



**Inhibition von Aurora-A als neue Therapiestrategie gegen
MYCN-amplifizierte Neuroblastome**

**Inhibition of Aurora-A as a novel therapeutic strategy against *MYCN*-
amplified Neuroblastoma**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Markus Brockmann

aus Münster

Würzburg 2015

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Utz Fischer

1. Betreuer: Prof. Dr. Martin Eilers

2. Betreuer: Prof. Dr. Manfred Gessler

3. Betreuer: Prof. Dr. Thomas U. Mayer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

“ES IST NICHT WENIG ZEIT, DIE WIR HABEN, SONDERN ES IST ZU VIEL
ZEIT, DIE WIR NICHT NUTZEN”

LUCIUS ANNAEUS SENECA

I Inhaltsverzeichnis

1	Summary	5
2	Zusammenfassung	6
3	Einleitung	8
3.1	Der Zellzyklus und seine Regulation	8
3.2	Das Neuroblastom	11
3.2.1	Prognostische Faktoren.....	12
3.3	Der Transkriptionsfaktor N-Myc	14
3.3.1	Die Transkriptionsfaktorfamilie der Myc-Proteine.....	14
3.3.2	Transkriptionelle Regulation durch die Myc-Familie.....	16
3.3.3	Biologische Funktionen von N-Myc im Neuroblastom.....	18
3.3.4	Regulation und Deregulation von N-Myc.....	20
3.4	Die Kinase Aurora-A	24
3.4.1	Mitotische Funktionen von Aurora-A.....	24
3.4.2	Nicht-Mitotische Funktionen von Aurora-A	26
3.4.3	Mechanismen der Regulation von Aurora-A	27
3.5	Zielsetzung der Arbeit	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Aurora-A blockiert den Fbxw7-vermittelten proteasomalen Abbau von N-Myc	30
4.1.1	Die mitotische Kinase Aurora-A stabilisiert den Transkriptionsfaktor N-Myc posttranslational.....	30
4.1.2	Fbxw7 vermittelt den proteasomalen Abbau von N-Myc.....	31
4.1.3	Aurora-A interagiert mit N-Myc und der E3-Ubiquitinligase Fbxw7	32
4.1.4	Aurora-A stabilisiert N-Myc in Abhängigkeit der T58/S62-Phosphorylierung.....	34
4.1.5	Aurora-A stabilisiert nicht das Fbxw7-Substrat Zyklin E	36
4.1.6	Die Stabilisierung von N-Myc ist unabhängig von der Aurora-A- Kinaseaktivität.....	36
4.1.7	N-Myc wird nicht durch Aurora-B stabilisiert.....	38
4.2	Die spezifischen Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 dissoziieren den N-Myc/Aurora-A-Komplex und destabilisieren dadurch N-Myc	39
4.2.1	Der Aurora-A Inhibitor MLN8054 reduziert das N-Myc Proteinlevel.....	39
4.2.2	Ausschließlich eine bestimmte Klasse an Aurora-A-Inhibitoren reduzieren die N-Myc-Proteinlevel	41

4.2.3	Ausschließlich Aurora-A-Inhibitoren, die die N-Myc-Proteinexpression reduzieren, dissoziieren auch den Aurora-A/N-Myc-Komplex.....	43
4.2.4	MLN8054 hat keinen Effekt auf die Aktivität von GSK3 β	45
4.2.5	MLN8054 reguliert die N-Myc-Expression posttranslational.....	46
4.2.6	MLN8054 begünstigt den Fbxw7-vermittelten N-Myc Proteinabbau.....	48
4.2.7	N-Myc wird während der Mitose über Fbxw7 degradiert.....	50
4.3	Die Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 haben therapeutisches Potential	52
4.3.1	MLN8054 induziert einen Wachstumsarrest in <i>MYCN</i> -amplifizierten Neuroblastomzellen	52
4.3.2	Die Inhibition von Aurora-A durch MLN8054 induziert die Expression des Zellzyklusinhibitors <i>CDKN1A</i>	54
4.3.3	Der Aurora-A-Inhibitor MLN8054 induziert Seneszenz in Neuroblastomzelllinien	56
4.3.4	MLN8054 inhibiert die N-Myc-Funktion in TH- <i>MYCN</i> -transgenen Mäusen... 58	
4.3.5	Der Aurora-A-Inhibitor MLN8054 verringert das Stammzellpotential von Neuroblasten.....	60
4.3.6	Eine Überexpression der Aurora-A-Mutante T217D verhindert den von MLN8054 induzierten Wachstumsarrest in <i>MYCN</i> -amplifizierten Zellen.....	62
5	Diskussion	65
5.1	Die <i>AURKA</i>-Überexpression in <i>MYCN</i>-amplifizierten Neuroblastomen ist assoziiert mit einer schlechten Prognose	65
5.2	Aurora-A verhindert den Fbxw7 vermittelten proteasomalen Abbau von N-Myc	67
5.2.1	Die Stabilisierung von Proteinen ist eine generelle Funktion von Aurora-A ..	67
5.2.2	Fbxw7 vermittelt den proteasomalen Abbau von N-Myc.....	68
5.2.3	Aurora-A stabilisiert phosphoryliertes N-Myc durch die spezifische Blockierung des Fbxw7-induzierten Proteinabbaus.....	69
5.2.4	Aurora-A interferiert mit der Fbxw7-Substraterkennungssequenz von N-Myc.....	71
5.3	Die Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 destabilisieren das N-Myc Protein	73
5.3.1	Aurora-A stabilisiert N-Myc unabhängig von der Kinaseaktivität.....	73
5.3.2	Spezifische Aurora-A-Inhibitoren dissoziieren den N-Myc/Aurora-A-Komplex.....	73
5.3.3	Die speziellen Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 reduzieren das N-Myc Proteinlevel.....	74
5.3.4	Die Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 regulieren die N-Myc-Expression posttranslational über den Fbxw7-vermittelten Degradationsweg.....	75
5.4	Die Aurora-A-Inhibitoren zeigen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> therapeutisches Potential	77
5.4.1	Die Millennium-Inhibitoren induzieren einen Wachstumsarrest in <i>MYCN</i> -amplifizierten Neuroblastomzellen.....	77

5.4.2	Das therapeutische Potential der Aurora-A-Inhibitoren kann im transgenen Mausmodell bestätigt werden	78
5.4.3.	Andere Inhibitoren zeigen keine therapeutische Wirkung gegen das <i>MYCN</i> -amplifizierte Neuroblastom.....	80
5.4.5	Aurora-A-Inhibitoren in klinischen Studien	81
5.4.6	Therapiestrategien gegen <i>MYCN</i> -amplifizierte Tumoren.....	82
6	Methoden	86
6.1	Zellbiologische Methoden	86
6.1.1	Kultivierung und Passagierung von humanen Zelllinien.....	86
6.1.2	Einfrieren und Revitalisierung humaner Zellen	87
6.1.3	Kultivierung von neuronalen Progenitorzellen als Sphären	87
6.1.4	Transfektion von humanen Zelllinien	87
6.1.5	Retrovirale und lentivirale Infektion von humanen Zelllinien.....	89
6.1.6	Propidiumiodid-Durchflusszytometrie	90
6.1.7	Intrazelluläre Durchflusszytometrie.....	91
6.1.7	Kristallviolett-Färbung.....	91
6.1.8	Wachstumskurve.....	91
6.2	Molekularbiologische Methoden	92
6.2.1	Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA	92
6.2.2	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>Escherichia coli</i>	92
6.2.3	Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration.....	92
6.2.4	Restriktionsanalyse von DNA.....	93
6.2.5	Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente	93
6.2.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	93
6.2.7	Hybridisierung von DNA-Oligonukleotide	93
6.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	94
6.2.9	RNA-Isolation	94
6.2.10	cDNA-Synthese	95
6.2.11	Polymerase-Kettenreaktion.....	95
6.3	Proteinbiochemische Methoden	98
6.3.1	Herstellung von Proteinlysaten.....	98
6.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	98
6.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	98
6.3.4	Western Blot.....	99
6.3.5	Bestimmung der Proteinhalbwertszeit.....	100
6.3.6	<i>In vivo</i> Ubiquitinierungsanalyse.....	101
6.3.7	Immunpräzipitation	101
6.3.8	Chromatin-Immunpräzipitation	102
6.3.9	Indirekte Immunfluoreszenz.....	103
7	Materialien	105
7.1	Bakterienstämme und Zelllinien	105
7.1.1	Bakterienstämme	105
7.1.2	Humane Zelllinien	105
7.2	Kultivierungsmedien und Zusätze.....	106

7.2.1	Medien für die Bakterienkultur.....	106
7.2.2	Medien und Zusätze für die Zellkultivierung	106
7.3	Nukleinsäuren	108
7.3.1	<i>Primer</i> und DNA-Oligonucleotide.....	108
7.3.2	RNA-Oligonukleotide (siRNA)	110
7.3.3	Plasmide	111
7.4	Antikörper	113
7.5	Chemikalien	117
7.6	Kits, Standards und Enzyme	117
7.7	Puffer und Lösungen	118
7.8	Gebrauchsmaterialien	122
7.9	Geräte, Membranen und Software.....	122
8	Literaturverzeichnis	123
9	Anhang.....	147
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	147
9.2	Publikationsliste.....	150
9.3	Lebenslauf.....	151
9.4	Danksagung	152
9.5	Eidesstattliche Erklärung.....	153

1 Summary

Amplification of *MYCN*, encoding the transcription factor N-Myc, is one of the strongest clinical predictors of poor prognosis in neuroblastoma. As a member of the oncogenic Myc family, N-Myc activates genes that are involved in several biological processes like metabolism, cell cycle progression, cell growth and apoptosis. Deregulation of *MYCN* expression leads to a distinct gene expression profile and an aggressive phenotype in neuroblastoma cells.

In normal neuronal progenitor cells, N-Myc is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system. N-Myc degradation is controlled by two phospho-sites. During mitosis, Cyclin B/Cdk1 phosphorylates N-Myc at serine 62, which primes the protein for a second phosphorylation at threonine 58 via GSK3 β . This phospho-degron provides a recognition site for Fbxw7, an F-box protein of the E3-Ligase complex SCF^{Fbxw7}, leading to destabilisation of the N-Myc protein. Mitotic degradation of the N-Myc protein allows progenitor cells to exit the cell cycle and enables terminal differentiation.

Our group had previously identified *AURKA* as a gene that is required for cell growth in *MYCN*-amplified neuroblastoma cells but not essential for cells lacking *MYCN*. Here, we show that Aurora-A counteracts the Fbxw7-mediated degradation, and that the interaction between Aurora-A and N-Myc is crucial for N-Myc stabilization. Surprisingly, Aurora-A stabilizes the transcription factor in a kinase-independent manner. Interestingly, two Aurora-A-Inhibitors, MLN8054 and MLN8237, inhibit the kinase activity but also destabilize the N-Myc protein. These inhibitors induce an unusual conformation of the kinase domain and resulting in the dissociation of the N-Myc/Aurora-A complex. We demonstrate that the disruption of the complex promotes Fbxw7-mediated degradation of N-Myc. Inhibitor treatment in neuroblastoma cells leads to a cell cycle arrest in G₁-phase. In a transgenic mouse model of *MYCN*-driven neuroblastoma, treatment causes downregulation of N-Myc protein levels, differentiation of the tumor cells and complete tumor regression in the majority of tumors. Consistent with the tumor reduction, treatment with MLN8054 and MLN8234 results in an extension of survival of the transgenic mice. Collectively, these results demonstrate that the Aurora-A-Inhibitors MLN8054 and MLN8237 are potential therapeutics against *MYCN*-amplified Neuroblastoma.

2 Zusammenfassung

Im Neuroblastom ist die Amplifikation des *MYCN*-Gens, das für den Transkriptionsfaktor N-Myc kodiert, der klinisch bedeutendste Faktor für eine schlechte Prognose. Als Mitglied der onkogenen Myc-Familie induziert N-Myc die Expression von Genen, die in vielen biologischen Prozessen wie Metabolismus, Zellzyklusprogression, Zellwachstum und Apoptose eine wichtige Rolle spielen. Die Deregulation der *MYCN*-Expression führt zu einem charakteristischen Genexpressionsprofil und einem aggressiven Phenotyp in den Tumorzellen.

In normalen neuronalen Vorläuferzellen wird N-Myc gewöhnlich sehr schnell proteasomal abgebaut. Während der Mitose wird N-Myc an Serin 62 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung dient als Erkennungssignal für die Kinase GSK3 β , die die Phosphorylierung an Threonin 58 katalysiert. Das Phosphodegron wird von Fbxw7, einer Komponente des E3-Ubiquitinligase-Komplex SCF^{Fbxw7}, erkannt. Die anschließende Ubiquitinierung induziert den proteasomalen Abbau des Proteins. Die Reduktion der N-Myc-Proteinlevel ermöglicht den neuronalen Vorläuferzellen den Austritt aus dem Zellzyklus und führt zu einer terminalen Differenzierung.

In einem shRNA *Screen* konnte *AURKA* als essentielles Gen für die Proliferation *MYCN*-amplifizierter Neuroblastomzellen identifiziert werden. Eine Aurora-A-Depletion hatte jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum nicht-amplifizierter Zellen.

Während dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass Aurora-A speziell den Fbxw7-vermittelten Abbau verhindert und dadurch N-Myc stabilisiert. Für die Stabilisierung ist zwar die Interaktion der beiden Proteine von entscheidender Bedeutung, überraschenderweise spielt die Kinaseaktivität von Aurora-A jedoch keine Rolle.

Zwei spezifische Aurora-A-Inhibitoren, MLN8054 und MLN8237, sind allerdings in der Lage, nicht nur die Kinaseaktivität zu hemmen, sondern auch die N-Myc-Proteinlevel zu reduzieren. Beide Moleküle induzieren eine Konformationsänderung in der Kinasedomäne von Aurora-A. Diese ungewöhnliche strukturelle Veränderung hat zur Folge, dass der N-Myc/Aurora-A-Komplex dissoziiert und N-Myc mit Hilfe von Fbxw7 proteasomal abgebaut werden kann. In *MYCN*-amplifizierten Zellen führt diese Reduktion an N-Myc zu einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase. Die *in vitro* Daten konnten in einem transgenen Maus-Modell für das *MYCN*-amplifizierte Neuroblastom bestätigt werden. Die Behandlung mit MLN8054 und MLN8237 führte in den Tumoren ebenfalls zu einer N-Myc-Reduktion. Darüber hinaus konnte ein prozentualer Anstieg an differenzierten Zellen, die vollständige Tumorregression in der Mehrzahl der Neuroblastome und eine gesteigerte Lebenserwartung beobachtet werden.

Insgesamt zeigen die *in vitro* und *in vivo* Daten, dass die spezifischen Aurora-A-Inhibitoren ein hohes therapeutisches Potential gegen das *MYCN*-amplifizierte Neuroblastom besitzen.

3 Einleitung

3.1 Der Zellzyklus und seine Regulation

Die Zellproliferation, bestehend aus Zellwachstum und -teilung, ist die Grundlage allen Lebens. Sie ist die Basis von Fortpflanzung, Wachstum sowie der Regeneration von Gewebe. Ein erwachsener Mensch besteht aus mehr als 100 Billionen Zellen, die aus einer einzigen befruchteten Eizelle hervorgehen. Jede Sekunde sterben in unserem Körper etwa 50 Millionen Zellen. Diesen Verlust an Zellen muss der Organismus durch Zellteilung wieder ausgleichen, um den zellulären Haushalt aufrecht zu erhalten (Schüring, 2003). Allerdings kann eine unkontrollierte Zellproliferation zu Krebs führen, so dass eine strikte Regulation des Zellzyklus notwendig ist (Hartwell, 2001; Hunt, 2001; Nurse, 2001).

Der Zellzyklus besteht aus zwei Phasen, der Interphase und der M-Phase. In der Interphase wird während der Synthese-Phase (S-Phase) die genomische DNA verdoppelt. Vor und nach der S-Phase, gibt es jeweils eine *Gap*-Phase (G_1 - und G_2 -Phase). In diesen Phasen wird das Zellwachstum ermöglicht und die neu synthetisierte DNA kontrolliert. Kommt es zu Fehlern während der DNA-Replikation oder treten anormale mitogene Stimuli auf (z.B. völliges Fehlen von Wachstumsfaktoren oder Überstimulation), kann dies zu einem Zellzyklusarrest oder zur Apoptose führen. Darüber hinaus verlieren bestimmte Zellen, wie z.B. ausdifferenzierte Neuronen, ihre Fähigkeit sich zu teilen und verharren in einer speziellen G_1 -Phase, der sogenannten G_0 -Phase. Die M-Phase umfasst die Teilung des Zellkerns (Mitose-Phase) sowie die Zytokinese in zwei Tochterzellen, in der die korrekte Chromosomentrennung kontrolliert wird (Vermeulen et al., 2003).

Die Progression des Zellzykluses beruht auf Zyklinen und Zyklin-abhängigen Serin/Threonin-Kinasen (*cyclin dependent kinase*; Cdk). Die Regulation der Zyklin/Cdk-Komplexe erfolgt dabei durch mehrere Mechanismen:

1. die periodische Expression der einzelnen Zykline
2. aktivierende als auch inhibierende Phosphorylierungen
3. die Inaktivierung durch Cdk-Inhibitoren

Cdk-Inhibitoren lassen sich in zwei Familien unterteilen, zum einen in die CIP-Familie (*Cdk inhibitory proteins*) und zum anderen in die INK4-Proteine (*inhibitors of kinase 4*). Während die Mitglieder der CIP-Familie (p21^{CIP1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}) einen ternären Komplex mit Cdk1 oder Cdk2 und dem korrespondierenden Zyklin bilden, interagieren die Mitglieder der INK4-Proteine (z.B. p16^{INK4A} und p19^{INK4D}) ausschließlich mit den Cdk6 (Cdk4/Cdk6) und verhindern so die Komplexbildung mit dem Zyklin (Vermeulen et al., 2003).

In der G₁-Phase kommt es nach mitogenen Stimuli unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Myc, der die Expression von Zyklin D und Cdk4 induziert (Bouchard et al., 1999; Hermeking et al., 2000; Perez-Roger et al., 1999). Die Komplexe Zyklin D/Cdk4- bzw. Zyklin D/Cdk6 aktivieren ihrerseits die Zyklin E-Expression, indem teilweise der Tumorsuppressor Rb (*Retinoblastoma protein*) durch Phosphorylierung inaktiviert wird (Harbour et al., 1999; Malumbres and Barbacid, 2009). Die vollständige Inaktivierung von Rb sowie die Aktivierung des Zyklin E/Cdk2-Komplexes führen schließlich zum Überschreiten des Restriktionspunktes und es erfolgt der Übergang von G₁ zur S-Phase. Steigende Mengen an Zyklin A führen zum Austausch von Zyklin E und zur Bildung des Zyklin A/Cdk2-Komplexes, der die DNA-Replikation induziert. Am Ende der G₂-Phase kommt es zur Komplexbildung zwischen Cdk1 mit Zyklin B, die schließlich den Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase induziert (Malumbres and Barbacid, 2005, 2009)(Abbildung 3.1).

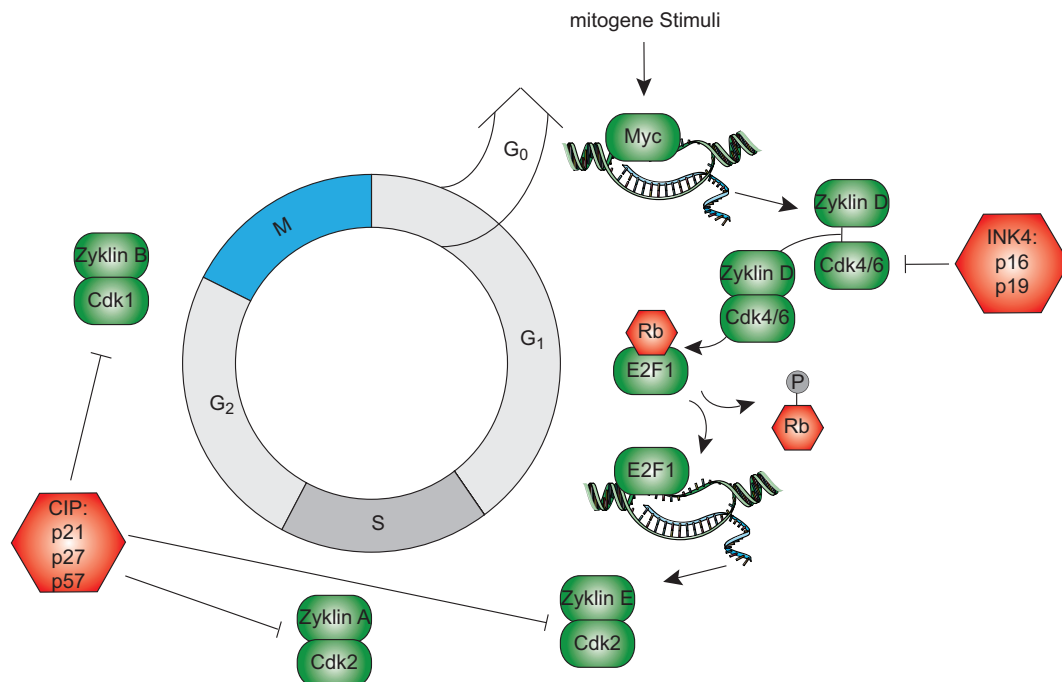


Abbildung 3.1: Der Zellzyklus

Die Regulation des Zellzyklus übernehmen Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (Cdks). Die Aktivität dieser Komplexe wird wiederum durch äußere Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren) und Cdk-Inhibitoren gesteuert. Der Transkriptionsfaktor Myc spielt bei der Progression des G₁-S-Übergangs eine wesentliche Rolle (In rot: Zellzyklus inhibierende Proteine; in grün: Zellzyklus fördernde Proteine).

Kommt es zu einer fehlerhaften Regulation der Zykline und/oder der Cdks kann dies zu einer unkontrollierten Proliferation und zur Tumorentstehung führen. Ein attraktiver Ansatzpunkt für eine Krebstherapie könnte die Inhibierung von Cdk2 sein. Es zeigte sich, dass Cdk2 für die normale Entwicklung nicht essentiell ist, aber eine Cdk2-Inhibition die

Proliferation in einigen Tumorzellen stoppen kann (Berthet et al., 2003; Martin et al., 2005; Ortega et al., 2003; Tetsu and McCormick, 2003).

Centrosomenzyklus

Die zentrale Aufgabe der mitotischen Zelle ist, die Trennung der Schwesterchromatiden und deren korrekte Aufteilung auf zwei Tochterzellen. Dies erfolgt in mehreren Schritten, die nach dem zytologischen Erscheinungsbild in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese unterteilt sind.

Der korrekte Ablauf erfolgt dabei mit Hilfe des Mikrotubuli organisierenden Zentrums (MTOC), dem sogenannten Centrosom. Dieses Zellorganell besteht aus einem Centriolenpaar mit Mutter- und Tochtercentriole, das von einer elektronendichten, pericentriolären Matrix (PCM) umgeben ist. Die zentrale Komponente sind γ -Tubulinringkomplexe (γ -TuRC), die die Nukleation der Mikrotubuli induzieren. Um Chromosomenanomalien zu vermeiden, durchläuft das Centrosom einen speziellen Zyklus, der mit dem Chromosomenzyklus exakt abgestimmt ist. In der G₁-Phase besitzen Zellen zunächst ein Centrosom, das sich während der S-Phase dupliziert. Nach Elongation der Tochtercentriole kommt es durch Akkumulation von γ -TuRC zur Reifung des Centrosoms, wodurch die Kapazität der Mikrotubuli-Nukleation erhöht wird. Am Ende der G₂-Phase, nachdem sich zwei Centrosome mit jeweils zwei Centriolen gebildet haben, kommt es in der Prophase zur Centrosomenseparation. Die in entgegengesetzter Richtung wandernden Centrosome bilden in der (Pro-)Metaphase die Spindelpole, der entstehenden Mitosespindel, die für die Auftrennung der Tochterchromosomen verantwortlich ist (Bettencourt-Dias and Glover, 2007)

Als ein wichtiger Regulator des Centrosomenzyklus konnte ebenfalls der Zyklin E/Cdk2-Komplex identifiziert werden. Studien in *Xenopus* zeigten, dass die Komplex-Inhibition entweder durch p21 oder durch p27 die Centriol-Duplikation verhindern kann (Hinchcliffe et al., 1999; Lacey et al., 1999).

Ferner spielen für die Centrosomenreifung eine große Anzahl an Proteinen (Plk1, Hef1, TPX2, Bora, NDEL1 und LATS2) eine entscheidende Rolle, die entweder Substrate von Aurora-A sind oder Aurora-A zum Centrosom rekrutieren. Dies zeigt die enorme Bedeutung von Aurora-A während des Centrosomenzyklus (Abschnitt 3.4)(De Luca et al., 2006; Hutterer et al., 2006; Lane and Nigg, 1996; Mori et al., 2007; Pugacheva and Golemis, 2005; Toji et al., 2004).

Fehler im Centrosomenzyklus aufgrund einer Deregulation von Aurora-A kann zu einer Centrosomenamplifikation (CA) führen. Als eine Hauptursache der genomischen Instabilität ist CA am progressiven Übergang von frühen Stadien zu malignen Tumoren beteiligt und kann als Kennzeichen von Krebs ("*Hallmark of cancer cells*") angesehen werden (Chan, 2011; Meraldi et al., 2002).

Im Neuroblastom (Abschnitt 3.2) konnte eine signifikante Korrelation zwischen Centrosomenamplifikation und einer *MYCN*-Überexpression (Abschnitt 3.3) beobachtet werden. Bestrahlte man Neuroblastomzelllinien führte dies in *MYCN*-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zu einer verstärkten Hyperamplifikation der Centrosome. Ursache dieser CA war eine durch N-Myc induzierte Expression der E3-Ligase MDM2, die ihrerseits p53 runterregulierte (Slack et al., 2007; Sugihara et al., 2004).

3.2 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein solider Tumor des sympathischen Nervensystems. Mit einer Inzidenz von etwa 10 pro $1 \cdot 10^6$ Kindern unter 15 Jahren ist es eine der häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter (Maris, 2010). Der Tumor tritt meist sporadisch auf. Nur lediglich 1-2% der Fälle sind auf eine familiäre Prädisposition zurückzuführen (Kushner et al., 1986; Maris et al., 1996). Das Neuroblastom entwickelt sich aus neuronalen Vorläuferzellen der Neuralleiste und ist lokalisiert im Abdomen, in der Nebenniere, im Brustkorb oder in der Halsregion. Darüber hinaus kann der maligne Tumor unter anderem auch in Lymphknoten, Knochen, Knochenmark und Leber metastasieren (Brodeur, 2003) (Abbildung 3.2). Je nach Ausbreitungsstadium und Lokalisation des diagnostizierten Tumors werden 6 Stadien (S1, S2A, S2B, S3, S4 und S4S) unterschieden, die nach dem „*International Neuroblastoma Staging System (INSS)*“ wie folgt unterteilt sind:

- Stadium 1: Ausschließlich Primärtumor diagnostiziert
- Stadium 2A: Tumor infiltriert das Nachbargewebe ohne die Lymphknoten zu befallen
- Stadium 2B: Tumor infiltriert das Nachbargewebe mit homolateralem Lymphknotenbefall
- Stadium 3: Tumor breitet sich über die Mittellinie aus und kann zudem beidseitig regionale Lymphknoten infiltrieren
- Stadium 4: Hämato gene Metastasen in den benannten Körperregionen (siehe Text)
- Stadium 4S Primärtumor mit teilweise Fernmetastasen wie z.B. in der Leber und zum geringen Teil auch im Knochenmark

Allerdings kann aufgrund der Lokalisation und Ausbreitung des Tumors keine exakte Prognose für die Patienten getroffen werden. Andere Faktoren wie Alter des Patienten, sowie molekulare, zelluläre und genetische Merkmale des Tumors spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle (Abschnitt 3.2.1). So zeigt sich, dass Patienten mit einem Neuroblastom Stadium 4S trotz Fernmetastasen eine hohe Wahrscheinlichkeit einer spontanen Tumorregression haben. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine weitere Einteilung zur verlässlicheren Prognose eingeführt. Mit Hilfe des Shimada Index, bei der eine histopathologische Klassifikation vorgenommen wird, lassen sich die Tumore mit günstiger und schlechter Prognose exakter gruppieren. Hierbei wird das Alter des Patienten, der Differenzierungsgrad sowie der Mitose-Karyorrhexis-Index bestimmt und anhand dieser Daten eine Prognose erstellt (Shimada et al., 1999; Shimada et al., 1984).

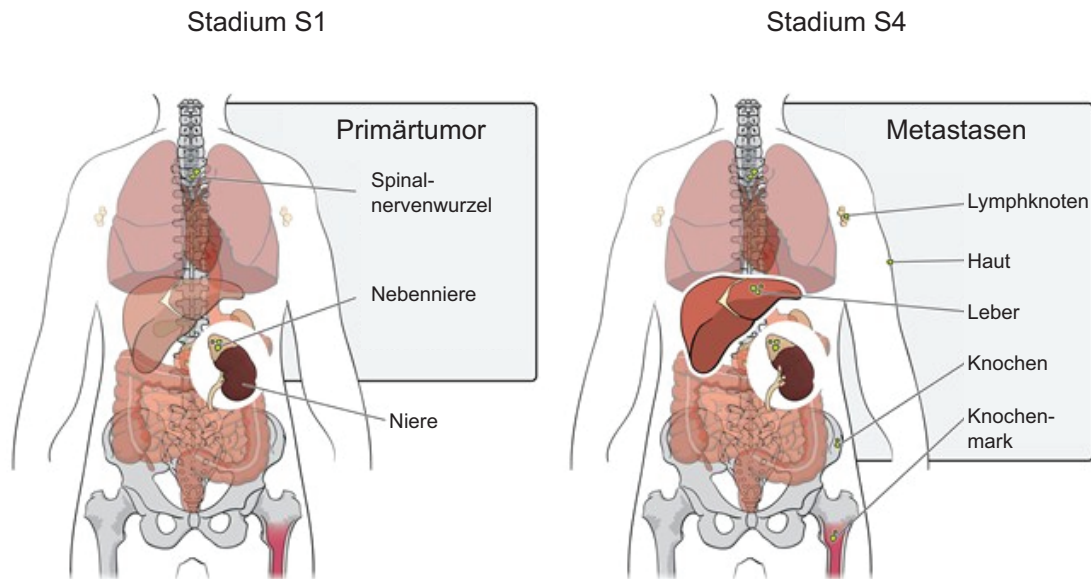


Abbildung 3.2: Lokalisation des Primärtumors und der Metastasen

Die Symptomatik des Neuroblastoms wird durch die Lokalisation des Tumors bestimmt. Der Primärtumor ist entlang des Grenzstrangs lokalisiert und metastasiert häufig in die Lymphknoten, Knochen und Knochenmark. (Modifiziert nach (<http://pedsurg.ucsf.edu/conditions-procedures/pediatric-cancer.aspx>))

3.2.1 Prognostische Faktoren

3.2.1.1 Alter des Patienten

Trotz der sehr heterogenen Erkrankung können einige prognostisch wichtige Faktoren ausgemacht werden. So spielt zum Beispiel das Patientenalter eine entscheidende Rolle. Das mediane Alter der Diagnose für eine Neuroblastomerkrankung liegt bei ca. 15 Monaten. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug nach der Neuroblastomstudie NB97 von 2002 $62 \pm 3\%$. Dabei zeigte sich eine altersabhängige Überlebenswahrscheinlichkeit. In allen sechs Stadien des INSS waren die Überlebenschancen im Säuglingsalter (≤ 12 Monate) günstiger. Darüber hinaus waren die Neuroblastompatienten unter einem Jahr mehrheitlich (87 %) in den prognostisch günstigeren Stadien (1, 2, 3 und 4S) anzutreffen, wohingegen ältere Patienten (≥ 12 Monate) vorwiegend (55 %) im Stadium 4 eingruppiert wurden (NB97, 2002).

3.2.1.2 Erbliche Mutationen, sowie somatische Mutationen

Wie bereits erwähnt, ist eine erblich bedingte Neuroblastomerkrankung relativ selten. Die erste familiäre Prädisposition, die identifiziert wurde, ist die Mutation des Gens *PHOX2B* (*paired-like homeobox 2b*). Das Gen codiert für den Transkriptionsfaktor PHOX2B, der den Zellzyklusaustritt, sowie die Differenzierung von Vorläuferzellen der Neuralleiste und die Neuronenbildung begünstigt (Raabe et al., 2008; Trochet et al., 2005).

Eine weitere Mutation, die sowohl erblich als auch spontan in somatischen Zellen auftreten kann, ist die Aktivierung der Kinase ALK (*anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*). Eine kontinuierliche Aktivierung des ALK-Signalweges begünstigt nicht nur die

Pathogenese des Neuroblastoms sondern auch einer Vielzahl von weiteren Krebserkrankungen, wie das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) oder den anaplastischen Schilddrüsenkrebs (ATC) und könnte demnach eine sogenannte "driver"-Mutation für viele Tumorarten sein. (Chen et al., 2008; George et al., 2008; Hallberg and Palmer, 2013). Neben Mutationen, die die Aktivität der Kinase beeinflussen, konnte zudem gezeigt werden, dass eine ALK-Überexpression bzw -Amplifikation zu einer schlechten Prognose für Neuroblastompatienten führt (Wang et al., 2013).

Aktuelle Forschungsergebnisse identifizierten LIN28B als einen weiteren prognostischen Parameter im Neuroblastom. So ist eine LIN28B-Überexpression assoziiert mit einer geringen Überlebenswahrscheinlichkeit und kann im Mausmodell Neuroblastom-ähnliche Tumore induzieren (Diskin et al., 2012; Molenaar et al., 2012).

3.2.1.3 Chromosomenanomalien

Die Anzahl der Chromosomen und damit der Grad der genomischen Stabilität ist ein weiterer prognostischer Parameter im Neuroblastom. Im Allgemeinen sind Tumorzellen von Neuroblastompatienten mit günstiger Prognose hyperdiploid oder nahezu triploid (Kaneko et al., 1987), obwohl dies auch stark vom Patientenalter abhängig ist.

Des Weiteren konnten im Neuroblastom einige Chromosomenanomalien identifiziert werden, die sich negativ auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten auswirken. Dabei kommt es bei fragilen genomischen Regionen sowohl zu Deletionen (z.B. Chromosom 1p und 11q) als auch zu Amplifikationen (z.B. *MYCN*-Amplifikation) (Brodeur et al., 1981; Guo et al., 1999; Seeger et al., 1985).

Deletion von Chromosom 1p und Chromosom 11q

Die Deletion von Chromosomenteilstücken kann schwerwiegende Auswirkungen auf die genomische Integrität haben und zu einem Verlust von Tumorsuppressorgenen führen. Dies kann die Tumorgenese begünstigen.

Eine häufige Abnormalität ist die Deletion des Teilstücks des kurzen Arms von Chromosom 1, die in über 20 % aller Neuroblastomfälle auftritt (Brodeur and Fong, 1989). Diese Chromosomenanomalie ist häufig assoziiert mit der Amplifikation von *MYCN* und kommt zusammen mit der *MYCN*-Amplifikation bei ca. 70 % der aggressiven, malignen Tumore vor. Allerdings ist die Deletion auch unabhängig von der Amplifikation von *MYCN* mit einer schlechten Prognose assoziiert (Attiyeh et al., 2005; Fong et al., 1989). Dies deutet darauf hin, dass auch andere Gene als *MYCN* bei der Pathogenese des Neuroblastoms eine Rolle spielen.

Eines der identifizierten deletierten Gene ist der Tumorsuppressor *CDH5* (*chromodomain helicase DNA binding domain 5*). Niedrige *CDH5*-Expressionslevel sind assoziiert mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und schlechter Prognose. Darüber hinaus konnte eine Korrelation von *MYCN*-Amplifikation und Hypermethylierung des *CDH5*-Promoters identifiziert werden (Fujita et al., 2008; Koyama et al., 2012).

Eine weitere Chromosomenabnormalität, die stark mit einer schlechten Patientenprognose korreliert, ist die Deletion des Chromosomenfragments 11q. Diese tritt mit einer Häufigkeit von 40-45 % auf und führt unter anderem zu einer Verringerung

der *CADM1*-Expression. *CADM1* kodiert für ein Adhäsionsmolekül und fungiert als Regulator der Zellproliferation (Guo et al., 1999; Nowacki et al., 2008).

Amplifikation des Gens *MYCN*

Der bedeutendste prognostische Parameter ist die Amplifikation des Gens *MYCN*. Bei einer *MYCN*-Amplifikation kommt es einerseits zur Ausbildung von ringförmigen, extrachromosomalen Strukturen (*double minute*) oder andererseits zur Entstehung einer integrierten chromosomalen Region (*homogeneously staining region*). Meist liegt diese neu integrierte Region auf einem anderen Chromosom als das ursprünglich auf Chromosom 2 lokalisierte *MYCN*-Gen. Die Amplifikation kann sich bis auf über 1MB (Megabasen) erstrecken und damit die Expressionsrate des Transkriptionsfaktors um durchschnittlich 100-fach erhöhen. Je nach Studie liegt der prozentuale Anteil *MYCN*-amplifizierter Tumore bei ca. 20-30 % und führt in allen Stadien des INSS zu einer signifikanten Reduktion der Überlebenswahrscheinlichkeit von Neuroblastompatienten (Maris and Matthay, 1999; Schwab et al., 2003)(Abbildung 3.3).

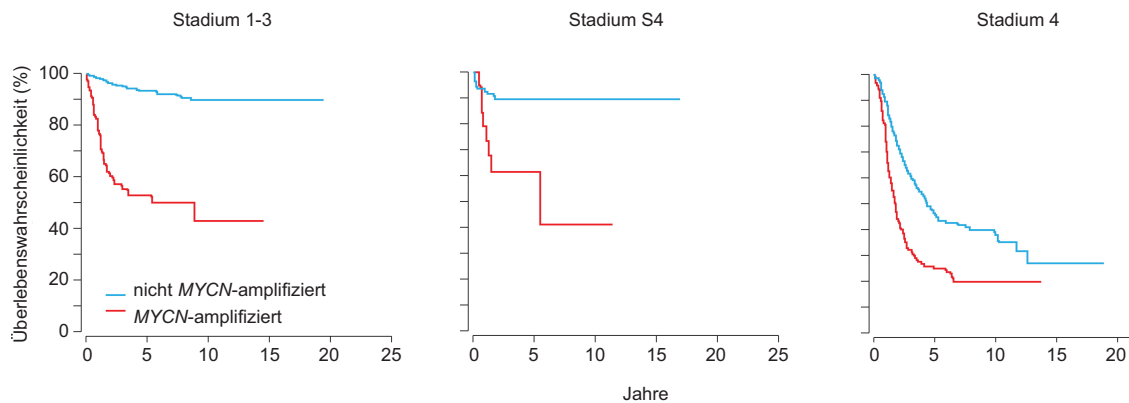


Abbildung 3.3: Kaplan-Meier-Kurven von Neuroblastompatienten in Abhängigkeit der *MYCN*-Amplifikation

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Neuroblastompatienten ist abhängig von der *MYCN*-Amplifikation des Tumors (Modifiziert nach (Schwab et al., 2003)).

3.3 Der Transkriptionsfaktor N-Myc

3.3.1 Die Transkriptionsfaktorfamilie der Myc-Proteine

Seit der Entdeckung des zellulären Ursprungs retroviraler Onkogene und dem Beweis, dass es sich bei Krebs um eine genetische Erkrankung handelt (Bishop, 1989; Varmus, 1989), ist *MYC* eines der bedeutendsten Onkogene in der Tumorbiologie. So sind alle drei Mitglieder dieser evolutionär hochkonservierten Transkriptionsfaktorfamilie, c-Myc, N-Myc und L-Myc, mit der Pathogenese humaner Krebserkrankungen assoziiert. Während die Deregulation von c-Myc in einer Vielzahl verschiedener Neoplasien vorkommt, ist die Amplifikation bzw. Überexpression von N- und L-Myc größtenteils auf neuroendokrine

bzw. bronchiale Tumoren beschränkt (Tabelle 3.1)(Beltran et al., 2011; Brodeur et al., 1984; Gabay et al., 2014; Kim et al., 2006).

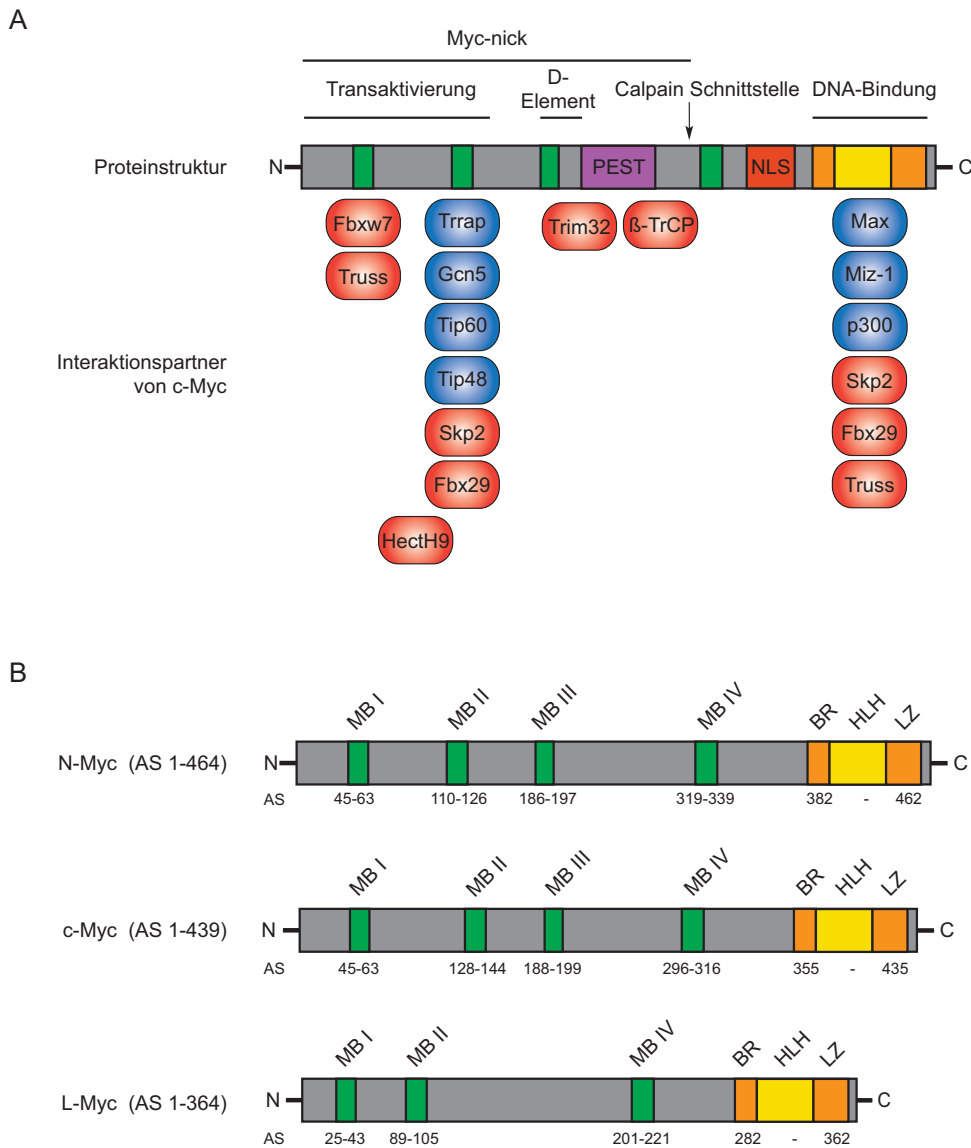


Abbildung 3.4: Die Proteinstrukturen der humanen Myc-Transkriptionsfaktorfamilie

- A. Allgemeine Struktur des Myc-Proteins mit seinen Bindungspartnern. Im mittleren Segment befinden sich ein D-Element und eine PEST-Sequenz, die eine wesentliche Rolle bei der proteolytischen Degradation des Proteins spielen. Die Spaltung des Proteins durch Calpain führt zu einem verkürzten zytoplasmatischen Protein (Myc-nick). Dargestellt sind einige Bindungspartner, die zusammen mit Myc die Transkription regulieren (blau) In rot sind E3-Ubiquitinligasen, die Myc ubiquitinieren, dargestellt.
- B. Die Proteinstruktur der unterschiedlichen Myc Proteine. (MB = Myc-Box; NLS = Kernlokalisierungssignal, BR = basische Region; HLH = Helix-Loop-Helix; LZ = Leuzin Zipper;) (Modifiziert nach (Conacci-Sorrell et al., 2014; Farrell and Sears, 2014))

Ein charakteristisches Merkmal der Transkriptionsfaktorfamilie ist die basische Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper (bHLH/LZ)-Domäne. Diese C-terminale Domäne vermittelt auch die Heterodimerisierung mit dem bHLH/LZ-Partnerprotein Max. Die Interaktion ermöglicht die sequenz-spezifische DNA-Bindung an sogenannte kanonische (5'-CACGTG-3') bzw. nicht-kanonische (5'-CANNTG-3') E-Boxen in Promotoren von Myc-Zielgenen. Neben der Myc/Max-Interaktion bindet Myc über die Domäne an die Proteine p300, SKP2 und Miz1 (*Myc interacting Zinc finger 1*) (Adhikary and Eilers, 2005; Peukert et al., 1997). In der N-terminalen Domäne befinden sich einige hochkonservierte Regionen (Myc-Box I – IV), die die Aktivität und Funktion von Myc beeinflussen. Während die Myc-Box I den proteasomalen Abbau reguliert (Sears et al., 2000), dient die Myc-Box II zur Interaktion mit Kofaktoren (z.B. Trrap, Tip48, Tip49, Tip60 und Gcn5), die die Transkription von Myc-Zielgenen begünstigen (Conacci-Sorrell et al., 2014). Darüber hinaus spielen die Myc-Boxen eine entscheidende Rolle bei der Myc-induzierten Zelltransformation und Apoptose (Cowling et al., 2006; Kato et al., 1990). Die nukleäre Lokalisation des Transkriptionsfaktors wird durch das Kernlokalisierungssignal vermittelt (Dang and Lee, 1988). Demgegenüber führt eine Calpain-Schnittstelle in c-Myc zu einem zytoplasmatischen Spaltprodukt (*Myc-nick*), das die zytoplasmatische Reorganisation und Differenzierung fördert (Conacci-Sorrell et al., 2010). Die PEST-Sequenz (reich an: Prolin, Glutamat, Serin und Threonin) und das D-Element im mittleren Segment des Proteins spielen beim Abbau des Transkriptionsfaktors eine wesentliche Rolle (Gregory and Hann, 2000) (Abbildung 3.4).

3.3.2 Transkriptionelle Regulation durch die Myc-Familie

Als Transkriptionsfaktor ist Myc in der Lage sowohl Gene zu aktivieren als auch zu reprimieren. Durch ChIP-Seq-Analysen zeigte sich, dass tausende Bindestellen im Genom von Myc besetzt sind (Guccione et al., 2006; Sabo and Amati, 2014; Walz et al., 2014) und etwa 15 % aller humanen Gene durch Myc reguliert werden (Dang et al., 2006).

Myc kann verschiedene Phasen der Transkription beeinflussen und dadurch Gene aktivieren. Zum einen reguliert Myc die Rekrutierung der RNA-Polymerase II zu den Promotoren und es kommt zur Steigerung der Initiationsrate der Transkription (Walz et al., 2014). Zum anderen wird die Elongation durch die Rekrutierung des Elongationsfaktors p-Tefb induziert. Dabei phosphoryliert p-Tefb die RNA-Polymerase II, die nach der Initiation in der Nähe des Promotors pausiert ("*RNA-Pol II pause release*") (Rahl et al., 2010).

Vor kurzem wurde ein neues Modell ("*transcriptional amplification model*" oder "*nonlinear amplifier model*") beschrieben, nachdem Myc anstelle von definierten Zielgenen alle bereits aktiven Gene einer Zelle verstärkt transkribiert (Lin et al., 2012; Nie et al., 2012). Das "amplifier" Modell kann allerdings nicht die direkte Repression von Zielgenen und das spezifische Genexpressionsmuster in Myc-transformierten Zellen erklären.

Wie bereits erwähnt, vermittelt die Heterodimerisierung mit dem Partnerprotein Max die Interaktion an spezifische E-Box-Sequenzen. Durch Rekrutierung von Kofaktoren (z.B. die

Histonacetyltransferasen CBP, Gcn5 und Tip60 und die ATPasen Tip48/Tip49) über das Adapterprotein Trrap kann die transkriptionelle Aktivierung eingeleitet werden. Dadurch kommt es zur Acetylierung von Histonen und zu einer offenen Chromatinstruktur (Adhikary and Eilers, 2005).

Die bekannteste Funktion als Repressor ist assoziiert mit einer Antagonisation anderer Transkriptionsfaktoren wie Miz1 und Sp1/Sp3 (Gartel et al., 2001; Staller et al., 2001).

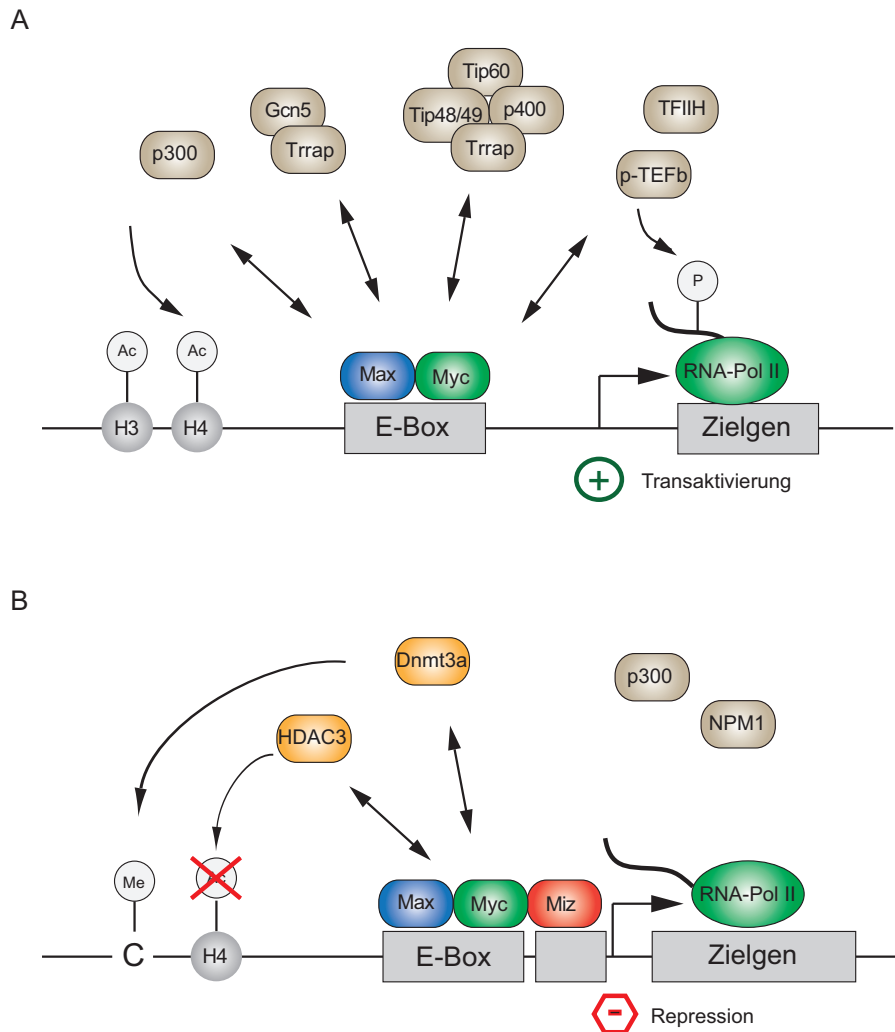


Abbildung 3.5: Modell der transkriptionellen Regulierung durch Myc

- A. Die Aktivierung von Myc-Zielgenen. Myc bindet zusammen mit Max an DNA-Sequenzen (E-Box) in der Promotorregion von Zielgenen. Die Rekrutierung von Kofaktoren führt zur transkriptionellen Aktivierung.
- B. Repression von Miz1-Zielgenen. Die Bindung von Myc an Miz1 führt zur Dissoziation von NPM1 und p300. Des Weiteren kann Myc die Kofaktoren Dnmt3a und HDAC3 rekrutieren. Dies induziert die Repression von Miz1-Zielgenen. (Modifiziert nach (Adhikary and Eilers, 2005))

Bei niedrigen Myc Levels aktiviert Miz1 Zielgene, die Einfluss auf den Zellzyklus, die Autophagie und die Zelladhäsion ausüben (Gebhardt et al., 2006; Staller et al., 2001; Wolf

et al., 2013). Dagegen führen hohe Myc-Level zur Bindung an Miz1 und zur gleichzeitigen Dissoziation der Koaktivatoren p300 und NPM1 (*nucleophosmin*) (Wanzel et al., 2008). Darüber hinaus kann Myc weitere Kofaktoren (Dnmt3a und HDAC3) rekrutieren, die entweder die DNA-Methylierung oder die Histondeacetylierung begünstigen (Brenner et al., 2005; Kurland and Tansey, 2008). Die Folge ist die Repression der Miz1-Zielgene (Abbildung 3.5)

3.3.3 Biologische Funktionen von N-Myc im Neuroblastom

Im Jahr 1983 wurde erstmalig das Protoonkogen *MYCN* als amplifizierte Region im Neuroblastom beschrieben (Kohl et al., 1983; Schwab et al., 1983). Die große Sequenzhomologie zwischen c- und N-Myc lässt darauf schließen, dass beide Proteine redundante Funktionen ausüben. So wurde gezeigt, dass N-Myc ebenso die Transformation und Proliferation von Fibroblasten fördert wie das homologe c-Myc-Protein (Schwab 1985; Yancupoulos 1985, Goldfarb 1988). Wie c-Myc ist auch N-Myc in der Lage Fibroblasten in iPSCs (induzierte pluripotente Stammzellen) zu reprogrammieren (Nakagawa and Yamanaka, 2010). So induziert N-Myc die Expression von Genen wie *KLF2*, *KLF4* und *LIN28B*, die die Pluripotenz und Selbsterneuerung (*self-renewal*) von Zellen fördern (Cotterman and Knoepfler, 2009). Demgegenüber arretieren und differenzieren Neuroblastomzellen nach einer Behandlung mit all-*trans*-Retinsäure (RA), da dies zu einer Reduktion der *MYCN*-Expression führt (Thiele et al., 1985). Eine exogene *MYCN*-Überexpression verhindert die RA-induzierte Arretierung und Differenzierung (Peverali et al., 1996).

Sowohl der c-Myc- als auch der N-Myc-*Knock out* (KO) sind embryonal letal. Die Unfähigkeit zur gegenseitigen Kompensation ist wahrscheinlich der unterschiedlichen Expression in den einzelnen Organen zuzuschreiben, da eine *MYCN*-Expression (*MYCN knock-in*) aus dem c-Myc-Lokus die embryonale Letalität von c-Myc KO-Mäusen verhindern kann (Malynn et al., 2000). Während *MYCN* hauptsächlich im Laufe der embryonalen Entwicklung und gewebespezifisch (z.B. Vorder- und Hinterhirn sowie Nieren) exprimiert wird, ist die *MYC*-Expression während der Embryogenese ubiquitär (Huang and Weiss, 2013; Mugrauer et al., 1988).

