirkt über einen anderen Mechanismus, jedoch ebenfalls differenzierend, und ist bereits in der Standardtherapie für das Hochrisikoetabliert<sup>177,178</sup>. Neuroblastom Da jedoch TrkA die in Regulation des Schmerzempfindens involviert ist<sup>179</sup>, und eine Verabreichung des Liganden NGF zu erhöhter Schmerzempfindlichkeit führt<sup>180,181</sup>, ist es erforderlich, diese Signalachse in weiteren Arbeiten genauer zu untersuchen, möchte man diese Schwierigkeiten umgehen und die Signalachse auf alternativem Wege aktivieren. Zusammengenommen sprechen die hier erzielten Resultate und die Ergebnisse der Literaturrecherche für eine Kombination aus spezifischer Inhibition der ALK/Shc3/N-Myc-Signalachse und Breitband-Kinase-Inhibition als Erweiterung der gezielten Behandlung<sup>177,178,182,183</sup> des Hochrisiko-Neuroblastoms, eventuell – gründlichere Kenntnisse vorausgesetzt - ergänzt um eine therapeutische Aktivierung der TrkA/Fyn-Signalachse.

## Ausblick und abschließende Überlegungen

Als Kritik an der vorliegenden Arbeit könnte die verhältnismäßig geringe Anzahl untersuchter RTKs angeführt werden (17 von 58), ebenso wie das Ausklammern

ihrer Liganden, der NRTKs (mit Ausnahme von Fyn), sowie der PTPs in der Betrachtung der pY-Signalprozesse im Neuroblastom. Weiterhin könnte die fehlende Bestimmung von Mutationsstatus sowie phosphorylierten Formen und, damit zusammenhängend, der tatsächlichen Aktivität der untersuchten Kinasen, welche nicht allein durch ihre bloße Expression gegeben ist, beanstandet werden. Diese Kritik ist durchaus berechtigt, insofern, als dass eventuell wichtige Kandidaten-Proteine (bzw. ihre möglichen differenziellen Aktivitäten) der Analyse entgangen sein mögen. Aus diesem Grund wäre es, wenngleich in Analogie zur geringen Anzahl wiederkehrender Mutationen im Neuroblastom<sup>18–20</sup> das Auffinden zahlreicher weiterer Kandidaten unwahrscheinlich scheint, dennoch interessant, in zukünftigen Phosphoproteom-Studien die Bestimmung von Proteinen der pY-Signaltransduktion (bzw. deren Aktivität) im Neuroblastom auszuweiten. Dies trifft auch in einem anderen Zusammenhang zu, der hier kurz erläutert werden soll. Dass die im SH2-Profiling abgegriffene, globale pY-Signalsituation jeweils das gemittelte Ergebnis des Zusammenwirkens sämtlicher der oben genannten Größen der pY-Signaltransduktion abzubilden schien, äußerte sich beispielsweise in dem Befund, dass ein Clustering der Neuroblastome anhand der in dieser Arbeit bestimmten RTK-Expressionsspiegel nicht aezeiat) signifikant mit der Gruppeneinteilung (Daten anhand der Clusteranalyse der SH2-Profile assoziiert war (P = 0,015; Exakter Test nach Fisher; Daten nicht gezeigt). Dennoch wurden in dieser Arbeit keine direkten, korrelativen Zusammenhänge zwischen einzelnen pY-Banden der SH2-Profile und Vertretern der bestimmten RTKs gefunden. Auch in diesem Kontext der Verknüpfung der globalen Ebene der pY-Signalprozesse mit der Ebene der sie bedingenden Größen, wäre es durchaus von Interesse, in zukünftigen Analysen weitere Proteinspezies der pYabhängigen Signaltransduktion mit einzuschließen. Hierbei könnte sich – ausreichend Material sowie die Verfügbarkeit entsprechender Assays vorausgesetzt – auch die Bestimmung tyrosinphosphorylierter Proteinspezies als nützlich erweisen, da es sich eben um diese posttranslationale Modifikation handelt, welche von SH2-Sonden erkannt und in SH2-Profilen dargestellt wird. Ungeachtet der dargestellten Punkte jedoch muss der oben angeführten Kritik entgegengehalten werden, dass die hier erfolgte Darstellung der pY-Signalsituation mittels SH2-Profiling die Erhebung der relevanten Informationen Sinne im der Frage nach einer globalen

### Diskussion

Zustandsbeschreibung bereits hinlänglich gewährleistete; dieses hatte ähnliche Profile pY-abhängiger Signaltransduktion der Neuroblastome verschiedener Risikogruppen gezeigt (Abbildung 9), anhand derer in einer Clusteranalyse eine risikoabhängige Gruppenzuordnung der Tumoren erhalten wurde (Abbildung 10). An diesen Ergebnissen, die globale Ebene der pY-Signalprozesse im Neuroblastom betreffend, würden auch ergänzend erhobene Expressionsspiegel weiterer Proteine der pY-Signaltransduktion keine Veränderung bewirken; hierzu in der Lage wären allenfalls zusätzliche SH2-Profile, eine Erhebung solcher stellt vor dem Hintergrund der sich überlappenden Bindungsspezifitäten von SH2-Domänen<sup>60</sup> und den in dieser Arbeit beobachteten Resultaten jedoch keinen erheblichen Informationszugewinn in Aussicht.

Obgleich in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zwischen den beobachteten Clustern von Neuroblastomen hohen und niedrigen Risikos keine gualitativen, und anstelle dessen lediglich quantitative Unterschiede in der Tyrosinphosphorylierung der dargestellten Proteine beobachtet wurden (Abbildungen 9 und 10), so konnten dennoch über die Bestimmung differenziell phosphorylierter pY-Signale von Seiten der SH2-Profile einige interessante Ansätze für fortführende Experimente erarbeitet (Abbildung 11). Es war jedoch auch offensichtlich, dass hierbei werden höchstwahrscheinlich ein Teil an Information verloren ging, welcher in Form zahlreicher pY-Signale in verschiedenen Kombinationen die risikoabhängige Cluster-Einteilung maßgeblich bedingen musste. Um diesen Teil relevanter Information zu erheben und aufzuzeigen, könnten in zukünftigen Analysen Algorithmen zu Hilfe genommen werden, welche nicht nach einzelnen, differenziell phosphorylierten pY-Banden, sondern anstelle dessen nach relevanten Kombinationen dieser suchen. Ungeachtet dessen sind neben der hier erfolgten Bestimmung differenziell phosphorylierter pY-Banden im Vergleich von Hoch-Niedrigrisikound Neuroblastomen (Abbildung 11), je nach Fragestellung, auch andere Vergleiche möglich, beispielsweise der anhand der Cluster-Einteilung ebenfalls naheliegende Vergleich zwischen Neuroblastomen des Niedrigrisiko-Clusters mit jenen des Hochrisiko- und Misch-Clusters gemeinsam (Abbildung 10). Im Hinblick auf eine Identifizierung der hier ermittelten pY-Kandidaten (Abbildung 11) wären SH2gerichtete Pulldown-Experimente mit anschließenden massenspektrometrischen