Die unkontrollierte Expression von *MYCN* spielt für die Pathogenese des Neuroblastoms eine entscheidende Rolle (Abschnitt 3.2.1.2). Im Mausmodell konnte durch eine ektopische *MYCN*-Überexpression in der Neuralleiste die Bildung von aggressiven Neuroblastomen induziert werden (Weiss et al., 1997). Die *MYCN*-Amplifikation im Neuroblastom führt ebenfalls zu einer schlechten Prognose und zu einem aggressiven Phänotyp. So korreliert das invasive und metastatische Verhalten der Tumore mit der *MYCN*-Expression (Benard, 1995; Goodman et al., 1997; Zaizen et al., 1993). Durch Repression der Expression von Integrin $\alpha 1$ und $\beta 1$ fördert N-Myc die Ablösung der Zellen aus dem Zellverband und ermöglicht dadurch die Zellmigration und -invasion (Tanaka and Fukuzawa, 2008; van Golen et al., 2003). Des Weiteren induziert N-Myc die Expression der Kinase FAK (*focal adhesion kinase*), einem wichtigen Regulator des Integrinsignalweges und Regulator für Migration and Metastasierung (Beierle et al., 2007;

Megison et al., 2013). Schließlich induziert der Transkriptionsfaktor die Expression der *micro*-RNA miR-9 und inhibiert so die E-cadherin-Expression. Dies führt zu einer verstärkten Zellmobilität und -invasion (Ma et al., 2010).

Die Angiogenese wird ebenfalls durch N-Myc beeinflusst. So korreliert eine hohe Vaskularität im Tumorgewebe mit einer *MYCN*-Amplifikation und einer schlechten Prognose im Neuroblastom. Mögliche Ursachen sind unter anderem die Induktion der Expression von proangiogenen Faktoren, wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Kang et al., 2008) und die Repression von wachstumshemmenden Faktoren (Hatzi et al., 2000).

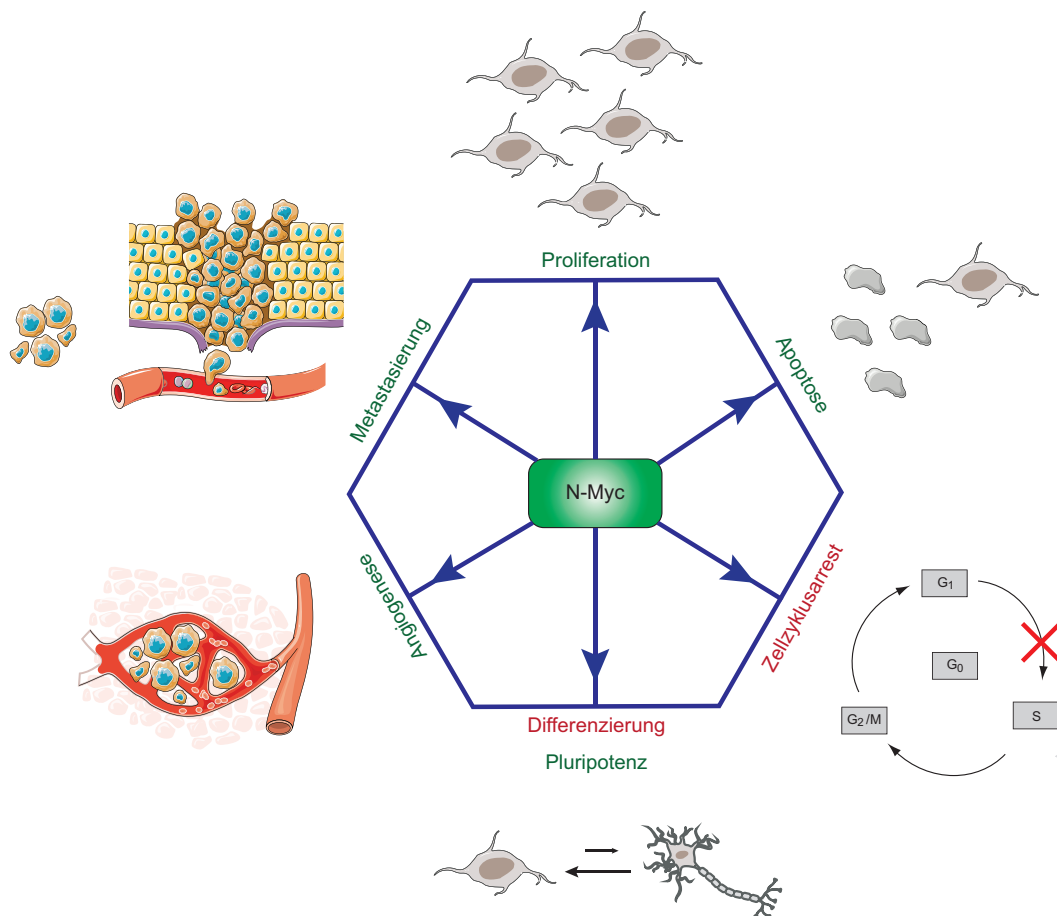


Abbildung 3.6: N-Myc beeinflusst wichtige biologische Prozesse

Der Transkriptionsfaktor kann durch Expression seiner Zielgene biologische Prozesse, wie Proliferation, Apoptose und Progression des Zellzyklus im Neuroblastom regulieren (Modifiziert nach (Huang and Weiss, 2013)).

Der Transkriptionsfaktor ist zudem in der Lage die Immunantwort gegen Neuroblastomzellen zu unterdrücken. N-Myc reprimiert die Expression des Chemokins MCP-1/CCL2 (*monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2*) und verhindert dadurch die Chemoattraktion von natürlichen Killerzellen (Song et al., 2007).

Schließlich fördert die *MYCN*-Überexpression das Wachstum nicht-amplifizierter Neuroblastomzellen und führt zu einem aggressiveren Phänotyp, wie im Mausmodell bewiesen werden konnte (Schweigerer et al., 1990). Aus therapeutischer Sicht ist die Tatsache interessant, dass speziell *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzellen in der Lage sind, den G₁-Arrest trotz Bestrahlung und p21-Aktivierung zu überwinden (Tweddle et al., 2001). Allerdings kann die Deregulation von N-Myc, ähnlich zur Myc-Überexpression, zur erhöhten Sensibilität gegenüber proapoptotischen Stimuli führen (Evan et al., 1992; Fulda et al., 1999, 2000).

3.3.4 Regulation und Deregulation von N-Myc

Aufgrund der enormen biologischen Relevanz ist es notwendig, dass N-Myc strikt reguliert wird. Im Gegensatz zu c-Myc wird N-Myc hauptsächlich während der Embryogenese in wenigen Geweben exprimiert (Mugrauer et al., 1988). Aus diesem Grund ist vermutlich die Deregulation von N-Myc auf einzelne maligne Tumore begrenzt (Tabelle 3.1). Ursache der erhöhten Aktivität ist in den meisten Fällen eine *MYCN*-Amplifikation, die zu einer schlechten Prognose für den Patienten führt (Tabelle 3.1). Neben der *MYCN*-Amplifikation kann in einigen Tumoren auch eine Überexpression des Transkriptionsfaktors vorliegen, wie im Fall des Mammakarzinoms und des Glioblastoms beschrieben wurde (Tabelle 3.1).

Die *MYCN*-Überexpression kann unterschiedliche Ursachen haben. So wird N-Myc durch diverse Stimuli aktiviert und auf verschiedenen Ebenen reguliert.

Es zeigt sich, dass einige Signalwege, die während der embryonalen Entwicklung aktiv sind, mit der Regulation von *MYCN* assoziiert sind.

So hat der Shh (*Sonic hedgehog*)-Signalweg einen positiven Einfluss auf die Expression des Protoonkogens, so dass wiederum die Zellzyklusprogression in neuronalen Körner-Vorläuferzellen des Kleinhirns gefördert wird (Kenney et al., 2003). Im Gegensatz dazu inhibiert der TGF β -Signalweg die *MYCN*-Expression und reguliert so die trachio-bronchiale Entwicklung der Lunge (Serra et al., 1994). Ein weiterer negativer Regulator der *MYCN*-Expression ist die all-*trans*-Retinsäure, die die Proliferation und Differenzierung von Neuroblastomzellen beeinflusst (Thiele et al., 1985).

Als Transkriptionsfaktoren, die die Expression von N-Myc induzieren, konnten die Proteine E2F1/E2F2/E2F3 sowie Sp1/Sp3 identifiziert werden (Kramps et al., 2004; Strieder and Lutz, 2003).

Auf post-transkriptioneller Ebene wird das *MYCN*-Expressionslevel durch das RNA-bindende Protein HuD positiv reguliert, indem es die *MYCN*-mRNA stabilisiert (Manohar et al., 2002). Dagegen reprimiert die *micro*-RNA miR-34a, die auf dem Chromosomenabschnitt 1p36 lokalisiert ist, die Expression des Transkriptionsfaktors (Wei et al., 2008). Interessanterweise ist dieser Locus häufig im *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom deletiert (Abschnitt 3.2.1.3)(Wei et al., 2008).

Tabelle 3.1 Übersicht über Tumoren mit einer *MYCN*-Überexpression (Modifiziert nach (Beltran, 2014))

Tumor	Häufigkeit der <i>MYCN</i> -Überexpression	Klinische Implikation	Referenz
Neuroblastom	Amplifikation in 20 %	Schlechte Prognose	(Brodeur et al., 1984, 1985)
Medulloblastom	Amplifikation in 5 %	Schlechte Prognose	(Swartling et al., 2010)
Glioblastom	Überexpression in manchen Subtypen	Histon 3.3 Mutation ist assoziiert mit <i>MYCN</i> -Überexpression	(Bjerke et al., 2013)
Retinoblastom	Amplifikation in < 5 %	Schlechte Prognose	(Lee et al., 1984; Rushlow et al., 2013)
alveoläres Rhabdomyosarkom	Amplifikation in 25 % Überexpression in 55 %	Korreliert mit PAX3-FOXO1/PAX7-FOXO1-Fusionsgenen, schlechte Prognose	(Nau et al., 1986; Tonelli et al., 2012)
Kleinzelliges Lungenkarzinom	Amplifikation in 15-20 %	Schlechte Resonanz auf die Chemotherapie	(Funa et al., 1987; Nau et al., 1986)
Prostatakarzinom	Amplifikation in 40 % der neuroendokrinen Tumoren, 5 % der Prostata-Adenokarzinome	klinisch aggressive Tumore	(Beltran et al., 2011; Mosquera et al., 2013)
Mammakarzinom	Überexpression in manchen Subtypen	Schlechte Prognose	(Mizukami et al., 1995)

Die Aktivität der Myc-Proteine kann ebenfalls durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, Acetylierungen und Ubiquitinierungen beeinflusst werden. (Vervoorts et al., 2006). Mehrere Kofaktoren von Myc (Abschnitt 3.3.1) besitzen z.B. eine Histon-Acetyltransferase-Aktivität, die für die Umstrukturierung des Chromatins verantwortlich ist. Studien konnten allerdings zeigen, dass Myc nicht nur die Histonacetyltransferasen rekrutiert, sondern auch selbst durch p300, Tip60 und Gcn5 *in vitro* acetyliert werden kann (Patel et al., 2004; Zhang et al., 2005). Acetylierte Lysinreste könnten als Plattform für die Interaktion mit anderen Proteinen, wie z.B. BET-Proteine, dienen (Zeng and Zhou, 2002).

Eine der am besten charakterisierten posttranslationalen Modifikationen in Myc ist die Phosphorylierung an Threonin 58 und an Serin 62 in der Myc-Box I (Henriksson et al., 1993). Die konservierten Phosphorylierungsstellen regulieren sowohl in N-Myc als auch in c-Myc den proteasomalen Abbau.

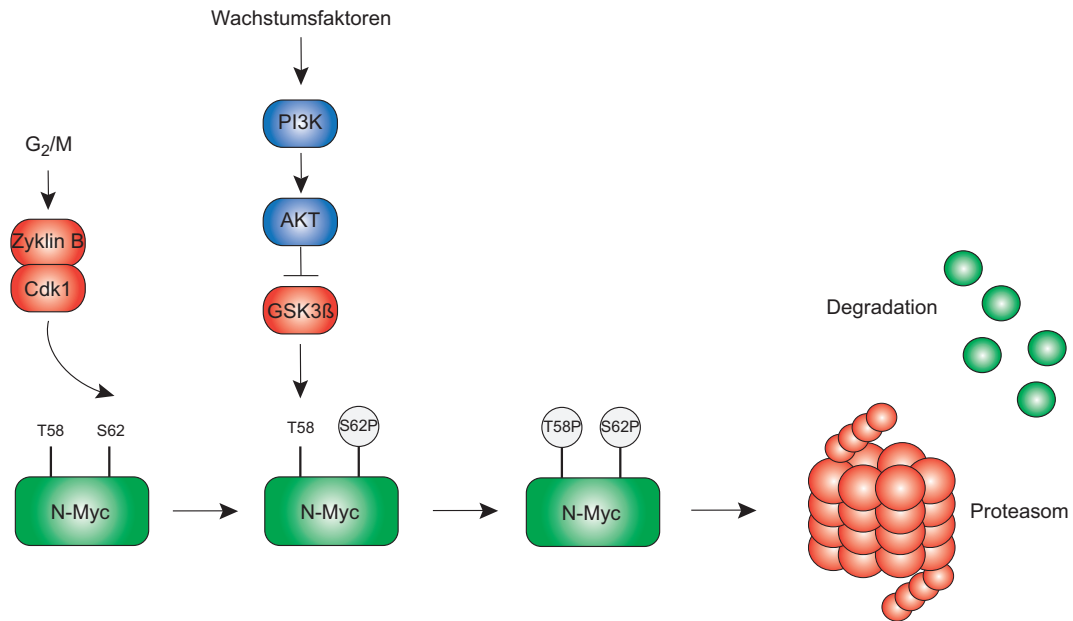


Abbildung 3.7: Der N-Myc-Proteinabbau

Während der Mitose wird N-Myc durch den Zyklin B/Cdk1-Komplex an Serin 62 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ermöglicht eine zweite Phosphorylierung an Threonin 58, wodurch der proteasomale Proteinabbau induziert wird (Modifiziert nach (Adhikary and Eilers, 2005)).

Der Mechanismus soll zunächst anhand von c-Myc beschrieben werden. Ras-aktivierte MAPKs (*Mitogen activated protein kinase*) phosphorylieren c-Myc an Serin 62 (Alvarez et al., 1991), das als Erkennungssignal für die Kinase GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*) fungiert. GSK3 β katalysiert im Anschluss die Phosphorylierung an Threonin 58, wodurch die Degradation von c-Myc induziert wird (Gregory et al., 2003). Wachstumsfaktoren, die den Signalweg PI3K/AKT aktivieren, führen zur Hemmung der Kinase GSK3 β und damit zur c-Myc-Stabilisierung (Sears et al., 2000). Des Weiteren ermöglicht die Phosphorylierung an T58 die Interaktion mit der Peptidylprolyl-Isomerase Pin1, die die *cis* zu *trans* Isomerisierung der Peptidbindung zum Prolin 63 katalysiert (Yeh et al., 2004). Die Konformationsänderung führt zur Bindung der *trans*-spezifischen Phosphatase PP2A (*Proteinphosphatase 2A*), die c-Myc an Serin 62 dephosphoryliert. Das einfach phosphorylierte c-Myc-Protein wird von dem Ubiquitinligasekomplex SCF^{Fbw7} gebunden, polyubiquitiniert und anschließend vom Proteasom abgebaut. Allerdings konnte gezeigt werden, dass auch doppelt phosphoryliertes c-Myc durch SCF^{Fbw7} gebunden werden kann (Welcker et al., 2004). Weitere Studien zeigten, dass Axin als Proteingerüst (*scaffold protein*) fungiert und dadurch die Interaktion der Proteine, die zur Destabilisierung von c-Myc beitragen, erleichtert (Arnold et al., 2009).

Ähnlich wie im Fall von c-Myc wird auch der N-Myc-Proteinabbau durch eine GSK3 β -abhängige Phosphorylierung an Threonin 58 vermittelt (Kenney et al., 2004). In neuronalen Vorläuferzellen phosphoryliert Cdk1 N-Myc während der Mitose an Serin 62. Im Gegensatz zu c-Myc führt eine Inhibition von PP2A zu einer N-Myc-Destabilisierung. Zudem hat Pin1 keinen Einfluss auf die S62-Phosphorylierung obwohl das Phosphodegronmotiv hoch konserviert ist (Sjostrom et al., 2005) (Abbildung 3.7).

Ob Fbw7, wie bei c-Myc, für den proteasomalen Abbau des Proteins verantwortlich ist, sollte in dieser Doktorarbeit geklärt werden.

Die Regulation der Proteinstabilität hat eine große Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Myc-Homöostase. So ist die Halbwertszeit der Myc-Proteine mit etwa 20 Minuten relativ kurz (Hann and Eisenman, 1984).

Der N-Myc-Proteinabbau kann über das Ubiquitin-Proteasom-System erfolgen (Ciechanover, 2004; Hershko, 2004; Rose, 2004).

Dabei werden die zu degradierenden Proteine mit Ubiquitin kovalent verknüpft. Das etwa 8,5 kDa leichte Protein dient als Erkennungssignal für den Proteasomkomplex, der schließlich das Protein abbaut. Ubiquitin dient nicht nur als Signal zum Abbau von Proteinen sondern kann viele weitere zelluläre Prozesse wie Signaltransduktion, Transkription, Epigenetik und Zellzyklusprogression beeinflussen (Nath and Shadan, 2009).

Neben einer Monoubiquitinierung können Proteine etwa auch an mehreren Stellen simultan ubiquitiniert werden. Darüber hinaus ist die Verknüpfung mit Polyubiquitinketten möglich. Die unterschiedliche Verknüpfung der Ubiquitin-Moleküle untereinander bestimmt die Funktion des Substratproteins. Je nach Art der Verknüpfung (Verknüpfung über Lysin (K) 6, 11, 27, 29, 33, 48 und/oder 63) hat dies auf das Substratprotein unterschiedliche Auswirkungen. So führen K48-Verknüpfungen zum proteasomalen Abbau, wohingegen K63-Verknüpfungen beispielsweise zur Signaltransduktion dienen können (Komander and Rape, 2012).

Die Ubiquitinierung ist ein mehrstufiger Prozess, der über drei Enzyme (E1, E2 und E3) katalysiert wird. Zunächst kommt es zur ATP-abhängigen Aktivierung des Ubiquitins durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1. Aktiviertes Ubiquitin wird anschließend durch eine Transacylierungsreaktion auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen. Im letzten Schritt wird das Substratprotein mit Hilfe der E3-Ubiquitinligase (E3 oder E3-Ligase) mit dem Ubiquitin markiert. Hierbei kommt es zur Ausbildung einer Peptidbindung zwischen der Carboxylgruppe des C-terminalen Glycins vom Ubiquitin mit der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysins des Substrates. Studien konnten jedoch belegen, dass c-Myc durch die E3-Ligase β -TrCP ebenfalls an der α -Aminogruppe ubiquitiniert werden kann (Popov et al., 2010).

Neben β -TrCP wurden weitere E3-Ligasen beschrieben, die in der Lage sind, c-Myc zu ubiquitinieren (Abbildung 3.4). Zwei intensiv charakterisierte E3-Ligasen sind Fbxw7 (*F-Box and WD40 Repeat Domain-Containing 7*) und HectH9 (*Huwe1*). Während Myc durch Fbxw7 degradiert wird, führt die K63-verknüpfte Ubiquitinierung durch HectH9 zur transkriptionellen Aktivierung von Myc-Zielgenen und trägt zur p300-Bindung bei (Adhikary et al., 2005; Welcker et al., 2004).

N-Myc wird ebenfalls durch HectH9 ubiquitiniert. Überraschenderweise katalysiert HectH9 in diesem Fall K48-verknüpfte Polyubiquitinketten, die zum proteasomalen Abbau des Proteins führen (Zhao et al., 2008). In einer massenspektrometrischen Studie konnte eine weitere E3-Ligase identifiziert werden, die sowohl mit c-Myc als auch mit N-Myc interagiert. Als Adapterprotein vermittelt TRUSS (*tumor necrosis factor receptor associated ubiquitous scaffolding and signaling protein*) die Interaktion zwischen den Myc-Proteinen und der DDB1-Cul4 E3-Ligase und stimuliert dadurch die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau (Choi et al., 2010).

3.4 Die Kinase Aurora-A

Aurora-A gehört zur Familie der Aurora-Kinasen, die im Säuger genom drei Mitglieder umfasst, *AURKA*, *AURKB* und *AURKC*. Alle drei Gene kodieren für Serin/Threonin-Kinasen, die entscheidende Aufgaben während der Mitose bzw. der Meiose übernehmen. Während Aurora-A und Aurora-B ubiquitär exprimiert werden und den Zellzyklusübergang von G2 zur Mitose koordinieren, wird Aurora-C spezifisch im Testis exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Spermatogenese (Hu et al., 2000; Nigg, 2001).

Trotz der sehr starken Sequenzhomologie (Abbildung 3.8), insbesondere in der Kinasedomäne, haben Aurora-A und Aurora-B divergente Aufgaben. Dies ist unter anderem auf die unterschiedliche Lokalisation der Kinasen zurückzuführen. Während Aurora-A je nach Zellzyklusphase an den Centrosomen, den Spindel-Polen oder der Zentralspindel lokalisiert ist, ist Aurora-B an den Chromosomenarmen, den Centromeren (in der Prophase), der Zentralspindel und dem Cortex (in der Anaphase) lokalisiert (Abbildung 3.9) (Fu et al., 2007).

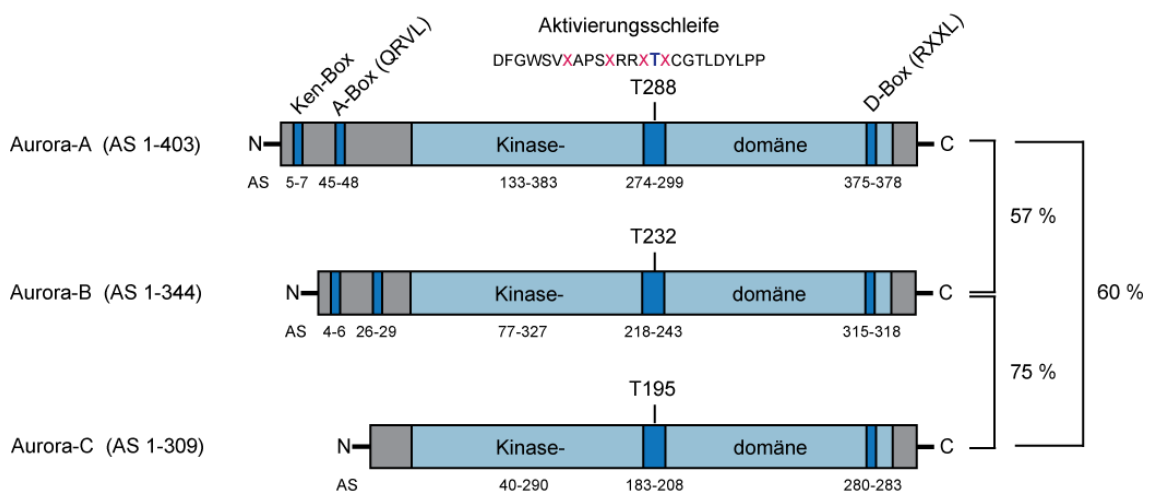


Abbildung 3.8: Struktur der humanen Aurora-Kinasen

Die Aurora Kinasen bestehen aus zwei Domänen, der N-terminalen, regulatorischen Region und der katalytischen Domäne. Während die katalytischen Domänen zu über 70 % homolog sind, unterscheiden sich die N-terminalen Bereiche in ihrer AS-Sequenz. Die Prozentzahlen geben die Sequenz-Homologien der einzelnen Kinasen untereinander wieder (Modifiziert nach (Fu et al., 2007)).

3.4.1 Mitotische Funktionen von Aurora-A

Seit der Entdeckung der homologen Kinase Ipl1 (*increase-in-ploidy 1*) in *Saccharomyces cerevisiae* konnten mehr als 60 Interaktionspartner für Aurora-A identifiziert werden, die zum Großteil wichtige Aufgaben während der Mitose übernehmen (Chan and Botstein,

1993; Nikonova et al., 2013). Ferner wurde in einem *Screen* zur Identifizierung von Genen, die für die mitotische Spindel essentiell sind, das homologe Gen *aur* in *Drosophila melanogaster* entdeckt (Glover et al., 1995). Die enorme Bedeutung während der Mitose zeigt sich auch in der embryonalen Letalität von Aurora-A-defizienten Mäusen, die Defekte im Mitose-Spindel-Aufbau, sowie in der Anordnung der Chromosomen haben (Lu et al., 2008; Sasai et al., 2008)

Während des G_2/M -Übergangs steigen die Aurora-A-Level und die Kinaseaktivität in humanen Zellen stark an und es kommt zur Änderung der subzellulären Lokalisation (Abbildung 3.9). Dabei fungiert Aurora-A als wichtiger Regulator der Centrosomenreifung und -separation, sowie des Mitoseintritts und der Spindelausbildung.

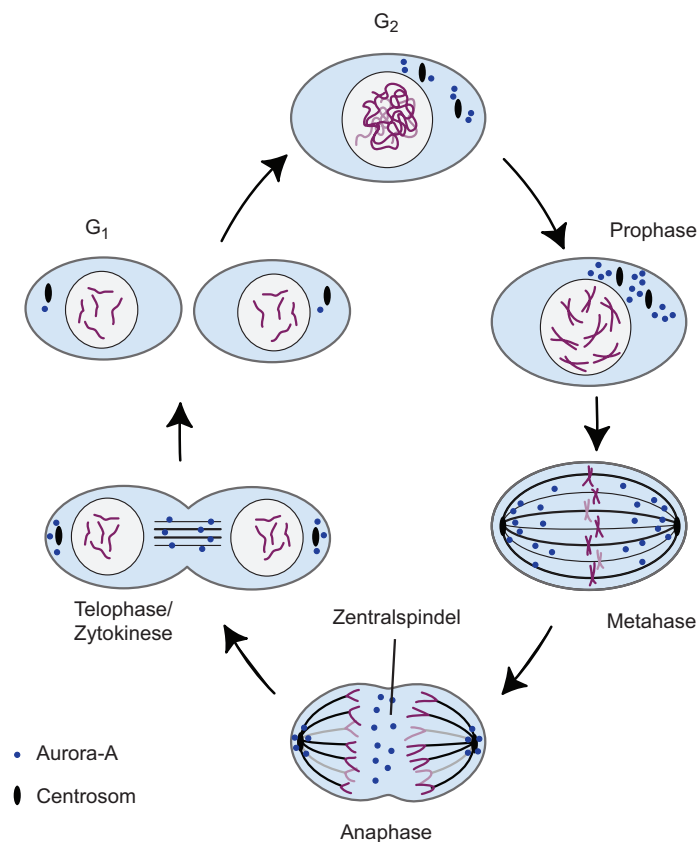


Abbildung 3.9: Lokalisation der Aurora-A-Kinase während des Zellzyklus

Die Lokalisation und Expressionslevel der Aurora-A-Kinase ändern sich im Verlauf des Zellzyklus. (Modifiziert nach (Lens et al., 2010)).

Wie bereits erwähnt, phosphoryliert Aurora-A einige Proteine, die eine entscheidende Rolle bei der Centrosomenreifung übernehmen (Abschnitt 3.1). Weitere Substrate von Aurora-A sind unter anderem TACC-Proteine (*Transforming acidic coiled-coil proteins*), die zur Stabilität und Ausbildung der Mikrotubuli beitragen (Bellanger and Gonczy, 2003; Giet et al., 2002). Zusätzlich zur Centrosomenreifung reguliert Aurora-A die Separation der Centriolenpaare. So verhindert eine Mikroinjektion von Aurora-A-Antikörpern in der späten G_2 -Phase die Ausbildung der korrekten Spindelpole (Marumoto et al., 2003). Des

Weiteren ist Aurora-A für die Zyklin B1/Cdk1-Rekrutierung zu den Centrosomen verantwortlich, was die Aktivierung des Zyklin B1/Cdk1 Komplexes ermöglicht (Hirota et al., 2003). Die Tyrosin Protein Phosphatase CDC25B, die ebenfalls durch Aurora-A phosphoryliert wird, dephosphoryliert und aktiviert anschließend den Zyklin B/Cdk1 Komplex an den Centrosomen (Dutertre et al., 2004; Lindqvist et al., 2005). In dem Organismus *Xenopus* konnte zudem eine posttranskriptionale Regulation von Zyklin B1 durch Aurora-A identifiziert werden. Nach der Phosphorylierung von CPEB (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein*) durch das zu Aurora-A homologe Protein Eg2 kommt es während des Mitoseeintritts zu einer Induktion der Zyklin B1-Translation (Cao and Richter, 2002; Groisman et al., 2000; Mendez et al., 2000).

In der (Pro-) Metaphase ist Aurora-A für die korrekte Anordnung der Chromosomen verantwortlich. So phosphoryliert Aurora-A direkt CENP-A, eine Kinetochor-spezifische Histon H3 Variante. Diese N-terminale Phosphorylierung ist wichtig für die Anheftung der Mikrotubuli an das Kinetochor. Als Konsequenz ermöglicht diese Bindung die korrekte Chromosomenanordnung in der Mitte zwischen den beiden Spindelpolen (Kunitoku et al., 2003).

Ferner spielt Aurora-A auch eine wesentliche Rolle bei der Zytokinese. Mikroinjektionen von Aurora-A-Antikörpern blockierten in HeLa-Zellen die Aurora-A-Funktion und führten zu einer gestörten Zytokinese bzw. zur Bildung von multinukleären Zellen. Allerdings resultierte eine Aurora-A-Überexpression ebenfalls in einer gestörten Zytokinese. Demnach ist die Balance einer exakten Aurora-A Expression für die korrekte Zytokinese von enormer Bedeutung (Marumoto et al., 2003; Zhang et al., 2004).

3.4.2 Nicht-Mitotische Funktionen von Aurora-A

Neuste Studien belegen, dass Aurora-A auch nicht-mitotische Funktionen ausübt. In humanen Interphasezellen ist Aurora-A hauptsächlich an den Centrosomen lokalisiert. Eine kleine Aurora-A-Fraktion befindet sich allerdings auch im Zytoplasma sowie im Zellkern (Rannou et al., 2008). Eine Inhibition von Aurora-A führt zu einer anormalen Mikrotubulstruktur in der Interphase. Auch die Mikrotubulidynamik ist nach einer Aurora-A-Inhibition gestört. So führte eine Aurora-A Inhibition in Interphasezellen zu einer gestörten Nukleation, sowie zu einer reduzierten Abbau- als auch Wachstumsrate der Mikrotubuli. Diese Funktion ist Aurora-A spezifisch. Wurde Aurora-B gehemmt, hatte dies nur geringe Auswirkungen auf die Mikrotubuli-Dynamik (Lorenzo et al., 2009). Zusammenfassend bestätigen diese Untersuchungen, dass die Aurora-A-Aktivität nicht nur auf die Mitose limitiert ist.

Mikrotubuli haben eine besondere Bedeutung bei der Stabilität und Aufrechterhaltung von Neuriten. Auch hier spielt Aurora-A eine wesentliche Rolle. Es zeigte sich, dass Aurora-A die Elongation von Axonen reguliert. Bei diesem neuen Signalweg wird Aurora-A durch α PKC an T287 phosphoryliert. Dies ermöglicht die Akkumulation am so genannten Axonhügel, an dem Aurora-A NDEL1, einen Regulator der Mikrotubuli-Organisation, ebenfalls phosphorylieren kann und die Neuriten-Elongation fördert. (Mori et al., 2009).

Eine weitere unerwartete nicht-mitotische Aurora-A Funktion ist der Abbau von primären Cilien. Cilien sind ebenfalls aus Mikrotubuli aufgebaut. Das Grundgerüst besteht aus einer Anordnung von neun kreisförmigen Mikrotubuli-Dupletts. Fehlfunktionen oder genetische Mutationen im Cilien-Aufbau können zu Ziliopathien mit unterschiedlichen Symptomen führen. Nach Aktivierung durch Hef1 reguliert Aurora-A den Abbau von primären Cilien, indem es HDAC6 in Interphasezellen phosphoryliert. Die durch HDAC6 induzierte Tubulin-Deacetylierung ermöglicht die Destabilisierung der Axoneme (Pugacheva et al., 2007).

3.4.3 Mechanismen der Regulation von Aurora-A

Die Aurora-A-Expression sowie die Kinase-Aktivität unterliegen einer strikten Regulation um den korrekten Ablauf der Mitose zu gewährleisten. Während der G₂/M-Phase ist sowohl die Aurora-A-Expression als auch die Kinaseaktivität am höchsten. Die zellzykluspezifische Transkription erfolgt in humanen Zellen durch den Transkriptionsfaktor E4TF1 (Tanaka et al., 2002). Zusätzlich verfügt die 5' UTR von Aurora-A über eine IRES-Sequenz (*internal ribosomal entry site*), die ebenfalls zellzyklus-spezifisch reguliert ist (Dobson et al., 2013).

Die posttranslationale Regulation ist sehr komplex und umfasst Regulatoren der Kinaseaktivität, sowie Proteine, die die proteasomale Degradation am Ende der Mitose koordinieren (Fukuda et al., 2005).

Das 43 kDa schwere Protein besitzt zwei Konsensussequenzen, die N-terminale A-Box und die C-terminale D-Box (*Destruction-box*), die für die proteasomale Degradation verantwortlich sind. Im Gegensatz zu anderen mitotischen Proteinen, wie zum Beispiel Nek2 und B99, ist die N-terminale KEN-Sequenz in Aurora-A nicht für die proteasomale Degradation von entscheidender Bedeutung (Littlepage and Ruderman, 2002; Pfleger and Kirschner, 2000) (Abbildung 3.8). Die proteasomale Degradation wird durch den E3-Ligase-Komplex APC/C^{Cdh1} (*anaphase promoting complex/cyclosome*) vermittelt (Castro et al., 2002a; Castro et al., 2002b; Honda et al., 2000; Littlepage and Ruderman, 2002; Walter et al., 2000). Während der Mitose ist Aurora-A an Serin 53 (in Xenopus; human: S51) phosphoryliert und vor dem proteasomalen Abbau durch den E3-Ligase-Komplex geschützt (Littlepage and Ruderman, 2002). In humanen Zellen interagiert die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) mit Aurora-A an den Spindelpolen und dephosphoryliert Serin 51. Die Inhibition von PP2A kann den proteasomalen Abbau am Ende der Mitose verhindern (Horn et al., 2007). Eine weitere E3-Ligase, die ebenfalls Aurora-A ubiquitiniert und zur Degradation führt, ist Chfr (*checkpoint protein with forkhead and ring domain*) (Yu et al., 2005b).

Eine Ubiquitin-unabhängige Degradation erfolgt mit Hilfe des *Aurora-A interacting Protein* (AIP). AIP interagiert sowohl mit Aurora-A als auch mit Antizyme1, einem Mediator der Ubiquitin-unabhängigen Proteindegradation. Als ternärer Komplex induzieren AIP und Antizym1 den Proteinabbau von Aurora-A (Lim and Gopalan, 2007a, b).

Dagegen verhindern PUM2 und USP2a die proteasomale Degradation von Aurora-A durch Bindung an die D-Box (Huang et al., 2011) bzw. durch Deubiquitinierung der Kinase am Ende der Mitose (Shi et al., 2011).

Neben der Proteininstabilität ist auch die enzymatische Aktivität der Kinase zellzyklus-spezifisch reguliert. Die wichtigste postranslationale Modifikation zur Regulierung der Kinaseaktivität ist die Autophosphorylierung an Threonin 288, die insbesondere während der Mitose auftritt. Die Phosphorylierung der T-Schleife führt zur Aktivierung (Eyers and Maller, 2004), wohingegen die Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase PP1 die Kinase inaktiviert (Katayama et al., 2001). Neben der Phosphorylierung an Threonin 288 konnte eine weitere bedeutende Phosphorylierungsstelle identifiziert werden, die ebenfalls die Enzymaktivität reguliert. Eine phosphomimetische Mutation von Serin 342 zu Aspartat führt zur vollständigen Blockierung der Kinaseaktivität (Littlepage et al., 2002).

Als wichtige Interaktionspartner der Aurora-A-Kinase, die deren Enzymaktivität positiv beeinflussen, konnte unter anderem TPX2 und Ajuba identifiziert werden. Neben diesen Aktivatoren sind auch negative Regulatoren, wie z.B. RasGAP, beschrieben, die durch Bindung an Aurora-A die Kinaseaktivität inhibieren (Eyers and Maller, 2004; Gigoux et al., 2002; Hirota et al., 2003; Kufer et al., 2002)

3.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Neuroblastom ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen im Kindesalter. Der bedeutendste prognostische Parameter im Neuroblastom ist die Amplifikation des Gens *MYCN*, die mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate assoziiert ist. Interessanterweise sind *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzellen von hohen N-Myc-Proteinmengen abhängig, wohingegen nicht-amplifizierte Zellen nach einer Herunterregulation des Transkriptionsfaktors in ihrer Proliferation nicht beeinflusst sind. Dieser Umstand ist für einen möglichen Therapieansatz von entscheidender Bedeutung. Wäre es möglich, die Funktion von N-Myc selektiv zu hemmen, würde dies zu einem Wachstumsstopp und möglicherweise sogar zu einer Regression des Tumors führen.

Aufgrund mangelnder Alternativen, N-Myc mit niedermolekularen Substanzen direkt zu inhibieren, wurde ein synthetisch-letaler *Screen* zur Identifizierung neuer essentieller Gene für das *MYCN*-amplifizierte Neuroblastom durchgeführt. Der shRNA-vermittelte *Screen* identifizierte 17 potentiell essentielle Gene, die ausschließlich das Wachstum *MYCN*-amplifizierter Neuroblastomzellen negativ beeinflussen.

Eines dieser Gene ist *AURKA*, welches für eine mitotische Serin/Threonin-Proteinkinase kodiert. Eine Überexpression bzw. Amplifikation des *AURKA*-Gens wurde in mehreren malignen Tumoren, wie Kolorektal- und Mammakarzinome sowie neuroendokrinen Tumoren nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine signifikante Assoziation mit höhergradigen Tumoren und einer schlechten Prognose. Einige Aurora-A-Inhibitoren werden bereits in klinischen Studien getestet und könnten demnach auch eine mögliche Therapieoption für Neuroblastompatienten sein.

In dieser Doktorarbeit sollte zum einen der genaue Mechanismus, der N-Myc/Aurora-A-Interaktion in Neuroblastomzellen aufgeklärt werden und zum anderen das therapeutische Potential von Aurora-A-Inhibitoren *in vitro* und *in vivo* näher analysiert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Aurora-A blockiert den Fbxw7-vermittelten proteasomalen Abbau von N-Myc

4.1.1 Die mitotische Kinase Aurora-A stabilisiert den Transkriptionsfaktor N-Myc posttranslational

Zur Identifizierung neuer essentieller Gene für das *MYCN*-amplifizierte Neuroblastom wurde ein shRNA-vermittelter, synthetisch-letaler *Screen* durchgeführt. Dazu wurden 194 Gene in einer *MYCN*-amplifizierten (IMR-32) sowie parallel in einer nicht *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinie (SH-EP) durch shRNAs depletiert. Als Kriterium für die Auswahl dieser potentiell essentiellen Gene diente zum einen eine cDNA-*Microarray*-Studie (Berwanger et al., 2002), in der 67 Gene identifiziert wurden, die in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen im Vergleich zu nicht-*MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen signifikant erhöht exprimiert vorliegen. Zum anderen entstammen die restlichen 127 Gene aus der Myc-Datenbank: <http://myc-cancer-gene.org/> und sind als direkte c-Myc Zielgene identifiziert worden (Otto et al., 2009).

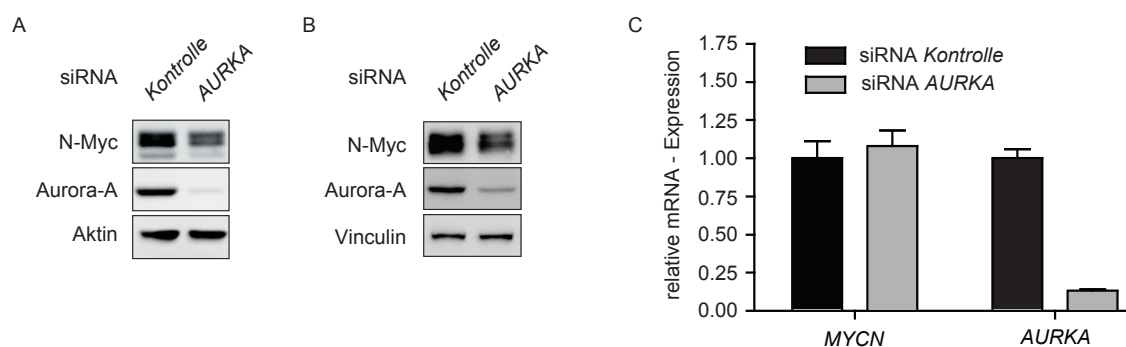


Abbildung 4.1: Aurora-A stabilisiert N-Myc

- A) IMR-5-Zellen wurden mit siRNAs gegen *AURKA* und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 60 h wurde das Aurora-A- sowie das N-Myc-Proteinlevel mittels Western Blot (WB) ermittelt. Aktin diente als Ladekontrolle.
- B) IMR-32-Zellen wurden ebenfalls mit siRNAs gegen *AURKA* und einer Kontroll-siRNA transfiziert und ein WB durchgeführt. Vinculin diente als Ladekontrolle.
- C) Behandelte IMR-32-Zellen (siehe 4.1 B) wurden mittels RT-PCR auf deren *MYCN*- und *AURKA*-Expression analysiert. Normalisiert wurde auf *RPS14* und *B2M*. (Mittelwert \pm SD; technisches Triplikat)

Teile dieser Abbildung wurden in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

17 potentiell essentielle Gene konnten ermittelt werden, die ausschließlich das Wachstum *MYCN*-amplifizierter Neuroblastomzellen regulieren. Eines dieser Gene ist *AURKA*, welches für die mitotische Serin/Threonin-Proteinkinase Aurora-A kodiert.

Eine shRNA-vermittelte *AURKA*-Depletion führte zu einem selektiven Proliferationsstopp in *MYCN*-amplifizierten Tumorzellen, hatte jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum nicht-*MYCN*-amplifizierter Zelllinien (Daten nicht gezeigt) (Otto et al., 2009). Um das selektive Proliferationsdefizit zu untersuchen wurden zwei Neuroblastomzelllinien (IMR-5 und IMR-32) mit einem Pool aus vier verschiedenen siRNAs gegen *AURKA* transfiziert. Eine Reduktion der Aurora-A-Expression führte zu einer gleichzeitigen Abnahme des N-Myc-Proteinlevels (Abbildung 4.1 A und B). Eine transkriptionelle Regulation von N-Myc durch die Kinase konnte ausgeschlossen werden, da die *MYCN*-mRNA-Expression nach einer Aurora-A-Depletion unverändert blieb (Abbildung 4.1 C). Cycloheximid-Experimente und Ubiquitin-Versuche belegten einen posttranslationalen Mechanismus der N-Myc-Stabilisierung durch Aurora-A (Otto et al., 2009).

4.1.2 Fbxw7 vermittelt den proteasomalen Abbau von N-Myc

Als wichtiger Mediator des proteasomalen Abbaus von c-Myc wurde das F-Box-Protein Fbxw7 (*F-Box and WD40 Repeat Domain-Containing 7*) des Ubiquitinligase-komplexes SCF^{Fbxw7} beschrieben (Welcker et al., 2004; Yada et al., 2004).

Aufgrund der hochkonservierten Myc-Box I, die in allen Myc-Proteinen vorkommt und in c-Myc den Fbxw7-vermittelten Proteinabbau ermöglicht, ist eine N-Myc-Proteindegradation durch dieses Substraterkennungsprotein ebenfalls denkbar (Abschnitt 3.3.4).

Die Hypothese, dass Fbxw7 eine entscheidende Rolle bei der proteasomalen N-Myc-Degradation spielt, sollte im Folgenden näher analysiert werden. Hierzu wurden zunächst IMR-32-Zellen mit siRNAs gegen *FBXW7* transfiziert und das N-Myc-Proteinlevel mit Hilfe eines WBs ermittelt. Eine Reduktion der Fbxw7-Proteinmenge führte zu einer Steigerung der N-Myc-Proteinexpression. Darüber hinaus konnte eine starke Reduktion der N-Myc-Proteinmenge nach einer Fbxw7-Überexpression in SH-EP-Zellen detektiert werden (Abbildung 4.2 A und B). Mit Hilfe einer endogenen IP konnte zudem eine Interaktion zwischen Fbxw7 und N-Myc ermittelt werden (Abbildung 4.2 C). Die Interaktion lässt darauf schließen, dass Fbxw7 als Substraterkennungsprotein agiert und die N-Myc-Ubiquitinierung vermittelt. Zur Bestätigung dieses Mechanismus wurde ein *in vivo* Ubiquitin-Assay durchgeführt. SH-EP-Zellen wurden mit *MYCN*, Flag-markiertem *FBXW7* und His-markiertem Ubiquitin ko-transfiziert. Anschließend wurde ubiquitiniertes N-Myc mit Hilfe von Ni²⁺-NTA-Agarose affinitätschromatographisch aufgereinigt und im WB detektiert. Eine Überexpression von *FBXW7* führte zu einer Akkumulation von ubiquitiniertem N-Myc (Abbildung 4.2 D).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fbxw7 an N-Myc bindet und als Substraterkennungsprotein für den E3-Ligasekomplex SCF^{Fbxw7} fungiert. Die Markierung mit Ubiquitin führt zur N-Myc-Degradation.

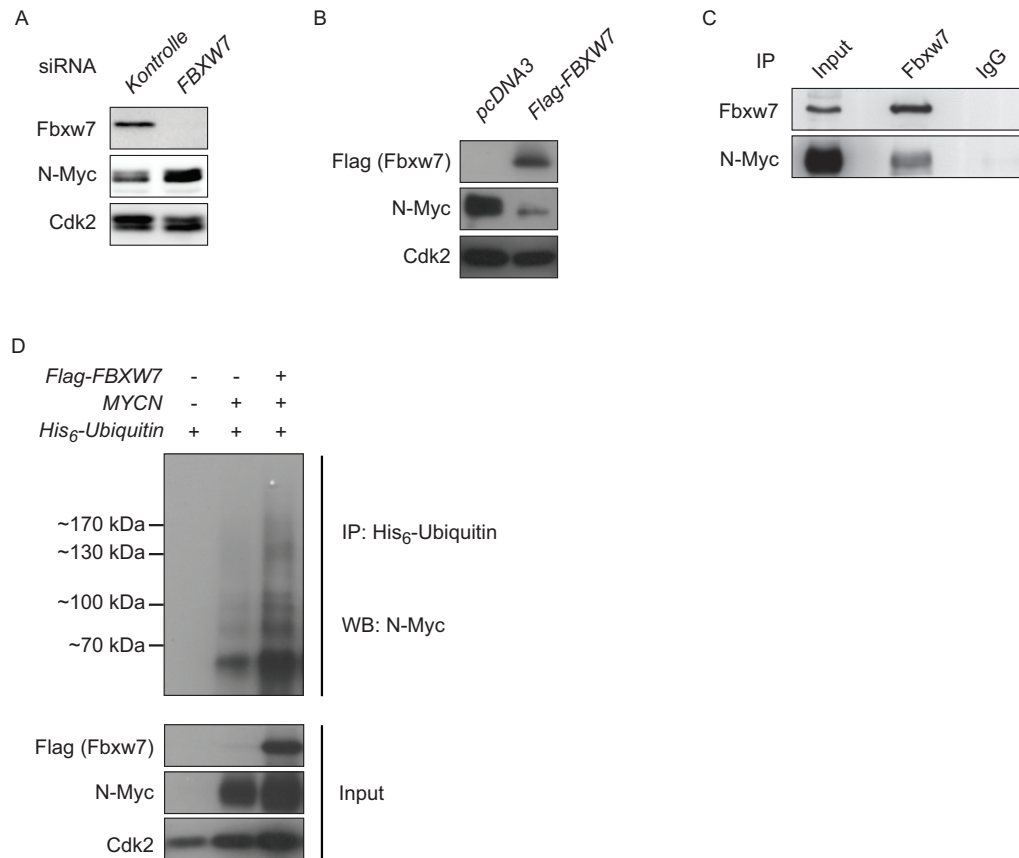


Abbildung 4.2: Fbxw7 ubiquitiniert N-Myc und induziert den proteasomalen Abbau des Proteins

- A) IMR-32-Zellen wurden mit siRNAs gegen *FBXW7* und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Das N-Myc-Proteinlevel sowie die Fbxw7-Depletion wurden mittels WB ermittelt. Cdk2 diente als Ladekontrolle.
- B) SH-EP-Zellen wurden mit *MYCN* und Flag-markiertem *FBXW7* transfiziert und die Proteine mittels WB detektiert. Cdk2 fungierte als Ladekontrolle.
- C) Eine endogene Immunpräzipitation mit Fbxw7 Antikörpern wurde in IMR-32-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Immunglobulingemisch der gleichen Spezies. Der Input betrug 7.5 % vom eingesetzten Lysat.
- D) SH-EP-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und die ubiquitinierten Proteine mittels Ni²⁺-NTA-Agarose affinitätschromatographisch aufgereinigt. Zur Akkumulation von ubiquitiniertem Protein wurden die Zellen 4 Stunden vor Ernte mit dem Proteasominhibitor MG132 (12,5 µM) behandelt. Ubiquitin-modifizierte N-Myc Proteine wurden im WB visualisiert.

Teile dieser Abbildung wurden in ähnlicher Form veröffentlicht in Otto et al., 2009.

4.1.3 Aurora-A interagiert mit N-Myc und der E3-Ubiquitinligase Fbxw7

Während Aurora-A N-Myc posttranslational stabilisiert (Abbildung 4.1; (Otto et al., 2009)), induziert Fbxw7 den proteasomalen Abbau des Transkriptionsfaktors (Abbildung 4.2; (Otto et al., 2009)). Immunfluoreszenzen (IF) und Immunpräzipitationen (IP) sollten zur detaillierteren Aufklärung des Mechanismus beitragen. Zur Ermittlung einer Ko-Lokalisation wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit *MYCN*-überexprimierenden SH-

EP-Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit den Primärantikörpern für N-Myc und Aurora-A inkubiert und die anschließende Detektion der Proteine erfolgte indirekt mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern (Alexa 488 bzw. Alexa 647). Zur Gegenfärbung des Zellkerns diente der DNA-Farbstoff Hoechst. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse belegte eine Ko-Lokalisation von N-Myc und Aurora-A sowohl in der Interphase als auch während der Mitose. In der Interphase trat diese Ko-Lokalisation im Zellkern auf. Während der Mitose waren sowohl Aurora-A als auch N-Myc an den Spindelpolen, sowie an der Zentralspindel lokalisiert (Abbildung 4.3 A).

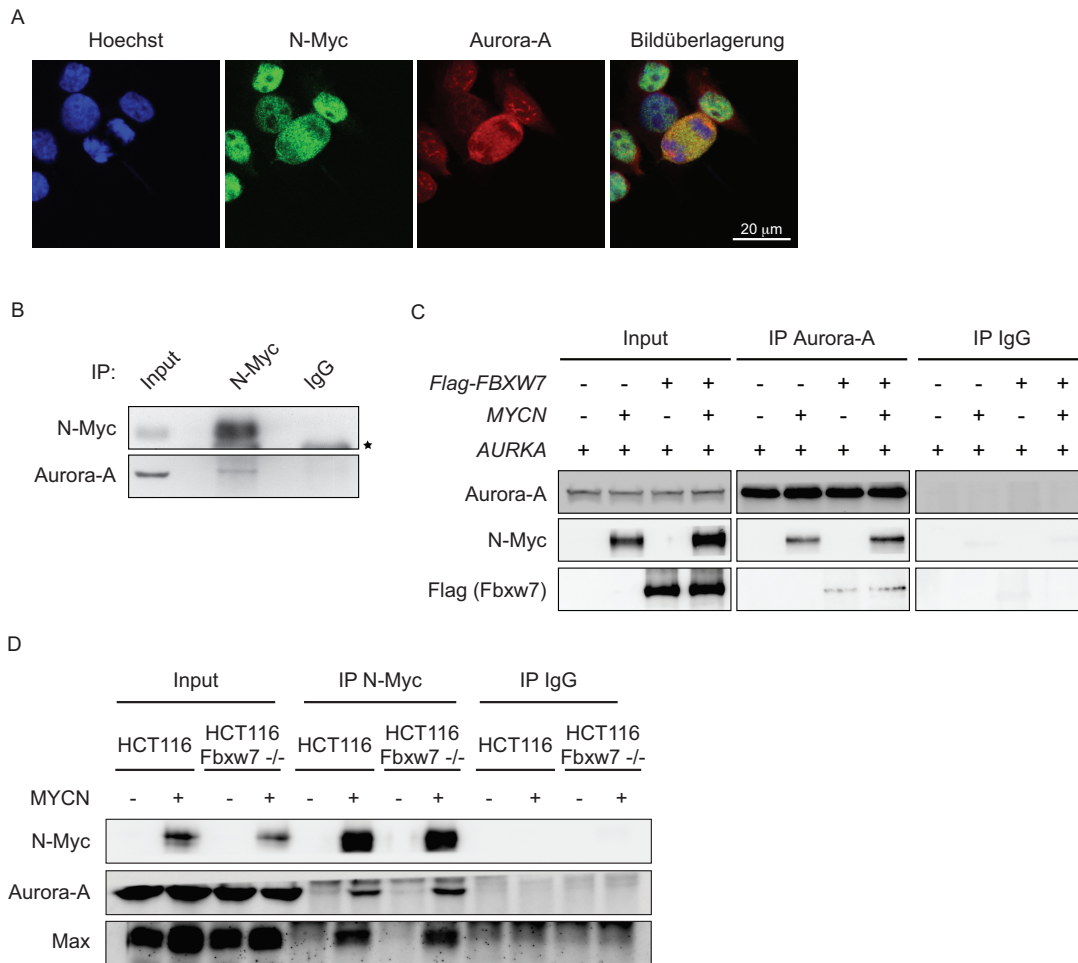


Abbildung 4.3: Aurora-A interagiert mit N-Myc und Fbxw7

- A) SH-EP-Zellen wurden stabil mit *MYCN* infiziert. Eine Immunfluoreszenz mit Aurora-A und N-Myc Antikörpern wurde durchgeführt. Das Chromatin ist mit Hoechst angefärbt.
- B) Eine endogene Immunpräzipitation mit spezifischen N-Myc Antikörpern wurde in IMR-32-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Immunglobulingemisch der gleichen Spezies. Der Input betrug 7.5 % vom eingesetzten Lysat. (* = schwere IgG Kette)
- C) SH-EP-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten (*Flag-FBXW7*, *MYCN* und *AURKA*) transfiziert und nach 48 h wurde Aurora-A mit Hilfe von spezifischen Aurora-A Antikörpern präzipitiert. Mittels WB wurde eine Ko-Präzipitation von N-Myc und Fbxw7 nachgewiesen.
- D) HCT116-wildtyp (wt) und Fbxw7 defiziente (-/-) Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und eine N-Myc-IP durchgeführt. Max diente als Kontrolle eines bekannten, Fbxw7-unabhängigen N-Myc-Interaktionspartners.

Teile dieser Abbildung wurden in ähnlicher Form veröffentlicht in Otto et al., 2009.