Analysen, wie kürzlich beschrieben<sup>184</sup>, vielversprechend. Darüber hinaus wäre es von Interesse zu beobachten, welche weiteren Proteine in Komplexen zusammen mit den per SH2-Pulldown angereicherten pY-Proteinen identifiziert würden; hier sind wieder qualitative Unterschiede denkbar, beispielsweise über in Hoch- und Niedrigrisiko-Neuroblastomen exklusiv exprimierte Adapter- oder Gerüstproteine. Identifizierte Kandidaten könnten im Anschluss über spezifische Antikörper, sowie funktionell in Experimenten mit Neuroblastom-Zelllinien, beispielsweise durch Inhibition oder siRNA-Knockdown, validiert werden; dieser experimentelle Ansatz scheint vor dem Hintergrund der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ähnlichkeit zwischen SH2-Profilen von Neuroblastom-Zelllinien und Primärtumoren (Abbildung 10) erfolgversprechend. Desweiteren von hohem Interesse, und aller Wahrscheinlichkeit nach über SH2-Pulldown-Experimente sowie Experimente mit Neuroblastom-Zelllinien in zukünftigen Arbeiten zugänglich, wäre eine genauere Untersuchung der Rolle der SH2-Domänen ABL1, GRB7, VAV2, sowie (insbesondere) GAP-N und SHC1, welche die in der vorliegenden Arbeit ermittelten, differenziell phosphorylierten pY-Banden in den von ihnen erhobenen SH2-Profilen aufwiesen (Abbildung 11), bzw. der Rolle der korrespondierenden Proteine (c-Abl, Grb7, Vav2, GAP, Shc1) jeweils im Hierzu sind bislang nur wenige und unvollständige Daten Neuroblastom. publiziert<sup>77,78,185-190</sup>, die aus diesem Grund nicht ausgeführt werden. Neben einer Erweiterung der Kenntnisse in Bezug auf die Rolle dieser Proteine wäre weiterhin die Frage nach Gründen für die Abwesenheit differenziell phosphorylierter pY-Signale in den SH2-Profilen von FYN und SHC3 sinnvoll, handelt es sich doch hierbei nach aktuellem Wissensstand<sup>75,77,78,113,130</sup>, sowie in der vorliegenden Arbeit bestätigt, um Proteine mit prognostischer Relevanz für das Neuroblastom. Bei alledem gilt es natürlich zu beachten, dass die hier angewandte Methodik des SH2-Profilings selbstverständlich nicht ohne Schwächen ist. Neben bereits an anderer Stelle diskutierten Aspekten<sup>53</sup> sei diesbezüglich hier nur darauf hingewiesen, dass die Auftrennung des Probenmaterials in der Auflösung begrenzt ist, während die Gellaufeigenschaften der heterogenen Proben gewissen Schwankungen unterliegen. Auch hier wären oben genannte SH2-Pulldown-Experimente zur Klärung nicht eindeutiger Befunde hilfreich, zum Beispiel in der Klärung von Fragen nach der Übereinstimmung der Identität von pY-Banden verschiedener Proben (nahezu)

gleicher apparenter Molekulargewichte. Jedoch treten derartige Fragen eben aufgrund der begrenzten Auflösung nicht immer überhaupt erst in Erscheinung; da sie sich aber mindestens theoretisch für jedes SH2-Profiling stellen, welches pY-Banden gleicher apparenter Molekulargewichte in verschiedenen Proben aufweist, scheint es empfehlenswert, wenn möglich, generell SH2-Pulldown-Experimente in Ergänzung durchzuführen.

Die vorliegende Arbeit führt eindrücklich die enorme Komplexität pY-abhängiger Signalprozesse im Neuroblastom vor Augen (Abbildung 12). Wenngleich die Untersuchung dieser Prozesse zweifellos nicht allein die biologische und klinische Heterogenität dieser komplexen Erkrankung wird erklären können, so legen die hier präsentierten Resultate doch nahe, dass die pY-vermittelte Signaltransduktion eng mit dem Verlauf der Erkrankung sowie den diesbezüglich prognostisch relevanten Größen verknüpft ist, ferner dass global erfasste, pY-abhängige Signalprozesse allem Anschein nach selbst von prognostischem Wert sind, sowie dass eine genauere Untersuchung dieser Prozesse möglicherweise bei der Identifizierung von weiteren prognostischen Größen behilflich sein könnte. Die erstaunlich hohe Ähnlichkeit der globalen pY-Signalzustände der Neuroblastome über die Grenzen der Risikogruppen hinweg erschwert derartige Analysen zwar deutlich, lässt jedoch vermuten, dass die Anzahl der kritischen Stellgrößen, welche gegebenenfalls in gezielten Therapien adressiert werden müssten, vermutlich geringer ist als für maligne Erkrankungen des Erwachsenenalters. Wie viele wissenschaftliche Arbeiten, so wirft auch diese weit mehr Fragen auf, als sie zu beantworten vermag; insbesondere im Hinblick auf die Verknüpfung der globalen Ebene pY-vermittelter Signalprozesse im Neuroblastom mit der Ebene der Abundanz und Aktivität der die erstere Ebene bedingenden Größen ergeben sich zahlreiche ungeklärte Fragen, deren Beantwortung nicht nur für das Neuroblastom, sondern auch in Bezug auf grundlegende Zusammenhänge in Netzwerken pY-abhängiger Signaltransduktion von hoher Relevanz erscheint. Diese Arbeit ist ein Ausgangspunkt für fortführende Experimente, um einige der implizit formulierten, sowie eventuell weitere, nicht berücksichtigte Fragen zu adressieren.
## Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakraniale solide Tumor des Kindesalters und verantwortlich für 11 % der durch pädiatrische Tumorerkrankungen verursachten Todesfälle<sup>1,2</sup>. Es weist eine ausgeprägte Heterogenität bezüglich des klinischen Verlaufs auf<sup>2</sup>. Anhand von Risikofaktoren wie INSS-Stadium, Alter bei Diagnose, *MYCN*- und 1p-Status werden Neuroblastome verschiedenen Risikogruppen zugeordnet<sup>2</sup>. Die pY-abhängige Signaltransduktion spielt eine erhebliche Rolle in der Pathogenese des Neuroblastoms, z.B. werden in etwa 10 % der Neuroblastome aktivierende Mutationen der RTK ALK beobachtet<sup>8,9,21,22</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine umfassende Analyse der pY-abhängigen Signaltransduktion im Neuroblastom mittels SH2-Profiling durchgeführt. Dabei wurden in Far-Western Blot-Analysen mit Hilfe von 35 bzw. 16 SH2-Domänen globale pY-Signalprofile von neun Neuroblastom-Zelllinien bzw. 21 primären Neuroblastomen verschiedener Risikogruppen erhoben und auf Zusammenhänge mit klinischen Parametern untersucht. Parallel dazu wurden mittels Western Blot-Analysen und ELISA 26 potenziell relevante Proteinspezies, darunter 17 RTKs, in den Primärtumoren bestimmt und auf ihre Verteilung auf die Risikogruppen sowie auf Assoziationen mit den SH2-Profilen analysiert. Abschließend wurden aus den erhobenen SH2-Profilen in Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen differenziell phosphorylierte pY-Proteine ermittelt.