Zur Bestätigung einer direkten Interaktion wurde eine endogene N-Myc-IP in der *MYCN*-amplifizierten Zelllinie IMR-32 durchgeführt. Neben N-Myc konnte ebenfalls Aurora-A im Präzipitat identifiziert werden (Abbildung 4.3 B). Ferner konnte diese Interaktion mit Hilfe einer exogenen Aurora-A-IP verifiziert werden. In der gleichen IP konnte ebenfalls eine Komplexbildung zwischen Aurora-A und Fbxw7 ermittelt werden. Diese Interaktion war unabhängig von N-Myc, da sowohl in nicht transfizierten SH-EP-Zellen, die keine N-Myc-Expression aufweisen, als auch in *MYCN*-überexprimierenden Zellen eine Bindung zwischen Aurora-A und Fbxw7 detektierbar war (Abbildung 4.3 C).

Inwiefern die Komplexbildung zwischen Aurora-A und N-Myc von Fbxw7 abhängig ist, sollte mit Hilfe von Fbxw7-defizienten Zellen untersucht werden. Sowohl in Fbxw7-negativen HCT116-Zellen als auch in den HCT116 wildtyp-Zellen war eine Interaktion zwischen N-Myc und Aurora-A detektierbar. Max diente als Kontrolle eines Fbxw7-unabhängigen Interaktionspartners von N-Myc (Abbildung 4.3 D).

Die Ergebnisse belegen eine Fbxw7-unabhängige Interaktion zwischen Aurora-A und N-Myc, sowie eine N-Myc-unabhängige Bindung zwischen Aurora-A und dem F-Box-Protein Fbxw7.

4.1.4 Aurora-A stabilisiert N-Myc in Abhängigkeit der T58/S62-Phosphorylierung

Da eine direkte Bindung von Aurora-A an N-Myc und Fbxw7 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.3), stellte sich die Frage, ob diese Interaktion den Fbxw7-induzierten proteasomalen Abbau von N-Myc beeinflusst. Dies wurde anhand von Transfektionsexperimenten in der Neuroblastomzelllinie SH-EP untersucht. Ein Fbxw7-vermittelter N-Myc-Abbau konnte durch eine gleichzeitige Überexpression von *AURKA* vollständig verhindert werden (Abbildung 4.4 A).

Der Fbxw7-vermittelte Abbau von c-Myc ist phosphorylierungsabhängig (Welcker et al., 2004; Yada et al., 2004). Das gleiche Phosphodegron (Threonin 58 und Serin 62) befindet sich in der Myc-Box I von N-Myc. Inwiefern das Phosphodegron einen Einfluss auf die N-Myc-Proteinstabilität durch Aurora-A hat, sollte in den nachfolgenden Experimenten analysiert werden. Hierzu wurden die zwei Aminosäuren (Threonin 58 und Serin 62) zu Alanin mutiert, wodurch die N-Myc-Phosphorylierung unterbunden wurde. Fbxw7 war im Gegensatz zum wildtyp Protein nicht in der Lage das mutierte N-Myc Protein abzubauen (Otto et al., 2009). Falls Aurora-A spezifisch dem Fbxw7-vermittelten N-Myc-Abbau entgegenwirkt, sollte die Kinase keinen Einfluss auf die Proteinstabilität der N-Myc Mutante (T58A/S62A) haben.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden SH-EP-Zellen stabil mit *MYCN* wildtyp oder mit der *MYCN* Mutante (T58A/S62A) infiziert und anschließend mit siRNAs gegen *AURKA* transfiziert. Eine Aurora-A Depletion resultierte in einer Reduktion des N-Myc wildtyp-Proteins, wohingegen kein Effekt in der Proteinexpression der N-Myc Mutante bei gleicher Aurora-A-Depletion detektiert wurde (Abbildung 4.4 B). Zur weiteren Validierung wurden SH-EP-Zellen entweder mit N-Myc wildtyp oder mit der N-Myc Mutante transfiziert und gleichzeitig *AURKA* überexprimiert. Eine vermehrte Aurora-A Expression induzierte ein höheres N-Myc wt Proteinlevel während eine ähnlich starke

Aurora-A-Überexpression zu keiner Expressionsveränderung des mutierten Proteins führte (Abbildung 4.4 C).

Fbxw7 bindet phosphorylierungsabhängig an N-Myc (Otto et al., 2009). In einer exogenen IP konnte gezeigt werden, dass die Aurora-A/N-Myc-Interaktion ebenfalls an die Phosphorylierung von T58 und S62 gekoppelt ist (Abbildung 4.4 D).

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass N-Myc durch eine phosphorylierungsabhängige Ubiquitinierung abgebaut wird. Dieser Fbxw7-induzierter Mechanismus wird durch die Aurora-A-Kinase verhindert, die ebenfalls spezifisch an phosphoryliertes N-Myc bindet.

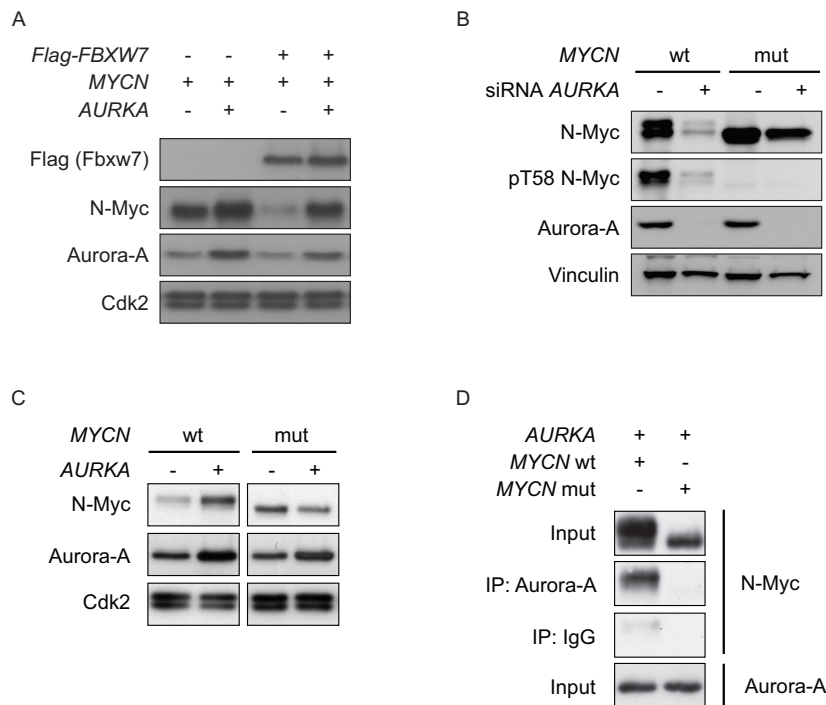


Abbildung 4.4: Aurora-A stabilisiert in Abhängigkeit der T58/S62-Phosphorylierung den Fbxw7-vermittelten N-Myc Proteinabbau

- A) SH-EP-Zellen wurden mit *MYCN*, *AURKA* und Flag-markiertem *FBXW7* transfiziert und die Proteine mittels WB detektiert. Cdk2 diente als Ladekontrolle.
- B) SH-EP-Zellen wurden stabil entweder mit *MYCN* wt oder mit *MYCN* mut (T58A/S62A) infiziert, selektioniert und mit siRNAs gegen *AURKA* transfiziert. Nach 60 h wurde das Zelllysate mittels WB analysiert. Vinculin fungierte als Ladekontrolle.
- C) SH-EP-Zellen wurden entweder mit *MYCN* wt oder mit *MYCN* mut (T58A/S62A) sowie mit *AURKA* ko-transfiziert. Die Proteine N-Myc, Aurora-A und Cdk2 (Ladekontrolle) wurden im WB nachgewiesen.
- D) SH-EP-Zellen wurden entweder mit *MYCN* wt oder mit *MYCN* mut (T58A/S62A) sowie mit *AURKA* ko-transfiziert. Nach einer Aurora-A-IP wurden die Interaktionen von N-Myc (wt bzw. mut) und Aurora-A mittels WB nachgewiesen.

Teile dieser Abbildung wurden in ähnlicher Form veröffentlicht in Otto et al., 2009.

4.1.5 Aurora-A stabilisiert nicht das Fbxw7-Substrat Zyklin E

Neben c-Myc sind noch weitere Fbxw7-Substrate, wie Zyklin E, Notch, Jun, SREBP1, mTOR und Mcl1, identifiziert worden (Clurman et al., 1996; Inuzuka et al., 2011; Koepp et al., 2001; Mao et al., 2008; Nateri et al., 2004; Oberg et al., 2001).

In welchem Umfang Aurora-A auch andere Fbxw7-Zielproteine stabilisieren kann, sollte anhand von Zyklin E ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden SH-EP-Zellen mit *CCNE1*, *AURKA* und Flag-markiertem *FBXW7* ko-transfiziert. Eine Fbxw7-Überexpression hatte eine Reduktion der Zyklin E-Proteinmenge zur Folge. Diese Fbxw7-abhängige Degradation konnte nicht durch eine gleichzeitige Überexpression von Aurora-A verhindert werden. Als Negativkontrolle diente die Zyklin E Mutante (T380A), die nicht mehr von Fbxw7 gebunden werden kann (Clurman et al., 1996) (Abbildung 4.5 A).

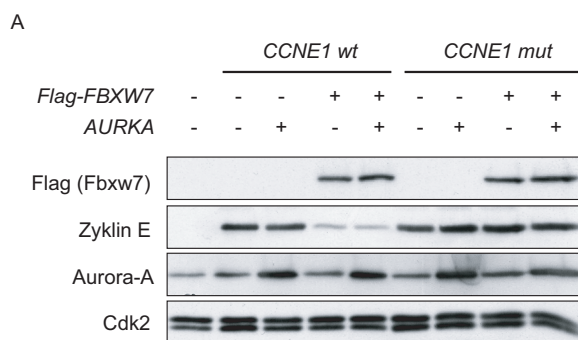


Abbildung 4.5: Aurora-A stabilisiert nicht das Fbxw7-Substrat Zyklin E

A) SH-EP-Zellen wurden mit *CCNE1 wt* und *CCNE1 mut* (T380A), sowie mit *AURKA* und Flag-markiertem *FBXW7* ko-transfiziert. Nach Lyse der Zellen wurden die analysierten Proteine mittels WB nachgewiesen. Cdk2 fungierte als Ladekontrolle. Diese Abbildung wurde veröffentlicht in Otto et al., 2009.

4.1.6 Die Stabilisierung von N-Myc ist unabhängig von der Aurora-A-Kinaseaktivität

Das Phosphodegron (pT58 und pS62) in N-Myc spielt für dessen Proteinstabilisierung durch Aurora-A eine entscheidende Rolle (Abbildung 4.4). Welche Domäne bzw. Aminosäuresequenz in Aurora-A essentiell für die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors ist, sollte mit Hilfe von Aurora-A Deletionsmutanten geklärt werden. SH-EP-Zellen wurden mit verschiedenen *AURKA*-Konstrukten (Abbildung 4.6 A) sowie mit *MYCN* ko-transfiziert. Die Expression von N-Myc und den HA-markierten Aurora-A Deletionsmutanten wurde im WB ermittelt. Eine Überexpression von wildtyp Aurora-A resultierte in einer starken Erhöhung des N-Myc-Proteinlevels. Eine moderate Anreicherung der N-Myc-Mengen konnte nach einer Überexpression von entweder der N- oder C-terminalen Deletionsmutante detektiert werden. Die Überexpression der Aurora-A-Mutante Δ KD führte hingegen zu keiner Steigerung der N-Myc-Proteinexpression (Abbildung 4.6 A und B).

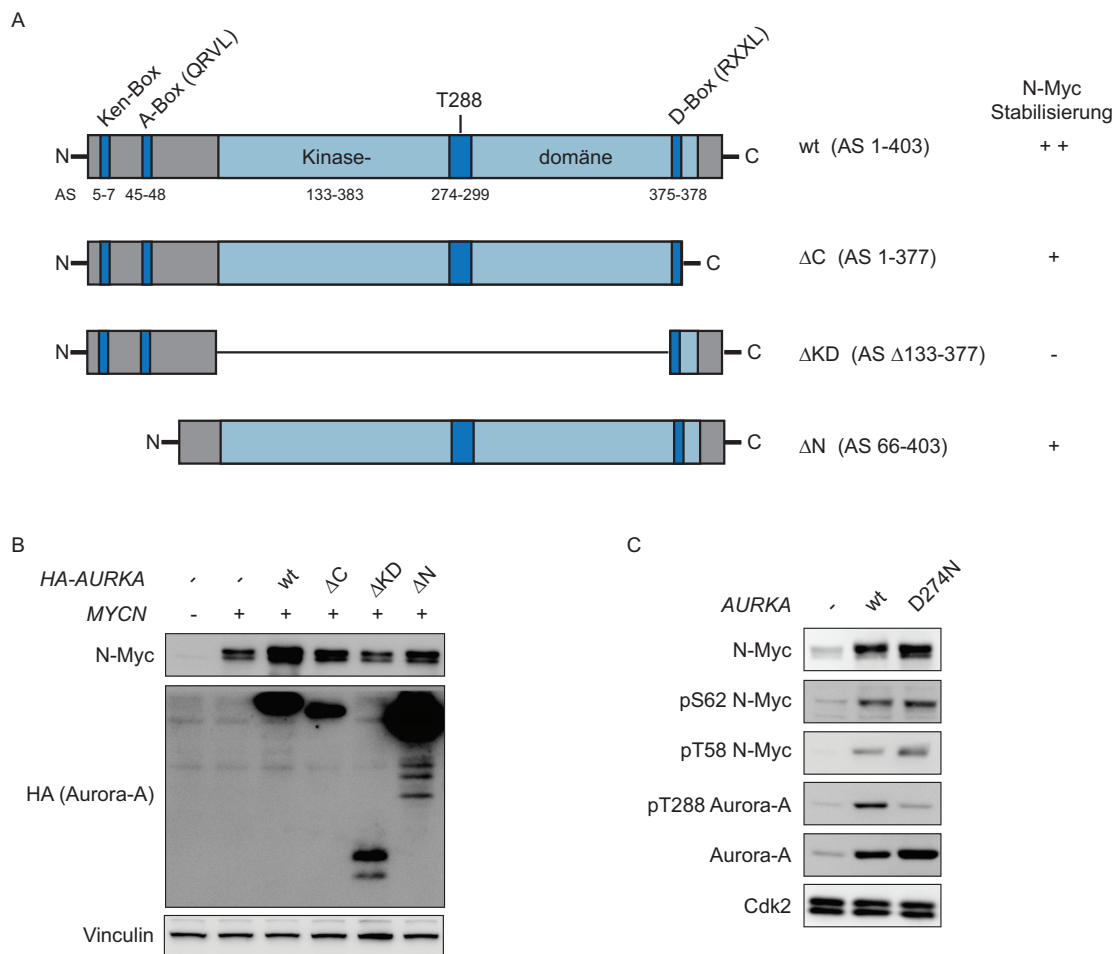


Abbildung 4.6: Die N-Myc-Stabilisierung ist unabhängig von der Kinaseaktivität

- A) Schema der einzelnen Aurora-A Deletionsmutanten und deren Effekt auf die N-Myc-Proteinstabilität (++ = starke Stabilisierung; + = moderate Stabilisierung; - = keine Stabilisierung).
- B) SH-EP-Zellen wurden mit den HA-markierten *AURKA*-Mutanten (siehe 4.7 A) und *MYCN* ko-transfiziert. Die N-Myc- und Aurora-A-Proteinlevel wurden mittels WB visualisiert. Vinculin diente als Ladekontrolle.
- C) SH-EP-Zellen wurden entweder mit Aurora-A wt oder einer Kinase-inaktiven Mutante sowie N-Myc ko-transfiziert. Totale N-Myc- und Aurora-A-Level, sowie phosphoryliertes N-Myc (pT58 und pS62) und Aurora-A (pT288) wurden mit Hilfe eines WB detektiert. Cdk2 wurde als Ladekontrolle verwendet.

Teile dieser Abbildung wurden in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

Inwiefern die Kinaseaktivität von Aurora-A zur N-Myc-Proteinstabilität beiträgt, sollte mit Hilfe einer Kinase-inaktiven Aurora-A-Mutante (D274N) analysiert werden. Zur Kontrolle der Kinaseaktivität wurde die Autophosphorylierung an Threonin 288 untersucht. Aktives Aurora-A ist an T288 phosphoryliert, wohingegen inaktives Aurora-A dephosphoryliert vorliegt. Sowohl die Überexpression von Aurora-A wt als auch die Überexpression der inaktiven Mutante führten zu einer erhöhten N-Myc-Proteinexpression. Darüber hinaus zeigte die Mutante keine Kinaseaktivität. Dagegen konnte nach Überexpression des wildtyp Proteins eine stärkere Phosphorylierung an

T288 festgestellt werden (Abbildung 4.6 C). Demzufolge ist die N-Myc-Proteininstabilität eine Kinase-unabhängige Funktion. Allerdings ist die Kinasedomäne von Aurora-A für die Stabilisierung von N-Myc notwendig.

4.1.7 N-Myc wird nicht durch Aurora-B stabilisiert

Die katalytische Domäne von Aurora-A ist entscheidend für die Stabilisierung von N-Myc (Abbildung 4.6). Die katalytischen Domänen der Aurora-Kinasen sind hochkonserviert. Ob auch die anderen Aurora-Kinasen einen stabilisierenden Effekt auf N-Myc haben, sollte im Folgenden eingehender untersucht werden. Hierfür wurden SH-EP-Zellen mit *MYCN*, *AURKA* und *AURKB* ko-transfiziert und das Proteinlevel mittels WB ermittelt. Lediglich eine Aurora-A-Überexpression erhöhte die N-Myc-Proteinmenge, wohingegen eine Aurora-B-Überexpression die N-Myc-Level nicht beeinflusste (Abbildung 4.7 A). Darüber hinaus wiesen Aurora-B depletierte Zellen im Vergleich zu nicht depletierten Zellen ebenfalls konstante N-Myc-Proteinmengen auf (Abbildung 4.6 B).

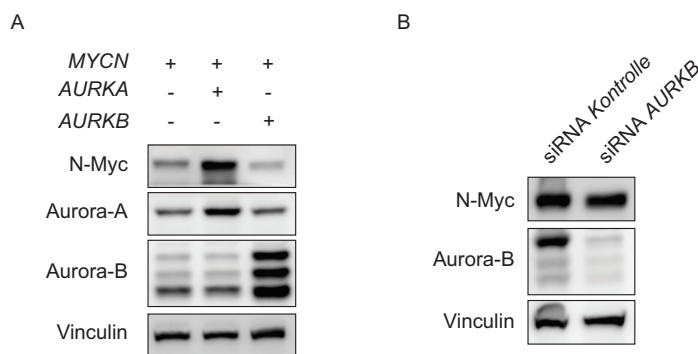


Abbildung 4.7: N-Myc wird nicht durch Aurora-B stabilisiert

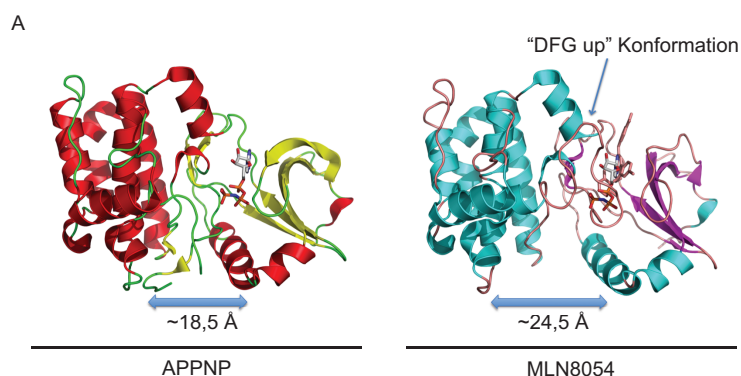
- A) SH-EP-Zellen wurden mit *MYCN*, *AURKA* und *AURKB* transfiziert und nach 48 h wurden die Proteinlevel an N-Myc, Aurora-A und -B mit Hilfe eines WBs bestimmt. Vinculin diente als Ladekontrolle.
- B) IMR-32-Zellen wurden mit siRNAs gegen *AURKB* und einer Kontroll-siRNA transfiziert. N-Myc, Aurora-B, sowie Vinculin (als Ladekontrolle) wurden im WB detektiert.
- Diese Abbildung wurde veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

4.2 Die spezifischen Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 dissoziieren den N-Myc/Aurora-A-Komplex und destabilisieren dadurch N-Myc

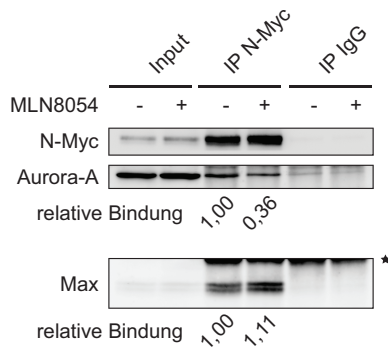
4.2.1 Der Aurora-A Inhibitor MLN8054 reduziert das N-Myc Proteinlevel

Kristallographische Studien zeigen, dass ein spezifischer Aurora-A-Inhibitor (MLN8054) eine atypische „DFG-up Konformation“ in der Kinasedomäne induziert, in denen mehrere Aminosäurereste eine veränderte Stellung zur ATP-gebundenen Form einnehmen (Dodson et al., 2010; Manfredi et al., 2007; Sloane et al., 2010) (Abbildung 4.8 A). Hinsichtlich der Tatsache, dass die Aurora-A/N-Myc-Interaktion und die Kinasedomäne von Aurora-A ausschlaggebend für den stabilisierenden Effekt auf N-Myc sind (Abbildung 4.3, 4.4 und 4.6), könnte diese MLN8054-bedingte Konformationsänderung den Komplex zwischen Aurora-A und N-Myc aufbrechen und destabilisierend auf das N-Myc-Protein wirken.

Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde eine endogene IP mit und ohne MLN8054-Inkubation durchgeführt. IMR-32-Zellen wurden für 4 h mit dem Aurora-A-Inhibitor MLN8054 bzw. mit DMSO als Kontrolle behandelt. Zum Schutz vor einer proteasomalen Degradation des N-Myc-Proteins wurden die Zellen parallel mit dem Proteasominhibitor MG132 inkubiert. N-Myc wurde mit einem spezifischen N-Myc-Antikörper präzipitiert und die Ko-Präzipitation von Aurora-A mit Hilfe eines WBs ermittelt. Nach MLN8054-Behandlung war die Interaktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle um ca. 70 % reduziert (DMSO: 1,00; MLN8054: 0,36). Die Interaktionsabnahme war spezifisch für den N-Myc/Aurora-A-Komplex, wohingegen ein anderer N-Myc-Bindungspartner (Max) durch den Aurora-A-Inhibitor nicht in seiner Affinität an N-Myc zu binden beeinflusst wurde (Abbildung 4.8 B).



B



C

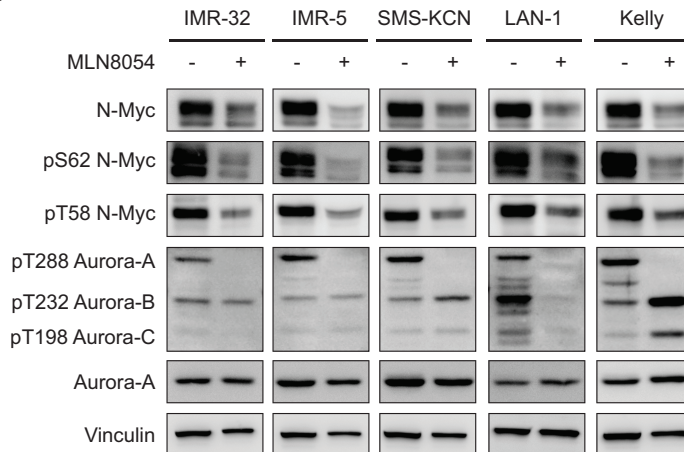


Abbildung 4.8: Der Aurora-A-Inhibitor MLN8054 führt zur spezifischen Dissoziation des Aurora-A/N-Myc Komplex und reduziert dadurch die N-Myc-Proteinmenge

- A) MLN8054 induziert eine atypische „DFG-up Konformation“ in der Aurora-A-Kinasedomäne. Kristallstruktur der ATP-gebundenen (APPNP) und der MLN8054-gebundenen Form von Aurora-A (nach (Dodson et al., 2010; Sloane et al., 2010); durch Prof. Schindelin graphisch dargestellt)
- B) Eine endogene Immunpräzipitation mit spezifischem N-Myc Antikörper wurde in IMR-32-Zellen mit und ohne MLN8054-Inkubation (1000 nM) durchgeführt. Zum Schutz vor einer proteasomalen Degradation wurden die Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 (5 μ M) inkubiert. Als Kontrolle diente ein Immunglobulingemisch der gleichen Spezies. Der Input betrug ca. 7.5 % vom eingesetzten Lysat. Max diente als Kontrolle eines bekannten N-Myc-Interaktionspartners (* = leichte IgG-Kette).
- C) Fünf *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzelllinien wurden für 48 h mit dem Aurora-A-Inhibitor MLN8054 (1000 nM) behandelt. Die angegebenen (phosphorylierten) Proteine wurden im WB detektiert. Vinculin diente als Ladekontrolle.

Teile dieser Abbildung wurden in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

Der Einfluss des spezifischen Inhibitors auf die N-Myc-Proteinexpression sollte in fünf *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinien analysiert werden. In allen fünf Zelllinien war eine starke Reduktion der N-Myc-Expression, feststellbar. Auch die phosphorylierten Formen des N-Myc-Proteins (pT58 sowie pS62) reduzierten sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Konformationsänderung und die daraus resultierende Hemmung der Aurora-A-Aktivität konnte durch den Verlust der Autophosphorylierung an Threonin 288 bestätigt werden, während die Aurora-A-Gesamtproteinmenge in allen Zelllinien

konstant blieb. Die anderen Aurora-Kinasen (Aurora-B und Aurora-C) waren in ihrer Kinaseaktivität nicht beeinflusst, welches durch den jeweiligen Status der Autophosphorylierungen an pT232 (Aurora-B) und pT198 (Aurora-C) verifiziert wurde. Lediglich in der Zelllinie LAN-1 war eine Inhibierung der Aurora-Kinasen B und C feststellbar (Abbildung 4.8 C).

Die Ergebnisse zeigen eine Aufspaltung des Aurora-A/N-Myc-Komplexes durch den spezifischen Aurora-A-Inhibitor MLN8054. Die Dissoziation der Interaktion resultierte in einer Reduktion der N-Myc-Proteinexpression. Eine Beteiligung der homologen Aurora-Kinasen (B und C) an der N-Myc-Proteininstabilisierung konnte ausgeschlossen werden.

4.2.2 Ausschließlich eine bestimmte Klasse an Aurora-A-Inhibitoren reduzieren die N-Myc-Proteinlevel

Das Molekül MLN8054 ist ein spezifischer Aurora-A-Inhibitor, der trotz der hohen Sequenzhomologie zwischen Aurora-A und B 43-fach stärker Aurora-A hemmt (Manfredi et al., 2007). Eine Weiterentwicklung dieses Inhibitors ist MLN8237 mit sehr ähnlicher Struktur. Als funktionelle Gruppen verfügt dieses Molekül zusätzlich über zwei Methoxygruppen (Abbildung 4.9 A).

Neben den beiden MLN-Inhibitoren gibt es weitere Aurora-Kinase-Inhibitoren. Diese weisen im Vergleich zu den MLN-Molekülen andere strukturelle Eigenschaften auf.

Der Aurora-A-Inhibitor MK5108 hemmt kompetitiv die ATP-Bindung und inhibiert so spezifisch die Aurora-A-Aktivität. Die Selektivität gegenüber den anderen Aurora-Kinasen ist dabei sehr hoch (zu Aurora-B: 220-fach; zu Aurora-C: 190-fach).

Der Pan Aurora-Kinase-Inhibitor VX680 kann neben Aurora-A sowohl Aurora-B als auch Aurora-C in nano-molaren Konzentrationen effektiv hemmen.

Inwiefern diese Aurora-Inhibitoren, die sich zum Teil in klinischen Studien befinden, einen Einfluss auf die N-Myc-Proteinexpression haben, sollte durch Titrationsreihen in SMS-KCN-Zellen analysiert werden.

Es zeigte sich, dass ausschließlich die MLN-Inhibitoren mit gleicher Molekülstruktur die N-Myc-Proteinmengen konzentrationsabhängig reduzieren. Trotz der Aurora-A-Inaktivierung, dokumentiert durch die Autophosphorylierung an Threonin 288, waren die beiden anderen Inhibitoren MK5108 und VX680 nicht in der Lage die N-Myc-Proteinexpression zu senken (Abbildung 4.9). Dies bestätigt erstens die Kinase-unabhängige N-Myc-Stabilisierung durch Aurora-A und deutet zweitens auf einen konformationsabhängigen Mechanismus hin.

A

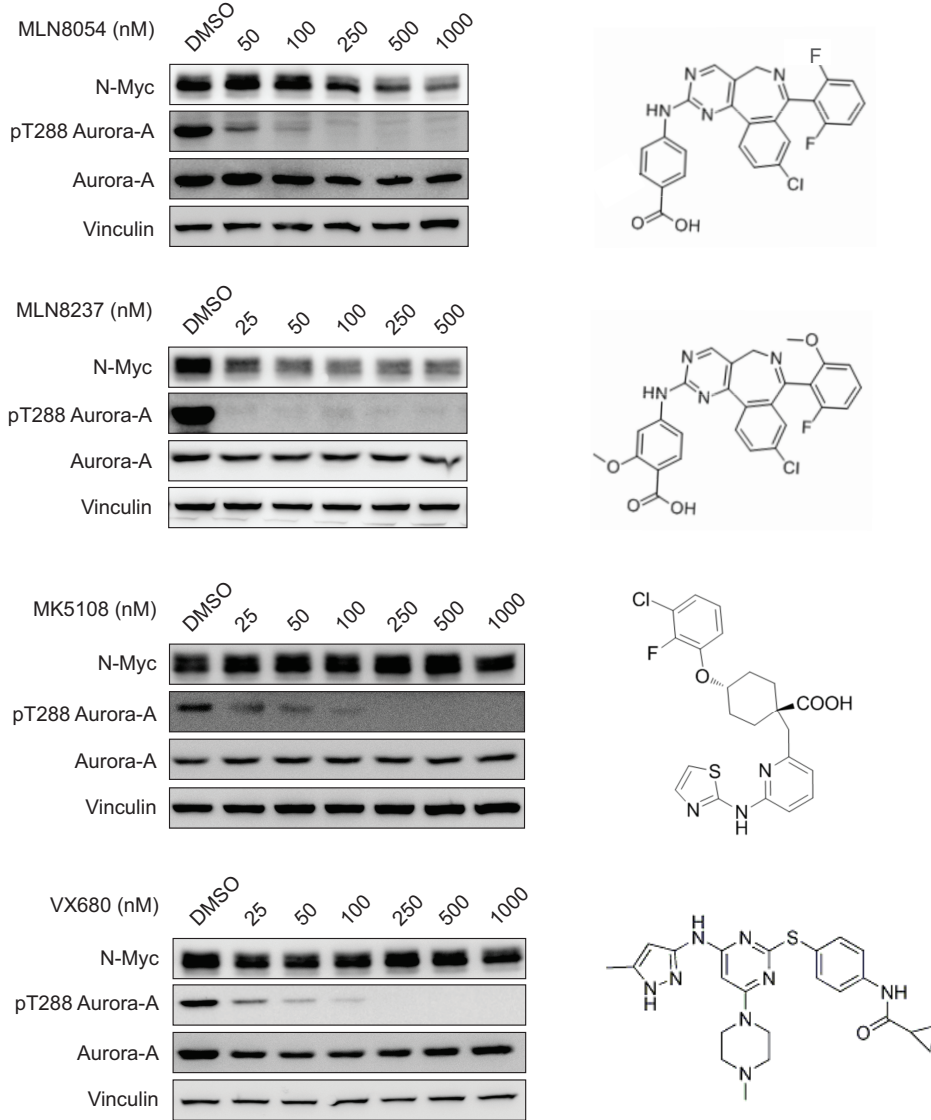
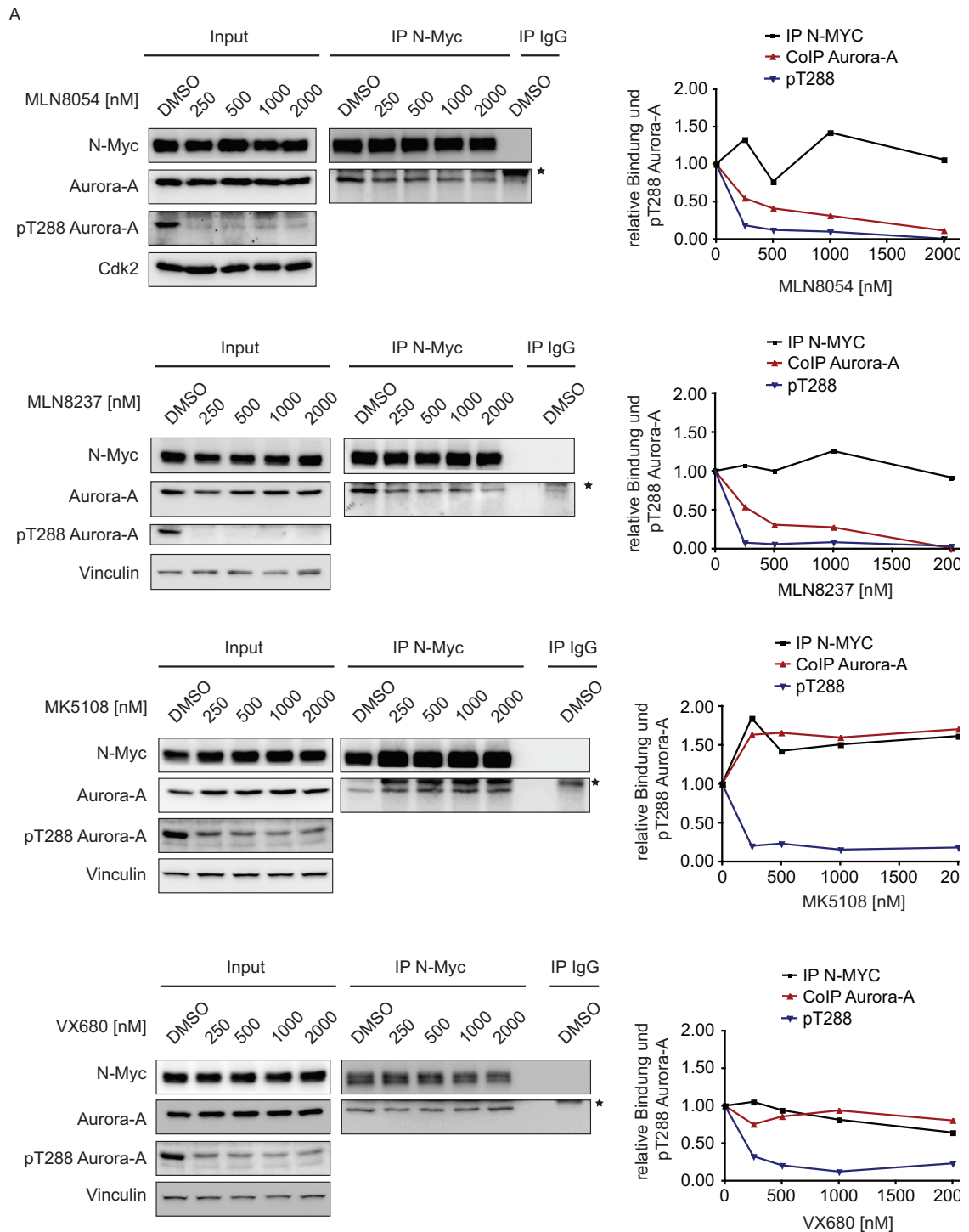


Abbildung 4.9: Die N-Myc-Proteinreduktion ist abhängig von der Molekülstruktur der Aurora-A-Inhibitoren

A) SMS-KCN-Zellen wurden mit den angegebenen Inhibitoren (Struktur: rechte Spalte) und Konzentrationen für 24 h behandelt. Das N-Myc-Proteinlevel, sowie Aurora-A und dessen phosphorylierte Form pT288 wurden mittels WB ermittelt. Vinculin diente als Ladekontrolle. Teile dieser Abbildung wurden in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

4.2.3 Ausschließlich Aurora-A-Inhibitoren, die die N-Myc-Proteinexpression reduzieren, dissoziieren auch den Aurora-A/N-Myc-Komplex

Die Konformationsänderung nach einer spezifischen Aurora-A-Inhibition mit MLN8054 bricht den N-Myc/Aurora-A-Komplex auf und führt zum N-Myc-Proteinabbau (Abbildung 4.8).



B

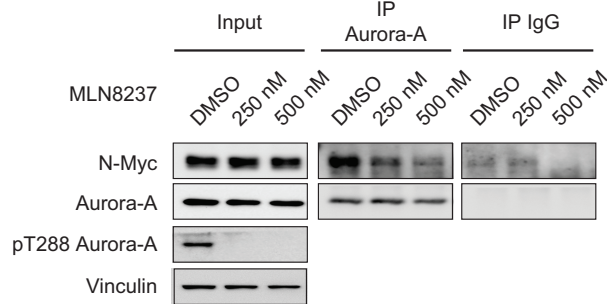


Abbildung 4.10: Ausschließlich die Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 dissoziieren den Aurora-A/N-Myc-Komplex

- A) IMR-32-Zellen wurden mit den jeweiligen Aurora-A-Inhibitoren und dem Proteasominhibitor MG132 (5 μ M) für 4 h inkubiert. Nach einer endogenen N-Myc-IP wurde das Präzipitat mit Hilfe eines WB detektiert. Der Input betrug ca. 7.5 % vom eingesetzten Lysat. Die Inhibition von Aurora-A wurde mit Hilfe der Autophosphorylierung an Threonin 288 ermittelt. Die densitometrische Quantifizierung des WBs ist graphisch dargestellt (rechte Spalte) (* = Schwere IgG-Kette).
- B) IMR-32-Zellen wurden mit MLN8237 und dem Proteasominhibitor MG132 (5 μ M) für 4 h inkubiert. Nach einer endogenen Aurora-A IP wurde das Präzipitat mit Hilfe eines WB detektiert. Der Input betrug ca. 7.5 % vom eingesetzten Lysat. Die Inhibition von Aurora-A wurde mit Hilfe der Autophosphorylierung an Threonin 288 ermittelt. Vinculin diente als Ladekontrolle.

Teile dieser Abbildung wurden in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

Zur Verifizierung und genaueren Untersuchung dieses Sachverhaltes wurden endogene N-Myc-IPs mit den anderen Aurora-A-Inhibitoren, die keinen Einfluss auf die N-Myc-Proteinmengen hatten, durchgeführt. IMR-32-Zellen wurden für 4 h mit den jeweiligen Aurora-A-Inhibitoren und dem Proteasominhibitor MG132 behandelt. Die Präzipitation von N-Myc sowie die Interaktion mit Aurora-A wurden im WB analysiert. Die Ergebnisse einer densitometrischen Quantifizierung wurde graphisch dargestellt (Abbildung 4.10 A). MLN8054 reduzierte die N-Myc/Aurora-A-Interaktion konzentrationsabhängig. Der MLN-Inhibitor MLN8237, der eine ähnliche Molekülstruktur zu der von MLN8054 aufweist und auch einen negativen Einfluss auf die N-Myc Proteinexpression ausübt, induzierte ebenfalls eine Komplexauflösung. Dagegen hatten die anderen Aurora-A-Hemmstoffe MK5108 und VX680 keinen Einfluss auf die Komplexbildung, obwohl die Aurora-A-Aktivität inhibiert wurde (Abbildung 4.10 A).

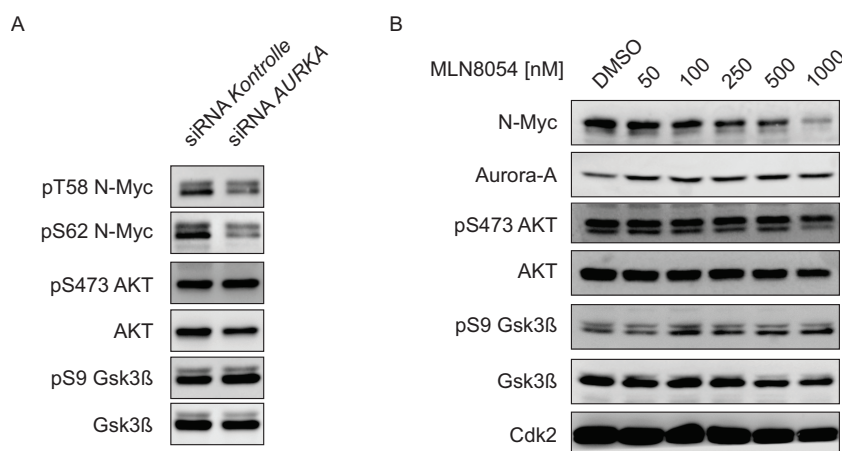
Eine inverse Ko-IP mit Aurora-A-Antikörpern bestätigte eine konzentrationsabhängige Abnahme der N-Myc/Aurora-A-Interaktion mit dem MLN8237-Inhibitor (Abbildung 4.10 B).

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass ausschließlich Aurora-Inhibitoren, die eine spezifische Konformationsänderung in der Kinasedomäne induzieren, die Interaktion zwischen Aurora-A und N-Myc konzentrationsabhängig aufbrechen können und damit die N-Myc-Level reduzieren.

4.2.4 MLN8054 hat keinen Effekt auf die Aktivität von GSK3 β

N-Myc wird durch GSK3 β an Threonin 58 phosphoryliert, wodurch der proteasomale Abbau eingeleitet wird (Abschnitt 3.3.4). In vorherigen Studien wurde eine mögliche Hemmung von GSK3 β durch eine Aurora-A-abhängige Phosphorylierung an Serin 9 beschrieben (Dar et al., 2009). Eine indirekte Inhibierung von GSK3 β durch Aurora-A erfolgt über die Aktivierung von AKT (Yao et al., 2009). Infolgedessen sollte überprüft werden, welche Auswirkung die Inhibition von Aurora-A auf den PI3K/AKT/GSK3 β -Signalweg in Neuroblastomzellen hat. Dazu wurde die *MYCN*-amplifizierte Zelllinie IMR-5 mit siRNAs gegen *AURKA* transfiziert. Mit Hilfe eines WBs sollte die Aktivität von GSK3 β und AKT anhand der Phosphorylierungen an Serin 9 (für GSK3 β) und an Serin 473 (für AKT) abgeschätzt werden. Ist GSK3 β an Serin 9 phosphoryliert, ist die Kinase gehemmt. Dagegen führt eine S473-Phosphorylierung zu einer Aktivierung von AKT. Trotz einer Reduktion von phosphoryliertem N-Myc (T58 und/oder S62) blieben die phosphorylierten Formen von GSK3 β und AKT konstant (Abbildung 4.11 A). Wie auch eine Aurora-A-Depletion hatte die spezifische Aurora-A-Inhibierung keinen Einfluss auf die Aktivität des PI3K/AKT/GSK3 β -Signalweges. Steigende Konzentrationen des Inhibitors MLN8054 führten allerdings zu einer Reduktion der N-Myc-Proteinmengen (Abbildung 4.11 B). Andere Aurora-Inhibitoren (CCT137690 und Hesperadin), die nicht den N-Myc/Aurora-A-Komplex dissoziieren konnten, führten zu einer Dephosphorylierung von GSK3 β an Serin 9 (Abbildung 4.11 C).

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass Aurora-A in Neuroblastomzellen keinen Effekt auf die Aktivität des PI3K/AKT/GSK3 β -Signalweges hat. Andere Aurora-Inhibitoren wie CCT137690 und Hesperadin, ein Aurora-B-Inhibitor, der in hohen Konzentrationen auch Aurora-A hemmen kann, haben *off-target* Effekte, die zur Induktion der GSK3 β -Aktivität führen. Der Aurora-A-Inhibitor MLN8054 hemmt spezifisch Aurora-A hat jedoch keinen Effekt auf die Serin 9-Phosphorylierung von GSK3 β (Abbildung 4.11 C).



C

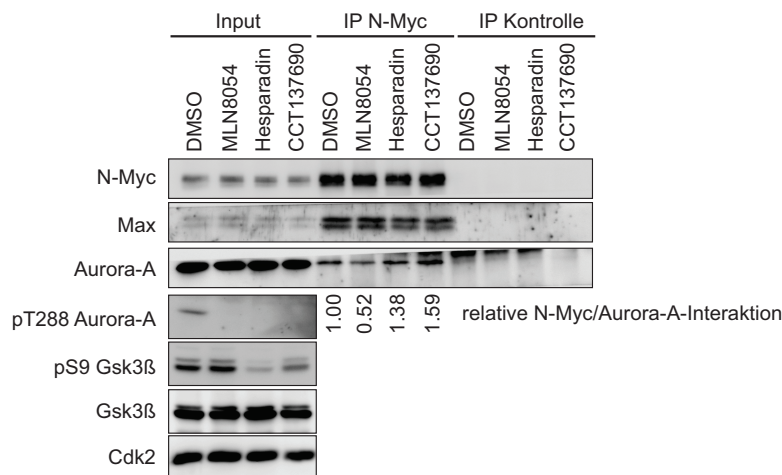


Abbildung 4.11: Aurora-A hat in Neuroblastomzelllinien keinen Effekt auf den PI3K/AKT/GSK3β-Signalweg

- A) IMR-5-Zellen wurden mit siRNAs gegen *AURKA* und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 60 h wurde das phosphorylierte N-Myc-Proteinlevel (T58 und S62), sowie GSK3β (S9) und AKT (S473) mit Hilfe eines WBs ermittelt. (Proteinlysate von Abbildung 4.1 A).
- B) SH-EP-Zellen wurden mit *MYCN* wt infiziert. Die Zellen wurden mit MLN8054 in den angegebenen Konzentrationen für 24 h behandelt. Die Proteinlevel von N-Myc, Aurora-A, GSK3β (S9) sowie AKT (S473) wurden mittels WB ermittelt. Cdk2 diente als Ladekontrolle.
- C) IMR-5-Zellen wurden mit den jeweiligen Aurora-A-Inhibitoren und dem Proteasominhibitor MG132 (5 μM) für 4 h inkubiert. Nach einer endogenen N-Myc-IP wurde das Präzipitat mit Hilfe eines WB detektiert. Der Input betrug ca. 7.5 % vom eingesetzten Lysat. Die Inhibition von Aurora-A wurde mit Hilfe der Autophosphorylierung an Threonin 288 ermittelt. Des Weiteren wurde die Aktivität von GSK3β durch die Phosphorylierung an Serin 9 abgeschätzt. Als Ladekontrollen dienten sowohl Cdk2 als auch GSK3β.

Teile dieser Abbildung wurden in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

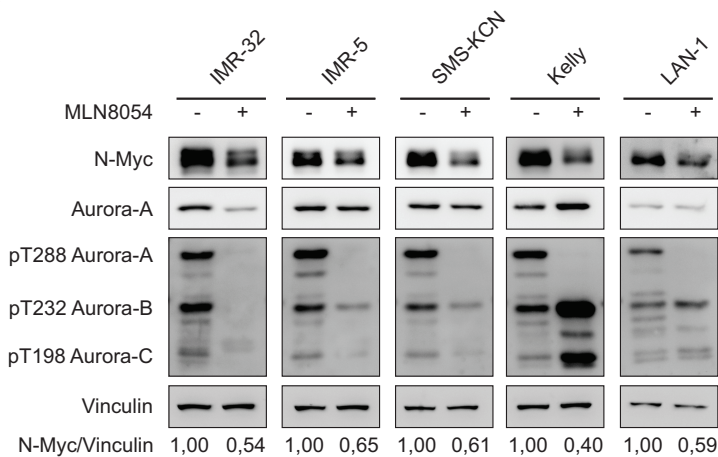
4.2.5 MLN8054 reguliert die N-Myc-Expression posttranslational

Die beiden Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 dissoziieren den N-Myc/Aurora-A-Komplex. Diese Interaktion ist für die Stabilisierung des N-Myc-Proteins durch Aurora-A essentiell (Abbildung 4.3, 4.4, 4.8, 4.9 und 4.10). Folglich sollte eine Inkubation von MLN8054 und MLN8237 zu einer posttranslationalen Destabilisierung des N-Myc-Proteins führen. Zur Überprüfung der Hypothese wurden fünf *MYCN*-amplifizierte Zelllinien für 24 h mit MLN8054 behandelt und das N-Myc-Proteinlevel sowie die *MYCN*-mRNA-Expression mit Hilfe einer *Realtime*-PCR analysiert. Trotz gleichbleibender mRNA-Expression reduzierte sich das N-Myc-Proteinlevel um ca. 50 % (Abbildung 4.12 A und B). In Cycloheximid-Versuchen konnte der zeitliche Verlauf der N-Myc-Proteindegradation nach Inhibitorzugabe mit der N-Myc-Abbaugeschwindigkeit DMSO-behandelter Zellen verglichen werden. Nach einer 24-stündigen Vorbehandlung mit MLN8054 reduzierte sich die N-Myc-Halbwertszeit von 47 ± 4 min auf 27 ± 7 min. Ein rapider Abbau war insbesondere in den ersten Zeitpunkten der Versuchsreihe (bis zu 45 min) zu beobachten (Abbildung 4.12 C und D). Die Cycloheximid-Resultate konnten in einem *Pulse-Chase*-Experiment verifiziert werden. Dabei wurden in *MYCN*-

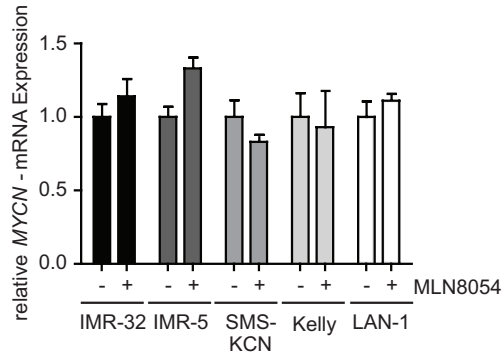
überexprimierenden SH-EP-Zellen die Proteine mit radioaktivem Methionin und Cystein markiert und anschließend der Abbau des radioaktiven N-Myc-Proteins zeitlich verfolgt. In MLN8054-behandelten Zellen zeigte sich ein schnellerer Abbau an radioaktivem N-Myc als in der DMSO-Kontrolle. Als Negativkontrolle dienten SH-EP-Zellen ohne *MYCN*-Expression (Abbildung 4.12 E und F).

Darüber hinaus verhinderte eine Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG132 die Reduktion des N-Myc Proteins in IMR-32-Zellen, trotz gleichzeitiger Aurora-A Inhibierung durch MLN8054 (Abbildung 4.12 G). Die Ergebnisse bestätigen, dass der MLN8054-Inhibitor dazu beiträgt, die N-Myc-Expression auf posttranslatonaler Ebene zu reduzieren.

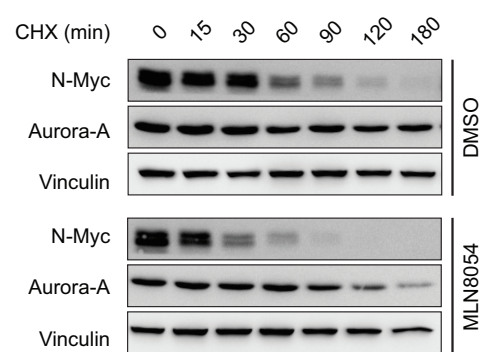
A



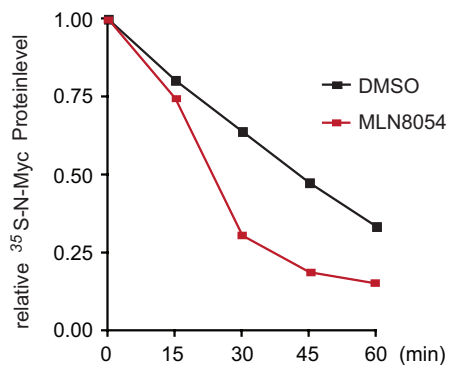
B



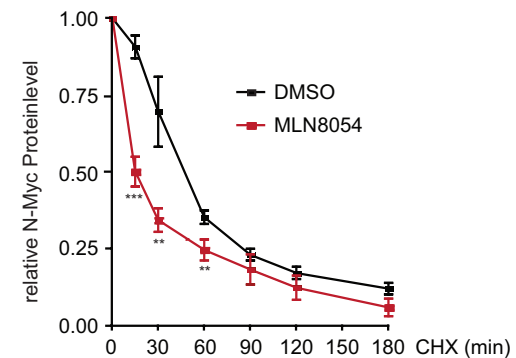
C



E



D



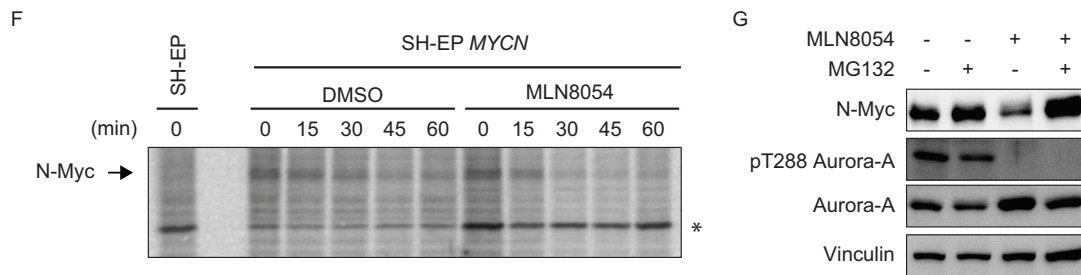


Abbildung 4.12: MLN8054 reguliert N-Myc posttranslational

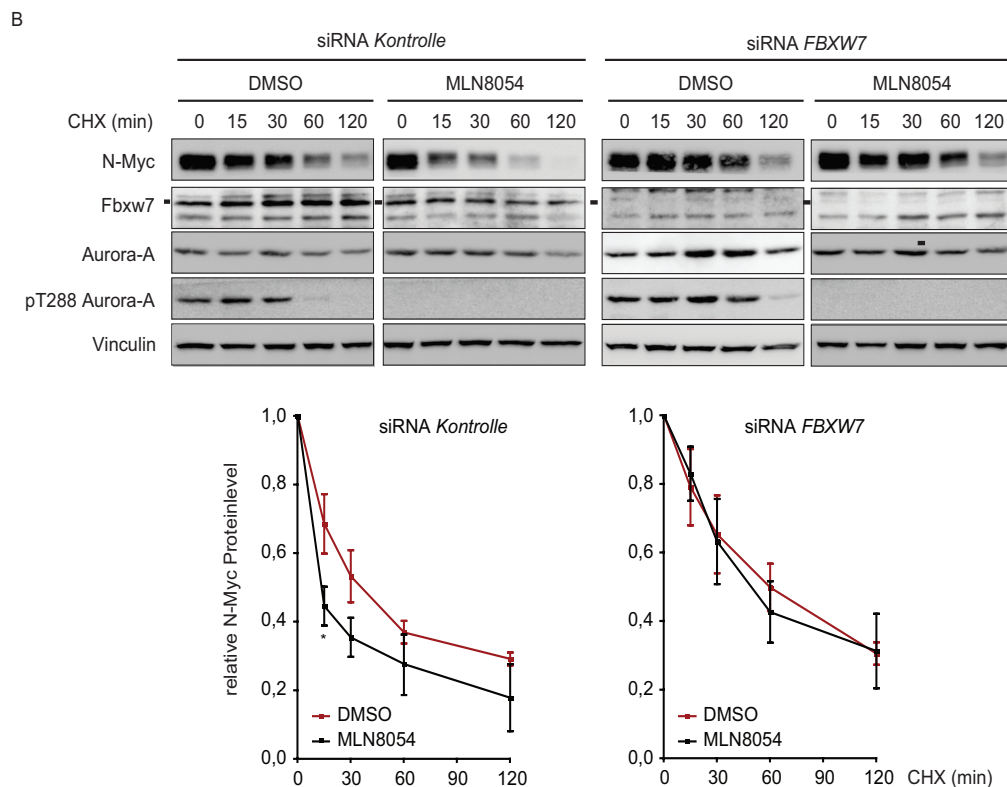
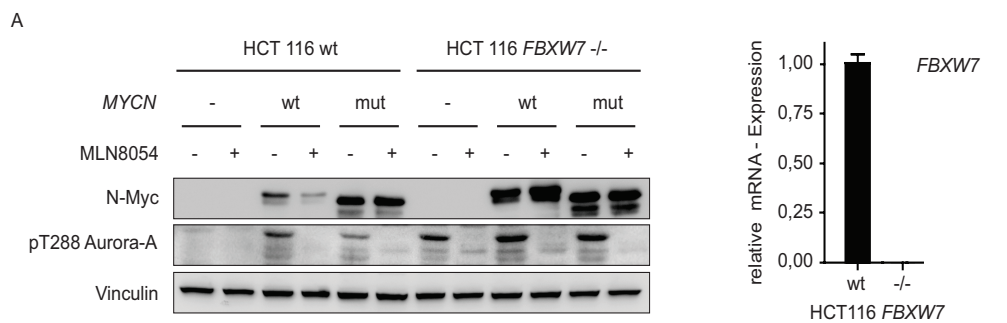
- A) Fünf *MYCN*-amplifizierte Zellen wurden mit dem Aurora-A-Inhibitor (1000 nM) für 24 h behandelt. Die Proteinlevel von N-Myc, Aurora-A und die phosphorylierten Proteine Aurora-A (pT288), Aurora-B (pT232) und Aurora-C (pT198) wurden im WB nachgewiesen. Vinculin diente als Ladekontrolle.
- B) Die behandelten Zellen (siehe 4.12 A) wurden mittels RT-PCR auf deren *MYCN*-mRNA-Expression analysiert. Normalisiert wurde auf *RPS14* und *B2M*. (Mittelwert \pm SD; technisches Triplikat)
- C) Nach 24-stündiger MLN8054-Inkubation (1000 nM) wurde die Translation durch 100 μ g/mL Cycloheximid (CHX) blockiert und die Proteinmengen nach den angegebenen Zeiten mit Hilfe eines WBs detektiert. Vinculin diente als Ladekontrolle (repräsentatives Ergebnis aus drei Cycloheximid-Experimenten).
- D) Quantifizierung der drei CHX-Experimente (siehe 4.12 C). Die Ausgangswerte (0 min) wurden gleich 1,00 gesetzt. Die Halbwertszeiten betragen: $T_{1/2}$ (DMSO) = 47 ± 4 min; $T_{1/2}$ (MLN8054) = 27 ± 7 (Mittelwert \pm SEM) (** = $p < 0,02$; *** = $p < 0,0001$).
- E) Quantifizierung von F.
- F) *MYCN*-überexprimierende SH-EP-Zellen wurden für 24 h mit 1000 nM MLN8054 inkubiert. Die Zellen wurden mit radioaktivem Methionin und Cystein für 1 h behandelt und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Das Präzipitat der N-Myc-IP wurde auf ein Acrylamidgel aufgetragen und das radioaktive N-Myc-Signal densitometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte SH-EP-Zellen. (* = unspezifische Bande).
- G) IMR-32-Zellen wurden, wie angegeben, mit MLN8054 (1000 nM; 14 h) und MG132 (5 μ M; 14 h) behandelt. Das Zelllysate wurde im WB untersucht. Vinculin diente als Ladekontrolle.
- Diese Abbildung wurde in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

4.2.6 MLN8054 begünstigt den Fbxw7-vermittelten N-Myc Proteinabbau

Eine Aurora-A-Überexpression verhindert den Fbxw7-induzierten proteasomalen Abbau von N-Myc. Inwiefern die Aurora-A-Inhibition durch MLN8054 ebenso spezifisch die Fbxw7-vermittelte N-Myc-Degradation fördert, sollte anhand von Fbxw7-defizienten HCT116-Zellen, sowie HCT116 wt-Zellen untersucht werden. Beide Zelllinien wurden entweder mit *MYCN* wt oder mit der *MYCN* Mutante (T58A/S62A = mut), die von Fbxw7 nicht mehr gebunden und destabilisiert werden kann, infiziert und mit MLN8054 inkubiert. In HCT116 wt Zellen konnte eine N-Myc-Reduktion des wildtyp Proteins detektiert werden, wohingegen eine MLN8054-Behandlung keinen Effekt auf die N-Myc-Mutante hatte. In Fbxw7-defizienten Zellen blieben sowohl die N-Myc wt Proteinlevel als auch die Proteinmenge der Mutante trotz Aurora-A-Inhibition konstant (Abbildung 4.13 A).

Da es sich bei HCT116 um eine Kolonkarzinomzelllinie handelt, sollten diese Resultate in Neuroblastomzelllinien validiert werden. Daher wurden IMR-32-Zellen mit siRNAs gegen *FBXW7* transfiziert. Sowohl *Fbxw7*-depletierte Zellen als auch Kontrollzellen (transfizierte Zellen mit einer siRNA ohne bestimmter Zielsequenz) wurden entweder mit MLN8054 oder mit DMSO behandelt. Nach 24 h wurde ein Cycloheximid-Experiment durchgeführt, um die Degradationskinetik des N-Myc-Proteins zeitlich zu verfolgen. Die *FBXW7*-Repression führte zu einer Stabilisierung des N-Myc-Proteins und verhinderte den beschleunigten N-Myc-Zerfall nach einer MLN8054-Behandlung (Abbildung 4.13 B).

Neben *Fbxw7* gibt es weitere E3-Ligasen, die N-Myc ubiquitinieren können und dadurch den Proteinabbau fördern. Eine identifizierte Ubiquitinligase, die den proteasomalen Abbau von N-Myc induziert, ist HectH9 (Zhao et al., 2008). Während eine HectH9-Depletion keinen signifikanten Einfluss auf den MLN8054-vermittelten N-Myc-Abbau hatte, blieben die N-Myc-Proteinlevel in IMR-32-Zellen nach einer *FBXW7*-Depletion trotz einer Aurora-A-Inhibition konstant (Abbildung 4.13 C).



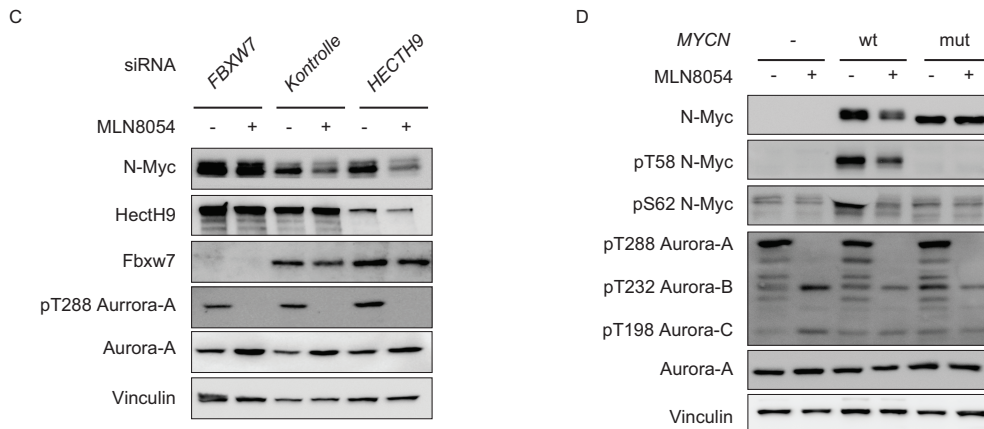


Abbildung 4.13: MLN8054 fördert die Fbxw7-vermittelte N-Myc-Proteindegradation

- A) HCT116 wildtyp (wt) und Fbxw7-defiziente (-/-) Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und die N-Myc-Proteinlevel nach MLN8054-Inkubation mittels WB detektiert. Vinculin diente als Ladekontrolle. Die *FBXW7*-Expression der HCT116-Zellen wurde mittels RT-PCR bestimmt (rechts; Mittelwert \pm SD; technisches Triplikat).
- B) IMR-32-Zellen wurden mit siRNAs gegen *FBXW7* und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden für 24 h mit DMSO bzw. mit MLN8054 (1000 nM) behandelt und anschließend für ein CHX-Experiment (100 μ g/mL Cycloheximid) verwendet. Vinculin diente als Ladekontrolle (repräsentatives Ergebnis aus drei Cycloheximid-Versuchen). Eine Quantifizierung der drei Experimente ist unterhalb des WBs graphisch dargestellt (Mittelwert \pm SEM) (* $p < 0,02$ relativ zu siFBXW7-transfizierten Zellen).
- C) IMR-32-Zellen wurden mit siRNAs gegen *FBXW7* und *HECTH9* sowie einer Kontroll-siRNA transfiziert. Die Proteinlevel von HectH9, Fbxw7, N-Myc, (pT288) Aurora-A sowie Vinculin wurden mit Hilfe eines WBs analysiert.
- D) SH-EP-Zellen wurden entweder mit *MYCN* wt oder mit *MYCN* mut (T58A/S62A) infiziert und mit MLN8054 (1000 nM) behandelt. Nach 24 h wurde das Zelllysate mittels WB analysiert. Vinculin diente als Ladekontrolle.

Diese Abbildung wurde in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

Die Fbxw7-induzierte N-Myc-Degradation und die Proteindestabilisierung durch Aurora-A sind phosphorylierungsabhängig. Der MLN8054 vermittelte N-Myc-Proteinabbau sollte demnach nicht bei der N-Myc Mutante (T58/S62A) stattfinden. Dies konnte sowohl in HCT116-Zellen (Abbildung 4.13 A), als auch in der Neuroblastomzelllinie SH-EP bestätigt werden (Abbildung 4.13 D).

Die Ergebnisse belegen eine MLN8054 induzierte N-Myc-Proteindestabilisierung, die über die E3-Ubiquitinligase Fbxw7 vermittelt wird.

4.2.7 N-Myc wird während der Mitose über Fbxw7 degradiert

In den Cycloheximid- und den *Pulse-Chase*-Experimenten zeigte sich, dass N-Myc mit einer Halbwertszeit von ca. 50 min degradiert wird (Abbildung 4.13). Bei MLN-behandelten Zellen ist diese Halbwertszeit um etwa die Hälfte reduziert. Mit 24-48 Stunden waren die Inkubationszeiten in den vorherigen Versuchen sehr lang im Vergleich zur Halbwertszeit. Aus diesem Grund wurde eine Messreihe mit kürzeren Zeitpunkten durchgeführt. Hierzu wurden SH-EP-Zellen retroviral mit *MYCN* infiziert. Die *MYCN*-

überexprimierenden Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte (4 h - 48 h) mit dem Aurora-A-Inhibitor MLN8054 inkubiert, lysiert und die N-Myc-Proteinlevel mit Hilfe eines WBs bestimmt. Die Inkubation des Inhibitors bewirkte zu allen Zeitpunkten eine Dephosphorylierung an Threonin 288. Die N-Myc-Proteinlevel reduzierten sich dagegen zeitabhängig. Nach 4 h war nur ein moderater Rückgang der N-Myc-Expression feststellbar. 44 h später war die größte N-Myc-Abnahme detektierbar (Abbildung 4.14 A). Die Diskrepanz zwischen kurzer N-Myc-Halbwertszeit und langer Inhibitor-Inkubationszeit könnte daher stammen, dass der Fbxw7-vermittelte N-Myc-Proteinabbau zellzyklusspezifisch stattfindet. Im Gegensatz zur Fbxw7-induzierten c-Myc Degradation ist die N-Myc-Phosphorylierung an Serin 62 zellzyklusabhängig und wird durch den Zyklin B/Cdk1-Komplex während der Mitose induziert (Sjostrom et al., 2005). Diese Proteinmodifikation ist das Signal für eine weitere Phosphorylierung an Threonin 58 und die nachfolgende Fbxw7-vermittelte Degradation. Eine N-Myc-Stabilisierung durch das Aurora-A-Protein, das spezifisch die Fbxw7-induzierte-Proteindegradation verhindert, sollte demnach während der Mitose stattfinden.

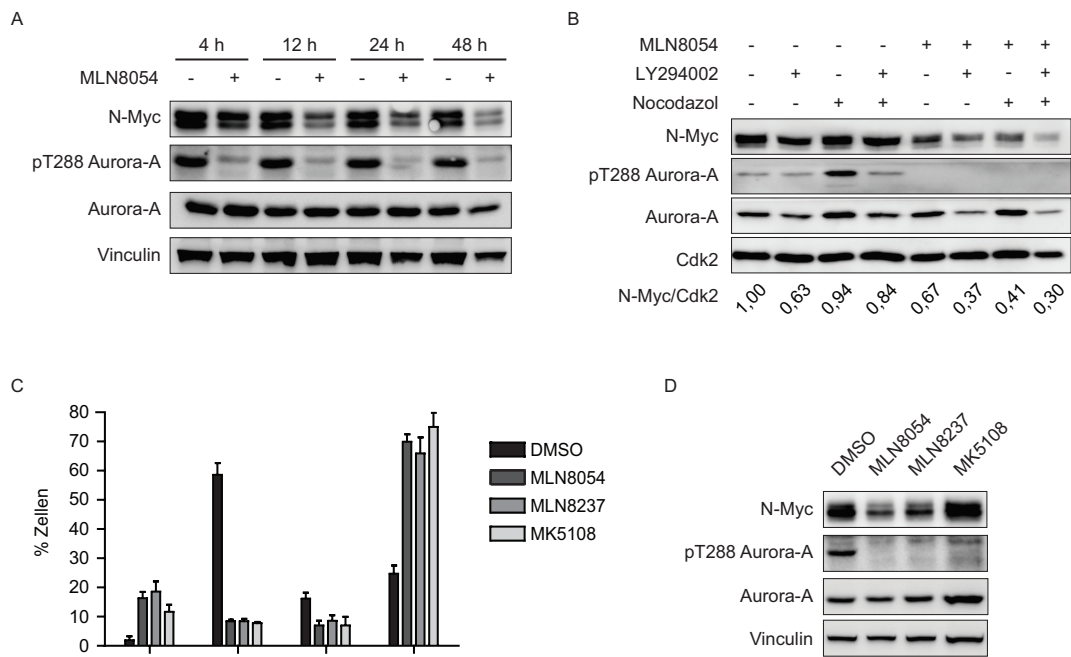


Abbildung 4.14: Die Stabilisierung von N-Myc durch Aurora-A findet während der Mitose statt

- A) *MYCN*-überexprimierende SH-EP-Zellen wurden mit dem Aurora-A-Inhibitor MLN8054 für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert und das N-Myc-Proteinlevel im WB bestimmt. Vinculin diente als Ladekontrolle, sowie pT288 Aurora-A als Kontrolle der erfolgreichen Kinasehemmung.
- B) IMR-5-Zellen wurden mit den Inhibitoren MLN8054 (1000 nM), Nocodazol (0,1 µg/ml), sowie LY294002 (50 µM), wie angegeben, für 18 h inkubiert. Die Proteinmengen von N-Myc, (pT288) Aurora-A und Cdk2 (Ladekontrolle) wurden im WB analysiert.
- C) IMR-32-Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Aurora-Inhibitoren (1000 nM) behandelt. Ein PI-FACS wurde durchgeführt. DMSO-behandelte Zellen fungierten als Kontrolle (Mittelwert ± SD; biologisches Triplikat).
- D) Behandelte IMR-32-Zellen (siehe 4.14 C) wurden lysiert und die Proteinmengen von N-Myc, (pT288) Aurora-A und Vinculin (Ladekontrolle) im WB analysiert.

Diese Abbildung wurde in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden IMR-5-Zellen mit Nocodazol, einem Inhibitor der Mikrotubuli-Polymerisation und dem PI3K-Inhibitor LY294002, der die T58-Phosphorylierung induziert und dadurch die N-Myc-Degradation fördert, behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen mit MLN8054 inkubiert. Eine alleinige Inhibition des PI3K-Signalweges führte zu einer Reduktion der N-Myc-Proteinmengen um etwa 40 %. Die Arretierung der Zellen in der Prometaphase durch Nocodazol zeigte kaum eine Veränderung auf die N-Myc-Proteinexpression, wohingegen der Mitosearrest eine Akkumulation von (aktiver) Aurora-A-Kinase hervorrief. Wurde allerdings gleichzeitig Aurora-A inhibiert, führte dies in mitotischen Zellen zu einem verstärktem N-Myc Proteinabbau (um etwa 60 %) (Abbildung 4.14 B).

Eine Aurora-A-Inhibition könnte auch indirekt dazu beitragen, dass N-Myc durch Fbxw7 degradiert wird. So führt eine Behandlung mit hohen Konzentrationen von Aurora-A-Inhibitoren zu einer G2/M-Akkumulation in der Neuroblastomzelllinie IMR-32 (Abbildung 4.14 C). In dieser Zellzyklusphase wird N-Myc durch Fbxw7 abgebaut. Allerdings reduzierten ausschließlich die Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 die N-Myc-Proteinlevel. Der spezifische Aurora-A-Inhibitor MK5108 verursachte zwar auch eine Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase, hatte allerdings keinen Einfluss auf die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors (Abbildung 4.14 C und D).

4.3 Die Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 haben therapeutisches Potential

4.3.1 MLN8054 induziert einen Wachstumsarrest in MYCN-amplifizierten Neuroblastomzellen

Die Reduktion der N-Myc-Proteinexpression durch die Aurora-A-Depletion bewirkt einen selektiven Wachstumsarrest in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen (Otto et al., 2009). Die IC_{50} -Werte von MLN8054 zur Proliferationsrepression *MYCN*-amplifizierter Zellen liegen zwischen 250 und 700 nM (Shang et al., 2009). In diesem Konzentrationsbereich konnte auch eine Reduktion der N-Myc-Proteinlevel festgestellt werden (Abbildung 4.15 A). Ein Wachstumsdefizit konnte auch in der *MYCN*-amplifizierten Zelllinie SMS-KCN nach einer MLN8054-Behandlung mit 250 nM detektiert werden (Abbildung 4.15 B). Die Verdopplungszeit stieg dabei von 32 h auf 48 h nach Aurora-A-Inhibition (Abbildung 4.15 B und C).

Vier weiterer amplifizierte Zelllinien zeigten in der Kristallviolett-färbung ebenfalls eine Verringerung ihrer Wachstumsrate (Abbildung 4.15 D).

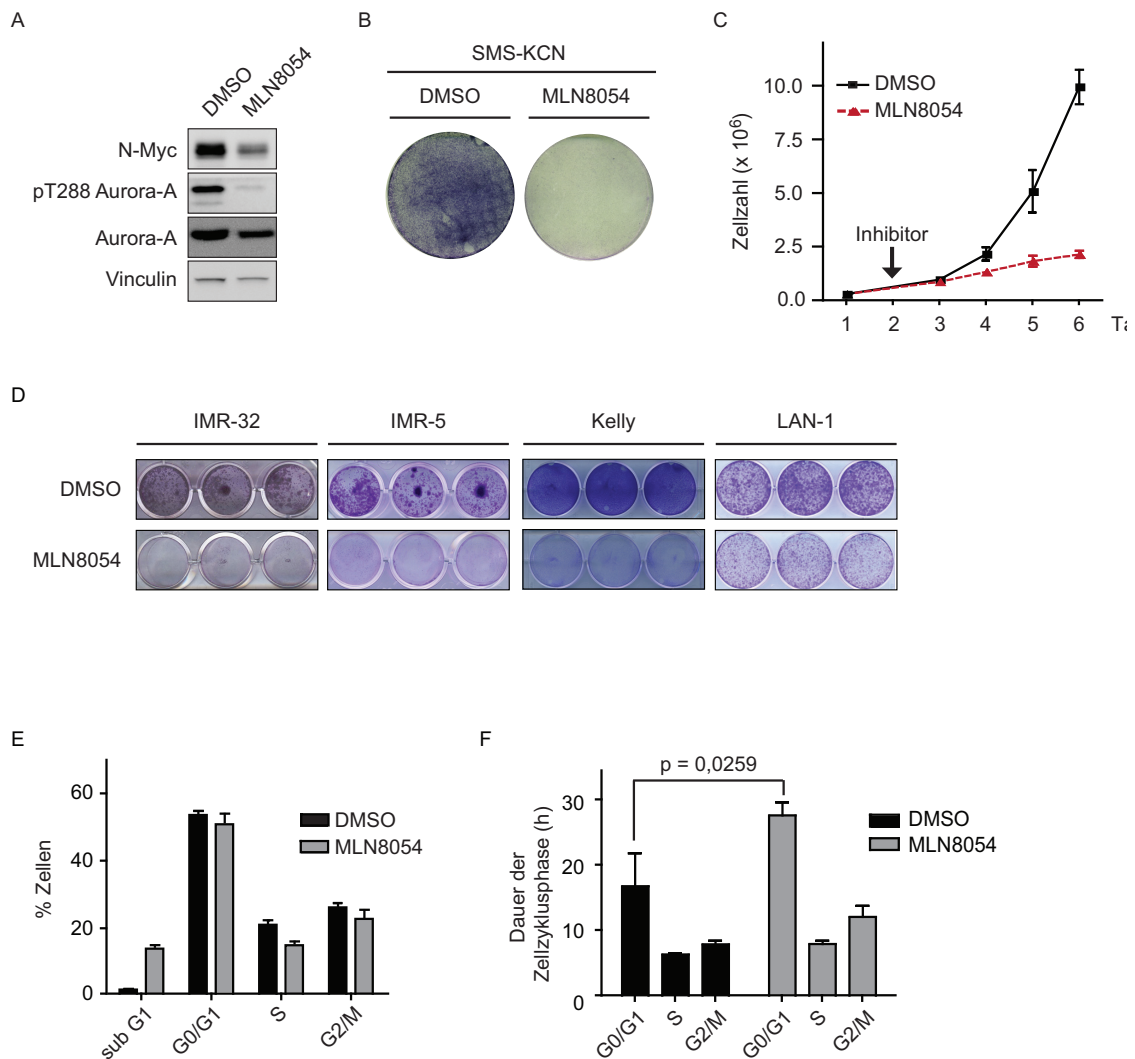


Abbildung 4.15: Eine MLN8054-Behandlung führt zu einem Wachstumsarrest in MYCN-amplifizierten Zellen

- A) SMS-KCN-Zellen wurden für 48 h mit DMSO bzw. mit 250 nM MLN8054 inkubiert. Das Proteinlysate wurde mittels WB auf eine N-Myc- und (pT288) Aurora-A-Expression hin untersucht. Vinculin diente als Ladekontrolle.
- B) SMS-KCN-Zellen wurden in gleicher Zellzahl ausplattiert und entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit 250 nM MLN8054 inkubiert. Nach vier Tagen wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett angefärbt.
- C) SMS-KCN-Zellen wurden in gleicher Zellzahl ausplattiert und entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit 250 nM MLN8054 inkubiert. Jeden Tag wurden eine DMSO- bzw. eine MLN8054-behandelte Zellkulturplatte geerntet und die Zellzahl bestimmt. Die restlichen Zellen wurden für eine PI-FACS-Analyse (siehe 4.15 E) verwendet (Mittelwert \pm SD; biologisches Triplikat).
- D) Vier MYCN-amplifizierte Zellen wurden in gleicher Zellzahl ausplattiert und entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit 250 nM MLN8054 inkubiert. Nach vier Tagen wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett angefärbt.
- E) PI-FACS-Analyse von SMS-KCN-Zellen nach Inhibitor-Zugabe. Behandelte SMS-KCN-Zellen (siehe 4.15 B) wurden nach 48 h mit Hilfe eines PI-FACS analysiert (Mittelwert \pm SD; biologisches Triplikat).
- F) Aus den ermittelten Verdopplungszeiten (siehe 4.15 B: DMSO = 32 h; MLN8054 = 48 h) und der Zellzyklusverteilung (siehe 4.15 D) konnte die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen berechnet werden (Mittelwert \pm SD).

Diese Abbildung wurde in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

Das reduzierte Wachstum sollte anhand einer PI-FACS-Messung in SMS-KCN-Zellen detaillierter untersucht werden. Die Zellzyklusanalyse zeigte einen leichten Anstieg der apoptischen Fraktion um ca. 10 %. Die anderen Zellzyklusphasen waren nicht signifikant verändert. Anhand der Wachstumskurven und der PI-FACS-Analyse konnte die Dauer der einzelnen Phasen des Zellzykluses berechnet werden. Dabei zeigte sich, dass die Dauer aller Zellzyklusphasen nach Aurora-A-Inhibition verlängert war, jedoch insbesondere die der G₁-Phase (DMSO: 17 h; MLN8054: 28 h; $p = 0,0259$). Längere Inkubationszeiten des Aurora-A-Inhibitors (≥ 48 h) mit hohen Konzentrationen (≥ 1000 nM) lösten in den Zellen zusätzlich Apoptose aus (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen einen Wachstumsarrest von *MYCN*-amplifizierten Zellen nach MLN8054-Behandlung und eine gleichzeitige Reduktion der N-Myc-Proteinmenge.

4.3.2 Die Inhibition von Aurora-A durch MLN8054 induziert die Expression des Zellzyklusinhibitors *CDKN1A*

Eine mögliche Ursache für den Wachstumsarrest könnte die Induktion des Zellzyklusinhibitors *CDKN1A* (p21) sein. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass p21 durch Myc reprimiert wird und dies zu einem G₁-Arrest führt (Herold et al., 2002; Seoane et al., 2002; Wu et al., 2003).

Ob die Reduktion der N-Myc-Proteinmenge nach Aurora-A-Inhibition ausreichend für eine *CDKN1A*-Induktion ist, sollte im nachfolgenden untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden fünf *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzelllinien mit MLN8054 behandelt und das *CDKN1A*-Expressionslevel quantitativ zur DMSO-Kontrolle bestimmt. Eine relative Zunahme der *CDKN1A*-mRNA-Menge konnte nach MLN8054-Zugabe in allen fünf Zelllinien detektiert werden (Abbildung 4.16 A).

Eine Überexpression von *MYCN* (wt und T58A/S62A-Mutante) in der Zelllinie LAN-1 konnte die p21-Induktion nach Aurora-A-Inhibition verhindern (Abbildung 4.16 B und C).

Inwiefern diese *MYCN*-Überexpression dem MLN8054 vermittelten G₁-Arrest entgegenwirken kann, sollte im Folgenden untersucht werden.

Hierzu wurden SMS-KCN-Zellen mit murinem wildtyp *Mycn* sowie der Phosphodegronmutante (T50A/S54A) und einem GFP Reportergen mit einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) infiziert. Die Zellen wurden mit nicht-infizierten Zellen gemischt, so dass zu Beginn des Experiments 20 % der Zellen GFP exprimierten. Die Zellen wurden über 18 Tage mit DMSO (als Kontrolle) bzw. mit MLN8054 behandelt und der Prozentsatz an GFP positiven Zellen mit Hilfe eines FACS analysiert. In Abwesenheit des Aurora-A-Inhibitors führte die ektopische Expression von N-Myc (wt oder mut) in SMS-KCN-Zellen lediglich zu einem moderaten Proliferationsvorteil während eine MLN8054-Inkubation die Proliferation *MYCN*-überexprimierender Zellen stark förderte (Abbildung 4.16 D). Die Verdopplungszeiten der Zellen korrelierten mit ihrer Fähigkeit, die MLN8054-induzierte p21-Expression zu unterdrücken, (Kontrollzellen: DMSO: 28 h, MLN8054: 36 h; *MYCN* wt/mut - Zellen: DMSO: 25 h, MLN8054: 32 h). Zudem zeigte sich

eine Akkumulation der Proteinmengen von Aurora-A und N-Myc in MLN8054-behandelten Zellen. Dies deutet auf eine positive Selektion von Zellen hin, die Aurora-A und N-Myc verstärkt exprimieren (Abbildung 4.16 D und E).

Insgesamt belegen die Resultate eine Induktion des Zellzyklusinhibitors p21 nach MLN8054-Behandlung. Dieser p21-Expressionsanstieg ist auf die Reduktion der N-Myc-Proteinlevel zurückzuführen. Die fehlende N-Myc-Expression und die damit verbundene p21-Induktion führen zu einem Proliferationsarrest, der durch eine Überexpression von N-Myc teilweise verhindert werden kann.

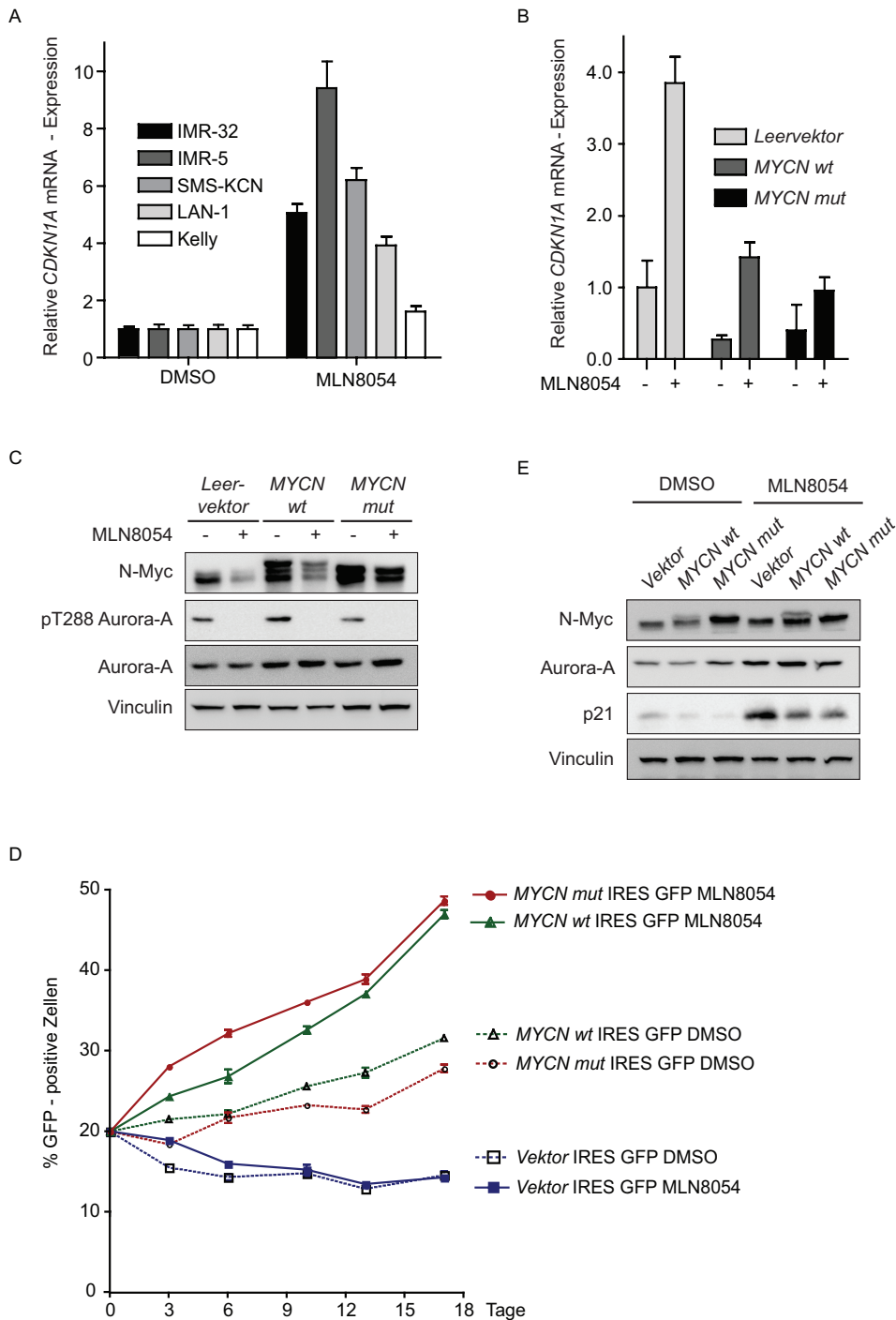


Abbildung 4.16: Eine *MYCN*-Überexpression hebt den Wachstumsarrest nach Aurora-A-

Inhibition teilweise auf

- A) *MYCN*-amplifizierte Zellen wurden mit MLN8054 (1000 nM) inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die mRNA mit Hilfe einer RT-PCR analysiert. Normalisiert wurde auf *RPS14* und *B2M* (Mittelwert \pm SD; technisches Triplikat).
- B) LAN-1-Zellen wurden entweder stabil mit *MYCN* wt oder mit *MYCN* mut (T58A/S62A) infiziert. Nach 24-stündiger Inkubation mit 1000 nM MLN8054 wurde die *CDKN1A*-mRNA-Expression im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen verglichen. Normalisiert wurde auf *RPS14* und *B2M* (Mittelwert \pm SD; technisches Triplikat).
- C) Die behandelten Zellen (siehe 4.14 B) wurden mittels WB auf ihre N-Myc- und (pT288) Aurora-A-Proteinexpression untersucht. Vinculin diente als Ladekontrolle.
- D) SMS-KCN-Zellen wurden mit murinem *Mycn* (wt oder mut (T50A/S54A)) und einem (IRES-) GFP Reportergen infiziert. Die Zellen wurden mit nicht-infizierten Zellen gemischt, so dass zu Beginn des Experiments 20 % der Zellen GFP positiv waren. Die Zellen wurden über 18 Tage mit DMSO (als Kontrolle) bzw. mit MLN8054 (100 nM) behandelt und der Prozentsatz an GFP exprimierenden Zellen mittels FACS analysiert (Mittelwert \pm SEM; biologisches Triplikat).
- E) Die behandelten Zellen (siehe 4.16 D) wurden mittels WB auf ihre N-Myc, Aurora-A und p21 Proteinexpression untersucht. Vinculin diente als Ladekontrolle.

Diese Abbildung wurde in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

4.3.3 Der Aurora-A-Inhibitor MLN8054 induziert Seneszenz in Neuroblastomzelllinien

Frühere Studien zeigten eine MLN8054-vermittelte Seneszenz sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Huck et al., 2010). Inwiefern der G₁-Arrest in den MLN8054-behandelten *MYCN*-amplifizierten Zellen ein permanenter Arrest sein könnte, sollte im nachfolgenden untersucht werden.

Hierzu wurden vier *MYCN*-amplifizierte Zelllinien verwendet und die Histon H3 Trimethylierung an Lysin 9 (H3K9me₃) nach einer MLN8054-Behandlung analysiert. Die Inkubation mit dem Aurora-A-Inhibitor führte zu einer Akkumulation des Seneszenzmarkers H3K9me₃ in allen vier Zelllinien. (Abbildung 4.17 A).

Inwiefern die Reduktion der N-Myc-Proteinlevel einen Einfluss auf die Trimethylierung von Histon H3 hat, sollte mit der Überexpression der N-Myc-Mutante, die nicht mehr durch eine Aurora-A-Inhibition abgebaut werden kann, detaillierter analysiert werden. Hierzu wurde die Zelllinie LAN-1 mit *MYCN* mut (T58A/S62A) infiziert und anschließend mit MLN8054 inkubiert. Zur quantitativen Bestimmung der Trimethylierung von Histon H3 wurde eine intrazelluläre Durchflusszytometrie mit spezifischen H3K9me₃-Antikörpern durchgeführt. In LAN-1-Kontrollzellen war eine Erhöhung des H3K9me₃-Signals nach Inhibitorzugabe festzustellen. Die Akkumulation an H3K9me₃-positiven Zellen konnte teilweise nach einer *MYCN*-Überexpression (T58A/S62A) verhindert werden. Der prozentuale Anteil an seneszenten Zellen verringerte sich von 25 % (MLN8054 behandelte Kontrollzellen) auf 18 % (*MYCN* mut überexprimierende Zellen nach MLN8054-Inkubation) (Abbildung 4.17 B). Auch mit Hilfe eines WBs konnte ein verminderter Anstieg an trimethyliertem Histon H3 in den *MYCN*-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden (Abbildung 4.17 C).

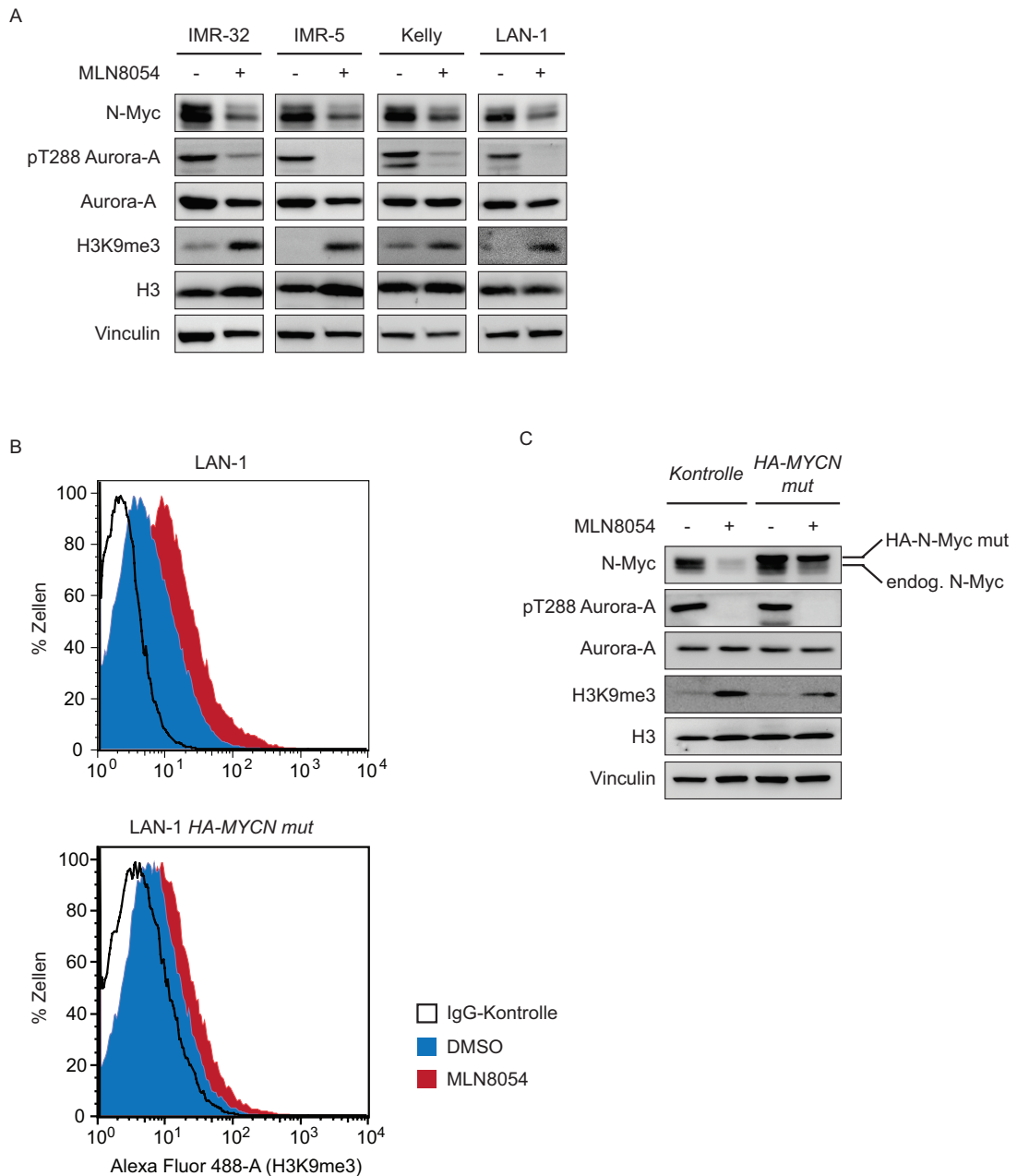


Abbildung 4.17: MLN8054 induziert Seneszenz in MYCN-amplifizierten Zellen

- A) MLN8054 führt zur Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 9. Vier *MYCN*-amplifizierte Zelllinien wurden für 48 h mit 250 nM MLN8054 behandelt und das Zelllysate mittels WB analysiert. Vinculin diente als Ladekontrolle.
- B) Eine Aurora-A Inhibition erhöht den prozentualen Anteil an seneszenten Zellen. LAN-1-Zellen wurden mit *MYCN* mut (T58A/S62A) oder einem Kontrollvektor infiziert. Nach Inkubation mit MLN8054 wurde der Anteil an H3K9me3-positiven Zellen mit Hilfe einer intrazellulären Durchflusszytometrie bestimmt. Ein IgG-Isotypengemisch der gleichen Spezies fungierte als Negativkontrolle.
- C) Eine *MYCN*-mut-Überexpression verhindert teilweise die Akkumulation der Trimethylierung an Histon H3. Korrespondierender WB zu Abbildung B. Vinculin diente als Ladekontrolle. (Zu beachten sind die unterschiedlichen N-Myc-Proteinmengen (endogene vs. überexprimierte Form (T58A/S62A) nach MLN8054-Zugabe)).

4.3.4 MLN8054 inhibiert die N-Myc-Funktion in TH-MYCN-transgenen Mäusen

Zur Beurteilung des therapeutischen Potentials der Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 *in vivo* wurde ein transgenes TH-MYCN Mausmodell verwendet. Durch eine ektopische Expression von humanem N-Myc in der Neuralleiste durch den Tyrosin-Hydroxylase (TH)-Promotor kommt es zur Bildung von aggressiven Neuroblastomen in diesen Mäusen (Weiss et al., 1997). Mäuse mit bereits etabliertem Neuroblastom wurden mit den Aurora-A-Inhibitor MLN8054 behandelt und die N-Myc-Proteinmenge in den Tumoren mit denen von Vehikel-behandelten Mäusen verglichen. Der Inhibitor reduzierte die N-Myc-Proteinlevel im Vergleich zu den Kontrollen. Zur Überprüfung der Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe in den Tumoren wurde die Inhibition von Aurora-A mittels der Autophosphorylierung an Threonin 288 analysiert. MLN8054 führte zu einer Dephosphorylierung an Threonin 288 (Abbildung 4.18 A). Der Verlust der N-Myc-Proteinexpression basierte auf einer posttranslationalen Regulation von N-Myc, da sich die Mengen der humanen MYCN- sowie der murinen *Mycn*-mRNA in den MLN-behandelten Tumoren im Vergleich zur Kontrolle nicht wesentlich reduzierte. Gleichzeitig war ein signifikanter Anstieg der murinen *Cdkn1a*-Expression in dem MLN8054-behandelten Tumor feststellbar (Abbildung 4.18 B).

Inwieweit die N-Myc-Reduktion im WB einen Einfluss auf die Promotorbindung hat, sollte durch ChIP-Experimente analysiert werden. Bei den DMSO-behandelten Mäusen zeigte sich in den Tumoren eine starke Anreicherung des Transkriptionsfaktors an die Apex-Promotorsequenz, einem gut charakterisierten N-Myc-Zielgen. Nach einer MLN8054-Therapie war die N-Myc-Rekrutierung an den Apex-Promotor stark reduziert (Abbildung 4.18 C). Ähnliche Ergebnisse konnten mit den N-Myc Zielgenen *Ncl1* und *Slc25a19* erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Abnahme der N-Myc-Rekrutierung an die E-Boxen könnte einen Einfluss auf die globale Gen-Expression und insbesondere auf die Expression von N-Myc Zielgenen haben. Dies sollte in einem *Microarray* näher analysiert werden.

Hierzu wurde die globale Gen-Expression von vier MLN8054-behandelten Tumoren mit vier unbehandelten Tumoren (Vehikel-Kontrolle) verglichen und eine GSEA-Analyse (*gene set enrichment analysis*; GSEA; (Subramanian et al., 2005)) durchgeführt. Myc-induzierte Gengruppen von Schumacher, Dang und Yu zeigten eine starke Repression nach einer MLN8054-Behandlung (Abbildung 4.18 D).

Die durch den Inhibitor regulierten Myc-Gengruppen waren darüber hinaus stark assoziiert mit einer schlechten Prognose für Neuroblastompatienten (Abbildung 4.18 E).

Die Resultate belegen, dass der Aurora-A-Inhibitor MLN8054 die N-Myc-Proteinexpression *in vivo* negativ beeinflusst und dadurch auch die N-Myc induzierte Transkription stark beeinträchtigt.

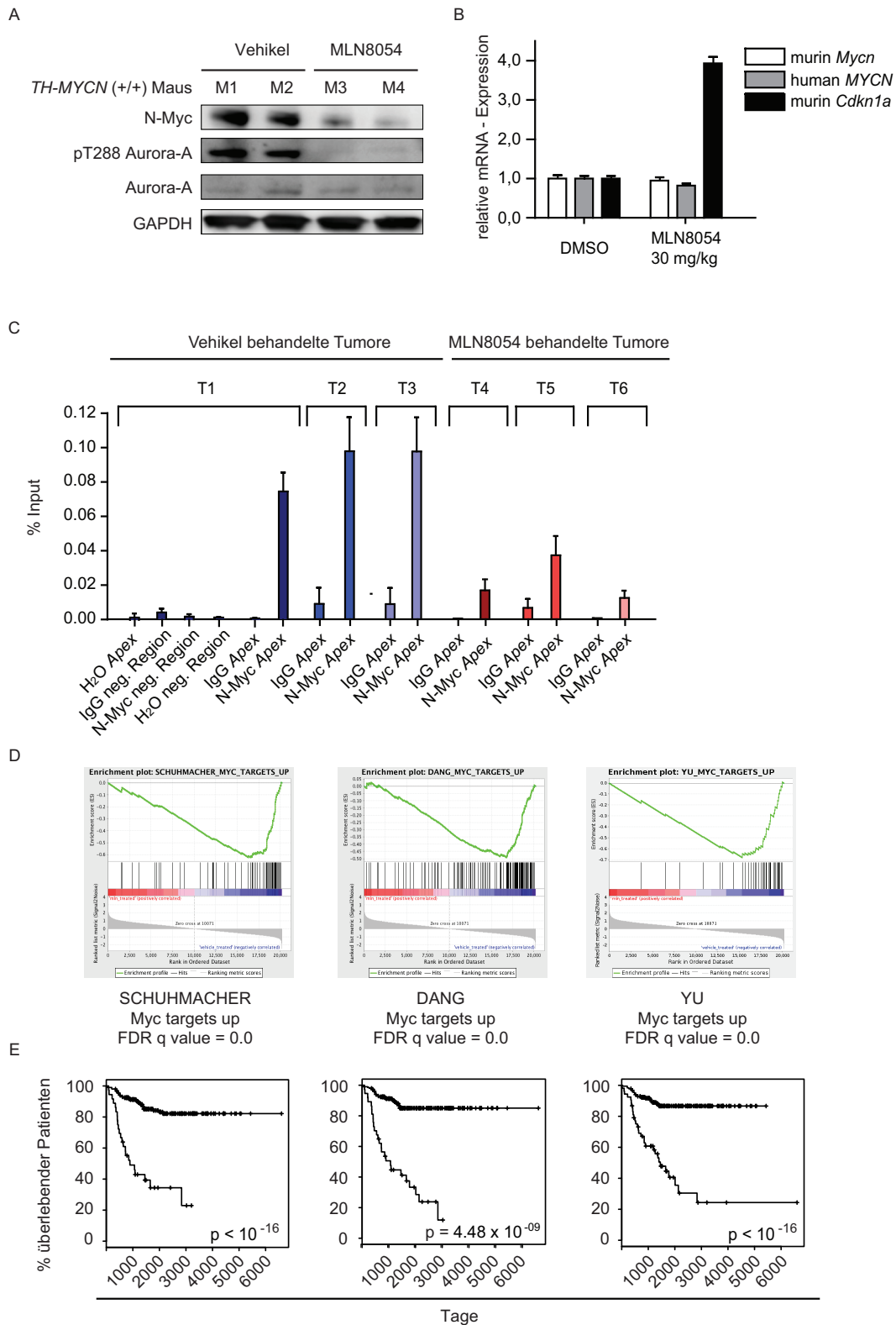


Abbildung 4.18: MLN8054 blockiert die transkriptionelle Funktion von N-Myc *in vivo*

A) Jeweils zwei transgene TH-MYCN-Mäuse wurden entweder mit DMSO (Vehikel) oder mit MLN8054 (30 mg/kg Maus) für 3 Tage behandelt. Der Tumor wurde entnommen und auf die N-Myc- bzw. auf die (pT288-) Aurora-A-Expression hin untersucht. GAPDH fungierte als Ladekontrolle (Durchgeführt von Evon Poon) (Brockmann et al., 2013).

- B) Die humane *MYCN*- und murine *Mycn*-mRNA-Expression sowie die murinen *Cdkn1a*-mRNA-Level von behandelten Mäusen (siehe 4.19 A; Gesamt-RNA wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Evon Poon) wurden mit Hilfe einer RT-PCR analysiert. Normalisiert wurde auf *Rps16* und *Actin* (Mittelwert \pm SD; technisches Triplikat).
- C) Jeweils drei transgene TH-*MYCN*-Mäuse wurden entweder mit DMSO (Vehikel) oder mit MLN8054 (40 mg/kg Maus) für 3 Tage behandelt. N-Myc gebundenes Chromatin wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper präzipitiert und die Apex-Promotorsequenz sowie eine negative genomische Kontrollregion amplifiziert. Als weitere Negativkontrollen dienten eine IgG-Kontrolle, sowie eine Wasserkontrolle (Die Tumore wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der AG Louis Chesler) (Mittelwert \pm SD; technisches Triplikat).
- D) Die RNA aus vier MLN8054- und vier Vehikel-behandelten Tumoren wurde isoliert und eine *Microarray*-Analyse durchgeführt. Eine GSEA-Analyse dokumentiert die Regulation von Myc Gengruppen (Schumacher, Dang und Yu) nach MLN8054-Therapie (Durchgeführt in Zusammenarbeit mit Evon Poon und Lukas Rycak).
- E) Die Kaplan-Meier-Diagramme von Neuroblastopatienten zeigen die prognostische Relevanz der drei Myc-Gengruppen (Schumacher, Dang und Yu). Für die Analyse wurden 476 Genexpressionsprofile von Neuroblastombiopsien verwendet ((Oberthuer et al., 2010) Analyse wurde durchgeführt von der AG Fischer).

Diese Abbildung wurde in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

4.3.5 Der Aurora-A-Inhibitor MLN8054 verringert das Stammzellpotential von Neuroblasten

Eine MLN8054-Behandlung der transgenen *MYCN*-Mäuse (Weiss et al., 1997) führte in den Tumoren zu einer Akkumulation von differenzierten Zellen und einer gleichzeitigen Reduktion der Bmi1-Proteinexpression, einem wichtigen Regulator der Selbsterneuerung von neuronalen Stammzellen (Brockmann et al., 2013; Molofsky et al., 2003). Darüber hinaus konnte bei der GSEA-Analyse (Abbildung 4.18 C) neben der Beeinflussung von Myc-regulierten Genen auch Gengruppen identifiziert werden, die charakteristisch und wichtig für pluripotente Zellen sind (Wong et al., 2008) (Abbildung 4.19 A).

Das Potential der MLN-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 die Selbsterneuerung von neuronalen Vorläuferzellen zu unterbinden, sollte daher im nachfolgenden näher untersucht werden. Hierzu wurden IMR-5-Zellen als Neurosphären kultiviert. Wurde dem Medium der Inhibitor MLN8054 zugefügt, reduzierte sich das Potential der Zellen in Sphären zu wachsen (Abbildung 4.19 B).

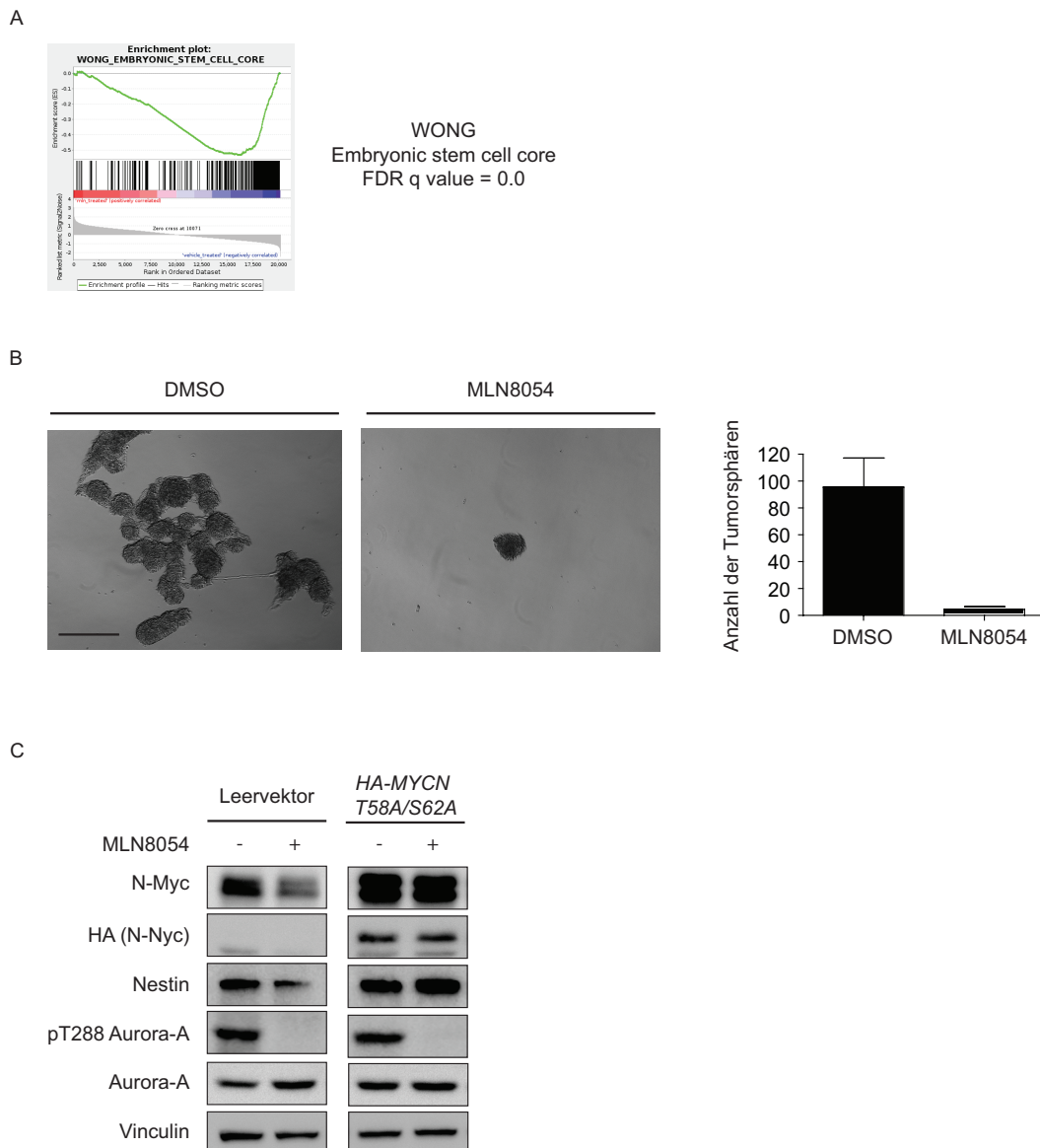


Abbildung 4.19: Die MLN8054-vermittelte N-Myc-Proteinstabilisierung vermindert das Stammzellpotential von MYCN-amplifizierten Neuroblastomzellen

- A) Eine GSEA-Analyse dokumentiert die Reduktion von charakteristischen Stammzellgenen (Wong et al., 2008) nach einer MLN8054-Behandlung (siehe Abbildung 4.18 D; Durchgeführt in Zusammenarbeit mit Evon Poon und Lukas Rycak).
- B) IMR-5-Zellen wurden in Sphärenmedium kultiviert und parallel dem Medium entweder DMSO (als Kontrolle) oder MLN8054 (250 nM) zugefügt. Nach zwei Wochen wurden die Sphärenkolonien gezählt (Mittelwert \pm SEM von 12 biologischen Replikaten; Maßstab = 100 μ m).
- C) LAN-1-Zellen wurden für 48 h mit MLN8054 (250 nM) inkubiert und parallel mit einer HA-markierten N-Myc-Mutante (T58A/S62A) stabil infiziert. Die Proteinlevel von (HA) N-Myc, (pT288) Aurora-A und Nestin wurden mittels WB analysiert. Vinculin fungierte als Ladekontrolle.