Clusteranalysen der SH2-Profile der Neuroblastom-Zelllinien zeigten eine bezüglich klinischer Parameter interessante Gruppeneinteilung der Zelllinien und ermöglichten adäguate Auswahl an SH2-Domänen für das SH2-Profiling eine primärer Neuroblastome. Die Bestimmung verschiedener Proteinspezies in den Primärtumoren bestätigte eine risikoabhängige Expression von ALK, N-Myc, Shc3, TrkA und Fyn, für die verbleibenden Proteinspezies hingegen, darunter auch TrkB und TrkC, wurde kein Zusammenhang mit dem Risiko beobachtet. Mehr als die Hälfte der untersuchten RTKs war in über 75 % aller Tumoren, EGFR, IGF1R, KIT und PDGFRß sogar in sämtlichen Neuroblastomen exprimiert. Das SH2-Profiling primärer Neuroblastome zeigte ähnliche, globale Profile pY-abhängiger Signaltransduktion ohne offensichtliche Zusammenhänge zu den bestimmten Proteinspezies. Die Clusteranalyse der SH2-Profile ordnete die Tumoren drei Clustern zu, die signifikant mit dem Risiko, dem INSS-Stadium sowie dem Alter bei Diagnose assoziiert waren. Schließlich konnten aus den SH2-Profilen sieben pY-Proteine ermittelt werden, die in Niedrig- und Hochrisiko-Neuroblastomen differenziell phosphoryliert waren.

erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass globale Profile pY-abhängiger Die Signaltransduktion im Neuroblastom tumorrelevante Informationen in Form einer komplexen Kombinatorik zahlreicher pY-Proteine enthalten und möglicherweise bei der Risikostratifizierung des Neuroblastoms behilflich sein könnten. Die ubiquitäre Expression mehrerer RTKs im Neuroblastom empfiehlt eine genauere Untersuchung der Rolle dieser in der Pathogenese des Neuroblastoms sowie der möglichen Implikationen für eine zielgerichtete Therapie. Die aus den SH2-Profilen ermittelten, differenziell phosphorylierten pY-Proteine stellen potenzielle Kandidaten für eine zukünftiae Identifizierung und funktionelle Validierung als mögliche neue therapeutische Ziele dar.

### Summary

Neuroblastoma is the most frequent extracranial solid tumor of childhood and accounts for 11 % of pediatric cancer deaths<sup>1,2</sup>. It shows a remarkable heterogeneity in clinical behavior<sup>2</sup>. Neuroblastomas are classified into different risk groups based on risk factors like INSS stage, age at diagnosis, *MYCN* status and 1p status<sup>2</sup>. pY-dependent signal transduction seems to be crucial for neuroblastoma pathogenesis, activating mutations of the RTK ALK, for example, are found in 10 % of neuroblastomas<sup>8,9,21,22</sup>.

This thesis presents a comprehensive analysis of pY-dependent signal transduction in neuroblastoma. Global profiles of pY signaling of nine neuroblastoma cell lines as well as 21 primary tumors of different risk groups were obtained by far-western blot analysis using 35 and 16 SH2 domains, respectively, and analyzed for associations with clinical parameters. In parallel, expression levels of 26 potentially relevant protein species, 17 of which were RTKs, were determined and examined for their distribution over the risk groups and for associations with the SH2 profiles. Finally, SH2 profiles were searched for differentially phosphorylated proteins among low and high risk neuroblastomas.

Cluster analyses of the SH2 profiles of the neuroblastoma cell lines showed interesting results with regard to clinical parameters and provided an adequate selection of SH2 domain probes for the SH2 profiling of primary neuroblastomas. Determination of the expression levels of several protein species in the primary tumors confirmed a risk-associated expression of ALK, N-Myc, Shc3, TrkA, and Fyn, whereas the remaining protein species including TrkB and TrkC were not associated with risk. More than half of the analyzed RTKs were expressed in over 75 % of neuroblastomas, with EGFR, IGF1R, KIT, and PDGFR $\beta$  being expressed in all of the tumors. SH2 profiling revealed similar global profiles of pY-dependent signal transduction in primary neuroblastomas with no apparent associations to the analyzed protein species. Cluster analysis of the SH2 profiles assigned the tumors to three clusters that were significantly associated with risk, INSS stage and age at diagnosis. Finally, seven pY proteins that were differentially phosphorylated among low and high risk neuroblastomas could be determined.

The presented results demonstrate that global profiles of pY-dependent signal transduction in neuroblastoma contain tumor-relevant information in the form of complex combinations of numerous pY proteins and might aid neuroblastoma risk stratification. The finding of a ubiquitous expression of several RTKs in primary neuroblastomas recommends a closer investigation of the role of these RTKs in the pathogenesis of neuroblastoma and the possible implications for therapy. The differentially phosphorylated proteins obtained from the SH2 profiles represent potential candidate proteins for future identification and functional validation as possible new therapeutic targets.

## Literaturverzeichnis

- 1. Kaatsch Peter & Claudia Spix. German Childhood Cancer Registry Annual Report 2011 (1980-2010). 01.09.2012.
- 2. Davidoff, A. M. Neuroblastoma, *Seminars in Pediatric Surgery* **21**, 2–14 (2012).
- 3. Takahashi, Y. Sipp, D. & Enomoto, H. Tissue Interactions in Neural Crest Cell Development and Disease, *Science* **341**, 860–863 (2013).
- 4. Fisher, J. P. & Tweddle, D. A. Neonatal neuroblastoma, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* **17**, 207–215 (2012).
- 5. Maris, J. M. Hogarty, M. D. Bagatell, R. & Cohn, S. L. Neuroblastoma, *The Lancet* **369**, 2106–2120 (2007).
- 6. Maris, J. M. Recent Advances in Neuroblastoma, *N Engl J Med* **362**, 2202–2211 (2010).
- 7. Brodeur, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma, *Nat. Rev. Cancer* **3**, 203–216 (2003).
- 8. Janoueix-Lerosey, I. *et al.* Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma, *Nature* **455**, 967–970 (2008).
- 9. Mossé, Y. P. *et al.* Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene, *Nature* **455**, 930–935 (2008).
- 10.Mosse, Y. P. *et al.* Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma, *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 727–730 (2004).
- 11.Trochet, D. *et al.* Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma, *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 761–764 (2004).
- 12.Wang, K. *et al.* Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene, *Nature* **469**, 216–220 (2011).
- 13.Capasso, M. *et al.* Common variations in BARD1 influence susceptibility to highrisk neuroblastoma, *Nat. Genet.* **41**, 718–723 (2009).
- 14.Diskin, S. J. *et al.* Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma, *Nature* **459**, 987–991 (2009).
- 15.Maris, J. M. *et al.* Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.* **358**, 2585–2593 (2008).
- 16.Diskin, S. J. *et al.* Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma, *Nat. Genet.* **44**, 1126–1130 (2012).
- 17.Molenaar, J. J. *et al.* LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression, *Nat. Genet.* **44**, 1199–1206 (2012).
- 18.Pugh, T. J. *et al.* The genetic landscape of high-risk neuroblastoma, *Nat Genet* **45**, 279–284 (2013).

- 19.Sausen, M. *et al.* Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma, *Nat. Genet.* **45**, 12–17 (2013).
- 20.Cheung, N.-K. V. *et al.* Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma, *JAMA* **307**, 1062–1071 (2012).
- 21.Chen, Y. *et al.* Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma, *Nature* **455**, 971–974 (2008).
- 22.George, R. E. *et al.* Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma, *Nature* **455**, 975–978 (2008).
- 23.Brodeur, G. M. *et al.* Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment, *J. Clin. Oncol.* **11**, 1466–1477 (1993).
- 24.Cohn, S. L. *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report, *J. Clin. Oncol.* **27**, 289–297 (2009).
- 25.Moroz, V. *et al.* Changes over three decades in outcome and the prognostic influence of age-at-diagnosis in young patients with neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group Project, *European Journal of Cancer* **47**, 561–571 (2011).
- 26.Schwab, M. *et al.* Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour, *Nature* **305**, 245–248 (1983).
- 27.Brodeur, G. M. Sekhon, G. & Goldstein, M. N. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas, *Cancer* **40**, 2256–2263 (1977).
- 28.Berthold, F. GPOH NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma. Available at http://www.kinderkrebsinfo.de/e1676/e9032/e1758/e7671/index\_ger.html (2004).
- 29. Monclair, T. *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report, *J. Clin. Oncol.* **27**, 298–303 (2009).
- 30.Lodish, H. F. *Molecular cell biology.* 7th ed. (W.H. Freeman and Co. New York, 2013).
- 31.Manning, G. Whyte, D. B. Martinez, R. Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome, *Science* **298**, 1912–1934 (2002).
- 32.Lim, W. A. & Pawson, T. Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system, *Cell* **142**, 661–667 (2010).
- 33.King, N. Hittinger, C. T. & Carroll, S. B. Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins, *Science* **301**, 361–363 (2003).
- 34.Blume-Jensen, P. & Hunter, T. Oncogenic kinase signalling, *Nature* **411**, 355–365 (2001).
- 35.Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types, *Nature* **502**, 333–339 (2013).

- 36. Vogelstein, B. et al. Cancer genome landscapes, Science 339, 1546–1558 (2013).
- 37.Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell* **144**, 646–674 (2011).
- 38.Liu, B. A. & Nash, P. D. Evolution of SH2 domains and phosphotyrosine signalling networks, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* **367**, 2556–2573 (2012).
- Schlessinger, J. & Lemmon, M. A. SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling, *Sci. STKE* 2003, RE12 (2003).
- 40.Liu, B. A. *et al.* The SH2 domain-containing proteins in 21 species establish the provenance and scope of phosphotyrosine signaling in eukaryotes, *Sci Signal* **4**, ra83 (2011).
- 41.Hunter, T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting, *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 140–146 (2009).
- 42.Liu, B. A. *et al.* The human and mouse complement of SH2 domain proteinsestablishing the boundaries of phosphotyrosine signaling, *Mol. Cell* **22**, 851–868 (2006).
- 43.Alonso, A. *et al.* Protein tyrosine phosphatases in the human genome, *Cell* **117**, 699–711 (2004).
- 44.Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases, *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
- 45.Meloche, S. & Pouysségur, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition, *Oncogene* **26**, 3227–3239 (2007).
- 46.Franke, T. F. Kaplan, D. R. & Cantley, L. C. PI3K: Downstream AKTion Blocks Apoptosis, *Cell* 88, 435–437 (1997).
- 47.Baselga, J. Norton, L. Albanell, J. Kim, Y. M. & Mendelsohn, J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts, *Cancer Res.* 58, 2825–2831 (1998).
- 48.Deininger, M. W. Goldman, J. M. Lydon, N. & Melo, J. V. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells, *Blood* **90**, 3691–3698 (1997).
- Brennan, D. J. O'Connor, D. P. Rexhepaj, E. Ponten, F. & Gallagher, W. M. Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology, *Nat. Rev. Cancer* 10, 605–617 (2010).
- 50.Kolch, W. & Pitt, A. Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer, *Nat. Rev. Cancer* **10**, 618–629 (2010).
- 51.Macek, B. Mann, M. & Olsen, J. V. Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 199–221 (2009).
- 52.Harsha, H. C. & Pandey, A. Phosphoproteomics in cancer, *Mol Oncol* **4**, 482–495 (2010).