Teile dieser Abbildung wurden in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

Inwieweit die generelle Aurora-A-Inhibition oder die induzierte N-Myc Proteinreduktion ausschlaggebend für die Hemmung der Selberneuerung von neuronalen Progenitorzellen ist, sollte anhand einer *MYCN*-mut-Überexpression (T58A/S62A) in LAN-1-Zellen untersucht werden. Erwartungsgemäß reduzierte sich nach einer Aurora-A-Inhibition das N-Myc-Proteinlevel in LAN-1-Zellen. Parallel dazu verminderte sich die Expression des neuronalen Stammzellmarkers Nestin (Park et al., 2010), wohingegen die Nestin-Proteinexpression nach gleichzeitiger *MYCN*-Überexpression konstant blieb (Abbildung 4.19 C).

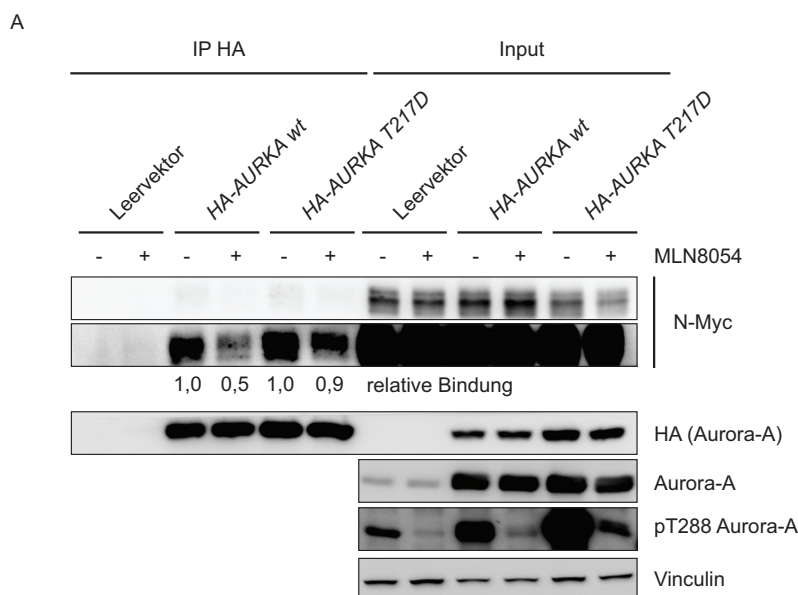
Die Resultate deuten darauf hin, dass die Reduktion des Transkriptionsfaktors ein entscheidender Faktor bei der Inhibierung des Stammzellpotentials von Neuroblasten ist und die Zellen durch die verminderte N-Myc Expression ausdifferenzieren.

4.3.6 Eine Überexpression der Aurora-A-Mutante T217D verhindert den von MLN8054 induzierten Wachstumsarrest in *MYCN*-amplifizierten Zellen

Neuste Studien konnten eine Aurora-A-Mutante identifizieren, die gegen eine MLN8054-vermittelte Inhibition resistent ist. Die Mutation von Threonin 217 zu Asparaginsäure reduziert die Affinität gegenüber den Wirkstoffen MLN8054 und MLN8237 und verhindert so die Kinase-Inhibition (Sloane et al., 2010).

Sofern diese Mutante resistent gegenüber einer MLN-induzierten Konformationsänderung ist, sollte diese Mutante trotz MLN-Inkubation an N-Myc binden und stabilisieren.

Zur Überprüfung der Hypothesen wurde eine *MYCN*-amplifizierte SMS-KCN-Zelllinie generiert, die entweder ein Doxyzyklin induzierbares Aurora-A wildtyp Allel oder ein mutiertes Aurora-A T217D Allel aufweist.



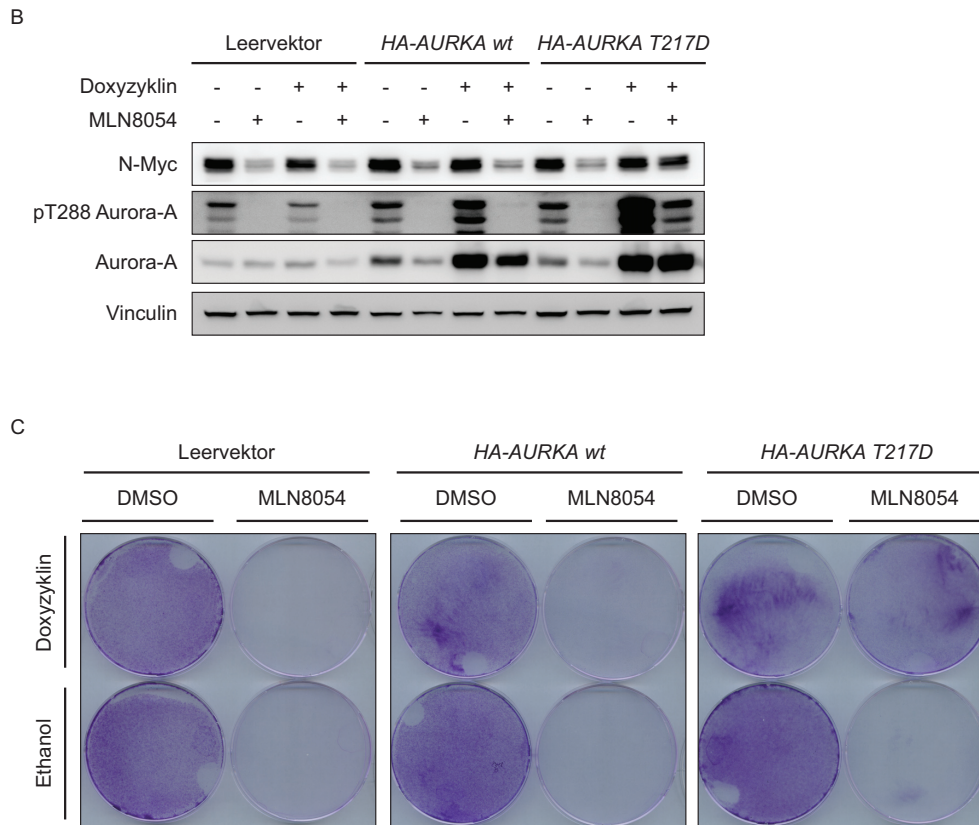


Abbildung 4.20: Eine Aurora-A T217D-Überexpression verhindert die Destabilisierung von N-Myc durch MLN8054

- A) *MYCN*-amplifizierte SMS-KCN-Zellen wurden stabil transduziert mit Doxyzyklin-induzierbaren Expressionsplasmiden (Leervektor, HA-markiertem Aurora-A wt oder HA-markiertem Aurora-A T217D). Die Zellen wurden mit MLN8054 (2000 nM, 4 h), Doxyzyklin (1 µg/ml, 12 h) und MG132 (5 µM, 4 h) behandelt und eine HA-IP zur spezifischen Präzipitation überexprimierender Aurora-A-Proteine durchgeführt. Die relative N-Myc-Interaktion zur DMSO-Kontrolle ist unterhalb jeder IP angezeigt.
- B) Die Doxyzyklin-induzierbaren Zellen (siehe 4.20 A) wurden mit DMSO bzw. mit MLN8054 (500 nM) und/oder mit Ethanol als Kontrolle bzw. mit Doxyzyklin (1 µg/ml), wie angegeben, behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von N-Myc, (pT288) Aurora-A und Vinculin (als Ladekontrolle) im WB analysiert.
- C) Die Doxyzyklin-induzierbaren Zellen (siehe 4.20 A) wurden mit DMSO bzw. mit MLN8054 (500 nM) und/oder mit Ethanol als Kontrolle bzw. mit Doxyzyklin (1 µg/ml), wie angegeben, behandelt. Nach vier Tagen wurde das Proliferationsverhalten der Zellen mittels Kristallviolett färbung visualisiert.

Diese Abbildung wurde in ähnlicher Form veröffentlicht in Brockmann et al., 2013.

In Anwesenheit des Inhibitors MLN8054 wurde eine Aurora-A-IP durchgeführt und die Interaktion zu N-Myc untersucht. Um ausschließlich die Interaktion mit den exogenen Aurora-A-Proteinen (wt und T217D) und N-Myc zu gewährleisten, wurden HA-markierte Aurora-A-Konstrukte verwendet und die IP mit HA-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Zudem wurde zum Schutz vor proteasomalem Abbau der Inhibitor MG132 verwendet. Trotz der Anwesenheit von MLN8054 wurde die Interaktion zwischen der Aurora-A-Mutante und N-Myc kaum beeinflusst, wohingegen der Aurora-A wildtyp/N-

Myc-Komplex mit MLN8054 instabil war (Abbildung 4.20 A).

Die Überexpression der Aurora-A-Mutante hatte auch Auswirkungen auf die Stabilität des N-Myc-Proteins und der Proliferation der Zelllinie. Wurden nicht induzierte Zellen, sowie SMS-KCN-Kontrollzellen (Leervektor) mit dem Aurora-A-Inhibitor MLN8054 inkubiert, kam es, wie erwartet, zu einem Proliferationsstopp und zu einer Reduktion der N-Myc-Proteinlevel. Auch eine gleichzeitige Induktion des Aurora-A wildtyp Allels führte zu einer Unterdrückung der Koloniebildung und der Runterregulierung von N-Myc, wohingegen die Überexpression des mutierten Aurora-A Proteins den Wachstumsarrest und die Destabilisierung des N-Myc-Proteins durch MLN8054 verhinderte (Abbildung 4.20 B und C).

5 Diskussion

5.1 Die *AURKA*-Überexpression in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen ist assoziiert mit einer schlechten Prognose

In 70 % aller humanen Tumoren ist eines der drei Mitglieder der Myc-Transkriptionsfaktorfamilie, c-Myc, N-Myc und L-Myc, dereguliert (Nilsson and Cleveland, 2003). In neuroendokrinen Tumoren liegt beispielsweise häufig eine *MYCN*-Amplifikation vor. Wie im Mausmodell gezeigt werden konnte, induziert eine Deregulation von *MYCN* die Tumorgenese von Neuroblastomen (Weiss et al., 1997). Demgegenüber konnte in mehreren Studien eindrucksvoll bewiesen werden, dass die Inhibition bzw. Repression von Myc ein attraktiver Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Krebstherapie ist. So führt z.B. die Überexpression einer dominant-negativen Mutante von Myc ("Omomyc") zu einer Regression von Lungentumoren ohne schwerwiegende Nebenwirkungen (Soucek et al., 2008). Ähnliche Resultate konnten auch für N-Myc gezeigt werden. Die direkte Repression des *MYCN*-Gens führt zu einem selektiven Proliferationsstopp in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen, hat jedoch keinen Einfluss auf nicht-amplifizierte Zellen (Otto et al., 2009).

Die direkte Inhibition des Transkriptionsfaktors stellt allerdings eine große Herausforderung für die Therapie des Neuroblastoms dar.

Zur Identifikation neuer essentieller Gene, die einfacher inhibierbar sind, wurde ein synthetisch-letaler *Screen* in Neuroblastomzelllinien durchgeführt (Otto et al., 2009). Eines der identifizierten Gene ist *AURKA*, das für die mitotische Proteinkinase Aurora-A kodiert. Die Depletion von Aurora-A führt ausschließlich in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen zu einem Proliferationsarrest. Das Wachstum nicht-amplifizierter Zellen wird hingegen durch eine Aurora-A-Depletion nicht beeinflusst (Otto et al., 2009). Wie auch *MYCN* ist *AURKA* als ein Onkogen beschrieben und in mehreren soliden Tumoren (z.B. Mamma-, Pankreas- und Kolorektalkarzinome) signifikant überexprimiert (Bischoff et al., 1998; Isola et al., 1995; Kallioniemi et al., 1994; Solinas-Toldo et al., 1996). Wie in einem Rattenmodell des Mammakarzinoms gezeigt wurde, korreliert die Aurora-A-Überexpression mit einer Centrosomenamplifikation (Abschnitt 3.1) und ist ein frühes Ereignis in der Tumorgenese (Goepfert et al., 2002).

Als Ursache der Überexpression wurde unter anderem eine Amplifikation derjenigen Genregion beschrieben, in der auch *AURKA* lokalisiert ist (Chromosom 20q13.2). Andererseits ist die Kinase in einigen Tumoren (z.B. in der Mehrheit der hepatozellulären Karzinome) zwar überexprimiert, der Genlocus weist jedoch keine Amplifikation auf

(Jeng et al., 2004). In diesen Fällen kommt es zu einer Deregulation auf Ebene der Transkription oder der (Post-) Translation. In ER α -positiven Brustkrebszellen aktiviert etwa Östrogen die ER α /GATA-3-Signalkaskade und induziert damit die Aurora-A-Transkription (Jiang et al., 2010). Des Weiteren sind einige Interaktionspartner von Aurora-A (Hef1, IQGAP1 und TPX2), die entweder die Stabilität oder die Aktivität der Kinase fördern, in Tumoren hochreguliert (Aguirre-Portoles et al., 2012; Giubettini et al., 2011; Pugacheva and Golemis, 2005; Yin et al., 2012). Demgegenüber ist die E3-Ligase Chfr (Abschnitt 3.4.3) in mehreren Tumoren wie z.B. im fortgeschrittenen Magenkarzinom durch Hypermethylierung der Promotorregion in der Expression reprimiert (Li et al., 2015; Sanbhnani and Yeong, 2012).

Auch im *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom ist Aurora-A gegenüber nicht *MYCN*-amplifizierten Tumoren signifikant höher exprimiert und korreliert zudem mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten (Berwanger et al., 2002; Otto et al., 2009; Shang et al., 2009) (Abbildung 5.1). Die Aurora-A-Überexpression im Neuroblastom basiert auf einem positiven *Feedback-loop*, bei dem die Mitglieder der Myc-Familie an den *AURKA*-Promotor binden können und direkt die Transkription induzieren (den Hollander et al., 2010; Lu et al., 2014; Otto et al., 2009). In einigen Fällen kann allerdings auch eine Amplifikation des Genlokus die Ursache der Überexpression sein (Zhou et al., 1998).

Im neuroendokrinen Prostatakrebs konnte ebenfalls eine Ko-Amplifikation der Gene *MYCN* und *AURKA* detektiert werden. Ko-amplifizierte Zellen reagieren sensibler auf eine Aurora-A-Inhibition (Beltran et al., 2011). Die Inhibition von Aurora-A könnte demnach eine neue therapeutische Strategie sein, *MYCN*-amplifizierte Tumoren zu behandeln.

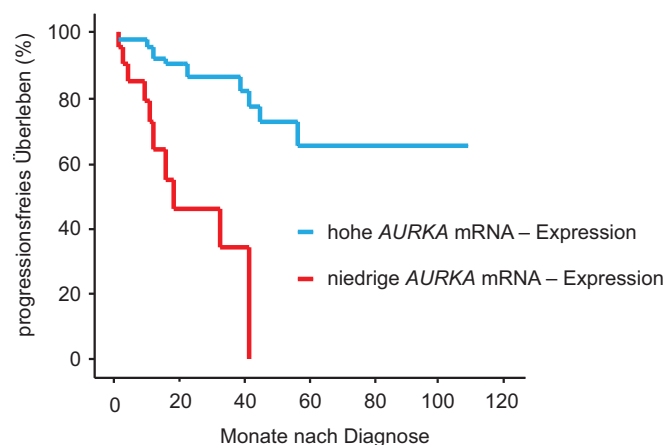


Abbildung 5.1: Die *AURKA* mRNA-Expression korreliert signifikant mit dem progressionsfreien Überleben (PFS) von Neuroblastompatienten

Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt das progressionsfreie Überleben von Neuroblastompatienten (n=62) nach Diagnose (Modifiziert nach (Shang et al., 2009)).

5.2 Aurora-A verhindert den Fbxw7 vermittelten proteasomalen Abbau von N-Myc

5.2.1 Die Stabilisierung von Proteinen ist eine generelle Funktion von Aurora-A

Neben der *MYCN*-Kopienanzahl spielen andere Faktoren und Mechanismen eine entscheidende Rolle, die die *MYCN*-Expression beeinflussen und dadurch zur Tumorentstehung beitragen können (Cohn et al., 1990). Eine Deregulation der N-Myc-Expression, die die Tumorprogression fördert, ist auf transkriptioneller, translationaler oder posttranslationaler Ebene denkbar. So führt die Induktion der *MYCN*-Transkription durch E2F-Transkriptionsfaktoren zu einer gesteigerten N-Myc-Proteinexpression (Hara et al., 1993; Lutz and Schwab, 1997; Strieder and Lutz, 2003). Darüber hinaus stabilisiert das RNA-bindende Protein HuD die *MYCN*-prä-mRNA in malignen Neuroblastomzelllinien (Lazarova et al., 1999; Manohar et al., 2002; Ross et al., 1997). Und schließlich führt die Destabilisierung des N-Myc-Proteins durch die E3-Ubiquitinligase HectH9 zur Differenzierung neuronaler Zellen (Zhao et al., 2008).

Während dieser Doktorarbeit konnte ein weiterer Mechanismus der N-Myc-Regulation identifiziert werden, der essentiell für *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome ist. Dabei stabilisiert die Serin/Threonin-Kinase Aurora-A den Transkriptionsfaktor posttranslational (Otto et al., 2009). In der Regel ist die Halbwertszeit der Myc-Proteine mit etwa 20 Minuten relativ kurz (Hann and Eisenman, 1984). In den untersuchten *MYCN*-amplifizierten Zelllinien ist dieser Proteinabbau durch Aurora-A jedoch pathologisch gestört. Die N-Myc-Proteinhalbwertszeit in *MYCN*-amplifizierten Zellen liegt bei etwa 50 min (47 ± 4 min) und ist damit doppelt so hoch wie unter normalen Bedingungen. Inhibiert man allerdings die Aurora-A-Kinase, führt dies zu einer beschleunigten N-Myc-Degradation ($T_{1/2} = 27 \pm 7$). Diese Halbwertszeit entspricht in etwa der normalen Situation (Abbildung 4.12 C und D).

Neben N-Myc sind weitere Proteine identifiziert worden, die in ihrer Proteinestabilität durch Aurora-A beeinflusst werden (Tabelle 5.1). Zum Beispiel ist eine gegenseitige Regulation zwischen p53 und Aurora-A beschrieben worden. So führen Phosphorylierungen durch Aurora-A zum proteasomalen Abbau bzw. zur Inhibierung der DNA-Bindung von p53, wohingegen p53 wiederum die transkriptionelle Aurora-A-Expression hemmt und die Degradation der Kinase fördert (Katayama et al., 2004; Liu et al., 2004; Wu et al., 2012).

Die Aurora-A-abhängige Phosphorylierung von I κ B α (Serin 32 und Serin 36) induziert ebenfalls die Degradation des Proteins und führt damit zur Aktivierung des NF κ B-Signalweges (Briassouli et al., 2007).

Neben der Destabilisierung von Proteinen ist Aurora-A durch seine Kinaseaktivität auch in der Lage, Proteine vor dem proteasomalen Abbau zu schützen (Tabelle 5.1).

Die Vielzahl an Proteinen, die in ihrer Stabilität durch Aurora-A reguliert werden, zeigt, dass die Funktion von Aurora-A nicht ausschließlich auf die Mitose beschränkt ist

(Abschnitt 3.4.1 und 3.4.2), sondern die Kinase auch andere zellphysiologische Prozesse beeinflusst.

Tabelle 5.2 Übersicht über Aurora-A-Substrate, die durch die Kinase in ihrer Protein-stabilität reguliert werden

Protein	Phosphorylierung	Effekt auf die Protein-stabilität	Referenz
p53	S315	Degradation	(Katayama et al., 2004)
I κ B α	S32/S36	Degradation	(Briassouli et al., 2007)
LIMK2	S283/T494/T505	Stabilisierung	(Johnson et al., 2012)
HURP	S627/S725/ S757/S830	Stabilisierung	(Yu et al., 2005a)
Geminin	T25	Stabilisierung	(Tsunematsu et al., 2013)
Zyklin B	?	Stabilisierung	(Qin et al., 2009)
β -Catenin	S552/S675	Stabilisierung	(Jin et al., 2015)
N-Myc	Interaktion	Stabilisierung	(Otto et al., 2009)

5.2.2 Fbxw7 vermittelt den proteasomalen Abbau von N-Myc

Das F-Box-Protein Fbxw7 ist das Substraterkennungsprotein des E3-Ligasekomplex SCF^{Fbxw7} (SKP1-CUL1-F-Box-Protein) und katalysiert zusammen mit der E2-Ligase Cdc34 die Verknüpfung von Lysin 48-Ubiquitinketten, die als Degradationssignal unter anderem für c-Myc fungieren (Welcker et al., 2004). Das Phosphodegron (pT58/pS62) reguliert die c-Myc-Protein-stabilität, indem Fbxw7 an den phosphorylierten Aminosäurerest Threonin 58 bindet und c-Myc ubiquitiniert (Welcker et al., 2004; Yada et al., 2004).

Aufgrund der hochkonservierten Myc-Box I, in der sich das Phosphodegron befindet, ist eine generelle Regulation der Myc-Proteine durch Fbxw7 sehr wahrscheinlich. Ein ähnlicher Mechanismus konnte in der Tat auch für das N-Myc Protein identifiziert werden. Die Induktion des N-Myc-Proteinabbaus vermitteln die Kinasen Cdk1 und GSK3 β durch Phosphorylierungen an Serin 62 bzw. Threonin 58 (Kenney et al., 2004; Sjostrom et al., 2005). Fbxw7 bindet phosphorylierungsabhängig (pT58/pS62) an N-Myc, ubiquitiniert den Transkriptionsfaktor und induziert so dessen proteasomalen Abbau (Abbildung 4.2 und 5.2) (Otto et al., 2009).

FBXW7 ist in einer Vielzahl von malignen Tumoren deletiert bzw. durch Mutationen inaktiviert. Seine Tumorsuppressorfunktion übt das Protein durch die Regulation von mehreren onkogenen Substraten wie Zyklin E und Myc aus (Clurman et al., 1996; Welcker et al., 2004). Im Nephroblastom beispielsweise konnten sowohl *MYCN*-Amplifikationen als auch Mutationen im *FBXW7* Locus identifiziert werden, die zur *MYCN*-Überexpression beitragen können (Williams et al., 2010)

5.2.3 Aurora-A stabilisiert phosphoryliertes N-Myc durch die spezifische Blockierung des Fbxw7-induzierten Proteinabbaus

Sowohl der Fbxw7-abhängige Proteinabbau als auch die N-Myc-Stabilisierung durch Aurora-A sind von den Phosphorylierungen an Threonin 58 und Serin 62 abhängig (Abbildung 4.4; 4.13 A und D; 4.16 C; 4.17 C).

Demnach könnte Aurora-A mit dem N-Myc-Degradationssignalweg interferieren und auf diese Weise N-Myc stabilisieren. Die N-Myc Phosphorylierung an T58, die den Signalweg zum Fbxw7-induzierten Abbau einleitet, wird durch GSK3 β vermittelt. GSK3 β wiederum wird durch den PI3K/AKT (Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B)-Signalweg negativ reguliert (Cross et al., 1995). Im Magenkarzinom konnte eine direkte Inhibierung von GSK3 β durch eine Aurora-A-abhängige Phosphorylierung beschrieben werden (Dar et al., 2009). Des Weiteren konnte eine Aktivierung von AKT durch Aurora-A gezeigt werden (Yao et al., 2009), wodurch Aurora-A GSK3 β indirekt inhibiert. Der postulierte Mechanismus, einer direkten oder indirekten Inhibition von GSK3 β durch Aurora-A, konnte allerdings für das *MYCN*-amplifizierte Neuroblastom nicht bestätigt werden (Abbildung 4.11) (Brockmann et al., 2013).

Eine mögliche Cdk1-Inhibition und die daraus resultierende Blockierung der Serin 62-Phosphorylierung konnte auch ausgeschlossen werden, da bereits beschrieben wurde, dass Aurora-A eher die Aktivierung des Zyklin B/Cdk1-Komplex fördert als inhibiert (Hirota et al., 2003). Die Rekrutierung der Phosphatase PP2A, die Serin 62 dephosphorylieren kann, wäre eine weitere Möglichkeit, die destabilisierende Phosphorylierung von N-Myc aufzuheben (Horn et al., 2007; Sjostrom et al., 2005). Eine Interaktion zwischen PP2A und Aurora-A konnte allerdings in Neuroblastomzelllinien nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Beobachtung, die gegen eine Blockierung des Degradationssignalweges auf Höhe der Phosphorylierung spricht, ist die Akkumulation des phosphorylierten N-Myc Proteins nach einer Aurora-A-Überexpression (Abbildung 4.6 C).

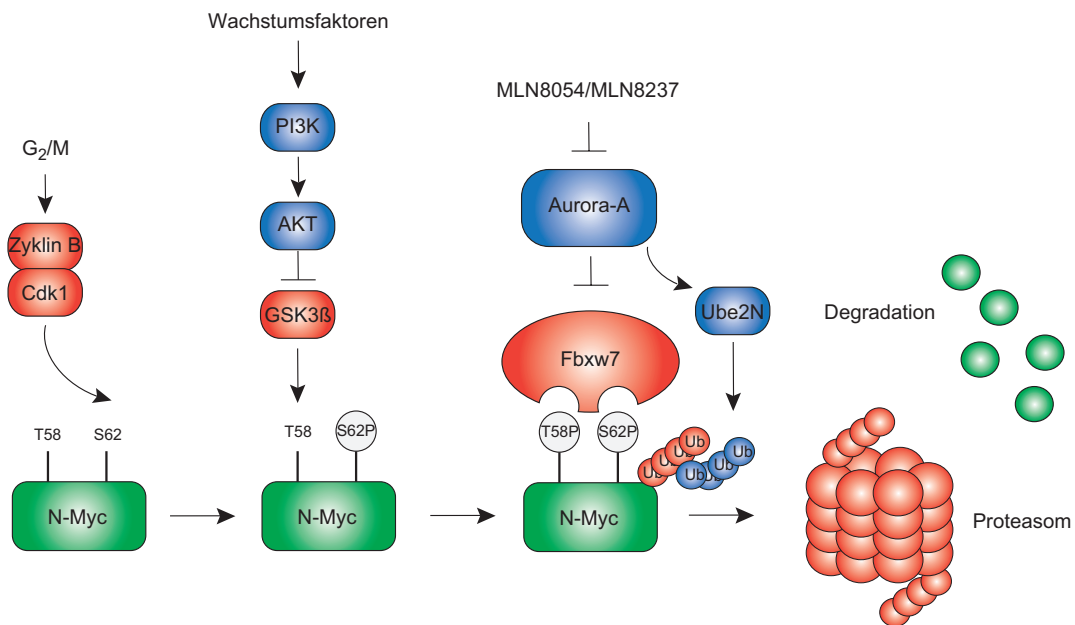


Abbildung 5.2: Modell der N-Myc-Stabilisierung durch Aurora-A

In der G_2/M -Phase wird N-Myc durch den Zyklus B/Cdk1-Komplex phosphoryliert. Dies initiiert eine weitere Phosphorylierung an Threonin 58. Das phosphorylierte N-Myc Protein wird durch Fbxw7 gebunden, ubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom degradiert. Aurora-A inhibiert den Fbxw7-vermittelten Proteinabbau indem es sowohl an N-Myc als auch an Fbxw7 bindet. Ein potentieller Mechanismus wäre die Rekrutierung von weiteren Proteinen, wie z.B. dem Ubiquitin konjugierenden Enzym Ube2N. Eine Verknüpfung mit heterotypischen Ubiquitinketten könnte einen proteasomalen Abbau verhindern. In rot sind Proteine dargestellt, die den N-Myc-Proteinabbau fördern. Blau gefärbte Proteine stabilisieren den Transkriptionsfaktor.

Demnach findet wahrscheinlich ein anderer Prozess statt, der nach der Phosphorylierung erfolgt. Aurora-A könnte etwa weitere Proteine rekrutieren, die den N-Myc-Proteinabbau verhindern. So bindet Aurora-A Ube2n, eine Ubiquitin-konjugierende E2-Ligase, die in der Lage ist, nicht-kanonische Lysin 63-verknüpfte Polyubiquitinketten zu katalysieren (Briassouli et al., 2006; Ewart-Toland et al., 2003; Kim et al., 2007; Pertel et al., 2011). Diese Art der Verknüpfung führt im Gegensatz zu Lysin 48-Polyubiquitinketten nicht zur proteasomalen Degradation des Proteins. Für c-Myc wurde bereits die Markierung mit heterotypischen Polyubiquitinketten beschrieben, die nicht zum Abbau führt sondern vielmehr die transkriptionelle Aktivität bzw. die Zellzyklusprogression stimuliert (Adhikary et al., 2005; Popov et al., 2010). Eine Aurora-A-Überexpression resultierte ebenfalls in einer atypischen Verknüpfung von Ubiquitinketten an N-Myc (Otto et al., 2009). Die nicht-kanonische Ubiquitinverknüpfung mit z.B. K63-Polyubiquitinketten könnte den proteasomalen Abbau verhindern und dadurch das ubiquitinierte N-Myc-Protein stabilisieren (Abbildung 5.2). Darüber hinaus könnte die atypische Ubiquitinierung, ähnlich zu c-Myc, die transkriptionelle Aktivität beeinflussen.

Der genaue Mechanismus der N-Myc-Stabilität konnte während dieser Doktorarbeit jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden. Massenspektrometrische Analysen könnten allerdings dazu beitragen, die Funktion von Aurora-A besser zu verstehen.

Proteomische Studien identifizierten bereits N-Myc-Interaktionspartner, die unter anderem bei der N-Myc-Proteinstabilität eine entscheidende Rolle spielen. Neben den E3-Ligasen, HectH9 und Fbxw7, konnte ebenfalls Aurora-A als Interaktionspartner detektiert werden (Choi et al., 2010). Ein unbekannter Interaktionspartner, der identifiziert wurde, ist das deubiquitinierende Enzym (DUB) USP11. USP11 spielt unter anderem eine entscheidende Rolle während der DNA-Doppelstrang-Bruch-Reparatur (*DNA Damage Response*) (Schoenfeld et al., 2004; Wiltshire et al., 2010, Yu et al., 2015). Neuere Studien dokumentieren die Inhibition von USP11 als ein therapeutisches Angriffsziel im duktalem Pankreasadenokarzinom (Burkhart et al., 2013). Aufgrund des therapeutischen Potentials wurde die Rolle von USP11 im Neuroblastom detaillierter untersucht.

Es zeigte sich, dass USP11 einen stabilisierenden Effekt auf N-Myc hat. Depletierte man USP11, führte dies zu einer Reduktion der N-Myc-Proteinmenge. Eine *USP11*-Überexpression induzierte die N-Myc-Proteinexpression. Darüber hinaus konnte eine direkte Interaktion der beiden Proteine detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ob Aurora-A in diesen Prozess involviert ist, konnte nicht geklärt werden. Ein möglicher Mechanismus wäre eine Aurora-A-abhängige Rekrutierung von USP11 an ubiquitiniertes N-Myc, wodurch USP11 wiederum N-Myc deubiquitiniert und dadurch stabilisiert. Für c-Myc wurde ein ähnlicher Mechanismus beschrieben. Hierbei antagonisiert das deubiquitinierende Enzym USP28 den Fbxw7-vermittelten Abbau von c-Myc (Popov et al., 2007).

5.2.4 Aurora-A interferiert mit der Fbxw7-Substraterkennungssequenz von N-Myc

Eine direkte Interaktion mit Aurora-A ist die Voraussetzung für die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors. Diese Interaktion ist von der T58/S62-Phosphorylierung abhängig (Abbildung 4.4) (Otto et al., 2009). Neben der N-Myc/Aurora-A-Interaktion kommt es auch zu einer Komplexbildung zwischen Aurora-A und Fbxw7 (Abbildung 4.3 C und D). Studien belegten bereits eine Fbxw7-vermittelte proteasomale Degradation von Aurora-A (Kwon et al., 2012). Dieser Abbau konnte allerdings in Neuroblastomzellen nicht beobachtet werden (Abbildung 4.4 A). Aurora-A könnte jedoch als Pseudosubstrat für Fbxw7 agieren und dadurch eine kompetitive Inhibition der E3-Ligase verursachen. Eine generelle Blockierung der E3-Ligaseaktivität durch das "Pseudosubstrat" Aurora-A kann jedoch ausgeschlossen werden, da weitere Fbxw7-Substrate, wie Zyklin E, nicht durch Aurora-A stabilisiert werden (Abbildung 4.5) (Ye et al., 2004).

Ein Vergleich der N-Myc-Aminosäuresequenz mit der Aurora-A-Substraterkennungssequenz ergibt eine Übereinstimmung in unmittelbarer Nähe des Phosphodegrons der Myc-Box I, die essentiell für die Bindung mit Fbxw7 und Aurora-A ist (Eilers, 2013;

Sardon et al., 2010) Aufgrund der Tatsache, dass hohe Aurora-A-Mengen zur N-Myc-Stabilisierung nötig sind (Abbildung 4.1 A und B, 4.4 A, B und C und 4.6) ist eine kompetitive Blockierung der Fbxw7/N-Myc-Interaktion denkbar (Abbildung 5.3). Die sterische Hinderung der Fbxw7/N-Myc-Bindung könnte die Rekrutierung von Proteinen (wie z.B. Ube2n und/oder USP11) ermöglichen, die zur N-Myc-Stabilisierung beitragen könnten. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für Fbxw7 beschrieben. Busino und Kollegen konnten zeigen, dass die NFκB Proteine p52 und RelB um die Bindung an p100 mit Fbxw7 konkurrieren und dadurch p100 stabilisieren (Busino et al., 2012).

Allerdings ist der prozentuale Anteil an N-Myc, der durch Aurora-A gebunden wird, mit etwa 1-5 % relativ klein (Abbildung 4.3). Die geringe Interaktionseffizienz könnte auf einer hohen Dissoziationskinetik beruhen. Neben einer Immunpräzipitation kann die Interaktion von Proteinen auch durch einen PLA-Assay (*proximity ligation assay*) untersucht werden. Dabei werden die Zellen fixiert und der *Status quo* an Interaktionen innerhalb der Zelle verändert sich nicht mehr. Mit Hilfe dieses Assays können in etwa gleich viele Aurora-A/N-Myc und N-Myc/Max Komplexe ermittelt werden (Brockmann et al., 2013). Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass der Anteil an N-Myc, der durch Aurora-A gebunden wird, in der Immunpräzipitation unterschätzt wird.

Ein möglicher therapeutischer Ansatz wäre die Verwendung von kleinen Peptiden (Craik et al., 2013) mit der Substraterkennungssequenz. Diese Peptide könnten mit N-Myc um die Bindung an Aurora-A konkurrieren. Der prozentuale Anteil an freiem N-Myc würde sich erhöhen. Die Blockierung von Aurora-A ermöglicht eine verstärkte Interaktion zwischen N-Myc und Fbxw7. Die Fbxw7-abhängige Ubiquitinierung führt zur Degradation des N-Myc-Proteins. Aus therapeutischer Sicht könnten die starken Nebenwirkungen (Abschnitt 5.5.4) einer Aurora-A-Inhibition vielleicht vermieden werden, da die Aktivität von Aurora-A höchstwahrscheinlich nicht beeinflusst würde.

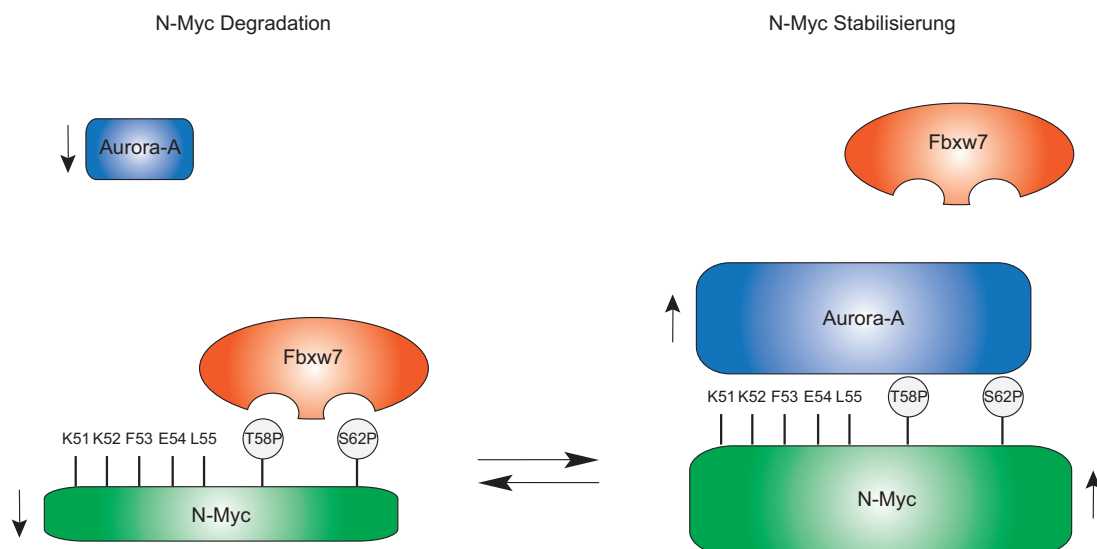


Abbildung 5.3: Modell der kompetitiven Hemmung der Fbxw7/N-Myc-Interaktion

Hohe Aurora-A-Proteinlevel binden an das Phosphodegron und die Substraterkennungssequenz in N-Myc. Dadurch wird Fbxw7 kompetitiv daran gehindert an N-Myc zu binden. Die proteasomale Degradation kann nicht mehr stattfinden.

5.3 Die Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 destabilisieren das N-Myc Protein

5.3.1 Aurora-A stabilisiert N-Myc unabhängig von der Kinaseaktivität

Die Verfügbarkeit von spezifischen Inhibitoren (Keen and Taylor, 2004) macht Aurora-A zu einem geeigneten Angriffsziel gegen *MYCN*-amplifizierte Tumoren.

Überraschenderweise stabilisiert Aurora-A N-Myc unabhängig von der Kinaseaktivität (Abbildung 4.6 C; 4.9; 4.14D). Neuste Studien belegen, dass Aurora-A auch Kinase-unabhängige Funktionen besitzt. So ist die Stabilisierung der Spindel-Mikrotubuli unabhängig von der Enzymaktivität (Toya et al., 2011).

In dieser Doktorarbeit konnte ein weiterer Kinase-unabhängiger Mechanismus von Aurora-A identifiziert werden. Dabei ist zwar die Kinasedomäne entscheidend an der N-Myc-Stabilität beteiligt, die Aktivität der Kinase spielt allerdings keine Rolle (Abbildung 4.6). Neben Aurora-A existieren noch zwei weitere Aurora-Kinasen, Aurora-B und Aurora-C, die eine ähnliche Struktur aufweisen. Es wurde ebenfalls beschrieben, dass Aurora-B mit SCF^{Fbxw7} interagiert. Ähnlich wie Aurora-A wird Aurora-B durch die E3-Ligase ubiquitiniert und degradiert (Teng et al., 2012). Trotz der sehr starken Sequenzhomologie, insbesondere in der Kinasedomäne, ist Aurora-B allerdings nicht in der Lage, N-Myc zu stabilisieren (Abbildung 4.7). Eine mögliche Ursache könnte die unterschiedliche Lokalisation der beiden Proteine sein (Abschnitt 3.4). Ein anderer Grund könnte die unterschiedliche Aminosäuresequenz im C- und N-terminalen Bereich sein. So interagiert Aurora-A mit Ube2N über einen Phenylalaninrest im N-terminalen Bereich. Dieser AS-Rest befindet sich nicht in der Aminosäuresequenz von Aurora-B (Briassouli et al., 2006). Auch die Bindung von Aurora-A an PP2A findet über den N-terminalen Bereich statt (Horn et al., 2007). Die Möglichkeit unterschiedliche Proteine im N-terminalen Bereich zu binden, spricht für die Hypothese der Rekrutierung von weiteren Proteinen, die N-Myc vor dem proteasomalen Abbau schützen.

5.3.2. Spezifische Aurora-A-Inhibitoren dissoziieren den N-Myc/Aurora-A-Komplex

Wie bereits erwähnt, ist die N-Myc-Stabilisierung durch Aurora-A eine Kinase-unabhängige Funktion. Entscheidend für die Stabilisierung ist lediglich die Interaktion der beiden Proteine. Eine Hemmung der Kinasaktivität mit Aurora-A-Inhibitoren hätte demnach keinen Effekt auf die N-Myc-Proteinexpression.

Im Jahr 2002 wurde die Kristallstruktur von Aurora-A im Komplex mit Adenosin aufgeklärt (Cheetham et al., 2002). Die Röntgenstrukturanalyse zeigt ein typisches Faltungsmuster mit zwei Domänen. Während der N-terminale Lobus hauptsächlich aus einer β -Faltblattstruktur besteht, ist der C-terminale Lobus durch α -Helices geprägt. In dem katalytischen Spalt zwischen diesen beiden Lobi befindet sich der *Aktivierungsloop*

(Bayliss et al., 2003; Cheetham et al., 2002; Nowakowski et al., 2002) (Abbildung 4.8 A). Kristallographische Strukturanalysen mit dem Inhibitor MLN8054 zeigen, dass das Molekül eine veränderte Konformation der Kinasedomäne induziert. Dabei kommt es zu einer atypischen "DFG-up Konformation" bei der mehrere Aminosäuren eine veränderte Position zur normalen ATP-gebundenen Form einnehmen. Die Bindetasche im aktiven Zentrum verändert daraufhin ihren polaren Charakter und wird hydrophob (Dodson et al., 2010). Aufgrund dieser strukturellen Veränderung könnte es zu einer Maskierung der Interaktionsoberfläche kommen und dadurch zur Blockierung der N-Myc-Bindung. In IP-Experimenten und PLA-Assays konnte diese Hypothese bestätigt werden. Andere Aurora-Inhibitoren, mit unterschiedlicher Molekülstruktur (VX680, Hesperadin, CCT137690 und MK5108) haben keinen Effekt auf die Komplexbildung. Lediglich die Inkubation mit dem Inhibitor MLN8237, der eine ähnliche Molekülstruktur aufweist, führt zu einer Dissoziation des Heterodimers (Abbildung 4.8 A und B; 4.10 und 4.11 C).

Die ATP-Bindetasche von Aurora-A unterscheidet sich von den anderen beiden Aurora-Kinasen in drei Aminosäureresten (L215, T217 und R220). Dieser strukturelle Unterschied in der ATP-Bindedomäne ermöglicht die selektive Aurora-A-Inhibition durch die beiden Moleküle MLN8054 und MLN8237 (Bavetsias et al., 2013; Dodson et al., 2010). Die Mutation von Threonin 217 zu Aspartat reduziert die Affinität gegenüber den Molekülen (Sloane et al., 2010) (Abbildung 4.20). IP-Experimente zeigen, dass die Interaktion zwischen der Aurora-A-Mutante (T217D) und N-Myc durch die beiden Inhibitoren (MLN8054 und MLN8237) nicht mehr blockiert werden kann. Infolgedessen ist die Mutante in der Lage, N-Myc trotz einer Behandlung mit den Aurora-A-Inhibitoren zu stabilisieren. Interessanterweise führt die phosphomimetische Mutation zu einer verstärkten katalytischen Aktivität. So erleichtert wahrscheinlich die veränderte strukturelle Position einiger Aminosäuren die Autophosphorylierung von Aurora-A (Abbildung 4.20 A und B). Die Aminosäure Threonin 217 spielt auch bei der Fbxw7-vermittelten Degradation von Aurora-A eine wesentliche Rolle. Werden die Aminosäuren T217 und E221 zu Alanin mutiert, wird sowohl die Interaktion zu Fbxw7 als auch der proteasomale Abbau unterbunden (Kwon et al., 2012). Inwieweit eine solche Mutation einen Effekt auf N-Myc hat, ist im Moment noch nicht bekannt. IP-Experimente und PLA-Assays sowie die Überexpression der Mutante in Aurora-A defizienten Zellen könnten jedoch darüber Aufschluss geben (Cowley et al., 2009).

5.3.3. Die speziellen Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 reduzieren das N-Myc Proteinlevel

Ausschließlich die Inhibitoren von der Firma Millennium (MLN8054 und MLN8237), die eine ähnliche Molekülstruktur aufweisen und den N-Myc/Aurora-A-Komplex dissoziieren können, sind in der Lage die N-Myc-Proteinlevel konzentrationsabhängig zu reduzieren (Abbildung 4.8 C; 4.9; 4.14 D). Die anderen untersuchten Aurora-Inhibitoren, die den Aurora-A/N-Myc-Komplex nicht dissoziieren können, inhibieren zwar die Kinaseaktivität von Aurora, haben allerdings keinen Einfluss auf die Proteinstabilität von N-Myc

(Abbildung 4.9, 4.11 C und 4.14 D). Dies bestätigt die Kinase-unabhängige Funktion von Aurora-A bei der N-Myc-Stabilisierung.

Titrationsreihen mit MLN8054 und MLN8237 zeigen, dass die IC₅₀-Werte für die N-Myc-Proteinabnahme und die der Dissoziation des Aurora-A/N-Myc-Komplexes deutlich höher liegen als die erforderliche Konzentration zur Inhibition der Autophosphorylierung (Abbildung 4.9 und 4.10). Eine mögliche Ursache könnte die zusätzliche Energie sein, die aufgebracht werden muss, um den bereits vorhandenen N-Myc/Aurora-A-Komplex zu dissoziieren. Der Inhibitor muss daher im Überschuss vorliegen, um nicht nur freies Aurora-A sondern auch bereits gebundenes Aurora-A zu inhibieren und gleichzeitig zu deformieren.

Ein *off target*-Effekt der Aurora-A-Inhibitoren kann ausgeschlossen werden, da die Aurora-A Mutante (T217D), die resistent gegenüber MLN8054 ist, trotz Inhibitorinkubation an N-Myc binden und dadurch den Transkriptionsfaktor stabilisieren kann (Sloane et al., 2010)(Abbildung 4.20).

5.3.4 Die Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 regulieren die N-Myc-Expression posttranslational über den Fbxw7-vermittelten Degradationsweg

Aurora-A stabilisiert das N-Myc-Protein durch Blockierung der Fbxw7-vermittelten Degradation (Abbildung 4.13) (Otto et al., 2009). Zur Aufklärung dieses Mechanismus wurde das Aurora-A-Expressionslevel, entweder durch Überexpression oder durch Depletion mit shRNAs, manipuliert. In dieser Doktorarbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die spezifische niedermolekulare Inhibition von Aurora-A ebenfalls, die Reduktion der N-Myc-Menge ermöglicht. Der Vergleich einer Aurora-A-Depletion durch shRNAs mit der spezifischen Aurora-A-Inhibition durch MLN8054 und MLN8237 belegt, dass derselbe Mechanismus zur N-Myc-Reduktion beiträgt (Brockmann et al., 2013; Otto et al., 2009).

Die Inkubation mit MLN8054 und MLN8237 reduziert die N-Myc Proteinmenge in allen untersuchten *MYCN*-amplifizierten Zellen. Gleichzeitig bleibt die mRNA-Expression von N-Myc relativ konstant. Cycloheximidexperimente und *Pulse Chase*-Experimente bestätigen den beschleunigten Proteinabbau von N-Myc. Des Weiteren wird der destabilisierende Effekt der Aurora-A-Inhibitoren durch den Proteasominhibitor MG132 verhindert. Dabei induzieren die Millennium-Inhibitoren spezifisch den Fbxw7-vermittelten N-Myc Proteinabbau (Abbildung 4.12 und 4.13). Derselbe Mechanismus kann bei einer Aurora-A-Depletion durch shRNAs beobachtet werden. Ein *off target* Effekt ist damit unwahrscheinlich (Otto et al., 2009).

Neben Fbxw7 gibt es noch weitere E3-Ligasen, die den N-Myc-Abbau vermitteln (Choi et al., 2010). So fördert HectH9 die Differenzierung neuronaler Zellen durch die Degradation von N-Myc (Zhao et al., 2008). Die Aurora-A vermittelte N-Myc-Stabilisierung beruht jedoch vermutlich nicht auf einem antagonisierenden Einfluss auf den HectH9-vermittelten proteasomalen Abbau (Abbildung 4.13 C).

Trotz einer relativ kurzen Halbwertszeit, reduzieren sich die N-Myc-Proteinlevel nach Inhibitorzugabe zeitabhängig. Die verhältnismäßig langen Inkubationszeiten stehen in Diskrepanz zu der schnellen Abbaugeschwindigkeit von N-Myc (Abbildung 4.12 C-F; 4.14 A). Eine mögliche Erklärung könnte der zellzykluspezifische Proteinabbau von N-Myc sein (Sjostrom et al., 2005) (Abschnitt 3.3.4). Die Mitose ist eine relativ kurze Phase des Zellzykluses. 60-80 % der Zellen befinden sich in der G₁- und der S-Phase. Der Aurora-A-Effekt auf die N-Myc-Proteininstabilität ist daher bei kurzen Inkubationszeiten schwer zu detektieren.

Die mitotische Phosphorylierung an Serin 62 induziert die Fbxw7-abhängige N-Myc-Degradation. (Abbildung 4.2) (Otto et al., 2009). Als Antagonist des Fbxw7-induzierten Abbaus ist Aurora-A besonders stark während der G₂/M-Phase exprimiert (Tanaka et al., 2002), in der auch eine Lokalisation zwischen N-Myc und Aurora-A beobachtet werden kann (Abbildung 4.3 A). Sowohl die gesteigerte Aurora-A-Expression als auch die Ko-Lokalisation ermöglichen die zellzykluspezifische Stabilisierung des N-Myc-Proteins.

In hohen Konzentrationen induzieren alle getesteten Aurora-A-Inhibitoren einen G₂/M-Arrest. Allerdings können ausschließlich die Moleküle MLN8054 und MLN8237, die auch den Aurora-A/N-Myc-Komplex dissoziieren, das N-Myc-Proteinlevel reduzieren. Eine indirekte Destabilisierung durch eine Arretierung der Zellen in der G₂/M-Phase, in der Fbxw7 den N-Myc-Abbau vermittelt, konnte damit ausgeschlossen werden (Abbildung 4.14 C und D; Daten nicht gezeigt).

Die Inkubation mit Nocodazol, einem Inhibitor der Mikrotubuli-Polymerisation, lässt die Zellen in der Prometaphase arretieren (Han et al., 2014). Der Mitosearrest hatte allerdings kaum einen Effekt auf das N-Myc-Proteinlevel. Die Ursache ist vermutlich die erhöhte, mitotische Aurora-A-Expression, die den proteasomalen Abbau verhindert (Abbildung 4.14 B) (Tanaka et al., 2002).

Eine gleichzeitige Inkubation mit MLN8054 und Nocodazole kann den destabilisierenden Effekt der Millennium-Inhibitoren jedoch verstärken (Abbildung 4.14 B). Aus therapeutischer Sicht wäre demnach eine gleichzeitige Behandlung mit den spezifischen Aurora-A-Inhibitoren und einem Zytostatikum, das die Tumorzellen in der Mitose arretieren lässt, von Vorteil. Die Verwendung von Molekülen und/oder Peptiden (Abschnitt 5.2.4) die ausschließlich die Interaktion zwischen N-Myc und Aurora-A blockieren, könnte auch von Vorteil sein. Wie bereits beschrieben wurde, kann Aurora-A durch mehrere Mechanismen die Aktivität des Zyklin B/Cdk1-Komplex fördern (Hirota et al., 2003; Lindqvist et al., 2009; Qin et al., 2009). Eine Inhibition von Aurora-A würde demnach gleichzeitig den Zyklin B/Cdk1-Komplex in seiner Funktion, die N-Myc Degradation einzuleiten, hemmen. Des Weiteren verzögert die allgemeine Aurora-A-Inhibition den Mitoseeintritt und könnte so den sofortigen N-Myc-Proteinabbau verhindern (Asteriti et al., 2014; Seki et al., 2008). Die direkte Blockierung der Aurora-A/N-Myc-Interaktion ohne dabei die Aurora-A-Kinase zu hemmen, könnte aus therapeutischer Sicht sinnvoll sein.

5.4 Die Aurora-A-Inhibitoren zeigen *in vitro* und *in vivo* therapeutisches Potential

5.4.1 Die Millennium-Inhibitoren induzieren einen Wachstumsarrest in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen

Eine längere Behandlung mit den spezifischen Inhibitoren führt zu einem Wachstumsarrest in allen getesteten *MYCN*-amplifizierten Zelllinien (Abbildung 4.15). Bei relativ niedrigen Konzentrationen (Shang et al., 2009), die ausreichen, um die N-Myc-Level zu reduzieren (Abbildung 4.15 A), sind alle Zellzyklusphasen verlängert. Insbesondere die Dauer der G₁-Phase ist signifikant erhöht (Abbildung 4.15 F).

Ein negativer Regulator der Progression des G₁-S-Übergangs ist der Zellzyklusinhibitor p21 (*CDKN1A*) (Harper et al., 1993). Eine c-Myc-vermittelte transkriptionelle Repression von *CDKN1A* konnte bereits nachgewiesen werden (Herold et al., 2002). Darüber hinaus führt eine *MYCN*-Depletion zu einer erhöhten *CDKN1A*-mRNA-Expression (Daten nicht gezeigt) sowie zu einem selektiven Proliferationsstop in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen (Otto et al., 2009). Die *CDKN1A*-Expression kann allerdings ebenso durch den Tumorsuppressor p53 induziert werden (el-Deiry et al., 1993). Ein cDNA-Microarray von Aurora-A depletierten IMR-32-Zellen dokumentiert einen Anstieg der p53-Expression sowie von dessen Zielgenen (Otto et al., 2009). Inwiefern die Erhöhung der *CDKN1A*-Expression über p53 erfolgt oder die N-Myc-Repression ausschlaggebend für die *CDKN1A*-Induktion ist, wurde anhand des Aurora-A-Inhibitors MLN8054 näher untersucht.

Die Behandlung mit MLN8054 steigert in allen getesteten *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinien das *CDKN1A*-Expressionslevel (Abbildung 4.16 A).

Sogar in der Zelllinie LAN-1, die ein mutiertes p53-Allel aufweist (Goldschneider et al., 2006), kann eine Induktion der *CDKN1A*-Expression detektiert werden (Abbildung 4.16 A und B). Zur weiteren Untersuchung wurden IMR-32-Zellen (p53-wildtyp) mit einer dominant negativen p53DD-Mutante, die mit endogenem p53 oligomerisieren und so p53 inaktivieren kann, infiziert (Bowman et al., 1996). Eine Behandlung mit MLN8054 führt zu einer Akkumulation der p21-Level sowohl in den Kontrollzellen (IMR-32 wildtyp) als auch in den p53DD-exprimierenden Zellen. Andere p53-Zielgene wie z.B. Plk2 wurden in der p53DD-exprimierenden Zelllinie nach einer Aurora-A-Inhibition nicht induziert (Brockmann et al., 2013). Die Aktivierung von p21 ist in diesem Kontext demnach p53-unabhängig. Folglich muss die Reduktion der N-Myc Level für die p21-Induktion verantwortlich sein. Eine gleichzeitige *MYCN*-Überexpression kann sowohl die MLN8054-vermittelte p21-Induktion als auch den Proliferationsarrest teilweise verhindern (Abbildung 4.16).

In post-mitotischen sympathischen Neuronen kann eine *MYCN*-Überexpression ebenfalls den Wiedereintritt in den Zellzyklus induzieren (Wartiovaara et al., 2002).

5.4.2 Das therapeutische Potential der Aurora-A-Inhibitoren kann im transgenen Mausmodell bestätigt werden

Mit Hilfe des transgenen *TH-MYCN*-Mausmodells sollte das therapeutische Potential der Aurora-A-Inhibitoren *in vivo* beurteilt werden (Brockmann et al., 2013; Weiss et al., 1997). Dabei induziert der Tyrosin-Hydroxylase-Promotor die ektopische Expression von humanem N-Myc in der Neuralleiste. Die Überexpression von *MYCN* führt zur Ausbildung von Neuroblastom-ähnlichen Tumoren (Weiss et al., 1997).

Mäuse mit bereits etabliertem Tumor wurden mit den spezifischen Aurora-A-Inhibitoren oral behandelt (Manfredi et al., 2007). Die Bioverfügbarkeit wurde anhand massenspektrometrischer Untersuchungen sowie durch die Autophosphorylierung an T288 der Aurora-A-Kinase im WB bewertet (Brockmann et al., 2013). Die *in vivo* Experimente bestätigen den post-translationalen Mechanismus. So bleiben die mRNA-Level trotz einer Reduktion der N-Myc-Proteinlevel konstant (Abbildung 4.18 A und B). In Übereinstimmung mit den *in vitro* Daten induziert die MLN8054-Behandlung ebenfalls die *CDKN1A*-Expression in den Tumorproben (Abbildung 4.18 B). ChIP-Experimente und GSEA-Analysen zeigen eine negative Regulation von Myc-induzierten Zielgenen (Abbildung 4.18 C und D) (Subramanian et al., 2005). Dabei ist die transkriptionelle Beeinflussung der Myc-regulierten Gene durch die Millennium-Inhibitoren assoziiert mit der Überlebenswahrscheinlichkeit von Neuroblastompatienten (Abbildung 4.18 D) (Oberthuer et al., 2010).

Zur genaueren Beurteilung des therapeutischen Potentials wurde das Tumorstadium in den transgenen Mäusen während der Behandlung mit den Aurora-A-Inhibitoren dokumentiert. Es zeigte sich, dass nach einer 7-tägigen MLN8054-Therapie in 4 von 9 Fällen eine vollständige Regression des Tumors eintritt. Zudem ist in etwa 80 % der Fälle eine deutliche Verringerung des Tumorstadiums feststellbar. Die Tumorstadiumsreduktion nach einer MLN8237-Therapie ist noch ausgeprägter und führt in allen Mäusen zu einer sehr starken Tumorstadiumsregression (Brockmann et al., 2013).

Im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen kann kein Anstieg an apoptotischen Zellen nach einer Millennium-Behandlung detektiert werden (Abschnitt 4.1.15) (Brockmann et al., 2013). Als mögliche Ursache der Tumorstadiumsreduktion kann Apoptose damit ausgeschlossen werden. Die histologische Analyse des Tumorgewebes weist nach einer Behandlung mit den Millennium-Molekülen eine signifikante Anreicherung des Anteils an mitotischen Zellen auf. Dies bestätigt die Bioverfügbarkeit der Aurora-A-Inhibitoren im Tumorgewebe, der die Zellen in der G₂/M-Phase arretieren lässt.

Zudem kann eine Induktion an seneszenten Zellen beobachtet werden (Brockmann et al., 2013). Es wurde bereits beschrieben, dass die Aurora-A-Inhibition durch MLN8054 *in vitro* und *in vivo* Seneszenz induzieren kann (Abbildung 4.17) (Huck et al., 2010). Ausserdem zeigten Studien, dass die zelluläre Seneszenz ein wichtiger Mechanismus bei der Tumorstadiumsregression nach einer Myc-Inaktivierung ist (Wu et al., 2007). Die Eliminierung von seneszenten Zellen übernimmt dabei das Immunsystem (Lasry and Ben-Neriah, 2015). Die Anreicherung von Mac2-positiven Zellen, einem Oberflächenmarker von

Makrophagen, im Tumorgewebe bestätigt die Theorie der Eliminierung von seneszenten Zellen durch das Immunsystem (Brockmann et al., 2013; Cherayil et al., 1989).

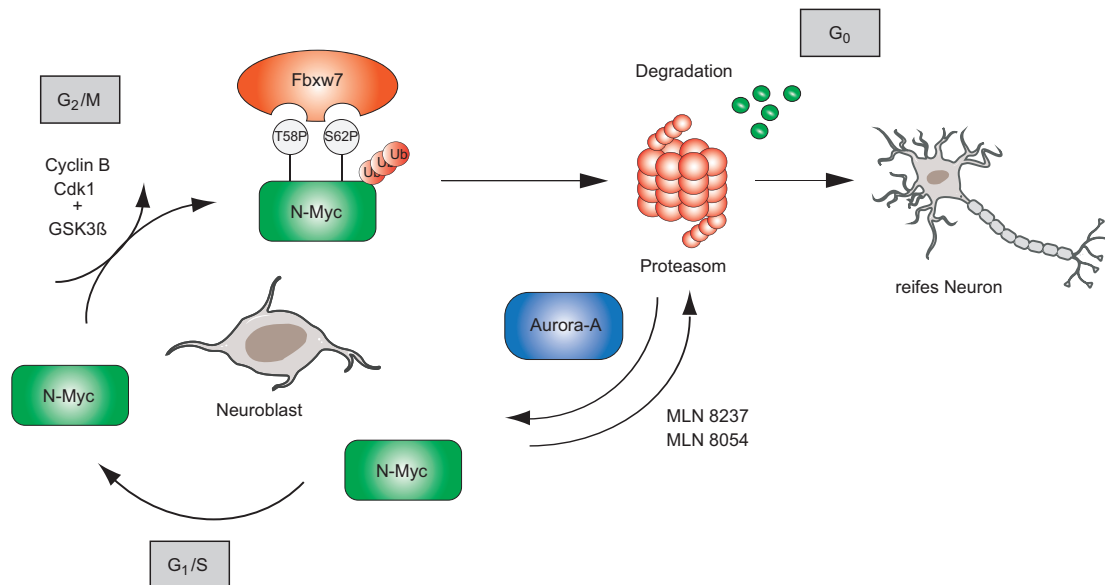


Abbildung 5.4: Modell der Differenzierung von Neuroblasten nach MLN-Behandlung

Hohe N-Myc-Level in der frühen G₁-Phase führen zur Progression des Zellzyklus. Die Reduktion der N-Myc-Proteinlevel durch die Millennium-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 führt zu einem Zellzyklusarrest und induziert die Ausdifferenzierung von Neuroblasten.

Neben der Anreicherung an seneszenten Zellen kann ein prozentualer Anstieg an differenzierten Zellen beobachtet werden. So führt eine Reduktion der N-Myc-Proteinlevel zur gleichzeitigen Repression von Bmi1 (Brockmann et al., 2013). Bmi1, ebenfalls ein prognostischer Marker im Neuroblastom, ist ein Zielgen von N-Myc und fördert die Stammzellproliferation und die Stammzell-Selbsterneuerung durch Inaktivierung des INK4A/Arf-Lokus (Bruggeman et al., 2005; Ochiai et al., 2010). Neben Bmi1 können weitere Gene identifiziert werden, die charakteristisch und wichtig für pluripotente Zellen sind (Abbildung 4.19 A)(Wong et al., 2008). Die Kultivierung von primären Neurosphären und Neurosphären aus Neuroblastomzelllinien in Anwesenheit des Aurora-A-Inhibitors stoppt die Proliferation und Selbsterneuerung der Zellen und induziert die Expression des Differenzierungsmarkers *NEFL* (*neurofilament protein L*)(Andriuolo et al., 2010; Brockmann et al., 2013)(Abbildung 4.19). Eine Überexpression der N-Myc-Mutante (T58A/S62A), die nicht von MLN8054 destabilisiert wird, kann teilweise den Effekt der Aurora-A-Inhibitoren aufheben (Abbildung 4.19 C).

Die Bedeutung der *MYCN*-Expression während der Differenzierung sympathischer Vorläuferzellen ist bereits beschrieben worden. Die Differenzierung von neuronalen Körner-Vorläuferzellen des Kleinhirns basiert auf der mitotischen N-Myc-Degradation (Knoepfler et al., 2002; Sjostrom et al., 2005), wohingegen die N-Myc-Überexpression die Progression des Zellzyklus in diesen Zellen vorantreibt (Kenney et al., 2003). Als

Therapieansatz konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Vitamin A Derivaten (*all-trans*-Retinsäure) die *MYCN*-Expression runterreguliert und es dadurch zu einer Differenzierung von Neuroblastomzellen kommt (Thiele et al., 1985).

Demnach beeinflussen die N-Myc-Proteinlevel das Stammzellpotentials der Neuroblastomzelle. Hohe Aurora-A-Level verhindern den mitotischen Abbau von N-Myc und es kommt zu einer Progression des Zellzyklus. Destabilisiert man das N-Myc-Protein durch die Millennium - Aurora-A-Inhibitoren kommt es zur terminalen Differenzierung der Neuroblasten (Abbildung 5.4).

5.4.3. Andere Inhibitoren zeigen keine therapeutische Wirkung gegen das *MYCN*-amplifizierte Neuroblastom

Die Reduktion des Tumolvolumens nach einer Millennium-Therapie hat eine positive Auswirkung auf die Lebenserwartung der transgenen Mäuse und bestätigt das therapeutische Potential der Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 (Brockmann et al., 2013).

Derzeit befinden sich neben MLN8237 einige Aurora-A-Inhibitoren in klinischen Studien (Agnese et al., 2007; Boss et al., 2009) (Abschnitt 5.5.1), die jedoch keinen Effekt auf die N-Myc-Proteininstabilität haben.

Daher sollte das therapeutische Potential von Aurora-A-Inhibitoren *in vivo* genauer untersucht werden. Ob eine generelle Aurora-A-Hemmung einen therapeutischen Erfolg bei *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomerkrankungen hat oder die Reduktion der N-Myc Proteinexpression ausschlaggebend für das therapeutische Potential der Aurora-A-Inhibitoren MLN8054 und MLN8237 ist, sollte anhand des Aurora-A-Inhibitors MK5108 geklärt werden. MK5108 inhibiert zwar hochselektiv Aurora-A (Shimomura et al., 2010), führt allerdings nicht zur Dissoziation des Aurora-A/N-Myc-Komplex. Darüber hinaus ist MK5108 nicht in der Lage, die N-Myc-Proteinmengen zu reduzieren (Abbildung 4.9 und 4.10).

Transgene TH-*MYCN*-Mäuse mit etabliertem Neuroblastom wurden mit MK5108 behandelt und die N-Myc Proteinexpression mit Hilfe eines WB analysiert. Erwartungsgemäß bleibt die N-Myc-Proteinmenge im Vergleich zu den Kontrolltumoren konstant. Darüber hinaus wächst das Tumolvolumen trotz einer MK5108-Therapie weiter an und die behandelten Tiere haben im Vergleich zu den Kontrollmäusen keine gesteigerte Lebenserwartung (Chesler, 2013).

Dementsprechend führt die Aurora-A-Inhibition mit MK5108 zu keinem messbaren therapeutischen Erfolg. Allerdings kann eine Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes in den Tumoren nicht eindeutig nachgewiesen werden, da massenspektrometrische Untersuchungen eine inkonsistente Anreicherung des Inhibitors in den Mausproben zeigen (Brockmann et al., 2013; Chesler, 2013).

Ein weiterer Aurora-A-Inhibitor, CCT137690, zeigt im transgenen TH-*MYCN*-Mausmodell einen moderaten therapeutischen Effekt. Das Tumorwachstum der behandelten Mäuse kann zwar verlangsamt werden, aber im Gegensatz zu den Millennium-Inhibitoren kommt es nicht zu einer Tumorregression. (Brockmann et al., 2013; Faisal et al., 2011).

Der leichte therapeutische Effekt beruht höchstwahrscheinlich auf einem *off-target* Effekt. So kann gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit CCT137690 die Kinase GSK3 β aktiviert wird und dadurch N-Myc destabilisiert werden kann (Abbildung 4.11 C) (Brockmann et al., 2013; Faisal et al., 2011).

Ob Aurora-A-Inhibitoren nun einen generellen Effekt auf *MYCN*-amplifizierte Tumore haben, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Weitere *in vivo* Tests mit selektiven Aurora-A-Inhibitoren sind notwendig, um diesen Sachverhalt eingehend zu untersuchen. Weitere Mausmodelle, wie z.B. eine transgene *MYCN mut* (T58A/S62A)-Maus oder die Kreuzung einer Fbxw7-defizienten Maus mit der transgenen TH-*MYCN* Maus, könnten zusätzlich über den genaueren Mechanismus Aufschluss geben.

5.4.5 Aurora-A-Inhibitoren in klinischen Studien

Trotz einer schnellen und starken Tumorreduktion verursacht der Aurora-A-Inhibitor MLN8054 in hohen Konzentrationen allerdings erhebliche Nebenwirkungen, die schließlich zum Tod der transgenen Mäuse führen. Niedrigere Konzentrationen wurden besser toleriert, und führen zu einer gesteigerten Lebenserwartung im Vergleich zu den Kontrolltieren (Brockmann et al., 2013)

MLN8237, eine Weiterentwicklung des Inhibitors MLN8054, wurde in niedrigeren Konzentrationen als MLN8054 eingesetzt und zeigt nicht so starke Nebenwirkungen. Die Lebenserwartung der Mäuse stieg im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant an.

Beide Millennium-Inhibitoren wurden in klinischen Studien getestet. Der Inhibitor MLN8054 wurde allerdings aufgrund zu starker Nebenwirkungen und nach Abschätzung des therapeutischen Nutzens während der klinischen Phase 1 wieder abgesetzt. Zusätzlich zu den starken Nebenwirkungen war ein wesentlicher Aspekt, der zum Abbruch der Studie führte, dass zu hohe Konzentrationen eingesetzt werden mussten, um die Kinase zu hemmen (NCT00249301, 2008) Somit spiegelt die klinische Studie die Resultate des transgenen Mausmodells nach einer MLN8054 Behandlung wieder. Wie bereits erwähnt, verursachen hohe MLN8054-Konzentrationen starke Nebenwirkungen und führen schließlich zum Tod der Mäuse.

Wie in den Mausexperimenten zeigt der Inhibitor MLN8237 einen größeren therapeutischen Erfolg. Im Gegensatz zu MLN8054 wurde die Phase I der klinischen Studie erfolgreich abgeschlossen (NCT00962091, 2013). Der Inhibitor befindet sich nun in mehreren weiterführenden klinischen Studien (Phase II)(z.B. NCT00807495, NCT02293005, NCT01812005; ClinicalTrials.gov.). Getestet wird unter anderem die Bioverfügbarkeit. Dabei liegt die Plasmakonzentration bei etwa 2 μ M (Matulonis et al., 2012). Diese Konzentration ist ausreichend um den Komplex zwischen Aurora-A und N-Myc zu dissoziieren und gleichzeitig N-Myc zu destabilisieren (Abbildung 4.8 und 4.9).

Zudem wurde MLN8237 in der klinischen Phase III getestet (Cheung et al., 2014). In dieser Studie wurden Patienten mit rezidiven und resistenten peripherischen T-Zell-Lymphomen (PtCl) behandelt. Allerdings wurde die Studie vor kurzem aufgrund eines mangelnden Therapieerfolgs abgebrochen. Patienten, die jedoch einen therapeutischen

Nutzen von der Behandlung hatten, sollen weiter behandelt werden. Darüber hinaus soll das therapeutische Potential von MLN8237 an Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom getestet werden (Takeda, 2015). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Nebenwirkungen im Verhältnis zum therapeutischen Nutzen gering ausfallen und weitere Studien trotz dieser Nebenwirkungen vertretbar sind.

Interessanterweise tritt beim Kleinzelligem Lungenkarzinom häufig eine *MYCN*-Amplifikation auf (Tabelle 3.1), die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Vor kurzem wurde die Klinische Studie (Phase II) mit dem Millennium-Inhibitor MLN8237 abgeschlossen. Etwa 20 % der Patienten sprechen auf die Therapie an. Interessanterweise ist die Prozentzahl mit der Prozentzahl der *MYCN*-deregulierten Tumore identisch. Ob eine Korrelation zwischen Therapieerfolg und *MYCN*-Amplifikation besteht, ist nicht geklärt (Melichar et al., 2015). Getestet wurden auch Patienten mit Mammakarzinom, Nicht Kleinzelligem Lungenkarzinom, Speiseröhrenkrebs und Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches. Insbesondere die Mammakarzinompatienten sprechen auf die Therapie an. Wie bereits beschrieben wurde, ist *MYCN* in manchen Subtypen des Mamakarzinoms überexprimiert (Tabelle 3.1). Ob wiederum ein Zusammenhang zwischen *MYCN*-Überexpression und Therapieerfolg besteht, ist nicht geklärt (Melichar et al., 2015)

Die Behandlung in allen fünf Studien führt zu einer Reihe von Nebenwirkungen die insbesondere das hämatopoetische System betreffen. Patienten leiden unter anderem an Neutropenie (über 40%), Leukopenie (über 20%) und Anämie (10%). Insgesamt sind über 40% der Patienten von schwerwiegenden Nebenwirkungen betroffen (Melichar et al., 2015). Trotz der schwerwiegenden Nebenwirkungen überwiegt der therapeutische Nutzen einer Behandlung mit MLN8237.

5.4.6 Therapiestrategien gegen *MYCN*-amplifizierte Tumoren

Zusammenfassend belegen die Mausdaten und die klinischen Studien, dass insbesondere der Inhibitor MLN8237 ein hohes therapeutisches Potential besitzt und möglicherweise im *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom einen therapeutischen Nutzen hat (Brockmann et al., 2013). Die MLN8234-Behandlung führt zu einer Reduktion der N-Myc Leveln und kann die Lebenserwartung der transgenen TH-*MYCN*-Maus signifikant steigern. Allerdings zeigen die Mausdaten auch, dass es trotz einer durchgehenden Behandlung mit dem Inhibitor MLN8237 es schließlich zu einem Rückfall des Tumors kommt.

Das Wiederauftreten des Tumors legt den Schluss nahe, dass die Behandlung mit dem Inhibitor nicht effizient genug ist. Eine Weiterentwicklung der Aurora-A-Inhibitoren, die stärker den Aurora-A/N-Myc-Komplex dissoziiert, wurde vor kurzem publiziert (Gustafson et al., 2014). Dieses Molekül induziert eine stärkere Konformationsänderung und reduziert ebenfalls die N-Myc-Proteinlevel. In einem Mausmodell für das Medulloblastom konnte das therapeutische Potential dieses Aurora-A-Inhibitors zwar bestätigt werden, allerdings konnte keine komplette Tumorregression, wie es im Großteil der MLN8237-behandelten Mäuse der Fall ist, detektiert werden. Die Lebenserwartung

konnte ebenfalls nur minimal gesteigert werden (Brockmann et al., 2013; Gustafson et al., 2014). Eine mögliche Ursache könnte eine unzureichende Bioverfügbarkeit des Inhibitors sein.

Eine weitere Möglichkeit die Rezidivwahrscheinlichkeit zu verringern und mögliche Resistenzen zu erschweren, ist die Kombination mit anderen Chemotherapeutika. Im Nachfolgenden sollen kurz einige Therapiestrategien bzw. Therapeutika vorgestellt werden, die in Kombination mit MLN8237 verwendet werden könnten:

PI3K-Inhibitoren

Neben der Inhibition von Aurora-A kann das N-Myc-Proteinlevel ebenso durch PI3K-Inhibitoren (wie z.B. LY294002) reduziert werden (Chesler et al., 2006; Sears et al., 2000). Die Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges führt zur Aktivierung von GSK3 β und damit zum proteasomalen Abbau von N-Myc. In der Zellkultur hatte die Kombination aus PI3K-Inhibitor (LY294002) und den speziellen Millennium-Inhibitoren einen additiven Effekt auf die N-Myc-Destabilisierung (Abbildung 4.14 B).

MDM2-Inhibition durch Nutlin-3

Die Inhibition von MDM2 durch Nutlin hat zwei wesentliche Effekte. Zum einen wird p53 stabilisiert und dadurch verstärkt Apoptose in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinien induziert (Gamble et al., 2012). Zum anderen wirkt MDM2 auf die Stabilität der *MYCN*-mRNA. Eine MDM2-Inhibition führt damit gleichzeitig zu einer Reduktion der *MYCN*-Expressionslevel (Gu et al., 2012).

Topoisomerase-Inhibition

In einem chemischen *Screen* zur Identifizierung neuer Therapeutika gegen *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome konnten die Topoisomerase-Inhibitoren Camptothecin und Topotecan ermittelt werden. Es zeigte sich, dass insbesondere die *MYCN*-amplifizierten Zellen sensitiv auf die Hemmung der Topoisomerase I reagierten (Sottile et al., 2012). Des Weiteren wurde vor kurzem eine klinische Studie mit Neuroblastompatienten, die einen rezidiven und/oder resistenten Tumor hatten, erfolgreich abgeschlossen. In dieser Studie (Phase II) wurden die Patienten mit einer Kombination des Topoisomerase-Inhibitors Irinotecan und des Zytostatikums Temozolomid behandelt. 15-19% der Patienten sprachen auf die Therapie an. Die Kombination der beiden Therapeutika war zudem gut verträglich (Bagatell et al., 2011).

Myc/Max-Interaktion

Das Molekül 10058-F4 inhibiert die c-Myc/Max-Heterodimerisierung, die für die transkriptionelle Aktivierung verantwortlich ist. Die N-Myc/Max-Interaktion konnte ebenfalls blockiert werden und führte zu einer Repression von N-Myc-Zielgenen im Neuroblastom (Huang et al., 2006; Zirath et al., 2013).

BET Bromodomäne-Inhibitor JQ1

Der niedermolekulare Inhibitor JQ1 bindet kompetitiv an acetylierte Lysin-Bindemotive und verhindert dadurch die Interaktion des BET-Bromodomän-Proteins BRD4 mit dem Chromatin. Die Myc-Transkription wird runterreguliert. Dies hatte sowohl für c-Myc getriebene Tumore als auch für *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome eine therapeutische Relevanz (Delmore et al., 2011; Puissant et al., 2013).

HDAC-Inhibitoren

Analog zu c-Myc (Kurland and Tansey, 2008) ist N-Myc auch in der Lage, HDACs zu rekrutieren und dadurch Tumorsuppressorgene zu reprimieren. Die Verwendung von HDAC-Inhibitoren im transgenen TH-*MYCN* Mausmodell reduzierte die Tumorgenese (Marshall et al., 2011). Interessanterweise ist auch Aurora-A in der Lage, HDACs zu aktivieren (Pugacheva et al., 2007). Möglicherweise ist Aurora-A an der transkriptionellen Regulation durch Myc beteiligt. Neben der onkogenen Funktion der N-Myc-Stabilisierung könnte dies auf die physiologische Relevanz der Aurora-A/N-Myc-Interaktion hindeuten.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass eine Aurora-A-Inhibition durch die Moleküle MLN8054 und MLN8237 eine neue Therapiestrategie gegen *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome ist. Die beiden niedermolekularen Inhibitoren binden hochaffin an Aurora-A, induzieren eine Konformationsänderung in der Kinasedomäne und verhindern so die Aurora-A/N-Myc-Interaktion. Die direkte Bindung der beiden Proteine ist entscheidend für die Aurora-A-abhängige N-Myc-Stabilisierung. Eine Dissoziation des Komplex führt zur Fbxw7-vermittelten Degradation von N-Myc und zu einem Zellzyklusarrest. Durch Verwendung des transgenen TH-*MYCN*-Mausmodells konnte das therapeutische Potential abgeschätzt werden. Die Behandlung mit den Inhibitoren reduziert die N-Myc-Proteinlevel, die transkriptionelle Aktivierung von N-Myc-Zielgenen und das Tumolvolumen. Die Lebenserwartung steigt nach einer MLN-Therapie signifikant an. Die Tatsache, dass sowohl Neuroblastomzellen als auch neuroendokrine Prostatakarzinomzellen sensitiv gegenüber einer Aurora-A-Inhibition sind, macht die Hemmung der Aurora-A-Kinase zu einem attraktiven Angriffspunkt für eine generelle Behandlung von *MYCN*-amplifizierten Tumoren (Beltran et al., 2011; Maris et al., 2010). Die Kombination mit weiteren Inhibitoren und Therapeutika könnte die Rezidivwahrscheinlichkeit des Tumors verhindern und die Resistenzbildung erschweren (Abbildung 5.5).

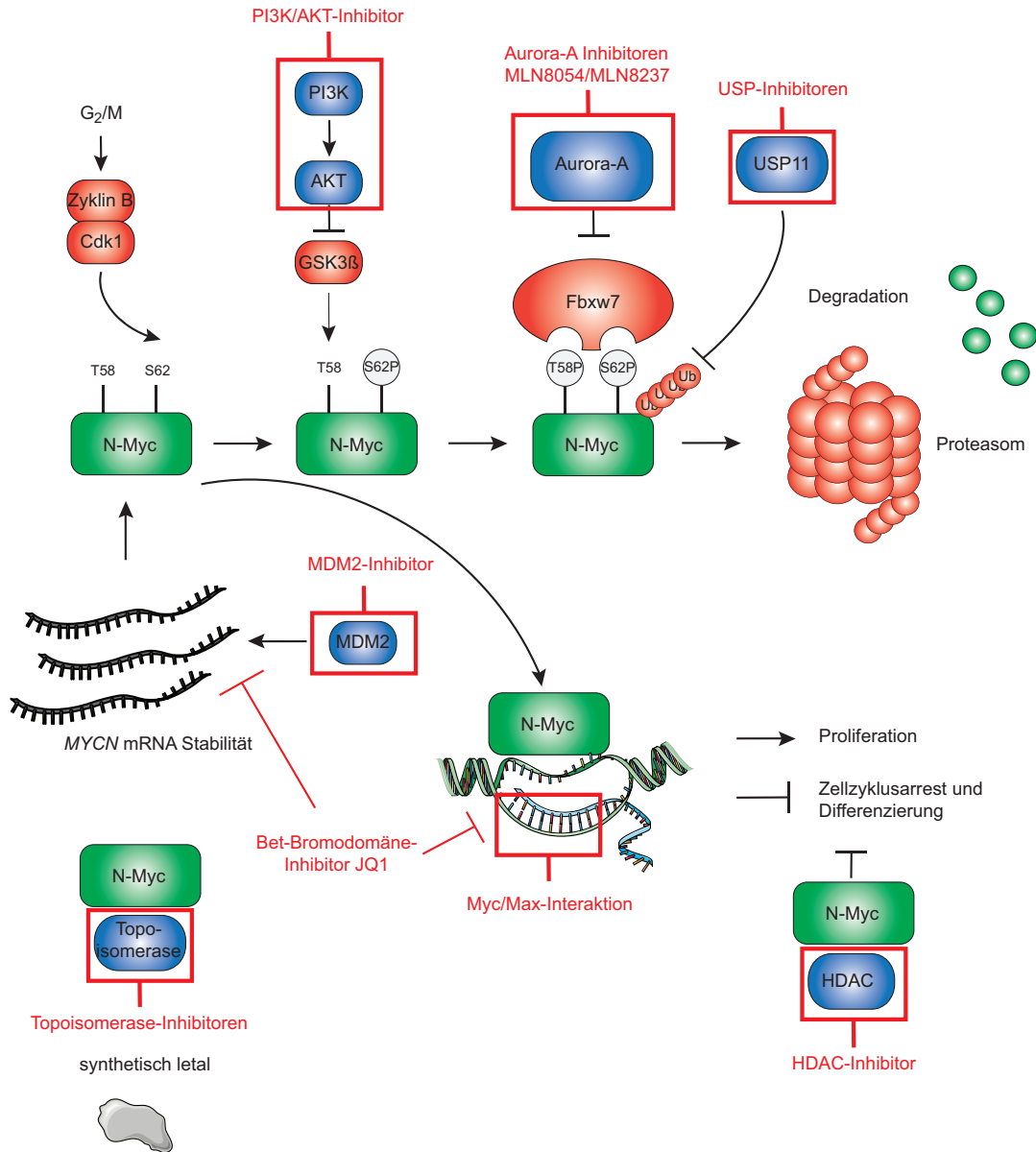


Abbildung 5.5: Therapiestrategien gegen das MYCN-amplifizierte Neuroblastom

Die Kombination von mehreren Therapeutika könnte die Rezidivwahrscheinlichkeit und die Resistenz gegenüber den Pharmazeutika verringern (Modifiziert nach (Huang and Weiss, 2013)).

6 Methoden

6.1 Zellbiologische Methoden

6.1.1 Kultivierung und Passagierung von humanen Zelllinien

Die Kultivierung von humanen Zelllinien erfolgte in sterilen Zellkulturschalen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Als Nährmedium diente RPMI- oder DMEM-Medium, dem 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % fötales Kälberserum (FCS) hinzugefügt wurden. Alle 2 Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

Zur Vermeidung einer Kontaktinhibition wurden die adhärent wachsenden Zellkulturen nach Erreichen einer 80–90 %igen Konfluenz passagiert. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand (ZKÜ) abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Durch Zugabe einer Trypsinlösung und anschließender Inkubation bei RT lösten sich die Zellen von der Kulturoberfläche ab. Zur Inhibierung der Trypsinaktivität wurde nach vollständiger Ablösung der Zellen FCS-haltiges Zellkulturmedium hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen in der gewünschten Zelldichte auf neue Zellkulturflaschen überführt. Für die Berechnung der Zellzahl diente zum einen die Zellzählmaschine *CasyTon*, die nach Angaben des Herstellers eingesetzt wurde, und zum anderen die Neubauerzählkammer. Folgende Gleichung wurde zur Ermittlung der Zellzahl bei der Neubauerzählkammer verwendet:

$$c = \frac{n \cdot F}{N \cdot V} \quad (1)$$

c = Zellkonzentration [Zellen/mL]

n = Anzahl der gezählten Zellen

N = Anzahl der gezählten Eckquadrate

V = Volumen über einem Eckquadrat [10^{-4} mL]

F = Verdünnungsfaktor

6.1.2 Einfrieren und Revitalisierung humaner Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Zellen wurden diese im flüssigen Stickstoff gelagert. Hierzu wurden die Zellen trypsinisiert (siehe 6.1.1), in Einfriermedium resuspendiert und anschließend in Kryogefäße aliquotiert. Die Zellen wurden bei -80 °C in Zellboxen (*Mr. Frosty*) gelagert. Nach 1–2 Tagen wurden die Kryogefäße in flüssigem Stickstoff überführt.

Zur Revitalisierung von kryokonservierten Zellkulturen wurden die Zellen möglichst rasch in einem bei 37 °C vortemperierten Wasserbad aufgetaut, in warmen Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturschale ausgesät. Nach 24 h wurde das Zellmedium gewechselt. Vor Verwendung der Zellen für etwaige Experimente wurden diese mindestens zweimal passagiert.

6.1.3 Kultivierung von neuronalen Progenitorzellen als Sphären

Die Kultivierung von neuronalen Progenitorzellen in dreidimensionalen Sphären fand in speziellem Sphärenmedium (7.2.2) statt. Damit die Zellen in nicht-adhärenente, kugelförmige Kolonien wuchsen, wurden Greiner Platten mit geringer Adsorbtionseffizienz verwendet. Nachdem die Sphären einen bestimmten Durchmesser (≈ 1 mm) überschritten, wurden die Zellen mechanisch und mit Hilfe von Trypsin vereinzelt und neu ausplattiert.

6.1.4 Transfektion von humanen Zelllinien

Die Transfektion von Zellen diente zum einen zur Expression von exogenen Genen und zum anderen zur Herstellung von infektiösen Viruspartikeln. Je nach Zelltyp und Experiment wurden die Zelllinien auf folgende Weise transfiziert:

1. Kalziumphosphat-Transfektion
2. PEI-Transfektion
3. Lipid-basierte Transfektion

Zwei bis drei Tage nach der transienten Transfektion wurden die Zellen geerntet und für weitere Experimente (FACS, WB, qRT-PCR oder virale Infektionen) verwendet.

6.1.4.1 Kalziumphosphat-Transfektion

Bei der Kalziumphosphatmethode wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion mit der gewünschten Zellzahl ausplattiert (SH-EP: 300.000 Zellen bzw. PHX/HEK-293T: 4.000.000 Zellen; jeweils auf 10 cm-Schalen). 1 h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit DMEM-Vollmedium überschichtet. Im Anschluss wurden

folgende zwei Lösungen zusammenpipetiert:

Lösung 1:	500 µl HBS (2x)
Lösung 2:	0,25 M CaCl (50 µl einer 2,5 M Stocklösung) 10 – 50 µg Plasmid-DNA ad 500 µl aqua bidest

Zur Ausbildung von DNA-Kalziumphosphatkomplexen wurde Lösung B langsam in Lösung A unter ständigem Vortexen zugetropft. Das Transfektionsgemisch wurde anschließend auf die Zellen gegeben und nach 14 – 24 h das Medium gewechselt (SH-EP: RPMI-Vollmedium bzw. PHX/HEK-293T: DMEM-Vollmedium). Vor Ernte der Zellen wurde die Transfektionseffizienz mittels des eGFP-Reporters ermittelt.

6.1.4.2 PEI-Transfektion

Bei der Polyethylenimine (PEI)-Methode wurden die Zellen ebenfalls 24 h vor der Transfektion mit der gewünschten Zellzahl ausplatiert (SH-EP: 400.000 Zellen bzw. PHX/HEK-293T: 5.000.000 Zellen; jeweils auf 10 cm-Schalen). Kurz vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit DMEM-Medium ohne Antibiotika überschichtet. Ähnlich zur Transfektion mit Hilfe der Kalziumphosphatmethode wurden auch bei dieser Methode zwei Lösungen zusammenpipetiert.

Lösung 1:	500 µl Opti-Mem 20 – 40 µl PEI
Lösung 2:	500 µl Opti-Mem 10 – 20 µg Plasmid-DNA

Beide Lösungen wurden bei RT für 5 min inkubiert und anschließend vereinigt. Das PEI-DNA-Gemisch wurde wiederum 20 min bei RT inkubiert und tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde nach 4 – 6 h gewechselt (Vollmedium). Vor Ernte der Zellen wurde wiederum die Transfektionseffizienz mittels des eGFP-Reporters ermittelt.

6.1.4.3 Lipid-basierte Transfektion

Zur Transfektion von doppelsträngiger siRNA (Dharmacon; siehe 7.3.2) wurde das Transfektionsreagenz Lipofektamin™ RNAiMAX (Life Technologies) verwendet. Hierzu wurden die Zellen 24 h vorher ausplatiert und während der Transfektion mit Antibiotika-freiem Medium (6 ml) kultiviert. Ähnlich zur PEI-Transfektion wurden zwei Lösungen angesetzt.

Lösung 1:	1000 µl Opti-Mem 20 µl Lipofektamin™ RNAiMAX
Lösung 2:	1000 µl Opti-Mem 10 µl siRNA (20 µM Stocklösung; Endkonzentration: 25 nM)

Beide Lösungen wurden erneut bei RT für 5 min inkubiert und anschließend vereinigt. Das Lipid-siRNA-Transfektionsgemisch wurde wiederum 20 min bei RT inkubiert und tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde nach 24 h gewechselt (Vollmedium) und die Zellen wurden 48 – 72 h nach der Transfektion zur weiteren Untersuchung geerntet.

6.1.5 Retrovirale und lentivirale Infektion von humanen Zelllinien

6.1.5.1 Retrovirale Infektion

Zur stabilen Expression von Genen bzw. shRNAs wurden die humanen Zellen mit dem *Moloney Murine Leukaemia Virus* (Mo-MuLV) infiziert. Um die stabile Infektion der Zellen zu ermöglichen, wurden diese zuvor mit dem murinen ekotrophen Rezeptor transfiziert (siehe 6.1.3) und anschließend je nach Resistenzgen mit dem jeweiligen Antibiotikum selektioniert.

Zur Herstellung der rekombinanten Virenpartikel wurde die Verpackungszelllinie Phoenix-Eco (PHX) mit dem jeweiligem Plasmid (pBabe, pWZL oder pRETRO.SUPER) transfiziert (siehe 6.2.3.1 und 6.2.3.2). Diese exprimiert neben den viralen Genen gag, env und pol auch das *SV40 large T-Antigen*, was es der Zelle ermöglicht episomale Plasmide mit dem *SV40 origin of replication* zu replizieren. Nach erfolgreicher Transfektion produzieren die PHX-Zellen infektiöse Virenpartikel und sezernieren diesen in den Zellkulturüberstand. Dieser ZKÜ wurde nach 48 h in einem Zentrifügeröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, RT, 400 g). Zur Vermeidung von der weiteren Kultivierung abgelöster PHX-Zellen wurde der ZKÜ filtriert (Satorius Porengröße: 0,45 µm), anschließend in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Infektion von Zellen mit dem murinen, ekotrophen Rezeptor wurden diese 24 h zuvor auf 10 cm Schalen ausplattiert. Ein Infektionsgemisch aus 3 ml des aufgetauten Virusüberstandes, 2 ml Vollmedium und 5 µl Polybrene (Sigma, Hexadimethrinbromid 4 µg/µl) wurde auf die Zellen gegeben. Nach 16 h wurde dem Gemisch noch 5 ml Vollmedium hinzugefügt. Nach 2 Tagen wurde die Selektion gestartet um nicht infizierte Zellen abzutöten. Als Kontrolle zur Infektionsrate und zur vollständigen Selektion diente eine mit eGFP-infizierte Kontrollplatte, die keinen zusätzlichen Selektionsmarker aufwies.

6.1.5.2 Lentivirale Infektion

Bei der lentiviralen Infektion können humane, sich nicht teilende Zellen effektiv infiziert werden. Die lentivirale Infektion wird ähnlich durchgeführt, wie die retrovirale Infektion

(6.1.5.1); findet jedoch aufgrund des hohen Risikos unter höheren Sicherheitsvorkehrungen (S2) statt. Zur Herstellung von infektiösen Viruspartikeln wurden HEK-293T-Zellen mit folgenden Vektoren (2. Generation) transfiziert:

DNA-Plasmide: 10 µg psPAX2 (Verpackungsplasmid)
 2,5 µg pMD2.G (*Envelope*-Plasmid)
 10 µg pRRL (IRES-eGFP, IRES-Tomato, IRES-puro)

Der Zellkulturüberstand wurde in Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert, filtriert und anschließend in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden Schock gefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert. Humane Neuroblastomzellen wurden 24 h vor Infektion ausplattiert und mit einem Infektionsgemisch aus 2 ml des aufgetauten Virusüberstandes, 3 ml Vollmedium und 5 µl Polybrene (Sigma, Hexadimethrinbromid 4 µg/µl) infiziert. Als Selektions- und Effizienzkontrolle diente wiederum eine eGFP-infizierte Zellkulturplatte.

6.1.6 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie

Anhand des DNA-Gehalts der Zellen lässt sich die Zellzyklusphase der jeweiligen Zelle ermitteln. Unter Verwendung des Farbstoffes Propidiumiodid, der in die DNA-Doppelhelix von porösen Zellen interkaliert, kann anhand der Intensität des Farbsignals der DNA-Gehalt (N) berechnet werden. Dabei unterscheidet man 5 Phasen:

1. Phase: *Sub-G*₁ (apoptotische bzw. nekrotische Zellen mit einem DNA-Gehalt von < 2N)
2. Phase: *G*₁/*G*₀ (Zellen in der *Gap*-Phase mit einem DNA-Gehalt von 2N)
3. Phase: S (Zellen in der Replikationsphase mit einem DNA-Gehalt von < 2N < 4N)
4. Phase: *G*₂/*M* (Zellen in der Postsynthese- oder der Mitose-Phase mit einem DNA-Gehalt von 4N)
5. Phase: polypleide Zellen mit einem DNA-Gehalt von < 4N

Die zu untersuchenden Zellen wurden abtrypsiniert und mit Hilfe des ZKÜ die Trypsinaktivität inhibiert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (5 min, RT, 400 g), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml kaltem PBS resuspendiert und unter ständigem Vortexen in kaltes Ethanol (4 ml; 100 %) zugetropft. Zur vollständigen Fixierung der Zellen wurde das Gemisch mindestens über Nacht bei -20 °C gelagert.

Zur FACS-Messung wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 400 g), mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Nach Ermittlung der Zellkonzentration (siehe 6.2.1) wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in PI-FACS-Puffer überführt und für 30 min bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Der DNA-Gehalt der angefärbten Zellen konnte mit Hilfe des FACSCanto II (BD) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argonlaser) und einem Bandpassfilter (585 ± 21 nm) gemessen werden (Propidiumiodid: Excitation =

536; Emission 617). Zur Auswertung der Zellzyklusverteilung diente das Programm BD FACS Diva 6.1.2.

6.1.7 Intrazelluläre Durchflusszytometrie

Zur quantitativen Analyse von intrazellulären Proteinen kann die Durchflusszytometrie genutzt werden. Bei dieser Methode können intrazelluläre Proteine spezifisch mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert und die Anzahl an positiven Zellen quantitativ ermittelt werden.

Zur quantitativen Bestimmung an Lysin 9 trimethylierten Histon 3 wurden behandelte Zellen, sowie Kontrollzellen abtrypsiniert und gezählt. Anschließend wurden 1 Million Zellen mit Hilfe des Puffers *BD Cytifix/CytopermTM* nach Angaben des Herstellers fixiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit *BD Perm/Wash* Puffer gewaschen und mit dem Primärantikörper (anti-Histon H3K9^{me}, abcam) für eine 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper (Alexa-488, Life Technologies) wiederum für 1 h bei 4 °C im Dunkeln behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal gewaschen und direkt für das FACS eingesetzt.

6.1.7 Kristallviolett-Färbung

Kristallviolett-Färbungen dienen zur ersten Beurteilung der Wachstumsraten von Zellen. Hierzu wurden die Zellen (entweder stabil infizierte oder mit Inhibitoren behandelte Zellen) in der gleichen Konzentration zur Kontrolle ausplattiert. Nach 4 – 5 Tagen wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Nach Trocknung der Zellen wurden diese für 10 min mit 70 % Ethanol fixiert. Die anschließend wiederum getrockneten Zellen wurden mit der Kristallviolettlösung für 30 min überschichtet. Im Anschluss wurden die Platten im Wasserbad gewaschen und getrocknet. Die Dichte an blaugefärbten Zellen war ein direktes Indiz auf die Proliferationsrate.

6.1.8 Wachstumskurve

Zur genaueren Quantifizierung der Wachstumsrate wurden Wachstumskurven durchgeführt. Dazu wurden wiederum die Zellen in der gleichen Dichte ausplattiert. Nach jedem Tag wurden die Zellen von drei Platten je Bedingung abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt (siehe 6.1.1). Die restlichen Zellen wurden zur PI-FACS-Messung (6.1.6) verwendet. Anhand beider Daten ließ sich die Länge der einzelnen Zellzyklusphasen ermitteln.

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

Chemisch kompetente (für Maxipräparation) DH5 α - oder ultra-chemisch-kompetente XL1 *blue* - *Escherichia coli* - Zellen (für Ligation von Plasmid DNA) wurden auf Eis aufgetaut. Zu dieser Zellsuspension wurden 100 ng Plasmid-DNA bzw. der Ligationsansatz hinzugefügt und die Lösung vorsichtig geschüttelt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein 90 sekündiger Hitzeschock bei 42 °C. Das Reaktionsgemisch wurde zur Abkühlung für 2 min auf Eis inkubiert, mit 800 μ l LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (1 min; 2000 x g), das Medium abgesaugt und das Zellpellet in 50 μ l resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf LB-Agar-Platten mit der jeweiligen Antibiotikerresistenz ausgestrichen. Nach Trocknung der Agar-Platten wurden diese über Kopf und über Nacht bei 37 °C gelagert.

6.2.2 Plasmid-DNA-Isolierung aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im großem Maßstab wurde eine 200 ml Übernachtskultur entsprechend den Angaben des Herstellers (*JETSTAR 2.0 Plasmid Purification Maxi Kit*, Genomed) verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde in destilliertem Wasser gelöst und eine DNA-Konzentration von 1 μ g/ μ l eingestellt. Zur längeren Lagerung wurde das Plasmid bei -20 °C eingefroren.

Für die Isolierung und Aufreinigung kleinerer Mengen wurden 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt und kurz abzentrifugiert (1 min; 2000 x g). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 100 μ l STET-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 1 min bei 95 °C erhitzt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde entfernt und die DNA mit Hilfe von Isopropanol bei -20 °C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min; 18000 x g; 4 °C) wurde das DNA Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 50 μ l Wasser gelöst.

6.2.3 Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration

Die Ermittlung der DNA- bzw. RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des *NanoDrop 1000* (PeqLab). Zur Reinheitsbestimmung wurde das Verhältnis der Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) zur Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) berechnet. Es wurde darauf geachtet, dass der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 lag.

6.2.4 Restriktionsanalyse von DNA

Zur sequenzspezifischen Hydrolyse von DNA wurden Restriktionsendonukleasen (Fermentas) nach Angaben des Hersteller verwendet. Dazu wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert und bei 37 °C für 1 h inkubiert:

PCR-Ansatz	1 µg DNA
	5 U Restriktionsendonuklease 1
	5 U Restriktionsendonuklease 2 (gegebenenfalls)
	1,5 µl 10x Reaktionspuffer
	1 µl RNase A (10 mg/ml)
	ad 15 µl dest. Wasser

Bei Herstellung größerer Mengen an fragmentierter DNA, die zur Klonierung diente, wurde ein größerer Ansatz gewählt.

6.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und Analyse der Fragmentgröße wurde 1-2 % Agarose (w/v) in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, Ethidiumbromid (0,3 µg/ml) zugesetzt und in einem Gelträger mit eingesetztem Probenkamm blasenfrei gegossen. Nach dem Auspolymerisieren der Gelmatrix wurde die Gelkammer in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt, vollständig mit TAE-Puffer überschichtet und der Probenkamm herausgezogen. Die aufzutragenden Proben wurden zunächst mit 20 % des DNA Ladepuffer (6x) versehen, bevor sie in die Geltaschen pipettiert wurden. Die Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von 16 V/cm². Zur Bestimmung von DNA-Fragmenten wurde bei der Agarose-Gelelektrophorese ein DNA-Längenstandard zusätzlich zur Probe aufgetragen.

6.2.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde das gewünschte DNA-Fragment mit der richtigen Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Extraktion erfolgte mit Hilfe des Gelextraktionskits (Qiagen).

6.2.7 Hybridisierung von DNA-Oligonukleotide

Zur Herstellung von sh-RNA-Vektoren wurden das Programm *siDesign* auf der Dharmacon *Homepage* (<http://www.dharmacon.com>), sowie das Programm *sFold* (<http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl>) verwendet. Für die spätere Ligation mussten zunächst die komplementären Einzelstrangnukleotide hybridisiert werden. Hierzu

wurde folgender Ansatz gewählt:

150 pmol Oligonukleotid 1
150 pmol Oligonukleotid 1
25 µl Hybridisierungspuffer
ad. 50 µl dest. Wasser

6.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung eines linearisiertem Plasmids mit doppelsträngigen DNA-Fragmenten erfolgte nach folgendem Ansatz:

100 ng linearisiertes Plasmid
x ng DNA – Fragment
1 µl T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)
1 µl T4 DNA-Ligasepuffer 10x (New England Biolabs)
ad 10 µl dest. Wasser

Im Fall von hybridisierten Oligonukleotiden wurde ein 240-facher, im Fall von größeren DNA-Fragmenten wurde ein dreifacher molarer Überschuss im Vergleich zum linearisiertem Plasmid gewählt. Der Ligationsansatz wurde bei RT für 1 h oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

6.2.9 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA von adhärent wachsenden Zellen erfolgte mit Hilfe der TriFast™-Reagenz (peqLab). Hierzu wurde zunächst das Zellmedium abgesaugt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und von der Zellkulturplatte mit 1 ml kaltem PBS abgeschabt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml TriFast™ resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurde zur Zellsuspension 200 µl Chloroform zugefügt und anschließend gründlich gemischt. Das Gemisch wurde 3 min bei RT inkubiert und danach zentrifugiert (10 min, 18000 x g). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol und 20 µg Glykogen überführt und 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 18000 x g, 4 °C) wurde das Pellet zweimal mit 75 %igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Nachdem sich der Ethanol vollständig verflüchtigt hatte wurde das Pellet in 20 µl Braun Wasser gelöst und die RNA-Konzentration bestimmt (siehe 6.2.3). Entweder wurde die RNA direkt zur cDNA-Synthese (siehe 6.2.10) oder zur Aufbewahrung bei -80°C gelagert.

6.2.10 cDNA-Synthese

Zur Generierung von komplementärer DNA aus Gesamt-RNA wurde 2 µg RNA durch eine reverse Transkription mit Hilfe von *Randomprimern* umgeschrieben. Hierzu wurde zunächst die Gesamt-RNA für 5 min auf 65 °C erhitzt, um mögliche Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde die RNA auf 4 °C abgekühlt und mit folgendem Ansatz vermischt:

10 µl *First Strand Buffer 5x* (Invitrogen)
5 µl DTT (0,1 M)
5 µl dNTPs (2,5 mM)
2 µl *Randomprimer*
0,2 µl RNAsin
1 µl M-MLV reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen)
ad 40 µl Braun Wasser

Nach einer 10 minütigen Inkubation bei RT wurde das Gemisch auf 37 °C erwärmt. Nach 1 h wurde die reverse Transkriptase durch Erhitzung auf 70 °C für 15 min denaturiert. Die cDNA-Lösung wurde anschließend 1:10 mit Braun Wasser verdünnt und entweder direkt für die Realtime-PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

6.2.11 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von doppelsträngiger DNA wurde die Methode der Polymerase Kettenreaktion durchgeführt. Je nach Anwendung wurde die Methode modifiziert. Die einzelnen PCR-Varianten sind im nachfolgenden beschrieben.

6.2.11.1 *Realtime-PCR (RT-PCR)*

Bei der *Realtime-PCR* finden Amplifikation und Detektion eines PCR-Produktes parallel statt (Echtzeit-Detektion). Demgegenüber steht die Endpunktbestimmung, in der oft kein Zusammenhang mehr mit der initialen Menge des Ausgangsmaterials (*Template*) und der Menge des Amplikons am Ende der Reaktion besteht. Die Echtzeit-Detektion erfolgte mit Hilfe des Cyaninfluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green*, der sich durch eine hohe Spezifität für doppelsträngige DNA auszeichnet. Durch Bindung von *SYBR-Green* an dsDNA kann dieser Farbstoff bei 480 nm angeregt werden, der dann wiederum bei 520 nm emittiert. Die Intensität ist proportional zur Menge des gebildeten amplifizierten doppelsträngigen Produktes. Die Auswertung der RT-PCR erfolgte über den C_t -Wert (*threshold cycle*). Der C_t -Wert drückt die Zyklenanzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Hintergrundsignal (*threshold*) ermittelt wird. Je mehr Ausgangsmaterial zu Beginn der Reaktion vorhanden ist, desto geringer ist die Anzahl an

Zyklen, die erforderlich sind, um den Punkt zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal übersteigt.

Bei der relativen Quantifizierung der mRNA-Expression wird die Expression eines Zielgens mit der eines Referenzgens verglichen. Als Referenzgene eignen sich insbesondere Gene, die trotz variablen exogenen Einflüssen auf eine Zelle ein konstantes mRNA-Expressionsniveau aufweisen und zudem ubiquitär exprimiert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Gene *RPS14* und *B2M* (humane RT-PCR), sowie die murinen Gene *Rps16* und *Actin* verwendet, wobei die Effizienz der *Primer* aller Gene (sowohl Ziel- als auch Referenzgene) bei 2 lag. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und die Standardabweichung nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz bestimmt.

RT-PCR-Ansatz: 5 µl SYBR-Green Mix (Thermo Scientific)
 10 µl cDNA (siehe 6.2.10)
 0,2 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
 0,2 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
 ad 20 µl Braun Wasser

Temperaturprofil: 1 Zyklus: 15 min bei 95 °C
 38 Zyklen: 30 sec bei 95 °C
 20 sec bei 60 °C
 15 sec bei 72 °C
 1 Zyklus: 1 min bei 95 °C
 Schmelzkurve: 15 min von 60 °C bis auf 95 °C

6.2.11.2 Zielgerichtete Mutagenese-PCR

Zur zielgerichteten Mutagenese einer Ziel-DNA wurden *Primer* ausgewählt, die eine leichte Abweichung in ihrer Sequenz im Vergleich zur Wildtyp-DNA aufwiesen (bis zu 3 Basen waren ausgetauscht, fehlten oder wurden zugefügt in der Mitte der *Primersequenz*). Durch eine PCR-Reaktion mit diesen *Primern* konnte eine Mutagenese in die Ausgangs-DNA induziert werden und somit die Aminosäuresequenz des kodierenden Proteins verändert werden. Nach der PCR-Reaktion konnte das mutierte Amplikon in Bakterienzellen transformiert werden und eine Plasmidpräparation durchgeführt werden. Zuvor musste allerdings die Ausgangs-DNA entfernt werden. Hierzu wurde der PCR-Ansatz mit dem Restriktionsenzym Dpn1 für 1 h bei 37 °C inkubiert, so dass das methylierte Ausgangsplasmid hydrolysiert wurde. Nicht methylierte DNA, wie die PCR-generierte mutierte DNA wurden nicht verdaut.

PCR-Ansatz:

- 5 µl Pfu Puffer 10x (Stratagene)
- 1 µl Turbo Pfu Polymerase (Stratagene)
- 50 ng Ausgangsplasmid
- 1 µl *Primer 1* (mit Mutation; 10 pmol)
- 1 µl *Primer 2* (mit Mutation; 10 pmol)
- 1-5 µl DMSO
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- ad 50 µl Braun Wasser

Temperaturprofil:

- 1 Zyklus: 5 min bei 95 °C
- 18 Zyklen: 30 sec bei 95 °C
- 30 sec bei 60 °C
- 30 sec pro kb bei 72 °C
- 1 Zyklus: 15 min bei 95 °C

6.2.11.3 Generierung von Expressionsvektoren mittels PCR

Zur Generierung von Expressionsvektoren wurde die Ziel-DNA (das zu exprimierende Gen) aus einem bereits vorhanden Plasmid amplifiziert. Die *Primer* wurden so synthetisiert, dass sie an den 3`und 5`-Enden neue Restriktionsschnittstellen aufwiesen, die kompatibel mit dem neuen Vektor waren.

PCR-Ansatz:

- 5 µl Pfu Puffer 10x (Stratagene)
- 1 µl Turbo Pfu Polymerase (Stratagene)
- 50 ng Ausgangsplasmid
- 1 µl *Primer 1* (mit Mutation; 10 pmol)
- 1 µl *Primer 2* (mit Mutation; 10 pmol)
- 1-5 µl DMSO
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- ad 50 µl Braun Wasser

Temperaturprofil:

- 1 Zyklus: 5 min bei 95 °C
- 30 Zyklen: 30 sec bei 95 °C
- 30 sec bei 60 °C
- 30 sec pro kb bei 72 °C
- 1 Zyklus: 15 min bei 95 °C

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Proteinisolation wurde das Zellmedium abgesaugt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml kaltem PBS abgeschabt. Nach Zentrifugation (400 x g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen in NP40-Puffer (mit Proteasom- und Phosphataseinhibitoren) resuspendiert. Die Zellen wurden 5 mal in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und anschließend im Wasserbad aufgetaut. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Lysate zur Pelletierung des Debris zentrifugiert (18000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 6.3.2). Zur Lagerung wurde das Proteinlysate im flüssigen Stickstoff Schock gefroren und bei -80 °C gelagert.