- 53.Machida, K. Khenkhar, M. & Nollau, P. Deciphering Phosphotyrosine-Dependent Signaling Networks in Cancer by SH2 Profiling, *Genes & Cancer* 3, 353–361 (2012).
- 54.Sevecka, M. Wolf-Yadlin, A. & MacBeath, G. Lysate microarrays enable highthroughput, quantitative investigations of cellular signaling, *Mol. Cell Proteomics* **10**, M110.005363 (2011).
- 55.Machida, K. Mayer, B. J. & Nollau, P. Profiling the global tyrosine phosphorylation state, *Mol. Cell Proteomics* **2**, 215–233 (2003).
- 56.Nollau, P. & Mayer, B. J. Profiling the global tyrosine phosphorylation state by Src homology 2 domain binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 13531–13536 (2001).
- 57.Tinti, M. *et al.* The SH2 Domain Interaction Landscape, *Cell Reports* **3**, 1293–1305 (2013).
- 58.Huang, H. *et al.* Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain, *Mol. Cell Proteomics* **7**, 768–784 (2008).
- 59.Ladbury, J. E. *et al.* Measurement of the binding of tyrosyl phosphopeptides to SH2 domains: a reappraisal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 3199–3203 (1995).
- 60.Machida, K. & Mayer, B. J. The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target, *Biochim. Biophys. Acta* **1747**, 1–25 (2005).
- 61. Machida, K. *et al.* Characterizing tyrosine phosphorylation signaling in lung cancer using SH2 profiling, *PLoS ONE* **5**, e13470 (2010).
- 62.Machida, K. *et al.* High-throughput phosphotyrosine profiling using SH2 domains, *Mol. Cell* **26**, 899–915 (2007).
- 63.Dierck, K. *et al.* Quantitative multiplexed profiling of cellular signaling networks using phosphotyrosine-specific DNA-tagged SH2 domains, *Nat. Methods* **3**, 737–744 (2006).
- 64.Nakagawara, A. *et al.* Association between High Levels of Expression of the TRK Gene and Favorable Outcome in Human Neuroblastoma, *N Engl J Med* **328**, 847–854 (1993).
- 65.Nakagawara, A. Arima, M. Azar, C. G. Scavarda, N. J. & Brodeur G. M. Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas, *Cancer Research* **52**, 1364–1368 (1992).
- 66.Brodeur, G. M. *et al.* Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas, *Clin. Cancer Res.* **15**, 3244–3250 (2009).
- 67.Yamashiro, D. J. *et al.* Expression and function of Trk-C in favourable human neuroblastomas, *Eur. J. Cancer* **33**, 2054–2057 (1997).
- 68.Nakagawara, A. Azar, C. G. Scavarda, N. J. & Brodeur, G. M. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas, *Mol. Cell. Biol.* 14, 759– 767 (1994).

- 69.Minturn, J. E. *et al.* Phase I trial of lestaurtinib for children with refractory neuroblastoma: a new approaches to neuroblastoma therapy consortium study, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **68**, 1057–1065 (2011).
- 70.Norris, R. E. Minturn, J. E. Brodeur, G. M. Maris, J. M. & Adamson, P. C. Preclinical evaluation of lestaurtinib (CEP-701) in combination with retinoids for neuroblastoma, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68, 1469–1475 (2011).
- 71. Iyer, R. *et al.* Lestaurtinib enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in murine xenograft models of neuroblastoma, *Clin. Cancer Res.* **16**, 1478–1485 (2010).
- 72.Zarrinkar, P. P. *et al.* AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML), *Blood* **114**, 2984–2992 (2009).
- 73.Light, J. E. *et al.* Clinical significance of NTRK family gene expression in neuroblastomas, *Pediatr. Blood Cancer* **59**, 226–232 (2012).
- 74.Berwanger, B. *et al.* Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma, *Cancer Cell* **2**, 377–386 (2002).
- 75.Miyake, I. *et al.* Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines, *Oncogene* **21**, 5823–5834 (2002).
- 76.Nakamura, T. *et al.* N-Shc: a neural-specific adapter molecule that mediates signaling from neurotrophin/Trk to Ras/MAPK pathway, *Oncogene* **13**, 1111–1121 (1996).
- 77.Miyake, I. Ohira, M. Nakagawara, A. & Sakai, R. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma, *Oncogene* **28**, 662–673 (2009).
- 78. Terui, E. *et al.* Shc family expression in neuroblastoma: high expression of shcC is associated with a poor prognosis in advanced neuroblastoma, *Clin. Cancer Res.* 11, 3280–3287 (2005).
- 79.Hallberg, B. & Palmer, R. H. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology, *Nat. Rev. Cancer* **13**, 685–700 (2013).
- 80.Morris, S. W. *et al.* Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma, *Science* **263**, 1281–1284 (1994).
- 81.Schulte, J. H. *et al.* High ALK receptor tyrosine kinase expression supersedes ALK mutation as a determining factor of an unfavorable phenotype in primary neuroblastoma, *Clin. Cancer Res.* **17**, 5082–5092 (2011).
- Passoni, L. *et al.* Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients, *Cancer Res.* **69**, 7338– 7346 (2009).
- 83.Schönherr, C. *et al.* Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells, *Oncogene* **31**, 5193–5200 (2012).
- 84.Berry, T. *et al.* The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma, *Cancer Cell* **22**, 117–130 (2012).

- 85.Heukamp, L. C. *et al.* Targeted expression of mutated ALK induces neuroblastoma in transgenic mice, *Sci Transl Med* **4**, 141ra91 (2012).
- 86.Zhu, S. *et al.* Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis, *Cancer Cell* **21**, 362–373 (2012).
- 87.Shaw, A. T. *et al.* Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK -Positive Lung Cancer, *N Engl J Med* **368**, 2385–2394 (2013).
- 88.Mossé, Y. P. *et al.* Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study, *Lancet Oncol.* **14**, 472–480 (2013).
- 89. Takagi, D. *et al.* Novel adaptor protein Shf interacts with ALK receptor and negatively regulates its downstream signals in neuroblastoma, *Cancer Sci.* **104**, 563–572 (2013).
- 90.Sattu, K. *et al.* Phosphoproteomic analysis of ALK downstream signaling pathways identifies STAT3 as a functional target of activated ALK in neuroblastoma cells, *FEBS J.* (2013).
- 91.Jung, E. J. Lee, S.-Y. & Kim, C. W. Proteomic analysis of novel targets associated with TrkA-mediated tyrosine phosphorylation signaling pathways in SK-N-MC neuroblastoma cells, *Proteomics* **13**, 355–367 (2013).
- 92.Mandili, G. *et al.* Identification of phosphoproteins as possible differentiation markers in all-trans-retinoic acid-treated neuroblastoma cells, *PLoS ONE* **6**, e18254 (2011).
- 93.Nakamura, M. *et al.* Phosphoproteomic profiling of human SH-SY5Y neuroblastoma cells during response to 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress, *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 977–989 (2006).
- 94. Tumilowicz, J. J. Nichols, W. W. Cholon, J. J. & Greene, A. E. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma, *Cancer Res.* **30**, 2110–2118 (1970).
- 95.Biedler, J. L. Helson, L. & Spengler, B. A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture, *Cancer Res.* **33**, 2643–2652 (1973).
- 96.Seeger, R. C. *et al.* Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines, *Cancer Res.* **37**, 1364–1371 (1977).
- 97.Seeger, R. C. Danon, Y. L. Rayner, S. A. & Hoover, F. Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody, *J. Immunol.* **128**, 983–989 (1982).
- 98.Helson, L. Member, B. & Helson, C. Importance of clinical exposure on verapamil enhancement of adriamycin-vincristine cytotoxicity in human neuroblastoma, *Cancer Drug Deliv* **1**, 303–305 (1984).
- 99.Rudolph, G. Schilbach-Stückle, K. Handgretinger, R. Kaiser, P. & Hameister, H. Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS, *Hum. Genet.* **86**, 562–566 (1991).

- 100. Marini, P. *et al.* SiMa, a new neuroblastoma cell line combining poor prognostic cytogenetic markers with high adrenergic differentiation, *Cancer Genet. Cytogenet.* **112**, 161–164 (1999).
- 101. Thiele, C. J. in *Human Cell Culture,* edited by J. R. W. Masters & B. Palsson (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2002), pp. 21–53.
- 102. Schneider, C. A. Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
- 103. GNU Image Manipulation Program. Available at http://www.gimp.org (2013).
- 104. Saeed, A. I. *et al.* TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis, *BioTechniques* **34**, 374–378 (2003).
- 105. Wu, L. *et al.* Variation and genetic control of protein abundance in humans, *Nature* **499**, 79–82 (2013).
- 106. Schwanhäusser, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control, *Nature* **473**, 337–342 (2011).
- 107. Kirouac, D. C. *et al.* Creating and analyzing pathway and protein interaction compendia for modelling signal transduction networks, *BMC Syst Biol* **6**, 29 (2012).
- 108. Rho, O. Kim, D. J. Kiguchi, K. & Digiovanni, J. Growth factor signaling pathways as targets for prevention of epithelial carcinogenesis, *Mol. Carcinog.* **50**, 264–279 (2011).
- 109. Wei, J. S. *et al.* Prediction of clinical outcome using gene expression profiling and artificial neural networks for patients with neuroblastoma, *Cancer Res.* **64**, 6883–6891 (2004).
- 110. Combaret, V. *et al.* Clinical relevance of TRKA expression on neuroblastoma: comparison with N-MYC amplification and CD44 expression, *Br. J. Cancer* **75**, 1151–1155 (1997).
- Kramer, K. *et al.* Correlation of MYCN amplification, Trk-A and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma, *Eur. J. Cancer* 33, 2098–2100 (1997).
- 112. Combaret, V. *et al.* Clinical relevance of CD44 cell-surface expression and Nmyc gene amplification in a multicentric analysis of 121 pediatric neuroblastomas, *J. Clin. Oncol.* **14**, 25–34 (1996).
- 113. Miyake, I. *et al.* Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells, *Oncogene* **24**, 3206–3215 (2005).
- 114. Puissant, A. *et al.* Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition, *Cancer Discov* **3**, 308–323 (2013).
- Schulte, J. H. *et al.* MYCN and ALKF1174L are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells, *Oncogene* 32, 1059–1065 (2013).
- 116. Chanthery, Y. H. *et al.* Paracrine signaling through MYCN enhances tumorvascular interactions in neuroblastoma, *Sci Transl Med* **4**, 115ra3 (2012).

- Valentijn, L. J. *et al.* Functional MYCN signature predicts outcome of neuroblastoma irrespective of MYCN amplification, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 19190–19195 (2012).
- 118. Johnsen, J. I. *et al.* Inhibitors of mammalian target of rapamycin downregulate MYCN protein expression and inhibit neuroblastoma growth in vitro and in vivo, *Oncogene* **27**, 2910–2922 (2008).
- 119. Kang, J. *et al.* N-myc is a novel regulator of PI3K-mediated VEGF expression in neuroblastoma, *Oncogene* **27**, 3999–4007 (2008).
- 120. Chan, H. S. *et al.* MYCN protein expression as a predictor of neuroblastoma prognosis, *Clin. Cancer Res.* **3**, 1699–1706 (1997).
- 121. Hiyama, E. Hiyama, K. Yokoyama, T. & Ishii, T. Immunohistochemical analysis of N-myc protein expression in neuroblastoma: correlation with prognosis of patients, *J. Pediatr. Surg.* **26**, 838–843 (1991).
- 122. Bresler, S. C. *et al.* Differential inhibitor sensitivity of anaplastic lymphoma kinase variants found in neuroblastoma, *Sci Transl Med* **3**, 108ra114 (2011).
- 123. Bagci, O. Tumer, S. Olgun, N. & Altungoz, O. Copy number status and mutation analyses of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors, *Cancer Lett.* **317**, 72–77 (2012).
- 124. Borrello, M. G. *et al.* trk and ret proto-oncogene expression in human neuroblastoma specimens: high frequency of trk expression in non-advanced stages, *Int. J. Cancer* **54**, 540–545 (1993).
- 125. Kogner, P. *et al.* Coexpression of Messenger RNA for TRK Protooncogene and Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor in Neuroblastoma with Favorable Prognosis, *Cancer Research* **53**, 2044–2050 (1993).
- 126. Matsunaga, T. *et al.* Neuronal src and trk a protooncogene expression in neuroblastomas and patient prognosis, *Int. J. Cancer* **79**, 226–231 (1998).
- 127. Svensson, T. *et al.* Coexpression of mRNA for the full-length neurotrophin receptor trk-C and trk-A in favourable neuroblastoma, *Eur. J. Cancer* **33**, 2058–2063 (1997).
- 128. Tacconelli, A. *et al.* TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma, *Cancer Cell* **6**, 347–360 (2004).
- 129. de Souza, Daniela Raguer Valadão *et al.* Prognostic impact of MYCN, DDX1, TrkA, and TrkC gene transcripts expression in neuroblastoma, *Pediatr Blood Cancer* **56**, 749–756 (2011).
- 130. Rajagopal, R. & Chao, M. V. A role for Fyn in Trk receptor transactivation by G-protein-coupled receptor signaling, *Mol. Cell. Neurosci.* **33**, 36–46 (2006).
- 131. Dey, N. Howell, B. W. De, P. K. & Durden, D. L. CSK negatively regulates nerve growth factor induced neural differentiation and augments AKT kinase activity, *Exp. Cell Res.* **307**, 1–14 (2005).
- 132. Ho, R. Proliferation of Human Neuroblastomas Mediated by the Epidermal Growth Factor Receptor, *Cancer Research* **65**, 9868–9875 (2005).