6.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford angewendet (Bradford, *et al.*, 1976). Hierzu wurde eine Halbmikroküvette mit 400 µl dest. Wasser, 100 µl NaCl (150 mM) und 500 µl Bradfordlösung gefüllt und anschließend 1 µl der Probe hinzupepipettiert. Nach gründlicher Mischung und 5-minütiger Inkubation erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm. Als Leerwertkontrolle diente der gleiche Ansatz mit 1 µl des reinen Lysepuffers. Die ermittelten Werte wurden mit einer zuvor durchgeführten Eichgerade (mit bekannten BSA-Proteinkonzentrationen) verglichen und so die Proteinkonzentration berechnet.

6.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, das an hydrophobe Bereiche der Proteine bindet und deren Eigenladung maskiert. Des Weiteren denaturiert SDS die Proteine, insbesondere nach vorheriger Reduktion der Disulfidbindungen durch Mercapthoethanol und DTT, und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. In einem elektrischen Feld wandern die SDS-Protein-Komplexe aufgrund des Molekularsiebeffekts einer porösen Polyacrylamidmatrix nach ihrem Stokes-Radius und können somit nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden.

Für die SDS-PAGE wurden Acrylamidgele (7,5-12,5 %iges Trenngel mit 4 %igem Sammelgel) verwendet. Hierzu wurden 10 µg Proteinlysate mit 3xSDS Probenpuffer versetzt und auf das gleiche Volumen (20 µl) mit NP40 Puffer aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C aufgekocht, abzentrifugiert und in die Geltaschen des Acrylamidgels pipettiert. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte durch Vergleich

der Laufstrecke mit der bekannter Proteinstandards. Die Elektrophorese wurde in einer SDS-PAGE-Apparatur (Bio-Rad) mit SDS-Laufpuffer bei 80-120 V für etwa 2 h durchgeführt.

6.3.4 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine (siehe 6.3.3) können mittels Elektrotransfer auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Membran übertragen und für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert werden.

Vor dem Blot-Vorgang wurden die Blotting pads in Blotting Puffer getränkt und die PVDF-Membran kurz in Methanol inkubiert, mit Wasser abgespült und mehrere Minuten in Blotting Puffer äquilibriert. Die Whatman-Filterpapiere wurden ebenfalls vor dem Blotten in Blotting Puffer getränkt. Der Elektrotransfer wurde in einer Miniblot-Apparatur im Nassverfahren (Harnischmacher) durchgeführt, wobei das Gel/Membran-Sandwich wie folgt auf der Anode von unten nach oben gepackt wurde:

Kathode (-)
 Blotting pad
 drei Filterpapiere
 Elektrophoresegel
 eine PVDF-Membran
 drei Filterpapiere
 Blotting pad
 Anode (+)

Das Blotmodul wurde mit Blotting Puffer gefüllt, so dass das Gel/Membran-Sandwich bedeckt ist. Zur Kühlung wurde der Transfer bei 4 °C und 300 mA für 2,5 h durchgeführt.

Nach Immobilisierung der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die immunologische Detektion. Zunächst wurden freie Bindungsstellen auf der Membran durch kontinuierliches Schütteln bei RT in Block Lösung abgesättigt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (in Block-Lösung) inkubiert. Bei Phosphoantikörpern wurde dieser lediglich in TBST verdünnt. Die PVDF-Membran wurde am nächsten Morgen fünfmal für je 5 min mit TBST gewaschen. Die nachfolgende Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (1:10000 in Block-Lösung) wurde bei RT für 1,5 h durchgeführt. Nachdem die Membran fünfmal für je 5 min mit TBST gewaschen wurde, erfolgte die Detektion der markierten Proteine mittels der Chemilumineszenzlösung ECL + Western Blot System (Amersham) analog zu den Anweisungen des Herstellers. Zur Detektion der

Proteine wurden entweder Röntgenfilme exponiert oder die Chemilumineszenz mit Hilfe des LAS-4000 mini (*Fujifilm Global*) visualisiert. Zur Quantifizierung der Proteinbanden diente das Programm Multi Gauge (*Fujifilm Global*).

Zur Detektion mehrerer Proteine der gleichen Größe auf derselben Membran wurden nach der ersten Detektion die gebundenen Antikörper wieder von der PVDF-Membran entfernt. Hierzu wurde die Membran zunächst in Methanol äquilibriert und anschließend mit TBST dreimal für 5 min gewaschen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 60 °C im Wasserbad mit Stripping - Puffer wurde die Membran erneut dreimal mit TBST für 5 min gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran in Block-Lösung inkubiert und die Proteindetektion mit einem anderen Antikörper wiederholt.

6.3.5 Bestimmung der Proteinhalbwertszeit

Die Bestimmung der Proteinhalbwertszeit kann entweder mit Hilfe des Translationsinhibitors Cycloheximid oder durch eine temporäre, radioaktive Markierung der Proteine erfolgen.

6.3.5.1 Protein-Halbwertszeitbestimmung mittels Cycloheximid

Die Proteinneubildung wird durch den Translationsinhibitor Cycloheximid unterbunden und die Degradationskinetik kann dadurch verfolgt werden. Hierzu wurden die Zellen mit 100 µg/ml CHX behandelt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Die zu untersuchenden Proteine wurden mittels SDS-Page (6.3.3) und WB (6.3.4) analysiert.

6.3.5.2 Protein-Halbwertszeitbestimmung mittels radioaktiver Markierung

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Proteinhalbwertszeit ist die radioaktive Markierung der Proteine für eine bestimmte Zeit und die anschließende Ernte der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Hierzu wurden die Zellen in Methionin und Cystein-freiem Medium, dem 4 mM Glutamin, 1 % Pen/Strep und dialysiertes FBS zugesetzt wurde, für 1 h kultiviert. Dem Medium wurde anschließend radioaktives Methionin und Cystein (500 µCi; Hartmann Analytics) zugefügt und die Zellen für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen zweimal mit normalen Vollmedium gewaschen und die Zellen weiter mit normalen Vollmedium kultiviert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, in RIPA-Puffer (mit Protease- und Phosphataseinhibitoren) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Bestimmung der inkorporierten radioaktiven Aminosäuren wurde eine Trichloressigsäure (TCA)-Fällung durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 5 µl des Lysates auf ein Stück Whatman-Filterpapier aufgetragen und luftgetrocknet. Die Filterpapiere wurden jeweils für 2 min in folgenden Lösungen inkubiert:

1 x 10 % TCA (v/v)
2 x 5 % TCA (v/v)
1 x 100% Ethanol
2 x 70% Ethanol

Die Filterpapiere wurden erneut luftgetrocknet, in Szintillationsröhrchen überführt, mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) überschichtet und im Szintillationszähler (Beckmann Couter) die Radioaktivität quantifiziert. Zur weiteren Analyse wurden die Lysate auf die gleiche Menge an Radioaktivität angeglichen und einer Immunpräzipitation (siehe 6.3.7) unterzogen. Die Immunpräzipitationseluat wurden auf ein Acrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt (siehe 6.3.3). Das Gel wurde mit einem Essigsäure/Methanol/Wasser-Gemisch (1:5:4) fixiert, in Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Die radioaktiven präzipitierten Proteine wurden mit Hilfe eines Röntgenfilms für 2- 72 h expoziert.

6.3.6 *In vivo* Ubiquitinierungsanalyse

Zur Analyse der Proteinubiquitinierung *in vivo* wurde ektopisch exprimiertes His-markiertes Ubiquitin verwendet. Die transfizierten Zellen wurden zum Schutz vor der proteasomalen Degradation mit dem Proteasominhibitor MG132 (5 μ M) für 12 h behandelt, im Anschluss geerntet und in 1 ml Puffer A (Ubiquitinlyse - Puffer) resuspendiert. 5 % der Zellen wurden allerdings direkt in SDS-Probenpuffer als Inputkontrolle überführt und bei 95 °C aufgeköcht.

Die restlichen lysierten Zellen wurden zum besseren Aufschluss zusätzlich sonifiziert (4 x 5 sec mit 10 sec Pause bei 20 % Amplitude). Das Debris wurde pelletiert (10 min, 6000 x g, 4 °C) und der Überstand in ein neues reaktionsgefäß überführt. In Puffer A äquibitere Ni-NTA-Agarose (50 μ l) wurde zu den Lysaten zupipettiert und 4 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (2 min, 1000 x g, 4 °C) und dreimal mit 1 ml Puffer A, zweimal mit 1 ml Puffer A/Puffer B (1:4 Gemisch) und schließlich zweimal mit 1 ml Puffer B gewaschen. Die *Beads* wurden in SDS-Probenpuffer mit 200 mM Imidazol) resuspendiert, bei 95 °C für 5 min aufgeköcht und kurz abzentrifugiert (10 sec, 18000 x g). 50 % des SDS-Probenpuffers, sowie des Inputes auf ein Acrylamidgel aufgetragen und die ubiquitinierten Proteine mittels SDS-PAGE (6.3.3) und WB (6.3.4) analysiert.

6.3.7 Immunpräzipitation

Die Technik der Immunpräzipitation ermöglicht den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen aus komplexen Gemischen (z.B. Zelllysaten).

Hierzu wurden zunächst die Zellen geerntet und das Zellpellet in 1 ml TNN-Lysepuffer (mit Proteasom- und Phosphataseinhibitoren) resuspendiert. Zum Aufschluss der zellen wurden diese sonifiziert (4 x 5 sec mit 10 sec Pause bei 20 % Amplitude) und

anschließend auf Eis für 30 min inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 18000 x g, 4 °C) wurde der Überstand überführt und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Für die IP wurde pro Ansatz 250 - 2000 µg Protein verwendet und auf 1 ml mit TNN-Puffer verdünnt. Zu jeder IP-Probe wurde entweder 2 µg Antikörper oder 2 µg Kontrollanti-körper der gleichen Spezies hinzugefügt und über Nacht rotierend bei 4 °C inkubiert. Je nach Antikörperspezies wurde entweder Protein A- oder Protein G-Sepharose in TNN-Puffer äquilibriert und 50 µl dieser Lösung zu den IP-Proben hinzugefügt. Das Gemisch wurde für weitere 2 h rotierend bei 4 °C inkubiert und die Sepharose-*Beads* für 2 min bei 300 x g und 4 °C pelletiert. Anschließend wurde die Sepharose zweimal mit 1 ml TNN-Puffer, einmal mit 1 ml Hochsalz-TNN-Puffer (TNN-Puffer mit 200 mM NaCl), zweimal mit 1 mL TNN-Puffer und anschließend einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Die Sepharose wurde mit 75 µl SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95 °C aufgekocht und kurz abzentrifugiert. 25 µl der IP, sowie 10 µg Protein des Inputs wurden auf ein Acrylamidgel aufgetragen und die präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE (6.3.3) und WB (6.3.4) analysiert.

6.3.8 Chromatin-Immunpräzipitation

Zur Bestimmung der Bindung des N-Myc-Transkriptionsfaktors an Promotorsequenzen *in vivo* wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation in Tumorproben durchgeführt.

Hierzu wurden jeweils drei Mäuse mit einem manifestierten Tumor für drei Tage entweder mit DMSO oder mit MLN8054 (40 mg/kg) behandelt. Der Tumor wurde entnommen und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren (Durchgeführt von E. Poon; AG L. Chesler).

Die Tumorbiopsien wurden auf Eis aufgetaut, in kleine Stücke (1-2 mm³) geschnitten, anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Pro Gramm Gewebe wurden 10 ml PBS hinzugegeben und mit Formaldehyd (Endkonzentration: 1,5 % v/v) bei RT 15 min rotierend fixiert. Die Quervernetzung der Proteine an die DNA wurde durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration: 0,125 M) gestoppt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 300 x g, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit kaltem PBS gewaschen, zentrifugiert (5 min, 300 x g, 4°C) und der Überstand wiederum verworfen.

Die Proben wurden mechanisch weiter zerkleinert, in ChIP-Lysispuffer I (mit Protease- und Phosphataseinhibitoren) resuspendiert und auf Eis 20 min inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (5 min, 300 x g, 4°C) und das Pellet in ChIP-Lysispuffer II (mit Protease- und Phosphataseinhibitoren) resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 4 °C sonifiziert (10 sec, jeweils 20 Sekunden Pause, für insgesamt 15 min bei 20 % Amplitude) und das Chromatin dadurch in 200 – 500 bp große Fragmente geschnitten. Zur Kühlung wurden die Proben auf einem Ethanol-Eisgemisch gelagert. Zur Überprüfung der DNA-Fragmentierung wurde ein Aliquot (25 µl) entnommen und mit TE-Puffer (475 µl), RNase (Endkonzentration: 20 µg/ml) und NaCl (Endkonzentration: 160 mM) versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Probe für mindestens weitere 6 h bei 65 °C inkubiert.

Anschließend wurde der Lösung EDTA (Endkonzentration: 5 mM) und Proteinase K (Endkonzentration: 200 µg/ml) hinzugefügt und 2 h bei 45 °C behandelt. Das revertierte Chromatin wurde mit Hilfe des *Qiaquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Konzentration der DNA-Proben wurden am *Nano Drop* ermittelt und auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen. Falls die Fragementierung nicht klein genug war, wurde die Probe erneut sonifiziert.

Zur Präzipitation der Protein-gebundenen DNA (in diesem Falle N-Myc-gebundene DNA) wurden pro Ansatz 50 µl Protein G-Dynabeads dreimal mit einer BSA-PBS (5 mg/ml) gewaschen und mit 2 µg Antikörper (N-Myc- oder Kontrollantikörper) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht rotierend bei 4 °C inkubiert und anschließend dreimal mit 1 ml BSA-PBS gewaschen. Die *Beads* wurden wiederum in 100 µl BSA-PBS resuspendiert und pro Ansatz die gleiche Menge Chromatin zugefügt. Zur Inputbestimmung wurde 1 % des Chromatins separat aufbewahrt. Die Präzipitation wurde bei 4 °C rotierend über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden die *Beads* dreimal mit Waschpuffer I, dreimal mit Waschpuffer II und dreimal mit Waschpuffer III gewaschen. Die *Beads* wurden in ein neues Reagenzgefäß überführt und nochmal mit TE-Puffer gewaschen. Zur Eluation wurden die *Beads* zweimal in Eluationspuffer resuspendiert und dabei für 15 min bei RT inkubiert. Die Eluate wurden vereinigt und zusammen mit den Inputproben revertiert. Hierzu wurden die (Input-) Proben mit TRIS-Puffer (1 M, pH = 6,8, 14 µl), 1 µl RNase (10 mg/ml) und 1,2 µl NaCl (5 M) versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Proben über Nacht bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden der Lösungen 3,5 µl EDTA (0,5 M) und 7 µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzugefügt und 2 h bei 45 °C behandelt. Das revertierte Chromatin wurde mit Hilfe des *Qiaquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die aufgereinigte DNA wurde mit spezifischen *Chip-Primern* zur Amplifikation von bestimmten Promotorsequenzen bzw. genomischer DNA (als Kontrolle) eingesetzt.

Die DNA-Bindung wurde nach der Immunpräzipitation als prozentualer Anteil der eingesetzten DNA-Menge angegeben.

6.3.9 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von Proteinen wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt.

Dazu wurden die auf Deckgläschen wachsenden Zellen zunächst vom Medium befreit, gewaschen und 15 min mit 3,7 %igem (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und entweder bei 4 °C gelagert oder direkt weiter für die Färbung verarbeitet. Hierzu wurden die Zellproben zweimal für 10 min mit 0,1 M Glycin/PBS und zweimal für 5 min mit 0,1 % NP40 (v/v)/PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für 45 min bei RT mit Block-Lösung (für IF) behandelt. Die Antikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C ebenfalls in Block-Lösung. Nach dreimaligem Waschen mit Block-Lösung wurden die Zellen mit dem fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (1:400 in Block-Lösung) für eine weitere 1 h bei RT behandelt. Zur Gegenfärbung des Zellkern wurden die Zellen gleichzeitig mit dem

DNA-Farbstoff Hoechst (1:10000) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Zellen wurde das Deckgläschen mit einem Tropfen Mowiol auf ein Objektträger invers gelegt.

Zur Vermeidung der Austrocknung der Zellen wurde das Deckgläschen mit Nagellack überzogen. Die Auswertung der Proteinlokalisierung erfolgte am konfokalen Mikroskop oder am BD-Pathway.

7 Materialien

7.1 Bakterienstämme und Zelllinien

7.1.1 Bakterienstämme

DH5 α *Escherichia coli*

Genotyp: *F*, $\phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYAargF)$ U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17(rk-, mk⁺)*, *phoA*, *supE44*, λ ; *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

XL1 *blue*

Escherichia coli

Genotyp: *F*, *proAB*, *lacZlqZ\Delta M15* Tn10 (*Tetr*), *recA1*, *endA1*, *hsdR17*, *supE44*, λ ; *thi-1*, *gyrA96*, *relA1 lac*

7.1.2 Humane Zelllinien

HCT116

humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC)
Wildtyp (Fbw7 +/+) und (Fbw7 -/-) defiziente Zelllinie (Rajagopalan *et al.*, 2004)

Phoenix-Eco (PHX)

humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC)
Abstammung: HEK293
Verpackungszelllinie zur Herstellung von MoMuLV-Retroviren (Kinsella and Nolan, 1996)

IMR-32

humane Neuroblastomzelllinie (Manfred Schwab)
MYCN-amplifizierte Zelllinie

IMR-5

humane Neuroblastomzelllinie (Angelika Eggert)
MYCN-amplifizierte Zelllinie

SMS-KCN

humane Neuroblastomzelllinie (Angelika Eggert)
MYCN-amplifizierte Zelllinie

LAN-1	humane Neuroblastomzelllinie (Angelika Eggert) <i>MYCN</i> -amplifizierte Zelllinie
Kelly	humane Neuroblastomzelllinie (Angelika Eggert) <i>MYCN</i> -amplifizierte Zelllinie
SH-EP	humane Neuroblastomzelllinie (Manfred Schwab) <i>MYCN</i> -nicht-amplifizierte Zelllinie

7.2 Kultivierungsmedien und Zusätze

7.2.1 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium (+ Amp)	1 % (w/v) Baktotrypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % NaCl (100 µg/ml Ampicillin)
LB-Agar (+ Amp)	LB-Medium + 1,2 % Bakto-Agar (Nach Autoklavierung und Abkühlung wurde dem noch flüssigem Medium 100 µg/ml Ampicillin hinzugefügt)

7.2.2 Medien und Zusätze für die Zellkultivierung

Zur Kultivierung von Säugerzelllinien wurde entweder RPMI-1640 (Neuroblastomzellen) oder DMEM (PHX und HCT116) als Medium verwendet. Diesem Grundmedium (RPMI-1640 bzw. DMEM; beide Sigma) wurden folgende Substanzen hinzugefügt:

	10 % (v/v) 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviertes FBS (Biochrome) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml, PAA)
Einfriermedium	90 % FBS 10 % DMSO
Hungermedium	DMEM bzw. RPMI-1640 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml)

Sphärenmedium	78 ml DMEM 156 ml DMEM/F12 (Life Technologies) 12,5 ml Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml) 1 ml Amphotericin B (1 µg/ml) 2,5 ml B27 (100 x; Life Technologies) 20 ng/µl bFGF (Biomol) 20 ng/µl EGF (Biomol)
Trypsin/EDTA	0,25 % Trypsin 5 mM EDTA 22,3 mM Tris pH 7,4 125 mM NaCl

Folgende Antibiotika und Zusätze wurden den einzelnen Medien hinzugefügt:

Antibiotika:

Doxyzyklin (Sigma)	1 µg/ml (Induktion der Proteinexpression)
G418/Neo ^R (PAA)	200 - 500 µg/ml (Selektion)
Hygromycin B (Merck)	100 - 400 µg/ml (Selektion)
Kanamycin (InvivoGen)	100 µg/ml (Schutz vor bakterieller Kontamination)
Plasmocin (InvivoGen)	0,25 µg/ml (Schutz vor Mycoplasmen)
Puromycin (InvivoGen)	1 µg/ml (Selektion)
Zeozin/Bleo ^R (InvivoGen)	30 - 100 µg/ml (Selektion)

Zusätze:

BEZ235 (Calbiochem)	50-200 nM (PI3 - Kinase Inhibitor)
CCT137690 (L. Chesler)	1000 nM (Aurora - Kinase Inhibitor)
Cycloheximid (Sigma)	50 µg/ml (Inhibierung der Translation)
Hesperadin (Selleck)	1000 nM (Aurora - Kinase Inhibitor)
LY294002 (LC Laboratories)	50 µM (PI3 - Kinase Inhibitor)
MG132 (Calbiochem)	5 µM (Inhibierung des proteasomalen Protein- abbaus)
MK5108 (Seleck)	25 - 1000 nM (Aurora-A - Kinase Inhibitor)
MLN8054 (Millenium)	25 - 2000 nM (Aurora-A - Kinase Inhibitor)
MLN8237 (Millenium)	25 - 1000 nM (Aurora-A - Kinase Inhibitor)
ML00599377 (Millenium)	250 - 1000 nM (Aurora-A - Kinase Inhibitor)
ML00614805 (Millenium)	250 - 1000 nM (Aurora-A - Kinase Inhibitor)
ML00605519 (Millenium)	250 - 1000 nM (Aurora-A - Kinase Inhibitor)
ML00605595 (Millenium)	250 - 1000 nM (Aurora-A - Kinase Inhibitor)
Nocodazol (Sigma)	0,1 µg/ml (Arretierung in der Mitose - Phase)
VX-680 (Seleck)	25 - 1000 nM (Aurora - Kinase Inhibitor)

7.3 Nukleinsäuren

7.3.1 Primer und DNA-Oligonukleotide

Alle unter Tabelle 7.1 aufgelisteten DNA-Oligonukleotide und *Primer* (F = *forward*; R = *reverse*) wurden von den Firmen Invitrogen bzw. Operon synthetisiert. Das *Primerdesign* erfolgte mit Hilfe der Programme *Universal ProbeLibrary* (Roche), *PrimerX* und *Primer3*. Bei der Generierung der *Real-Time PCR-Primer* wurde darauf geachtet, dass die Amplifikation der Zielsequenzen intronüberspannend und somit spezifisch für mRNA ist. Als *Sequenzierprimer* dienten entweder die jeweiligen *qRT-PCR-Primer* oder die *Standardprimer* der entsprechenden Plasmide.

Tabelle 7.1 Übersicht über die verwendeten Primer und DNA-Oligonukleotide

Gen	Bezeichnung + (F bzw. R)	Spezies	Primersequenz [5'→3']	Verwendung
AURKA	AURKA 5' BamHI (F)	human	TTAACGGATCCGCATCATGGAC CGATCTAAAG	Klonierung
AURKA	AURKA 3' XhoI (R)	human	TTAACCTCGAGCCTGCACGATT CCTAAGACTG	Klonierung
AURKA	AURKA 32 BamHI (F)	human	TTAACGGATCCATGCCTTGTC GAATCCATTACCTGT	Klonierung
AURKA	AURKA 66 BamHI (F)	human	TTAACGGATCCATGTCCAGTCA CAAGCCGGT	Klonierung
AURKA	AURKA 133 BamHI (F)	human	TTAACGGATCCATGTTTGAAA TTGGTCGCCCTCTG	Klonierung
AURKA	AURKA 388 XhoI (R)	human	TTAACCTCGAGCTATGATGAAT TTGCTGTGATCCAGG	Klonierung
AURKA	AURKA 377 XhoI (R)	human	TTAACCTCGAGCTATACTTCTC TGAGCATTGGCCT	Klonierung
AURKA	AURKA 132 XhoI (R)	human	TTAACCTCGAGGTCTTCCAAAG CCCCTGC	Klonierung
AURKA	AURKA 378 SalI (F)	human	TTAACGTCGACCTTGAACACCC CTGGATCAC	Klonierung
AURKA	DeltaC3_ Aurka_for (F)	human	gtggcaccctggactacctgTAGccccct gaaatgattgaagg	Klonierung
AURKA	DeltaC3_ Aurka_rev (R)	human	ccttcaatcatttcagggggCTAcaggt gtccaggtgccac	Klonierung
AURKA	DeltaC4_ Aurka_for (F)	human	gcttaaaattgcagattttgggtgTAGt cagtacatgctccatcttc	Klonierung
AURKA	DeltaC4_ Aurka_rev (R)	human	ggaagatggagcatgtactgaCTAccac ccaaaatctgcaatttaagc	Klonierung
AURKA	DeltaC5_ Aurka_for (F)	human	cttagactgtatggttatttcTAGcatgat gctaccagagtctacc	Klonierung

Gen	Bezeichnung + (F bzw. R)	Spezies	Primersequenz [5'→3']	Verwendung
AURKA	DeltaC5_ Aurka_rev (R)	human	ggtagactctgtagcatcatgCTAgaataaccatacagtctaag	Klonierung
AURKA	DeltaC6_ Aurka_for (F)	human	ggcagtgggctttggaagactttTAGga aattggctgcacctctggg	Klonierung
AURKA	DeltaC6_ Aurka_rev (R)	human	cccagaggcgaccaatttcCTAaaagt cttccaaagcccactgcc	Klonierung
AURKA	DeltaC7_ Aurka_for (F)	human	cctttgcaagcacaaaagcttgctTAGtc cagtcacaagccggttcag	Klonierung
AURKA	DeltaC7_ Aurka_rev (R)	human	ctgaaccggcttgactggaCTAgaca agcttttgcttgcaaagg	Klonierung
AURKA	Aurora T217A for (F)	human	CTGGAATATGCACCACTTGGAG ACGTTTATAGAGAACTTCAGAA AC	Mutagenese
AURKA	Aurora T217A rev (F)	human	GTTTCTGAAGTTCTCTATAAAC GTCTCCAAGTGGTGCATATTCC AG	Mutagenese
Mycn	Mycn rev (R)	murin	TCTCTACGGTGACCACATCG	qRT-PCR
Rps16	Rps16 fwd (F)	murin	AGGAGCGATTTGCTGGTGTG	qRT-PCR
Rps16	Rps16 rev (R)	murin	GCTACCAGGGCCTTTGAGAT	qRT-PCR
AURKA	AURKA fwd (F)	human	GGAGAAAGCCGGAGTGGAGCAT C	qRT-PCR
AURKA	AURKA rev (R)	human	TTCAATCATTTCAGGGGGCAGG TA	qRT-PCR
B2M	B2M fwd (F)	human	TCTCGCTCCGTGGCCT	qRT-PCR
B2M	B2M rev (R)	human	TCAGTAAGTCAACTTCAATGTC GGAT	qRT-PCR
FBXW7	FBXW7 fwd (F)	human	CAGCAGTCACAGGCAAATGT	qRT-PCR
FBXW7	FBXW7 rev (R)	human	GCATCTCGAGAACCGCTAAC	qRT-PCR
MYCN	MYCN fwd (F)	human	CCACAAGGCCCTCAGTACC	qRT-PCR
MYCN	MYCN rev (R)	human	TCTTCTCTTCATCATCTTCAT CA	qRT-PCR
p21CIP1	p21CIP1 fwd (F)	human	CGAAGTCAGTTCCTTGTGGAG	qRT-PCR
p21CIP1	p21CIP1 rev (R)	human	CATGGGTCTGACGGACAT	qRT-PCR
PLK2	PLK2 fwd (F)	human	TCAAGTGACGGTGCTGAAAT	qRT-PCR
PLK2	PLK2 rev (R)	human	CACTAGGCAGATCTCCACCAT	qRT-PCR
RPS14	RPS14 fwd (F)	human	GGCAGACCGAGATGAATCCTCA	qRT-PCR

Gen	Bezeichnung + (F bzw. R)	Spezies	Primersequenz [5'→3']	Verwendung
RPS14	RPS14 rev (R)	human	CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC	qRT-PCR
AURKA	AURKA-sh-1 fwd (F)	human	GATCCCCAACGTGTTCTCGTGA CTCATTCAAGAGATGAGTCACG AGAACACGTTTTTTTTGGAAA	sh-RNA
AURKA	AURKA-sh-1 rev (R)	human	AGTTTTTCCAAAAAACGTGTT CTCGTGAATCATCTCTTGAATG AGTCACGAGAACACGTTGGG	sh-RNA
AURKA	AURKA-sh-2 fwd (F)	human	GATCCCCGAATCAGAAGCAGAA GCAATTCAAGAGATTGCTTCTG CTTCTGATTCTTTTTGGAAA	sh-RNA
AURKA	AURKA-sh-2 rev (R)	human	AGTTTTTCCAAAAAGAATCAGA AGCAGAAGCAATCTCTTGAATT GCTTCTGCTTCTGATTCTGGG	sh-RNA
MYCN	MYCN-sh rev (R)	human	AGTTTTTCCAAAAAGACAGCAG CAGTTGCTAAATCTCTTGAATT TAGCAACTGCTGCTGTCTGGG	sh-RNA
Ncl1	mNCL1 fwd ChIP (F)	murin	GGCTCAGTCTTTTGCCTCAG	ChIP
Ncl1	mNCL1 rev ChIP (R)	murin	GTACCGACGACTCTGGAGC	ChIP
neg. Region	mChIP neg. 250 (F)	murin	GAATGTGGCCAGTGGACTTT	ChIP
neg. Region	mChIP neg. 251 (R)	murin	ATCCTAAGCTTCCCCTCCAG	ChIP
Slc25A19	SLC25A19 fwd ChIP (F)	murin	CCACTCCGTGTGTCAGAACAG	ChIP
Slc25A19	SLC25A19 rev ChIP (R)	murin	AGTGGTGGTGGGAGGGATTC	ChIP

7.3.2 RNA-Oligonukleotide (siRNA)

Die verwendeten RNA-Oligonukleotidgemische (*ON-TARGETplusSMARTpool*) bestanden aus jeweils vier siRNAs (gerichtet gegen: *MYCN*, *AURKA*, *USP11*, *FBW7* und *HUWE*) und wurden von der Firma Dharmacon synthetisiert. Als Kontrolle diente die siRNA *sicontrol* (*ON-TARGET plus Non-Targeting siRNA #1*). Bei der Transfektion wurde Opti-Mem (Life Technologies) als Medium verwendet.

7.3.3 Plasmide

7.3.3.1 Leervektoren

pBabe (<i>bleo, hygro, puro</i>)	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit einem LTR-Promotor und einem Bleomycin-, Hygromycin- oder Puromycin -Resistenzgen (Morgenstern and Land, 1990)
pRETRO.SUPER <i>puro</i>	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit einem RNA-Polymerase III-abhängigen H1-RNA-Promotor (zur Expression von shRNAs) und dem Puromycin-Resistenzgen (Brummelkamp et al., 2002)
pWZL (<i>neo, eGFP</i>)	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit einem LTR-Promotor und dem Neomycin-Resistenzgen oder dem eGFP-Reportergen ((Morgenstern and Land, 1990); Anne Marie Kenney)
pTRE2pur	eukaryotischer Expressionsvektor mit einem Minimal-CMV-Promotor 5'-abwärts eines <i>Tet response Element</i> (TRE) und dem Puromycin-Resistenzgen (Clonetech)
pTet-On (<i>neo</i>)	eukaryotischer Expressionsvektor mit einem CMV-Promotor zur Expression des <i>reverse tTA</i> Gens und dem Neomycin-Resistenzgen (Clonetech)
pcDNA3.0	eukaryotischer Expressionsvektor mit einem CMV-Promotor (Invitrogen)
psPAX2	eukaryotischer lentiviraler Vektor (Verpackungsplasmid)
pMD2.G	eukaryotischer lentiviraler Vektor (<i>Envelope</i> -Plasmid)
pRRL	eukaryotischer lentiviraler Expressionsvektor (IRES-eGFP, IRES-Tomato, IRES-puro)

7.3.3.2 Expressionsvektoren

pBABE <i>bleo p53DD</i>	pBABE <i>bleo</i> zur Expression von <i>p53DD</i> (humanes TP53, kodierend für die Aminosäuren 302-390), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thorsten Stiewe und Ursula Eilers
pBABE <i>H2B-GFP</i>	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit LTR-Promotor zur Expression eines Fusionskonstruktes aus humanem Histon H2 und GFP. Zur Kontrolle der Effizienz von Transfektionen oder Infektionen verwendet
pBABE <i>hygro EcoR</i>	pBabe-Vektor zur Expression des murinen ekotrophen Rezeptors, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Marion Elend
pWZL <i>neo EcoR</i>	pWZL-Vektor zur Expression des murinen ekotrophen Rezeptors, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Manuel Serrano
pWZL <i>neo MYCN</i>	pWZL-Vektor zur Expression von humanem <i>MYCN</i> (<i>wt</i> oder <i>mut</i> = T58A/S62A), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tobias Otto
pWZL murine <i>Mycn (EGFP)</i>	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit der CDS von murinem <i>Mycn</i> (mit Flag-Tag) und dem eGFP-Reportergen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Anne Marie Kenney
pTRE2pur <i>AURKA</i>	pTRE2pur-Vektor mit der CDS von humanem <i>AURKA</i> (<i>wt</i> und der Punktmutante T217D jeweils mit HA-Tag)
pcDNA3.0 <i>AURKA</i>	pcDNA3.0-Vektor mit der CDS von humanem <i>AURKA</i> (<i>wt</i> und verschiedene Mutanten mit und ohne HA-Tag)
p3xFLAG-FBXW7 α	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor zur Expression von FLAG-markiertem humanem <i>FBXW7α</i> , freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Markus Welcker und Bruce Clurman

pcDNA3.0 <i>MYCN</i>	pcDNA3.0-Vektor mit der CDS von humanem <i>MYCN</i> (<i>wt</i> oder <i>mut</i> = T58A/S62A) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tobias Otto
pcDNA3.0 (<i>His</i> -) <i>Ubiquitin</i>	pcDNA3 zur Expression von His-markiertem humanem Ubiquitin (<i>wt</i> , K48, K11/K48, K48/K63 = Mutation aller Lysine zu Arginin außer die angegebenen Lysine), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Nikita Popov
pcDNA3.0 <i>HA-USP11</i>	pcDNA3-Vektor mit der CDS von humanem <i>USP11</i>
pCS2m- <i>Zyclin E</i>	Expressionsvektor mit CMV-Promotor, <i>Myc-Tag</i> und der CDS von humanem <i>Zyclin E</i> (<i>wt</i> bzw <i>mut</i> = T380A), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bruce Clurman
pRRL - <i>HA-MYCN</i>	pRRL-Vektor zur stabilen Expression von humanem, HA-markiertem <i>MYCN</i> wildtyp bzw. Mutante (<i>mut</i> = T58A/S62A) und dem Reporter gen Tomato (IRES-Tomato) oder dem Resistenzgen für Puromycin (IRES-puro)

7.4 Antikörper

Tabelle 7.3 Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Spezies	Verwendung	Firma
anti-Myc (9E10)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von humanem Myc mittels Western Blotting	AG Eilers
anti-Cyclin E (H12/sc-247)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von humanem Cyclin E mittels Western Blotting	Santa Cruz
anti-CDK2 (M2/sc-163)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem CDK2 mittels Western Blotting	Santa Cruz
anti-Max (C17/sc-197X)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem Max mittels Western Blotting	Santa Cruz

Antikörper	Spezies	Verwendung	Firma
anti-N-Myc (B8.4.B)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von humanem N-Myc mittels Western Blotting	BD
anti-Aurora-A (3092)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem Aurora-A mittels Western Blotting	Cell Signaling
anti-p53 (DO-1/sc-126)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von humanem TP53 mittels Western Blotting	Santa Cruz
anti-Myc pS62	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem, an S62 phosphoryliertem Myc mittels Western Blotting	Anne-Marie Kenney
anti-Histon H3 (ab1791)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem Histon H3 mittels Western Blotting	Abcam
anti-GSK3beta (27C10)	monoklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem GSK3beta mittels Western Blotting	Cell Signaling
anti-cleaved Parp, Asp 214 (51-9000017)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von humanem, aktiviertem Parp mittels Western Blotting	BD
anti-Myc pT58 (ab28842)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem, an T58 phosphoryliertem Myc mittels Western Blotting	Abcam
anti-Aurora- A/B/C pT288/T232/ T198 (2914S neu)	monoklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem, an T288/T232/T198 phosphoryliertem Aurora-A/B/C mittels Western Blotting	Cell Signaling
anti-p21 (C- 19, sc-397)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem p21 mittels Western Blotting	Santa Cruz
anti-Aurora-A pT288 (2914S alt)	monoklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem, an T288 phosphoryliertem Aurora-A mittels Western Blotting	Cell Signaling
anti-UBE2D (sc-15000)	polyklonal Ziege	Primärantikörper zur Detektion von humanem UBCH5 mittels Western Blotting	Santa Cruz
anti-HA (16B12)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von HA-fusionierten Proteinen mittels Western Blotting und IP	Covance

Antikörper	Spezies	Verwendung	Firma
anti-cleaved Parp, Asp 214 (51-9000017)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von humanem, aktiviertem Parp mittels Western Blotting	BD
anti-Myc pT58 (ab28842)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem, an T58 phosphoryliertem Myc mittels Western Blotting	Abcam
anti-Aurora-A/B/C pT288/T232/T198 (2914S neu)	monoklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem, an T288/T232/T198 phosphoryliertem Aurora-A/B/C mittels Western Blotting	Cell Signaling
anti-p21 (C-19, sc-397)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem p21 mittels Western Blotting	Santa Cruz
anti-Aurora-A pT288 (2914S alt)	monoklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem, an T288 phosphoryliertem Aurora-A mittels Western Blotting	Cell Signaling
anti-GSK3beta pS9 (9336)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem, an S9 phosphoryliertem GSK3beta mittels Western Blotting	Cell Signaling
anti-USP11 (A301-613A)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem USP11 mittels Western Blotting und IP	Bethyl
anti-AKT	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem AKT mittels Western Blotting	Cell Signaling
anti-AKT pS473 (9271)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem, an S473 phosphoryliertem AKT mittels Western Blotting	Cell Signaling
anti-Fbxw7	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von humanem Fbxw7 mittels Western Blotting	Axel Behrens
anti-Vinculin (V9131)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von humanem Vinculin mittels Western Blotting	Sigma
anti-Aurora B (A300-431A)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem Aurora-B mittels Western Blotting	Bethyl
anti-Aurora-A (N-20, sc-14318)	polyklonal Ziege	Primärantikörper zur Detektion von humanem Aurora-A mittels IP	Santa Cruz

Antikörper	Spezies	Verwendung	Firma
anti-Nestin (MAB5326)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von humanem Nestin mittels Western Blotting	Millipore
anti-FLAG (F3165)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von FLAG-fusionierten Proteinen mittels Western Blotting und IP	Sigma
anti-CDC4 (sc- 33196)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem Fbxw7 mittels IP	Santa Cruz
anti-N-Myc (sc-53993)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von humanem N-Myc mittels (Chromatin)- IP	Santa Cruz
anti-Aurora-A (ab1287)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem Aurora-A mittels Immunfluoreszenz	Abcam
anti-N-Myc (NCM II 100, sc-56729)	monoklonal Maus	Primärantikörper zur Detektion von humanem N-Myc mittels Immunfluoreszenz	Santa Cruz
anti-Histon H3 K9me (ab8898)	polyklonal Kaninchen	Primärantikörper zur Detektion von humanem, trimethylierten Histon H3 (Lysin 9) mittels Western Blotting und FACS	Abcam
anti- Kaninchen-IgG HRP (934)	Esel	Sekundärantikörper zur Detektion von Kaninchen-IgG mittels Western Blotting	Amersham, NA
anti-Maus-IgG HRP (931)	Schaf	Sekundärantikörper zur Detektion von Maus-IgG mittels Western Blotting	Amersham, NA
anti-Ziege-IgG HRP (sc-2020)	Esel	Sekundärantikörper zur Detektion von Ziegen-IgG mittels Western Blotting	Santa Cruz
anti-True Kaninchen-IgG HRP (13- 8816-31)	-	Sekundärantikörper zur Detektion von Kaninchen-IgG mittels Western Blotting (bei IPs)	eBioscience
anti-True Maus-IgG HRP (13-8817-30)	-	Sekundärantikörper zur Detektion Maus-IgG mittels Western Blotting (bei IPs)	eBioscience
Alexa Fluor® 488 anti- Kaninchen IgG	Ziege	Sekundärantikörper für FACS-Analysen und Immunfluoreszenz gekoppelt mit Alexa Fluor® 488	Life Technologies
Alexa Fluor® 488 anti-Maus IgG	Ziege	Sekundärantikörper für FACS-Analysen und Immunfluoreszenz gekoppelt mit Alexa Fluor® 488	Life Technologies

Antikörper	Spezies	Verwendung	Firma
Alexa Fluor® 647 anti- Kaninchen IgG	Ziege	Sekundärantikörper für FACS-Analysen und Immunfluoreszenz gekoppelt mit Alexa Fluor® 647	Life Technologies
Alexa Fluor® 647 anti-Maus IgG	Ziege	Sekundärantikörper für FACS-Analysen und Immunfluoreszenz gekoppelt mit Alexa Fluor® 647	Life Technologies

7.5 Chemikalien

Alle Chemikalien, wenn nicht anders angegeben, wurden bei den Firmen Acros Organics, AppliChem, Calbiochem, Difco, Invitrogen, Merck, Roth und Sigma mit höchstem Reinheitsgrad bestellt. Radioaktiv markiertes L-Methionin und L-Cystein (³⁵Schwefel) wurde von der Firma Hartmann Analytics bezogen.

7.6 Kits, Standards und Enzyme

DNA-Marker	1 kb DNA Ladder (Invitrogen)
DNase-freie RNase A	Sigma
dNTPs	Stammlösung je 100 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Sigma)
Entwicklerlösungen	Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)
Lipofectamine RNAiMAX	Life Technologies
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
peqGOLD TriFast	peqlab (Erlangen)
Phosphataseinhibitoren	Sigma, 20 mg/ml gelöst in DMSO (1:100 – 1:1000 eingesetzt)
Pfu Polymerase	Fermentas
Pfu-Turbo Polymerase	Stratagene
Proteinaseinhibitoren	Protease Cocktail (Sigma), 20 mg/ml gelöst in Dimethylsulfoxid (1:1000 eingesetzt)
Protein-Marker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)
Qiaquick PCR purification Kit	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	Fermentas und NEB New England Biolabs
RNase-freie DNase	Fermentas
SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Scientific
T4-DNA-Ligase	Fermentas

7.7 Puffer und Lösungen

Puffer A für Ubiquitin-Assays	6 M Guanidinhydrochlorid 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 (240 ml einer 1 M Na ₂ HPO ₄ mit ca. 10 ml einer 1 M NaH ₂ PO ₄ auf pH 8,0 eingestellt) 10 mM Imidazol 250 mM NaCl 0,4 % (v/v) Tween-20 frisch: 20 mM NEM und 20 µM MG-132
Puffer B für Ubiquitin-Assays	25 mM Tris, pH 6,8 20 mM Imidazol
Block-Lösung für WB	5 % Magermilch in TBS-T
Block-Lösung für IF	0,1 % NP-40 5 % FBS in PBS
Blotting Puffer	20 mM Tris Base 150 mM Glycin 150 ml Methanol ad. 1 l dest. Wasser
Bradford Lösung	8,5 % Phosphorsäure 4,75 % Ethanol 0,01 % Coomassie Brilliant Blue in dest. Wasser
ChIP-Lysepuffer I (RIPA-Puffer)	5 mM PIPES, pH 8 85 mM KCL 0,5 % (v/v) NP-40 in dest. Wasser
ChIP-Lysepuffer II	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 % (v/v) NP-40 1 % DOC 0,1 % SDS in dest. Wasser

ChIP-Waschpuffer I	20 mM Tris-HCl, pH 8,1 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,1 % SDS 1 % Triton X 100 in dest. Wasser
ChIP-Waschpuffer II	20 mM Tris-HCl, pH 8,1 500 mM NaCl 2 mM EDTA 0,1 % SDS 1 % Triton X 100 in dest. Wasser
ChIP-Waschpuffer III	10 mM Tris-HCl, pH 8,1 250 mM LiCl 1 mM EDTA 1 % DOC 1 % NP-40 in dest. Wasser
ChIP-Elutionspuffer	1 % (w/v) SDS 100 mM NaHCO ₃ in dest. Wasser
DNA Ladepuffer (6x)	10 mM EDTA, pH 8,0 0,2 % (w/v) Orange G 40 % (w/v) Saccharose in dest. Wasser
Fixierlösung für IF	Formaldehyd 3,7% in PBS
Glycin Waschpuffer für IF	0,1 M Glycin in PBS
HBS (2x)	280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM HEPES in dest. Wasser
Hybridisierungspuffer (2x)	200 mM NaCl 100 mM HEPES in dest. Wasser, pH 7,4
Kristallviolettlösung	0,1 % Kristallviolett in dest. Wasser

Mowiol-Lösung	13,3% Mowiol 4-88 33,3% Glycerin 0,13 M Tris, pH 8,5
NP-40 Waschpuffer für IF	0,1% NP-40 in PBS
NP-40-Lysepuffer	50 mM Tris, pH 8,0 150 mM NaCl 1 % (v/v) NP-40 10 mM Na ₂ Na ₄ P ₂ O ₇ 100 mM NaF 2 mM Na ₃ VO ₄ in dest. Wasser
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄ in dest. Wasser
PI-FACS-Puffer	38 mM Natriumcitrat 54 µM Propidiumiodid 24 µg/ml RNase A in dest. Wasser
Sammelgel 4%	4 % Acrylamid/Bisacrylamid 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,1 % TEMED in dest. Wasser
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base 250 mM Glycin 0,1 % SDS in dest. Wasser
Stripping Puffer	62,5 mM Tris pH 6,7 2 % SDS 0,7 % β-Mercaptoethanol in dest. Wasser

SDS-Probenpuffer (3x)	187,5 mM Tris, pH 6,8 30 % Glycerin 6 % SDS 0,03 % Bromphenolblau 2 M β -Mercaptoethanol in dest. Wasser
STET-Puffer	8 % Sucrose 50 mM EDTA 50 mM Tris pH 8,0 0,5 % Tritron X-100 in dest. Wasser
TAE (50x)	2 M Tris, pH 8,0 5,7 % Essigsäure 50 mM EDTA in dest. Wasser
TBS (-T)	25 mM Tris, pH 7,4 140 mM NaCl (0,2 % Tween-20) in dest. Wasser
TE	10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA in dest. Wasser
TNN-Puffer	50 mM Tris, pH 7,5 120 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5 % NP-40 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 100 mM NaF 2 mM Na_3VO_4
Trenngel 10 – 15 %	10 – 15 % Acrylamid/Bisacrylamid 375 mM Tris, pH 8,8 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,1 % TEMED

7.8 Gebrauchsmaterialien

Alle Gebrauchsmaterialien (z.B. Reaktionsgefäße, Zentrifugenröhrchen oder Zellkulturschalen) wurden von den Firmen Applied Biosystems, Eppendorf, Greiner, Nunc, Sarstedt, Kimberley-Clark und VWR International bezogen.

7.9 Geräte, Membranen und Software

Blottingapparatur	Mini Trans-Blot (Bio-Rad)
	Mini Wet Blot
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II (BD Biosciences)
Entwicklermaschine	LAS-4000 mini (Fujifilm Global)
Filterpapier	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)
Fluoreszenzmikroskop	BD Pathway (BD Biosciences)
Heizblock	Dry Bath System (STARLAB)
Mikroskop	Axiovert 40CFL (Zeiss)
PCR-Gerät	Mastercycler pro S (Eppendorf)
Photometer	Ultrospec 3100 pro UV/Visible (Amersham Biosciences)
	Spektralphotometer NanoDrop 3000 (Thermo Scientific)
PVDF-Membran	Immobilon-P-Transfer Membrane (Millipore)
qRT-PCR-Gerät	Mx3000P (Stratagene)
Schüttelinkubator	Model G25 (New Brunswick Scientific)
SDS-PAGE-Apparatur	Minigel (Bio-Rad)
	Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad)
Sterilarbeitsbank	HeraSafe (Heraeus)
Wasserbad	Julabo 5M-5M Bad/Umwälzthermostat (Julabo)
Whatman-Filterpapier	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)
Zellkulturinkubator	BBD 6220 (Heraeus)
Zellzähler	CASY Zellzähler (Innovatis)
Zentrifugen	Sorvall RC-5B Zentrifuge (DuPont Instruments)
	Zentrifuge 5417R (Eppendorf)
	Megafuge 1.0 R mit Cytospineinsätzen (Heraeus)

<http://www.servier.com>

Endnote

8 Literaturverzeichnis

Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 635-645.

Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A., Hulleman, E., Popov, N., Beier, R., Bernard, S., Quarto, M., Capra, M., Goettig, S., *et al.* (2005). The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 123, 409-421.

Agnese, V., Bazan, V., Fiorentino, F.P., Fanale, D., Badalamenti, G., Colucci, G., Adamo, V., Santini, D., and Russo, A. (2007). The role of Aurora-A inhibitors in cancer therapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 18 Suppl 6*, vi47-52.

Aguirre-Portoles, C., Bird, A.W., Hyman, A., Canamero, M., Perez de Castro, I., and Malumbres, M. (2012). Tpx2 controls spindle integrity, genome stability, and tumor development. *Cancer research* 72, 1518-1528.

Alvarez, E., Northwood, I.C., Gonzalez, F.A., Latour, D.A., Seth, A., Abate, C., Curran, T., and Davis, R.J. (1991). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 266, 15277-15285.

Andreiuolo, F., Puget, S., Peyre, M., Dantas-Barbosa, C., Boddaert, N., Philippe, C., Mauguen, A., Grill, J., and Varlet, P. (2010). Neuronal differentiation distinguishes supratentorial and infratentorial childhood ependymomas. *Neuro-oncology* 12, 1126-1134.

Arnold, H.K., Zhang, X., Daniel, C.J., Tibbitts, D., Escamilla-Powers, J., Farrell, A., Tokarz, S., Morgan, C., and Sears, R.C. (2009). The Axin1 scaffold protein promotes formation of a degradation complex for c-Myc. *The EMBO journal* 28, 500-512.

Asteriti, I.A., Di Cesare, E., De Mattia, F., Hilsenstein, V., Neumann, B., Cundari, E., Lavia, P., and Guarguaglini, G. (2014). The Aurora-A inhibitor MLN8237 affects multiple mitotic processes and induces dose-dependent mitotic abnormalities and aneuploidy. *Oncotarget* 5, 6229-6242.

Attiyeh, E.F., London, W.B., Mosse, Y.P., Wang, Q., Winter, C., Khazi, D., McGrady, P.W., Seeger, R.C., Look, A.T., Shimada, H., *et al.* (2005). Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *The New England journal of medicine* 353, 2243-2253.

Bagatell, R., London, W.B., Wagner, L.M., Voss, S.D., Stewart, C.F., Maris, J.M., Kretschmar, C., and Cohn, S.L. (2011). Phase II study of irinotecan and temozolomide in children with relapsed or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 208-213.

- Bavetsias, V., Faisal, A., Crumpler, S., Brown, N., Kosmopoulou, M., Joshi, A., Atrash, B., Perez-Fuertes, Y., Schmitt, J.A., Boxall, K.J., *et al.* (2013). Aurora isoform selectivity: design and synthesis of imidazo[4,5-b]pyridine derivatives as highly selective inhibitors of Aurora-A kinase in cells. *Journal of medicinal chemistry* *56*, 9122-9135.
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., and Conti, E. (2003). Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Molecular cell* *12*, 851-862.
- Beierle, E.A., Trujillo, A., Nagaram, A., Kurenova, E.V., Finch, R., Ma, X., Vella, J., Cance, W.G., and Golubovskaya, V.M. (2007). N-MYC regulates focal adhesion kinase expression in human neuroblastoma. *The Journal of biological chemistry* *282*, 12503-12516.
- Bellanger, J.M., and Gonczy, P. (2003). TAC-1 and ZYG-9 form a complex that promotes microtubule assembly in *C. elegans* embryos. *Current biology : CB* *13*, 1488-1498.
- Beltran, H. (2014). The N-myc Oncogene: Maximizing its Targets, Regulation, and Therapeutic Potential. *Molecular cancer research : MCR* *12*, 815-822.
- Beltran, H., Rickman, D.S., Park, K., Chae, S.S., Sboner, A., MacDonald, T.Y., Wang, Y., Sheikh, K.L., Terry, S., Tagawa, S.T., *et al.* (2011). Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. *Cancer discovery* *1*, 487-495.
- Benard, J. (1995). Genetic alterations associated with metastatic dissemination and chemoresistance in neuroblastoma. *European journal of cancer* *31A*, 560-564.
- Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L., and Kaldis, P. (2003). Cdk2 knockout mice are viable. *Current biology : CB* *13*, 1775-1785.
- Berwanger, B., Hartmann, O., Bergmann, E., Bernard, S., Nielsen, D., Krause, M., Kartal, A., Flynn, D., Wiedemeyer, R., Schwab, M., *et al.* (2002). Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer cell* *2*, 377-386.
- Bettencourt-Dias, M., and Glover, D.M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomes bring new understanding. *Nature reviews Molecular cell biology* *8*, 451-463.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., *et al.* (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *The EMBO journal* *17*, 3052-3065.
- Bishop, M. (1989). Nobelpreis für Medizin.
- Bjerke, L., Mackay, A., Nandhabalan, M., Burford, A., Jury, A., Popov, S., Bax, D.A., Carvalho, D., Taylor, K.R., Vinci, M., *et al.* (2013). Histone H3.3 mutations drive pediatric glioblastoma through upregulation of MYCN. *Cancer discovery* *3*, 512-519.
- Boss, D.S., Beijnen, J.H., and Schellens, J.H. (2009). Clinical experience with aurora kinase inhibitors: a review. *The oncologist* *14*, 780-793.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *The EMBO journal* *18*, 5321-5333.

- Bowman, T., Symonds, H., Gu, L., Yin, C., Oren, M., and Van Dyke, T. (1996). Tissue-specific inactivation of p53 tumor suppression in the mouse. *Genes & development* *10*, 826-835.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Vire, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., *et al.* (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *The EMBO journal* *24*, 336-346.
- Briassouli, P., Chan, F., and Linardopoulos, S. (2006). The N-terminal domain of the Aurora-A Phe-31 variant encodes an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination of I κ B α . *Human molecular genetics* *15*, 3343-3350.
- Briassouli, P., Chan, F., Savage, K., Reis-Filho, J.S., and Linardopoulos, S. (2007). Aurora-A regulation of nuclear factor- κ B signaling by phosphorylation of I κ B α . *Cancer research* *67*, 1689-1695.
- Brockmann, M., Poon, E., Berry, T., Carstensen, A., Deubzer, H.E., Rycak, L., Jamin, Y., Thway, K., Robinson, S.P., Roels, F., *et al.* (2013). Small molecule inhibitors of aurora-a induce proteasomal degradation of N-myc in childhood neuroblastoma. *Cancer cell* *24*, 75-89.
- Brodeur, G.M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews Cancer* *3*, 203-216.
- Brodeur, G.M., and Fong, C.T. (1989). Molecular biology and genetics of human neuroblastoma. *Cancer genetics and cytogenetics* *41*, 153-174.
- Brodeur, G.M., Green, A.A., Hayes, F.A., Williams, K.J., Williams, D.L., and Tsiatis, A.A. (1981). Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer research* *41*, 4678-4686.
- Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* *224*, 1121-1124.
- Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1985). Amplification of N-myc sequences in primary human neuroblastomas: correlation with advanced disease stage. *Progress in clinical and biological research* *175*, 105-113.
- Bruggeman, S.W., Valk-Lingbeek, M.E., van der Stoop, P.P., Jacobs, J.J., Kieboom, K., Tanger, E., Hulsman, D., Leung, C., Arsenijevic, Y., Marino, S., *et al.* (2005). Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes & development* *19*, 1438-1443.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* *296*, 550-553.
- Burkhardt, R.A., Peng, Y., Norris, Z.A., Tholey, R.M., Talbott, V.A., Liang, Q., Ai, Y., Miller, K., Lal, S., Cozzitorto, J.A., *et al.* (2013). Mitoxantrone targets human ubiquitin-specific peptidase 11 (USP11) and is a potent inhibitor of pancreatic cancer cell survival. *Molecular cancer research : MCR* *11*, 901-911.
- Busino, L., Millman, S.E., Scotto, L., Kyratsous, C.A., Basrur, V., O'Connor, O., Hoffmann, A., Elenitoba-Johnson, K.S., and Pagano, M. (2012). Fbxw7 α - and GSK3-mediated degradation of p100 is a pro-survival mechanism in multiple myeloma. *Nature cell biology* *14*, 375-385.