- 133. Tang, X. X. *et al.* High-level expression of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 is associated with low tumor stage and high TrkA expression in human neuroblastomas, *Clin. Cancer Res.* **5**, 1491–1496 (1999).
- 134. Nagao, M. *et al.* Expression of ret Proto-oncogene in Human Neuroblastomas, *Cancer Science* **81**, 309–312 (1990).
- 135. Gambini, C. *et al.* Expression of HER2/neu is uncommon in human neuroblastic tumors and is unrelated to tumor progression, *Cancer Immunol. Immunother.* **52**, 116–120 (2003).
- 136. Richards, K. N. *et al.* Signaling of ERBB receptor tyrosine kinases promotes neuroblastoma growth in vitro and in vivo, *Cancer* **116**, 3233–3243 (2010).
- 137. Tonini, G. P. Nakagawara, A. & Berthold, F. Towards a turning point of neuroblastoma therapy, *Cancer Letters* **326**, 128–134 (2012).
- 138. Izycka-Swieszewska, E. *et al.* Prognostic significance of HER2 expression in neuroblastic tumors, *Mod. Pathol.* **23**, 1261–1268 (2010).
- Cohen, P. S. Chan, J. P. Lipkunskaya, M. Biedler, J. L. & Seeger, R. C. Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. The Children's Cancer Group, *Blood* 84, 3465–3472 (1994).
- 140. Shimada, A. *et al.* Expression of KIT and PDGFR is associated with a good prognosis in neuroblastoma, *Pediatr. Blood Cancer* **50**, 213–217 (2008).
- 141. Krams, M. *et al.* Expression of the c-kit receptor characterizes a subset of neuroblastomas with favorable prognosis, *Oncogene* **23**, 588–595 (2004).
- 142. Vitali, R. *et al.* c-Kit is preferentially expressed in MYCN-amplified neuroblastoma and its effect on cell proliferation is inhibited in vitro by STI-571, *Int. J. Cancer* **106**, 147–152 (2003).
- Langer, I. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastomas, *Med. Pediatr. Oncol.* 34, 386–393 (2000).
- 144. Wagner, J. P. *et al.* Receptor Tyrosine Kinases Fall into Distinct Classes Based on Their Inferred Signaling Networks, *Science Signaling* **6**, ra58 (2013).
- 145. Wilson, T. R. *et al.* Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors, *Nature* **487**, 505–509 (2012).
- 146. Stommel, J. M. *et al.* Coactivation of Receptor Tyrosine Kinases Affects the Response of Tumor Cells to Targeted Therapies, *Science* **318**, 287–290 (2007).
- Weber, A. *et al.* Coexpression of insulin receptor-related receptor and insulinlike growth factor 1 receptor correlates with enhanced apoptosis and dedifferentiation in human neuroblastomas, *Clin. Cancer Res.* 9, 5683–5692 (2003).
- 148. Meister, B. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human neuroblastoma, *European Journal of Cancer* **35**, 445–449 (1999).

- Smithey, B. E. Pappo, A. S. & Hill, D. A. C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study, *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 486– 492 (2002).
- 150. Müller-Tidow, C. *et al.* High-throughput analysis of genome-wide receptor tyrosine kinase expression in human cancers identifies potential novel drug targets, *Clin. Cancer Res.* **10**, 1241–1249 (2004).
- 151. Friedman, D. L. *et al.* Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study, *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 1083–1095 (2010).
- 152. Meadows, A. T. *et al.* Second neoplasms in survivors of childhood cancer: findings from the Childhood Cancer Survivor Study cohort, *J. Clin. Oncol.* **27**, 2356–2362 (2009).
- 153. Delmore, J. E. *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc, *Cell* **146**, 904–917 (2011).
- 154. Filippakopoulos, P. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains, *Nature* **468**, 1067–1073 (2010).
- 155. Opel, D. *et al.* Targeting aberrant PI3K/Akt activation by PI103 restores sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in neuroblastoma, *Clin. Cancer Res.* **17**, 3233–3247 (2011).
- 156. Segerström, L. *et al.* Effects of small molecule inhibitors of PI3K/Akt/mTOR signaling on neuroblastoma growth in vitro and in vivo, *Int. J. Cancer* **129**, 2958–2965 (2011).
- 157. Chesler, L. *et al.* Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase destabilizes Mycn protein and blocks malignant progression in neuroblastoma, *Cancer Res.* **66**, 8139–8146 (2006).
- 158. Kim, S. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition down-regulates survivin and facilitates TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastomas, *J. Pediatr. Surg.* **39**, 516–521 (2004).
- Brockmann, M. *et al.* Small Molecule Inhibitors of Aurora-A Induce Proteasomal Degradation of N-Myc in Childhood Neuroblastoma, *Cancer Cell* (2013).
- Mossé, Y. P. *et al.* Pediatric phase I trial and pharmacokinetic study of MLN8237, an investigational oral selective small-molecule inhibitor of Aurora kinase A: a Children's Oncology Group Phase I Consortium study, *Clin. Cancer Res.* 18, 6058–6064 (2012).
- 161. Rössler, J. *et al.* EGFR inhibition using gefitinib is not active in neuroblastoma cell lines, *Anticancer Res.* **29**, 1327–1333 (2009).
- 162. Jakacki, R. I. *et al.* Pediatric phase I and pharmacokinetic study of erlotinib followed by the combination of erlotinib and temozolomide: a Children's Oncology Group Phase I Consortium Study, *J. Clin. Oncol.* **26**, 4921–4927 (2008).

- 163. Tamura, S. *et al.* Induction of apoptosis by an inhibitor of EGFR in neuroblastoma cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **358**, 226–232 (2007).
- 164. Wojtalla, A. *et al.* Novel agents targeting the IGF-1R/PI3K pathway impair cell proliferation and survival in subsets of medulloblastoma and neuroblastoma, *PLoS ONE* **7**, e47109 (2012).
- 165. Carboni, J. M. *et al.* BMS-754807, a small molecule inhibitor of insulin-like growth factor-1R/IR, *Mol. Cancer Ther.* **8**, 3341–3349 (2009).
- 166. Huang, F. *et al.* The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors, *Cancer Res.* **69**, 161–170 (2009).
- Pappano, W. N. *et al.* Reversal of oncogene transformation and suppression of tumor growth by the novel IGF1R kinase inhibitor A-928605, *BMC Cancer* 9, 314 (2009).
- Meyer, G. E. *et al.* Nordihydroguaiaretic acid inhibits insulin-like growth factor signaling, growth, and survival in human neuroblastoma cells, *J. Cell. Biochem.* **102**, 1529–1541 (2007).
- 169. Tanno, B. *et al.* Down-regulation of insulin-like growth factor I receptor activity by NVP-AEW541 has an antitumor effect on neuroblastoma cells in vitro and in vivo, *Clin. Cancer Res.* **12**, 6772–6780 (2006).
- Nilsson, M. B. *et al.* Multiple receptor tyrosine kinases regulate HIF-1a and HIF-2a in normoxia and hypoxia in neuroblastoma: implications for antiangiogenic mechanisms of multikinase inhibitors, *Oncogene* 29, 2938–2949 (2010).
- 171. Rössler, J. *et al.* The selective VEGFR1-3 inhibitor axitinib (AG-013736) shows antitumor activity in human neuroblastoma xenografts, *Int. J. Cancer* **128**, 2748–2758 (2011).
- 172. Maris, J. M. *et al.* Initial testing of the VEGFR inhibitor AZD2171 by the pediatric preclinical testing program, *Pediatr Blood Cancer* **50**, 581–587 (2008).
- 173. Bäckman, U. & Christofferson, R. The selective class III/V receptor tyrosine kinase inhibitor SU11657 inhibits tumor growth and angiogenesis in experimental neuroblastomas grown in mice, *Pediatr. Res.* **57**, 690–695 (2005).
- 174. Kim, A. Balis, F. M. & Widemann, B. C. Sorafenib and sunitinib, *Oncologist* **14**, 800–805 (2009).
- Socinski, M. A. Multitargeted receptor tyrosine kinase inhibition: an antiangiogenic strategy in non-small cell lung cancer, *Cancer Treat. Rev.* 37, 611– 617 (2011).
- 176. Manning, G. Whyte, D. B. Martinez, R. Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome, *Science* **298**, 1912–1934 (2002).
- 177. Matthay, K. K. *et al.* Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by

13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study, *J. Clin. Oncol.* **27**, 1007–1013 (2009).

- Matthay, K. K. *et al.* Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13cis-retinoic acid. Children's Cancer Group, *N. Engl. J. Med.* **341**, 1165–1173 (1999).
- 179. McKelvey, L. Shorten, G. D. & O'Keeffe, G. W. Nerve growth factor-mediated regulation of pain signalling and proposed new intervention strategies in clinical pain management, *J. Neurochem.* **124**, 276–289 (2013).
- 180. Gerber, Renate Karin Herren, Nie, H. Arendt-Nielsen, L. Curatolo, M. & Graven-Nielsen, T. Local pain and spreading hyperalgesia induced by intramuscular injection of nerve growth factor are not reduced by local anesthesia of the muscle, *Clin J Pain* **27**, 240–247 (2011).
- Rukwied, R. *et al.* NGF induces non-inflammatory localized and lasting mechanical and thermal hypersensitivity in human skin, *Pain* **148**, 407–413 (2010).
- 182. Cheung, N.-K. V. *et al.* Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission, *J. Clin. Oncol.* **30**, 3264–3270 (2012).
- 183. Yu, A. L. *et al.* Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma, *N Engl J Med* **363**, 1324–1334 (2010).
- 184. Schweigel, H. *et al.* Deciphering of ADP-induced, phosphotyrosine-dependent signaling networks in human platelets by Src-homology 2 region (SH2)-profiling, *Proteomics* **13**, 1016–1027 (2013).
- 185. Mitra, A. Kalayarasan, S. Gupta, V. & Radha, V. TC-PTP dephosphorylates the guanine nucleotide exchange factor C3G (RapGEF1) and negatively regulates differentiation of human neuroblastoma cells, *PLoS ONE* **6**, e23681 (2011).
- Mitra, A. & Radha, V. F-actin-binding domain of c-Abl regulates localized phosphorylation of C3G: role of C3G in c-Abl-mediated cell death, *Oncogene* 29, 4528–4542 (2010).
- 187. Han, D. Spengler, B. A. & Ross, R. A. Increased wild-type N-ras activation by neurofibromin down-regulation increases human neuroblastoma stem cell malignancy, *Genes Cancer* **2**, 1034–1043 (2011).
- 188. Hölzel, M. *et al.* NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome, *Cell* **142**, 218–229 (2010).
- 189. Ballester, R. *et al.* The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins, *Cell* **63**, 851–859 (1990).
- 190. Motegi, A. Fujimoto, J. Kotani, M. Sakuraba, H. & Yamamoto, T. ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth, *J. Cell. Sci.* **117**, 3319–3329 (2004).

## Veröffentlichungen und Förderungen

#### Vorträge

<u>Khenkhar M</u>, Dierck K, Prall S, Trochimiuk M, Horstmann MA, Nollau P. "Deciphering of tyrosine phosphorylation states in neuroblastoma by SH2 Profiling". *XXIV. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung*, Wilsede (2011)

#### Publikationen

Machida K, <u>Khenkhar M</u>, Nollau P. "Deciphering Phosphotyrosine-Dependent Signaling Networks in Cancer by SH2 Profiling". *Genes Cancer.* 3(5-6): 353–361 (2012).

#### Förderungen

Das Projekt wurde mit Fördermitteln der Deutschen Krebshilfe unterstützt und genehmigt von der Ethik-Kommission der Stadt Hamburg (PV3319 11.9.2009).

### Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Christoph Wagener für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Klinische Chemie für den Zeitraum der Promotion, sowie für die Anfertigung des schriftlichen Erstgutachtens der vorliegenden Arbeit bedanken. Bei Herrn PD Dr. Hartwig Lüthen möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Peter Nollau für die hervorragende Betreuung und Anleitung dieses Promotionsvorhabens, für wertvolle wissenschaftliche Ratschläge und für die zahlreichen kritischen Diskussionen und problemorientierten Gespräche.

Ich danke weiter Herrn Prof. Dr. Martin Horstmann, Herrn Dr. Kevin Dierck, Herrn Miguel Córdova und Frau Magdalena Trochimiuk für die Bereitstellung von Zelllinien und Primärtumormaterial bzw. die durchgeführten experimentellen Arbeiten, sowie für die wichtigen Gespräche und Anregungen im Rahmen dieses Projekts.

Ich möchte mich weiterhin bei der gesamten Forschungsabteilung des Instituts für Klinische Chemie für das angenehme Arbeitsklima, das Anlernen der verschiedenen Methoden sowie unzählige interessante Gespräche bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen guten Freunden, ganz besonders jedoch meiner Frau Carmen und meinen Eltern, herzlich für Ihre fortwährende Hilfe und Unterstützung danken.

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, 27.03.2014

he

Malik F. A. Khenkhar