- Cao, Q., and Richter, J.D. (2002). Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *The EMBO journal* 21, 3852-3862.
- Castro, A., Arlot-Bonnemains, Y., Vigneron, S., Labbe, J.C., Prigent, C., and Lorca, T. (2002a). APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO reports* 3, 457-462.
- Castro, A., Vigneron, S., Bernis, C., Labbe, J.C., Prigent, C., and Lorca, T. (2002b). The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *EMBO reports* 3, 1209-1214.
- Chan, C.S., and Botstein, D. (1993). Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* 135, 677-691.
- Chan, J.Y. (2011). A clinical overview of centrosome amplification in human cancers. *International journal of biological sciences* 7, 1122-1144.
- Cheetham, G.M., Knegt, R.M., Coll, J.T., Renwick, S.B., Swenson, L., Weber, P., Lippke, J.A., and Austen, D.A. (2002). Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase. *The Journal of biological chemistry* 277, 42419-42422.
- Chen, Y., Takita, J., Choi, Y.L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., Wang, L., Soda, M., Kikuchi, A., Igarashi, T., *et al.* (2008). Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455, 971-974.
- Cherayil, B.J., Weiner, S.J., and Pillai, S. (1989). The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *The Journal of experimental medicine* 170, 1959-1972.
- Chesler, L. (2013). persönliche Mitteilung.
- Chesler, L., Schlieve, C., Goldenberg, D.D., Kenney, A., Kim, G., McMillan, A., Matthay, K.K., Rowitch, D., and Weiss, W.A. (2006). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase destabilizes Mycn protein and blocks malignant progression in neuroblastoma. *Cancer research* 66, 8139-8146.
- Cheung, C.H., Sarvagalla, S., Lee, J.Y., Huang, Y.C., and Coumar, M.S. (2014). Aurora kinase inhibitor patents and agents in clinical testing: an update (2011 - 2013). *Expert opinion on therapeutic patents* 24, 1021-1038.
- Choi, S.H., Wright, J.B., Gerber, S.A., and Cole, M.D. (2010). Myc protein is stabilized by suppression of a novel E3 ligase complex in cancer cells. *Genes & development* 24, 1236-1241.
- Ciechanover, A. (2004). Nobelpreis für Chemie.
- ClinicalTrials.gov.
- Clurman, B.E., Sheaff, R.J., Thress, K., Groudine, M., and Roberts, J.M. (1996). Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes & development* 10, 1979-1990.
- Cohn, S.L., Salwen, H., Quasney, M.W., Ikegaki, N., Cowan, J.M., Herst, C.V., Kennett, R.H., Rosen, S.T., DiGiuseppe, J.A., and Brodeur, G.M. (1990). Prolonged N-myc protein half-life in a neuroblastoma cell line lacking N-myc amplification. *Oncogene* 5, 1821-1827.

- Conacci-Sorrell, M., McFerrin, L., and Eisenman, R.N. (2014). An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4, a014357.
- Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., and Eisenman, R.N. (2010). Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation. *Cell* 142, 480-493.
- Cotterman, R., and Knoepfler, P.S. (2009). N-Myc regulates expression of pluripotency genes in neuroblastoma including *lif*, *klf2*, *klf4*, and *lin28b*. *PLoS one* 4, e5799.
- Cowley, D.O., Rivera-Perez, J.A., Schliekelman, M., He, Y.J., Oliver, T.G., Lu, L., O'Quinn, R., Salmon, E.D., Magnuson, T., and Van Dyke, T. (2009). Aurora-A kinase is essential for bipolar spindle formation and early development. *Molecular and cellular biology* 29, 1059-1071.
- Cowling, V.H., Chandriani, S., Whitfield, M.L., and Cole, M.D. (2006). A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Molecular and cellular biology* 26, 4226-4239.
- Craik, D.J., Fairlie, D.P., Liras, S., and Price, D. (2013). The future of peptide-based drugs. *Chemical biology & drug design* 81, 136-147.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Dang, C.V., and Lee, W.M. (1988). Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Molecular and cellular biology* 8, 4048-4054.
- Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., and Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. *Seminars in cancer biology* 16, 253-264.
- Dar, A.A., Belkhir, A., and El-Rifai, W. (2009). The aurora kinase A regulates GSK-3beta in gastric cancer cells. *Oncogene* 28, 866-875.
- De Luca, M., Lavia, P., and Guarguaglini, G. (2006). A functional interplay between Aurora-A, Plk1 and TPX2 at spindle poles: Plk1 controls centrosomal localization of Aurora-A and TPX2 spindle association. *Cell cycle* 5, 296-303.
- Delmore, J.E., Issa, G.C., Lemieux, M.E., Rahl, P.B., Shi, J., Jacobs, H.M., Kastiris, E., Gilpatrick, T., Paranal, R.M., Qi, J., *et al.* (2011). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 146, 904-917.
- den Hollander, J., Rimpi, S., Doherty, J.R., Rudelius, M., Buck, A., Hoellein, A., Kremer, M., Graf, N., Scheerer, M., Hall, M.A., *et al.* (2010). Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state. *Blood* 116, 1498-1505.
- Diskin, S.J., Capasso, M., Schnepf, R.W., Cole, K.A., Attiyeh, E.F., Hou, C., Diamond, M., Carpenter, E.L., Winter, C., Lee, H., *et al.* (2012). Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nature genetics* 44, 1126-1130.
- Dobson, T., Chen, J., and Krushel, L.A. (2013). Dysregulating IRES-dependent translation contributes to overexpression of oncogenic Aurora A Kinase. *Molecular cancer research : MCR* 11, 887-900.

- Dodson, C.A., Kosmopoulou, M., Richards, M.W., Atrash, B., Bavetsias, V., Blagg, J., and Bayliss, R. (2010). Crystal structure of an Aurora-A mutant that mimics Aurora-B bound to MLN8054: insights into selectivity and drug design. *The Biochemical journal* 427, 19-28.
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J.P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., *et al.* (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *Journal of cell science* 117, 2523-2531.
- Eilers, M. (2013). persönliche Mitteilung.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., and Hancock, D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.
- Ewart-Toland, A., Briassouli, P., de Koning, J.P., Mao, J.H., Yuan, J., Chan, F., MacCarthy-Morrogh, L., Ponder, B.A., Nagase, H., Burn, J., *et al.* (2003). Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nature genetics* 34, 403-412.
- Eyers, P.A., and Maller, J.L. (2004). Regulation of Xenopus Aurora A activation by TPX2. *The Journal of biological chemistry* 279, 9008-9015.
- Faisal, A., Vaughan, L., Bavetsias, V., Sun, C., Atrash, B., Avery, S., Jamin, Y., Robinson, S.P., Workman, P., Blagg, J., *et al.* (2011). The aurora kinase inhibitor CCT137690 downregulates MYCN and sensitizes MYCN-amplified neuroblastoma in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 10, 2115-2123.
- Farrell, A.S., and Sears, R.C. (2014). MYC degradation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4.
- Fong, C.T., Dracopoli, N.C., White, P.S., Merrill, P.T., Griffith, R.C., Housman, D.E., and Brodeur, G.M. (1989). Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 3753-3757.
- Fu, J., Bian, M., Jiang, Q., and Zhang, C. (2007). Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Molecular cancer research : MCR* 5, 1-10.
- Fujita, T., Igarashi, J., Okawa, E.R., Gotoh, T., Manne, J., Kolla, V., Kim, J., Zhao, H., Pawel, B.R., London, W.B., *et al.* (2008). CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute* 100, 940-949.
- Fukuda, T., Mishina, Y., Walker, M.P., and DiAugustine, R.P. (2005). Conditional transgenic system for mouse aurora a kinase: degradation by the ubiquitin proteasome pathway controls the level of the transgenic protein. *Molecular and cellular biology* 25, 5270-5281.
- Fulda, S., Lutz, W., Schwab, M., and Debatin, K.M. (1999). MycN sensitizes neuroblastoma cells for drug-induced apoptosis. *Oncogene* 18, 1479-1486.

- Fulda, S., Lutz, W., Schwab, M., and Debatin, K.M. (2000). MycN sensitizes neuroblastoma cells for drug-triggered apoptosis. *Medical and pediatric oncology* 35, 582-584.
- Funa, K., Steinholtz, L., Nou, E., and Bergh, J. (1987). Increased expression of N-myc in human small cell lung cancer biopsies predicts lack of response to chemotherapy and poor prognosis. *American journal of clinical pathology* 88, 216-220.
- Gabay, M., Li, Y., and Felsher, D.W. (2014). MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4.
- Gamble, L.D., Kees, U.R., Tweddle, D.A., and Lunec, J. (2012). MYCN sensitizes neuroblastoma to the MDM2-p53 antagonists Nutlin-3 and MI-63. *Oncogene* 31, 752-763.
- Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A.L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4510-4515.
- Gebhardt, A., Frye, M., Herold, S., Benitah, S.A., Braun, K., Samans, B., Watt, F.M., Elsasser, H.P., and Eilers, M. (2006). Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *The Journal of cell biology* 172, 139-149.
- George, R.E., Sanda, T., Hanna, M., Frohling, S., Luther, W., 2nd, Zhang, J., Ahn, Y., Zhou, W., London, W.B., McGrady, P., *et al.* (2008). Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 455, 975-978.
- Giet, R., McLean, D., Descamps, S., Lee, M.J., Raff, J.W., Prigent, C., and Glover, D.M. (2002). Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *The Journal of cell biology* 156, 437-451.
- Gigoux, V., L'Hoste, S., Raynaud, F., Camonis, J., and Garbay, C. (2002). Identification of Aurora kinases as RasGAP Src homology 3 domain-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 277, 23742-23746.
- Giubettini, M., Asteriti, I.A., Scrofani, J., De Luca, M., Lindon, C., Lavia, P., and Guarguaglini, G. (2011). Control of Aurora-A stability through interaction with TPX2. *Journal of cell science* 124, 113-122.
- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A., and Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81, 95-105.
- Goepfert, T.M., Adigun, Y.E., Zhong, L., Gay, J., Medina, D., and Brinkley, W.R. (2002). Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis. *Cancer research* 62, 4115-4122.
- Goldschneider, D., Horvilleur, E., Plassa, L.F., Guillaud-Bataille, M., Million, K., Wittmer-Dupret, E., Danglot, G., de The, H., Benard, J., May, E., *et al.* (2006). Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma. *Nucleic acids research* 34, 5603-5612.
- Goodman, L.A., Liu, B.C., Thiele, C.J., Schmidt, M.L., Cohn, S.L., Yamashiro, J.M., Pai, D.S., Ikegaki, N., and Wada, R.K. (1997). Modulation of N-myc expression alters the invasiveness of neuroblastoma. *Clinical & experimental metastasis* 15, 130-139.

- Gregory, M.A., Qi, Y., and Hann, S.R. (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *The Journal of biological chemistry* 278, 51606-51612.
- Groisman, I., Huang, Y.S., Mendez, R., Cao, Q., Theurkauf, W., and Richter, J.D. (2000). CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell* 103, 435-447.
- Gu, L., Zhang, H., He, J., Li, J., Huang, M., and Zhou, M. (2012). MDM2 regulates MYCN mRNA stabilization and translation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 31, 1342-1353.
- Guccione, E., Martinato, F., Finocchiaro, G., Luzi, L., Tizzoni, L., Dall' Olio, V., Zardo, G., Nervi, C., Bernard, L., and Amati, B. (2006). Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nature cell biology* 8, 764-770.
- Guo, C., White, P.S., Weiss, M.J., Hogarty, M.D., Thompson, P.M., Stram, D.O., Gerbing, R., Matthay, K.K., Seeger, R.C., Brodeur, G.M., *et al.* (1999). Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* 18, 4948-4957.
- Gustafson, W.C., Meyerowitz, J.G., Nekritz, E.A., Chen, J., Benes, C., Charron, E., Simonds, E.F., Seeger, R., Matthay, K.K., Hertz, N.T., *et al.* (2014). Drugging MYCN through an allosteric transition in Aurora kinase A. *Cancer cell* 26, 414-427.
- Hallberg, B., and Palmer, R.H. (2013). Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nature reviews Cancer* 13, 685-700.
- Han, C.R., Jun do, Y., Lee, J.Y., and Kim, Y.H. (2014). Prometaphase arrest-dependent phosphorylation of Bcl-2 and Bim reduces the association of Bcl-2 with Bak or Bim, provoking Bak activation and mitochondrial apoptosis in nocodazole-treated Jurkat T cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 19, 224-240.
- Hann, S.R., and Eisenman, R.N. (1984). Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Molecular and cellular biology* 4, 2486-2497.
- Hara, E., Okamoto, S., Nakada, S., Taya, Y., Sekiya, S., and Oda, K. (1993). Protein phosphorylation required for the formation of E2F complexes regulates N-myc transcription during differentiation of human embryonal carcinoma cells. *Oncogene* 8, 1023-1032.
- Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98, 859-869.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Hartwell, L. (2001). Nobelpreis für Medizin.
- Hatzi, E., Breit, S., Zoephel, A., Ashman, K., Tontsch, U., Ahorn, H., Murphy, C., Schweigerer, L., and Fotsis, T. (2000). MYCN oncogene and angiogenesis: down-regulation of endothelial growth inhibitors in human neuroblastoma cells. Purification, structural, and functional characterization. *Advances in experimental medicine and biology* 476, 239-248.

- Henriksson, M., Bakardjiev, A., Klein, G., and Luscher, B. (1993). Phosphorylation sites mapping in the N-terminal domain of c-myc modulate its transforming potential. *Oncogene* 8, 3199-3209.
- Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J.F., Obaya, A.J., O'Connell, B.C., Mateyak, M.K., Tam, W., Kohlhuber, F., *et al.* (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2229-2234.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaoja, J., Saluz, H.P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Molecular cell* 10, 509-521.
- Hershko, A. (2004). Nobelpreis für Chemie.
- Hinchcliffe, E.H., Li, C., Thompson, E.A., Maller, J.L., and Sluder, G. (1999). Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* 283, 851-854.
- Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. (2003). Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114, 585-598.
- Honda, K., Mihara, H., Kato, Y., Yamaguchi, A., Tanaka, H., Yasuda, H., Furukawa, K., and Urano, T. (2000). Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 19, 2812-2819.
- Horn, V., Thelu, J., Garcia, A., Albiges-Rizo, C., Block, M.R., and Viallet, J. (2007). Functional interaction of Aurora-A and PP2A during mitosis. *Molecular biology of the cell* 18, 1233-1241.
- <http://pedsurg.ucsf.edu/conditions--procedures/pediatric-cancer.aspx>.
- Hu, H.M., Chuang, C.K., Lee, M.J., Tseng, T.C., and Tang, T.K. (2000). Genomic organization, expression, and chromosome localization of a third aurora-related kinase gene, Aie1. *DNA and cell biology* 19, 679-688.
- Huang, M., and Weiss, W.A. (2013). Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3, a014415.
- Huang, M.J., Cheng, Y.C., Liu, C.R., Lin, S., and Liu, H.E. (2006). A small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, induces cell-cycle arrest, apoptosis, and myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia. *Experimental hematology* 34, 1480-1489.
- Huang, Y.H., Wu, C.C., Chou, C.K., and Huang, C.Y. (2011). A translational regulator, PUM2, promotes both protein stability and kinase activity of Aurora-A. *PLoS one* 6, e19718.
- Huck, J.J., Zhang, M., McDonald, A., Bowman, D., Hoar, K.M., Stringer, B., Ecsedy, J., Manfredi, M.G., and Hyer, M.L. (2010). MLN8054, an inhibitor of Aurora A kinase, induces senescence in human tumor cells both in vitro and in vivo. *Molecular cancer research : MCR* 8, 373-384.
- Hunt, T. (2001). Nobelpreis für Medizin.

- Hutterer, A., Berdnik, D., Wirtz-Peitz, F., Zigman, M., Schleiffer, A., and Knoblich, J.A. (2006). Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Developmental cell* 11, 147-157.
- Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R.S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A.W., *et al.* (2011). SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* 471, 104-109.
- Isola, J.J., Kallioniemi, O.P., Chu, L.W., Fuqua, S.A., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K., and Waldman, F.M. (1995). Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *The American journal of pathology* 147, 905-911.
- Jeng, Y.M., Peng, S.Y., Lin, C.Y., and Hsu, H.C. (2004). Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 2065-2071.
- Jiang, S., Katayama, H., Wang, J., Li, S.A., Hong, Y., Radvanyi, L., Li, J.J., and Sen, S. (2010). Estrogen-induced aurora kinase-A (AURKA) gene expression is activated by GATA-3 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Hormones & cancer* 1, 11-20.
- Jin, S., Wang, X., Tong, T., Zhang, D., Shi, J., Chen, J., and Zhan, Q. (2015). Aurora-A enhances malignant development of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by phosphorylating beta-catenin. *Molecular oncology* 9, 249-259.
- Johnson, E.O., Chang, K.H., Ghosh, S., Venkatesh, C., Giger, K., Low, P.S., and Shah, K. (2012). LIMK2 is a crucial regulator and effector of Aurora-A-kinase-mediated malignancy. *Journal of cell science* 125, 1204-1216.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Piper, J., Tanner, M., Stokke, T., Chen, L., Smith, H.S., Pinkel, D., Gray, J.W., and Waldman, F.M. (1994). Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 2156-2160.
- Kaneko, Y., Kanda, N., Maseki, N., Sakurai, M., Tsuchida, Y., Takeda, T., Okabe, I., and Sakurai, M. (1987). Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas. *Cancer research* 47, 311-318.
- Kang, J., Rychahou, P.G., Ishola, T.A., Mourot, J.M., Evers, B.M., and Chung, D.H. (2008). N-myc is a novel regulator of PI3K-mediated VEGF expression in neuroblastoma. *Oncogene* 27, 3999-4007.
- Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, Z.M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, R.B., Czerniak, B.A., and Sen, S. (2004). Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nature genetics* 36, 55-62.
- Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M., and Sen, S. (2001). Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *The Journal of biological chemistry* 276, 46219-46224.
- Kato, G.J., Barrett, J., Villa-Garcia, M., and Dang, C.V. (1990). An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Molecular and cellular biology* 10, 5914-5920.

- Keen, N., and Taylor, S. (2004). Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nature reviews Cancer* 4, 927-936.
- Kenney, A.M., Cole, M.D., and Rowitch, D.H. (2003). Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* 130, 15-28.
- Kenney, A.M., Widlund, H.R., and Rowitch, D.H. (2004). Hedgehog and PI-3 kinase signaling converge on Nmyc1 to promote cell cycle progression in cerebellar neuronal precursors. *Development* 131, 217-228.
- Kim, H.T., Kim, K.P., Lledias, F., Kisselev, A.F., Scaglione, K.M., Skowyra, D., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L. (2007). Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *The Journal of biological chemistry* 282, 17375-17386.
- Kim, Y.H., Girard, L., Giacomini, C.P., Wang, P., Hernandez-Boussard, T., Tibshirani, R., Minna, J.D., and Pollack, J.R. (2006). Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. *Oncogene* 25, 130-138.
- Knoepfler, P.S., Cheng, P.F., and Eisenman, R.N. (2002). N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes & development* 16, 2699-2712.
- Koepp, D.M., Schaefer, L.K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2001). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 294, 173-177.
- Kohl, N.E., Kanda, N., Schreck, R.R., Bruns, G., Latt, S.A., Gilbert, F., and Alt, F.W. (1983). Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35, 359-367.
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry* 81, 203-229.
- Koyama, H., Zhuang, T., Light, J.E., Kolla, V., Higashi, M., McGrady, P.W., London, W.B., and Brodeur, G.M. (2012). Mechanisms of CHD5 Inactivation in neuroblastomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 1588-1597.
- Kramps, C., Strieder, V., Sapetschnig, A., Suske, G., and Lutz, W. (2004). E2F and Sp1/Sp3 Synergize but are not sufficient to activate the MYCN gene in neuroblastomas. *The Journal of biological chemistry* 279, 5110-5117.
- Kufer, T.A., Sillje, H.H., Korner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P., and Nigg, E.A. (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *The Journal of cell biology* 158, 617-623.
- Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H., and Hirota, T. (2003). CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Developmental cell* 5, 853-864.

- Kurland, J.F., and Tansey, W.P. (2008). Myc-mediated transcriptional repression by recruitment of histone deacetylase. *Cancer research* 68, 3624-3629.
- Kushner, B.H., Gilbert, F., and Helson, L. (1986). Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations. *Cancer* 57, 1887-1893.
- Kwon, Y.W., Kim, I.J., Wu, D., Lu, J., Stock, W.A., Jr., Liu, Y., Huang, Y., Kang, H.C., DelRosario, R., Jen, K.Y., *et al.* (2012). Pten regulates Aurora-A and cooperates with Fbxw7 in modulating radiation-induced tumor development. *Molecular cancer research : MCR* 10, 834-844.
- Lacey, K.R., Jackson, P.K., and Stearns, T. (1999). Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2817-2822.
- Lane, H.A., and Nigg, E.A. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *The Journal of cell biology* 135, 1701-1713.
- Lasry, A., and Ben-Neriah, Y. (2015). Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. *Trends in immunology* 36, 217-228.
- Lazarova, D.L., Spengler, B.A., Biedler, J.L., and Ross, R.A. (1999). HuD, a neuronal-specific RNA-binding protein, is a putative regulator of N-myc pre-mRNA processing/stability in malignant human neuroblasts. *Oncogene* 18, 2703-2710.
- Lee, W.H., Murphree, A.L., and Benedict, W.F. (1984). Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* 309, 458-460.
- Lens, S.M., Voest, E.E., and Medema, R.H. (2010). Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nature reviews Cancer* 10, 825-841.
- Li, Y., Yang, Y., Lu, Y., Herman, J.G., Brock, M.V., Zhao, P., and Guo, M. (2015). Predictive value of CHFR and MLH1 methylation in human gastric cancer. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 18, 280-287.
- Lim, S.K., and Gopalan, G. (2007a). Antizyme1 mediates AURKAIP1-dependent degradation of Aurora-A. *Oncogene* 26, 6593-6603.
- Lim, S.K., and Gopalan, G. (2007b). Aurora-A kinase interacting protein 1 (AURKAIP1) promotes Aurora-A degradation through an alternative ubiquitin-independent pathway. *The Biochemical journal* 403, 119-127.
- Lin, C.Y., Loven, J., Rahl, P.B., Paranal, R.M., Burge, C.B., Bradner, J.E., Lee, T.I., and Young, R.A. (2012). Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* 151, 56-67.
- Lindqvist, A., Kallstrom, H., Lundgren, A., Barsoum, E., and Rosenthal, C.K. (2005). Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *The Journal of cell biology* 171, 35-45.
- Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V., and Medema, R.H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *The Journal of cell biology* 185, 193-202.

- Littlepage, L.E., and Ruderman, J.V. (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes & development* 16, 2274-2285.
- Littlepage, L.E., Wu, H., Andresson, T., Deanehan, J.K., Amundadottir, L.T., and Ruderman, J.V. (2002). Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15440-15445.
- Liu, Q., Kaneko, S., Yang, L., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Chen, J., and Cheng, J.Q. (2004). Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *The Journal of biological chemistry* 279, 52175-52182.
- Lorenzo, C., Liao, Q., Hardwicke, M.A., and Ducommun, B. (2009). Pharmacological inhibition of aurora-A but not aurora-B impairs interphase microtubule dynamics. *Cell cycle* 8, 1733-1737.
- Lu, L., Han, H., Tian, Y., Li, W., Zhang, J., Feng, M., and Li, Y. (2014). Aurora kinase A mediates c-Myc's oncogenic effects in hepatocellular carcinoma. *Molecular carcinogenesis*.
- Lu, L.Y., Wood, J.L., Ye, L., Minter-Dykhouse, K., Saunders, T.L., Yu, X., and Chen, J. (2008). Aurora A is essential for early embryonic development and tumor suppression. *The Journal of biological chemistry* 283, 31785-31790.
- Lutz, W., and Schwab, M. (1997). In vivo regulation of single copy and amplified N-myc in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 15, 303-315.
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., Teruya-Feldstein, J., Reinhardt, F., Onder, T.T., Valastyan, S., *et al.* (2010). miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature cell biology* 12, 247-256.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences* 30, 630-641.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer* 9, 153-166.
- Malynn, B.A., de Alboran, I.M., O'Hagan, R.C., Bronson, R., Davidson, L., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes & development* 14, 1390-1399.
- Manfredi, M.G., Ecsedy, J.A., Meetze, K.A., Balani, S.K., Burenkova, O., Chen, W., Galvin, K.M., Hoar, K.M., Huck, J.J., LeRoy, P.J., *et al.* (2007). Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4106-4111.
- Manohar, C.F., Short, M.L., Nguyen, A., Nguyen, N.N., Chagnovich, D., Yang, Q., and Cohn, S.L. (2002). HuD, a neuronal-specific RNA-binding protein, increases the in vivo stability of MYCN RNA. *The Journal of biological chemistry* 277, 1967-1973.
- Mao, J.H., Kim, I.J., Wu, D., Climent, J., Kang, H.C., DelRosario, R., and Balmain, A. (2008). FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression. *Science* 321, 1499-1502.

- Maris, J.M. (2010). Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine* 362, 2202-2211.
- Maris, J.M., Kyemba, S.M., Rebbeck, T.R., White, P.S., Sulman, E.P., Jensen, S.J., Allen, C., Biegel, J.A., Yanofsky, R.A., Feldman, G.L., *et al.* (1996). Familial predisposition to neuroblastoma does not map to chromosome band 1p36. *Cancer research* 56, 3421-3425.
- Maris, J.M., and Matthay, K.K. (1999). Molecular biology of neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17, 2264-2279.
- Maris, J.M., Morton, C.L., Gorlick, R., Kolb, E.A., Lock, R., Carol, H., Keir, S.T., Reynolds, C.P., Kang, M.H., Wu, J., *et al.* (2010). Initial testing of the aurora kinase A inhibitor MLN8237 by the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP). *Pediatric blood & cancer* 55, 26-34.
- Marshall, G.M., Liu, P.Y., Gherardi, S., Scarlett, C.J., Bedalov, A., Xu, N., Iraci, N., Valli, E., Ling, D., Thomas, W., *et al.* (2011). SIRT1 promotes N-Myc oncogenesis through a positive feedback loop involving the effects of MKP3 and ERK on N-Myc protein stability. *PLoS genetics* 7, e1002135.
- Martin, A., Odajima, J., Hunt, S.L., Dubus, P., Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer cell* 7, 591-598.
- Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., and Saya, H. (2003). Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 51786-51795.
- Matulonis, U.A., Sharma, S., Ghamande, S., Gordon, M.S., Del Prete, S.A., Ray-Coquard, I., Kutarska, E., Liu, H., Fingert, H., Zhou, X., *et al.* (2012). Phase II study of MLN8237 (alisertib), an investigational Aurora A kinase inhibitor, in patients with platinum-resistant or -refractory epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma. *Gynecologic oncology* 127, 63-69.
- Megison, M.L., Stewart, J.E., Nabers, H.C., Gillory, L.A., and Beierle, E.A. (2013). FAK inhibition decreases cell invasion, migration and metastasis in MYCN amplified neuroblastoma. *Clinical & experimental metastasis* 30, 555-568.
- Melichar, B., Adenis, A., Lockhart, A.C., Bennouna, J., Dees, E.C., Kayaleh, O., Obermannova, R., DeMichele, A., Zatloukal, P., Zhang, B., *et al.* (2015). Safety and activity of alisertib, an investigational aurora kinase A inhibitor, in patients with breast cancer, small-cell lung cancer, non-small-cell lung cancer, head and neck squamous-cell carcinoma, and gastro-oesophageal adenocarcinoma: a five-arm phase 2 study. *The lancet oncology* 16, 395-405.
- Mendez, R., Murthy, K.G., Ryan, K., Manley, J.L., and Richter, J.D. (2000). Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. *Molecular cell* 6, 1253-1259.
- Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E.A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *The EMBO journal* 21, 483-492.

- Mizukami, Y., Nonomura, A., Takizawa, T., Noguchi, M., Michigishi, T., Nakamura, S., and Ishizaki, T. (1995). N-myc protein expression in human breast carcinoma: prognostic implications. *Anticancer research* 15, 2899-2905.
- Molenaar, J.J., Domingo-Fernandez, R., Ebus, M.E., Lindner, S., Koster, J., Drabek, K., Mestdagh, P., van Sluis, P., Valentijn, L.J., van Nes, J., *et al.* (2012). LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nature genetics* 44, 1199-1206.
- Molofsky, A.V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.K., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425, 962-967.
- Morgenstern, J.P., and Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic acids research* 18, 3587-3596.
- Mori, D., Yamada, M., Mimori-Kiyosue, Y., Shirai, Y., Suzuki, A., Ohno, S., Saya, H., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2009). An essential role of the aPKC-Aurora A-NDEL1 pathway in neurite elongation by modulation of microtubule dynamics. *Nature cell biology* 11, 1057-1068.
- Mori, D., Yano, Y., Toyo-oka, K., Yoshida, N., Yamada, M., Muramatsu, M., Zhang, D., Saya, H., Toyoshima, Y.Y., Kinoshita, K., *et al.* (2007). NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Molecular and cellular biology* 27, 352-367.
- Mosquera, J.M., Beltran, H., Park, K., MacDonald, T.Y., Robinson, B.D., Tagawa, S.T., Perner, S., Bismar, T.A., Erbersdobler, A., Dhir, R., *et al.* (2013). Concurrent AURKA and MYCN gene amplifications are harbingers of lethal treatment-related neuroendocrine prostate cancer. *Neoplasia* 15, 1-10.
- Mugrauer, G., Alt, F.W., and Ekblom, P. (1988). N-myc proto-oncogene expression during organogenesis in the developing mouse as revealed by in situ hybridization. *The Journal of cell biology* 107, 1325-1335.
- Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2010). Reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Advances in experimental medicine and biology* 695, 215-224.
- Nateri, A.S., Riera-Sans, L., Da Costa, C., and Behrens, A. (2004). The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science* 303, 1374-1378.
- Nath, D., and Shadan, S. (2009). The ubiquitin system. *Nature* 458, 421.
- Nau, M.M., Brooks, B.J., Jr., Carney, D.N., Gazdar, A.F., Battey, J.F., Sausville, E.A., and Minna, J.D. (1986). Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 1092-1096.
- NB97, Neuroblastomstudie (2002).
- NCT00249301 (2008). ClinicalTrials.gov.

- Nie, Z., Hu, G., Wei, G., Cui, K., Yamane, A., Resch, W., Wang, R., Green, D.R., Tessarollo, L., Casellas, R., *et al.* (2012). c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* 151, 68-79.
- Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 21-32.
- Nikonova, A.S., Astsaturon, I., Serebriiskii, I.G., Dunbrack, R.L., Jr., and Golemis, E.A. (2013). Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 661-687.
- Nilsson, J.A., and Cleveland, J.L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22, 9007-9021.
- Nowacki, S., Skowron, M., Oberthuer, A., Fagin, A., Voth, H., Brors, B., Westermann, F., Eggert, A., Hero, B., Berthold, F., *et al.* (2008). Expression of the tumour suppressor gene CADM1 is associated with favourable outcome and inhibits cell survival in neuroblastoma. *Oncogene* 27, 3329-3338.
- Nowakowski, J., Cronin, C.N., McRee, D.E., Knuth, M.W., Nelson, C.G., Pavletich, N.P., Rogers, J., Sang, B.C., Scheibe, D.N., Swanson, R.V., *et al.* (2002). Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography. *Structure* 10, 1659-1667.
- Nurse, P. (2001). Nobelpreis für Medizin.
- Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M., and Lendahl, U. (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *The Journal of biological chemistry* 276, 35847-35853.
- Oberthuer, A., Juraeva, D., Li, L., Kahlert, Y., Westermann, F., Eils, R., Berthold, F., Shi, L., Wolfinger, R.D., Fischer, M., *et al.* (2010). Comparison of performance of one-color and two-color gene-expression analyses in predicting clinical endpoints of neuroblastoma patients. *The pharmacogenomics journal* 10, 258-266.
- Ochiai, H., Takenobu, H., Nakagawa, A., Yamaguchi, Y., Kimura, M., Ohira, M., Okimoto, Y., Fujimura, Y., Koseki, H., Kohno, Y., *et al.* (2010). Bmi1 is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene* 29, 2681-2690.
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J.L., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nature genetics* 35, 25-31.
- Otto, T., Horn, S., Brockmann, M., Eilers, U., Schuttrumpf, L., Popov, N., Kenney, A.M., Schulte, J.H., Beijersbergen, R., Christiansen, H., *et al.* (2009). Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer cell* 15, 67-78.
- Park, D., Xiang, A.P., Mao, F.F., Zhang, L., Di, C.G., Liu, X.M., Shao, Y., Ma, B.F., Lee, J.H., Ha, K.S., *et al.* (2010). Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem cells* 28, 2162-2171.

- Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., *et al.* (2004). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Molecular and cellular biology* 24, 10826-10834.
- Perez-Roger, I., Kim, S.H., Griffiths, B., Sewing, A., and Land, H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *The EMBO journal* 18, 5310-5320.
- Pertel, T., Hausmann, S., Morger, D., Zuger, S., Guerra, J., Lascano, J., Reinhard, C., Santoni, F.A., Uchil, P.D., Chatel, L., *et al.* (2011). TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* 472, 361-365.
- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F., and Eilers, M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *The EMBO journal* 16, 5672-5686.
- Peverali, F.A., Orioli, D., Tonon, L., Ciana, P., Bunone, G., Negri, M., and Della-Valle, G. (1996). Retinoic acid-induced growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells are counteracted by N-myc and enhanced by max overexpressions. *Oncogene* 12, 457-462.
- Pfleger, C.M., and Kirschner, M.W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes & development* 14, 655-665.
- Popov, N., Schulein, C., Jaenicke, L.A., and Eilers, M. (2010). Ubiquitylation of the amino terminus of Myc by SCF(beta-TrCP) antagonizes SCF(Fbw7)-mediated turnover. *Nature cell biology* 12, 973-981.
- Popov, N., Wanzel, M., Madiredjo, M., Zhang, D., Beijersbergen, R., Bernards, R., Moll, R., Elledge, S.J., and Eilers, M. (2007). The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. *Nature cell biology* 9, 765-774.
- Pugacheva, E.N., and Golemis, E.A. (2005). The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nature cell biology* 7, 937-946.
- Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., and Golemis, E.A. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129, 1351-1363.
- Puissant, A., Frumm, S.M., Alexe, G., Bassil, C.F., Qi, J., Chanthery, Y.H., Nekritz, E.A., Zeid, R., Gustafson, W.C., Greninger, P., *et al.* (2013). Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition. *Cancer discovery* 3, 308-323.
- Qin, L., Tong, T., Song, Y., Xue, L., Fan, F., and Zhan, Q. (2009). Aurora-A interacts with Cyclin B1 and enhances its stability. *Cancer letters* 275, 77-85.
- Raabe, E.H., Laudenslager, M., Winter, C., Wasserman, N., Cole, K., LaQuaglia, M., Maris, D.J., Mosse, Y.P., and Maris, J.M. (2008). Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene* 27, 469-476.
- Rahl, P.B., Lin, C.Y., Seila, A.C., Flynn, R.A., McCuine, S., Burge, C.B., Sharp, P.A., and Young, R.A. (2010). c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 141, 432-445.

- Rannou, Y., Troadec, M.B., Petretti, C., Hans, F., Dutertre, S., Dimitrov, S., and Prigent, C. (2008). Localization of aurora A and aurora B kinases during interphase: role of the N-terminal domain. *Cell cycle* 7, 3012-3020.
- Rose, I. (2004). Nobelpreis für Chemie.
- Ross, R.A., Lazarova, D.L., Manley, G.T., Smitt, P.S., Spengler, B.A., Posner, J.B., and Biedler, J.L. (1997). HuD, a neuronal-specific RNA-binding protein, is a potential regulator of MYCN expression in human neuroblastoma cells. *European journal of cancer* 33, 2071-2074.
- Rushlow, D.E., Mol, B.M., Kennett, J.Y., Yee, S., Pajovic, S., Theriault, B.L., Prigoda-Lee, N.L., Spencer, C., Dimaras, H., Corson, T.W., *et al.* (2013). Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: genomic, gene expression, and clinical studies. *The lancet oncology* 14, 327-334.
- Sabo, A., and Amati, B. (2014). Genome recognition by MYC. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4.
- Sanbhnani, S., and Yeong, F.M. (2012). CHFR: a key checkpoint component implicated in a wide range of cancers. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 1669-1687.
- Sardon, T., Pache, R.A., Stein, A., Molina, H., Vernos, I., and Aloy, P. (2010). Uncovering new substrates for Aurora A kinase. *EMBO reports* 11, 977-984.
- Sasai, K., Parant, J.M., Brandt, M.E., Carter, J., Adams, H.P., Stass, S.A., Killary, A.M., Katayama, H., and Sen, S. (2008). Targeted disruption of Aurora A causes abnormal mitotic spindle assembly, chromosome misalignment and embryonic lethality. *Oncogene* 27, 4122-4127.
- Schoenfeld, A.R., Apgar, S., Dolios, G., Wang, R., and Aaronson, S.A. (2004). BRCA2 is ubiquitinated in vivo and interacts with USP11, a deubiquitinating enzyme that exhibits prosurvival function in the cellular response to DNA damage. *Molecular and cellular biology* 24, 7444-7455.
- Schüring, J. (2003). Wie viele Zellen hat der Mensch. *Spektrum.de*.
- Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., and Trent, J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305, 245-248.
- Schwab, M., Westermann, F., Hero, B., and Berthold, F. (2003). Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The lancet oncology* 4, 472-480.
- Schweigerer, L., Breit, S., Wenzel, A., Tsunamoto, K., Ludwig, R., and Schwab, M. (1990). Augmented MYCN expression advances the malignant phenotype of human neuroblastoma cells: evidence for induction of autocrine growth factor activity. *Cancer research* 50, 4411-4416.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J.R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & development* 14, 2501-2514.

- Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S.E., Wong, K.Y., and Hammond, D. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *The New England journal of medicine* *313*, 1111-1116.
- Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.Y., Yates, J.R., and Fang, G. (2008). Bora and the kinase Aurora cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* *320*, 1655-1658.
- Seoane, J., Le, H.V., and Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* *419*, 729-734.
- Serra, R., Pelton, R.W., and Moses, H.L. (1994). TGF beta 1 inhibits branching morphogenesis and N-myc expression in lung bud organ cultures. *Development* *120*, 2153-2161.
- Shang, X., Burlingame, S.M., Okcu, M.F., Ge, N., Russell, H.V., Egler, R.A., David, R.D., Vasudevan, S.A., Yang, J., and Nuchtern, J.G. (2009). Aurora A is a negative prognostic factor and a new therapeutic target in human neuroblastoma. *Molecular cancer therapeutics* *8*, 2461-2469.
- Shi, Y., Solomon, L.R., Pereda-Lopez, A., Giranda, V.L., Luo, Y., Johnson, E.F., Shoemaker, A.R., Leverson, J., and Liu, X. (2011). Ubiquitin-specific cysteine protease 2a (USP2a) regulates the stability of Aurora-A. *The Journal of biological chemistry* *286*, 38960-38968.
- Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V., Roald, B., Stram, D.O., Gerbing, R.B., Lukens, J.N., Matthay, K.K., *et al.* (1999). The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* *86*, 364-372.
- Shimada, H., Chatten, J., Newton, W.A., Jr., Sachs, N., Hamoudi, A.B., Chiba, T., Marsden, H.B., and Misugi, K. (1984). Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute* *73*, 405-416.
- Shimomura, T., Hasako, S., Nakatsuru, Y., Mita, T., Ichikawa, K., Kodera, T., Sakai, T., Nambu, T., Miyamoto, M., Takahashi, I., *et al.* (2010). MK-5108, a highly selective Aurora-A kinase inhibitor, shows antitumor activity alone and in combination with docetaxel. *Molecular cancer therapeutics* *9*, 157-166.
- Sjostrom, S.K., Finn, G., Hahn, W.C., Rowitch, D.H., and Kenney, A.M. (2005). The Cdk1 complex plays a prime role in regulating N-myc phosphorylation and turnover in neural precursors. *Developmental cell* *9*, 327-338.
- Slack, A.D., Chen, Z., Ludwig, A.D., Hicks, J., and Shohet, J.M. (2007). MYCN-directed centrosome amplification requires MDM2-mediated suppression of p53 activity in neuroblastoma cells. *Cancer research* *67*, 2448-2455.
- Sloane, D.A., Trikić, M.Z., Chu, M.L., Lamers, M.B., Mason, C.S., Mueller, I., Savory, W.J., Williams, D.H., and Eyers, P.A. (2010). Drug-resistant aurora A mutants for cellular target validation of the small molecule kinase inhibitors MLN8054 and MLN8237. *ACS chemical biology* *5*, 563-576.

- Solinas-Toldo, S., Wallrapp, C., Muller-Pillasch, F., Bentz, M., Gress, T., and Lichter, P. (1996). Mapping of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma by comparative genomic hybridization. *Cancer research* 56, 3803-3807.
- Song, L., Ara, T., Wu, H.W., Woo, C.W., Reynolds, C.P., Seeger, R.C., DeClerck, Y.A., Thiele, C.J., Sposto, R., and Metelitsa, L.S. (2007). Oncogene MYCN regulates localization of NKT cells to the site of disease in neuroblastoma. *The Journal of clinical investigation* 117, 2702-2712.
- Sottile, F., Gnemmi, I., Cantilena, S., D'Acunto, W.C., and Sala, A. (2012). A chemical screen identifies the chemotherapeutic drug topotecan as a specific inhibitor of the B-MYB/MYCN axis in neuroblastoma. *Oncotarget* 3, 535-545.
- Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C.P., Finch, A.J., Murphy, D.J., Sodik, N.M., Karnezis, A.N., Swigart, L.B., Nasi, S., and Evan, G.I. (2008). Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature* 455, 679-683.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., *et al.* (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nature cell biology* 3, 392-399.
- Strieder, V., and Lutz, W. (2003). E2F proteins regulate MYCN expression in neuroblastomas. *The Journal of biological chemistry* 278, 2983-2989.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., *et al.* (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15545-15550.
- Sugihara, E., Kanai, M., Matsui, A., Onodera, M., Schwab, M., and Miwa, M. (2004). Enhanced expression of MYCN leads to centrosome hyperamplification after DNA damage in neuroblastoma cells. *Oncogene* 23, 1005-1009.
- Swartling, F.J., Grimmer, M.R., Hackett, C.S., Northcott, P.A., Fan, Q.W., Goldenberg, D.D., Lau, J., Masic, S., Nguyen, K., Yakovenko, S., *et al.* (2010). Pleiotropic role for MYCN in medulloblastoma. *Genes & development* 24, 1059-1072.
- Takeda (2015). Takeda Announces Termination of Alisertib Phase 3 Trial in Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma.
- Tanaka, M., Ueda, A., Kanamori, H., Ideguchi, H., Yang, J., Kitajima, S., and Ishigatsubo, Y. (2002). Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1. *The Journal of biological chemistry* 277, 10719-10726.
- Tanaka, N., and Fukuzawa, M. (2008). MYCN downregulates integrin alpha1 to promote invasion of human neuroblastoma cells. *International journal of oncology* 33, 815-821.
- Teng, C.L., Hsieh, Y.C., Phan, L., Shin, J., Gully, C., Velazquez-Torres, G., Skerl, S., Yeung, S.C., Hsu, S.L., and Lee, M.H. (2012). FBXW7 is involved in Aurora B degradation. *Cell cycle* 11, 4059-4068.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (2003). Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer cell* 3, 233-245.

- Thiele, C.J., Reynolds, C.P., and Israel, M.A. (1985). Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313, 404-406.
- Toji, S., Yabuta, N., Hosomi, T., Nishihara, S., Kobayashi, T., Suzuki, S., Tamai, K., and Nojima, H. (2004). The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 9, 383-397.
- Tonelli, R., McIntyre, A., Camerin, C., Walters, Z.S., Di Leo, K., Selfe, J., Purgato, S., Missiaglia, E., Tortori, A., Renshaw, J., *et al.* (2012). Antitumor activity of sustained N-myc reduction in rhabdomyosarcomas and transcriptional block by antigene therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 796-807.
- Toya, M., Terasawa, M., Nagata, K., Iida, Y., and Sugimoto, A. (2011). A kinase-independent role for Aurora A in the assembly of mitotic spindle microtubules in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nature cell biology* 13, 708-714.
- Trochet, D., Hong, S.J., Lim, J.K., Brunet, J.F., Munnich, A., Kim, K.S., Lyonnet, S., Goridis, C., and Amiel, J. (2005). Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction. *Human molecular genetics* 14, 3697-3708.
- Tsunematsu, T., Takihara, Y., Ishimaru, N., Pagano, M., Takata, T., and Kudo, Y. (2013). Aurora-A controls pre-replicative complex assembly and DNA replication by stabilizing geminin in mitosis. *Nature communications* 4, 1885.
- Tweddle, D.A., Malcolm, A.J., Cole, M., Pearson, A.D., and Lunec, J. (2001). p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G(1) arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells. *The American journal of pathology* 158, 2067-2077.
- van Golen, C.M., Soules, M.E., Grauman, A.R., and Feldman, E.L. (2003). N-Myc overexpression leads to decreased beta1 integrin expression and increased apoptosis in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 22, 2664-2673.
- Varmus, H. (1989). Nobelpreis für Medizin
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation* 36, 131-149.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J., and Luscher, B. (2006). The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 281, 34725-34729.
- Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J., and Lees, E. (2000). The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* 19, 4906-4916.
- Walz, S., Lorenzin, F., Morton, J., Wiese, K.E., von Eyss, B., Herold, S., Rycak, L., Dumay-Odelot, H., Karim, S., Bartkuhn, M., *et al.* (2014). Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature* 511, 483-487.
- Wang, M., Zhou, C., Sun, Q., Cai, R., Li, Y., Wang, D., and Gong, L. (2013). ALK amplification and protein expression predict inferior prognosis in neuroblastomas. *Experimental and molecular pathology* 95, 124-130.

- Wanzel, M., Russ, A.C., Kleine-Kohlbrecher, D., Colombo, E., Pelicci, P.G., and Eilers, M. (2008). A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nature cell biology* *10*, 1051-1061.
- Wartiovaara, K., Barnabe-Heider, F., Miller, F.D., and Kaplan, D.R. (2002). N-myc promotes survival and induces S-phase entry of postmitotic sympathetic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *22*, 815-824.
- Wei, J.S., Song, Y.K., Durinck, S., Chen, Q.R., Cheuk, A.T., Tsang, P., Zhang, Q., Thiele, C.J., Slack, A., Shohet, J., *et al.* (2008). The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene* *27*, 5204-5213.
- Weiss, W.A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B.G., and Bishop, J.M. (1997). Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *The EMBO journal* *16*, 2985-2995.
- Welcker, M., Orian, A., Jin, J., Grim, J.E., Harper, J.W., Eisenman, R.N., and Clurman, B.E. (2004). The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 9085-9090.
- Williams, R.D., Al-Saadi, R., Chagtai, T., Popov, S., Messahel, B., Sebire, N., Gessler, M., Wegert, J., Graf, N., Leuschner, I., *et al.* (2010). Subtype-specific FBXW7 mutation and MYCN copy number gain in Wilms' tumor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *16*, 2036-2045.
- Wiltshire, T.D., Lovejoy, C.A., Wang, T., Xia, F., O'Connor, M.J., and Cortez, D. (2010). Sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition identifies ubiquitin-specific peptidase 11 (USP11) as a regulator of DNA double-strand break repair. *The Journal of biological chemistry* *285*, 14565-14571.
- Wolf, E., Gebhardt, A., Kawauchi, D., Walz, S., von Eyss, B., Wagner, N., Renninger, C., Krohne, G., Asan, E., Roussel, M.F., *et al.* (2013). Miz1 is required to maintain autophagic flux. *Nature communications* *4*, 2535.
- Wong, D.J., Liu, H., Ridky, T.W., Cassarino, D., Segal, E., and Chang, H.Y. (2008). Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell stem cell* *2*, 333-344.
- Wu, C.C., Yang, T.Y., Yu, C.T., Phan, L., Ivan, C., Sood, A.K., Hsu, S.L., and Lee, M.H. (2012). p53 negatively regulates Aurora A via both transcriptional and posttranslational regulation. *Cell cycle* *11*, 3433-3442.
- Wu, C.H., van Riggelen, J., Yetil, A., Fan, A.C., Bachireddy, P., and Felsher, D.W. (2007). Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 13028-13033.
- Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M.J., von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., and Larsson, L.G. (2003). Myc represses differentiation-induced p21^{CIP1} expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* *22*, 351-360.

- Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T., Nishiyama, M., Tsunematsu, R., Imaki, H., Ishida, N., Okumura, F., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2004). Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *The EMBO journal* 23, 2116-2125.
- Yao, J.E., Yan, M., Guan, Z., Pan, C.B., Xia, L.P., Li, C.X., Wang, L.H., Long, Z.J., Zhao, Y., Li, M.W., *et al.* (2009). Aurora-A down-regulates IkappaBalpha via Akt activation and interacts with insulin-like growth factor-1 induced phosphatidylinositol 3-kinase pathway for cancer cell survival. *Molecular cancer* 8, 95.
- Ye, X., Nalepa, G., Welcker, M., Kessler, B.M., Spooner, E., Qin, J., Elledge, S.J., Clurman, B.E., and Harper, J.W. (2004). Recognition of phosphodegron motifs in human cyclin E by the SCF(Fbw7) ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry* 279, 50110-50119.
- Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W.C., Stukenberg, P.T., Shenolikar, S., Uchida, T., *et al.* (2004). A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nature cell biology* 6, 308-318.
- Yin, N., Shi, J., Wang, D., Tong, T., Wang, M., Fan, F., and Zhan, Q. (2012). IQGAP1 interacts with Aurora-A and enhances its stability and its role in cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 421, 64-69.
- Yu, C.T., Hsu, J.M., Lee, Y.C., Tsou, A.P., Chou, C.K., and Huang, C.Y. (2005a). Phosphorylation and stabilization of HURP by Aurora-A: implication of HURP as a transforming target of Aurora-A. *Molecular and cellular biology* 25, 5789-5800.
- Yu, M., Liu K., Mao Z., Luo J., Gu W., Zhao W. (2015) USP11 is a negative regulator to yH2AX Ubiquitilation by RNF8/RNF168. *J.Biol.Chem.*
- Yu, X., Minter-Dykhouse, K., Malureanu, L., Zhao, W.M., Zhang, D., Merkle, C.J., Ward, I.M., Saya, H., Fang, G., van Deursen, J., *et al.* (2005b). Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation. *Nature genetics* 37, 401-406.
- Zaizen, Y., Taniguchi, S., Noguchi, S., and Suita, S. (1993). The effect of N-myc amplification and expression on invasiveness of neuroblastoma cells. *Journal of pediatric surgery* 28, 766-769.
- Zeng, L., and Zhou, M.M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS letters* 513, 124-128.
- Zhang, D., Hirota, T., Marumoto, T., Shimizu, M., Kunitoku, N., Sasayama, T., Arima, Y., Feng, L., Suzuki, M., Takeya, M., *et al.* (2004). Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene* 23, 8720-8730.
- Zhang, K., Faiola, F., and Martinez, E. (2005). Six lysine residues on c-Myc are direct substrates for acetylation by p300. *Biochemical and biophysical research communications* 336, 274-280.
- Zhao, X., Heng, J.I., Guardavaccaro, D., Jiang, R., Pagano, M., Guillemot, F., Iavarone, A., and Lasorella, A. (2008). The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein. *Nature cell biology* 10, 643-653.

Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R., and Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nature genetics* 20, 189-193.

Zirath, H., Frenzel, A., Oliynyk, G., Segerstrom, L., Westermark, U.K., Larsson, K., Munksgaard Persson, M., Hultenby, K., Lehtio, J., Einvik, C., *et al.* (2013). MYC inhibition induces metabolic changes leading to accumulation of lipid droplets in tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 10258-10263.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
ATC	Anaplastischen Schilddrüsenkrebs
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CA	Centrosomenamplifikation
cDNA	komplementäre DNA
CDS	<i>coding DNA sequence</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
dest.	destiliert
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung

g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde (<i>hour</i>)
HA	Hemagglutinin
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
IP	Immunpräzipitation
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
k	Kilo
kb	Kilobasen
L	Liter
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	Milli
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
μ	Mikro
min	Minute
mut	Muatante/mutiert
n	Nano
NSCLC	Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit Tween20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Konzentration
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
Tab.	Tabelle

<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered Saline mit Tween</i>
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
WB	Western Blot
wt	wildtyp
ZKÜ	Zellkulturüberstand

Abkürzungen für Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspariginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungen für Nukleinsäurebasen

A	Ade	Adenin
G	Gua	Guanin
C	Cyt	Cytosin
T	Thy	Thymin

9.2 Publikationsliste

Carstensen A., **Brockmann M.** and Eilers M. (2013) Myc – Proteininstabilität als Angriffsziel für zielgerichtete Therapien, *BIOspektrum*, 7, 726-729

Brockmann M., Poon E., Berry T., Carstensen A., Deubzer H.E., Rycak L., Jamin Y., Thway K., Robinson S.P., Roels F., Witt O., Fischer M., Chesler L. and Eilers M. (2013) Small Molecule Inhibitors of Aurora-A induce Proteasomal Degradation of N-Myc in Childhood Neuroblastoma, *Cancer Cell*, 24, 75-89

Otto T., Horn S., **Brockmann M.**, Eilers U., Schüttrumpf L., Popov N., Kenney A. M., Schulte J. H., Beijersbergen R., Christiansen H., Berwanger B. and Eilers M. (2009) Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in Human Neuroblastoma, *Cancer Cell*, 15, 67-78.

9.3 Lebenslauf

Markus Brockmann

Geburtsdatum-/ort 11.07.1980 in Münster

seit 09/2013

Netherlands Cancer Institute, Niederlande

Department of Biochemistry

Labor: Thijn Brummelkamp

12/2007 – 07/2013

Universität Marburg und Würzburg

Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie

Promotion: "Regulation der Proteinstabilität von N-Myc im Neuroblastom"

Betreuer: Prof. Dr. Martin Eilers

01/2007 – 09/2007

Ruhr-Universität Bochum

Herz- und Diabeteszentrum NRW

Diplomarbeit: „Analysen zur Biosynthese der extrazellulären Matrix bei systemischer Sklerodermie und immunologische Detektion der humanen Xylosyltransferase I“

Betreuer: Prof. Dr. med. Knut Kleesiek

02/2006 – 08/2006

University of Notre Dame, USA

Department of Chemistry and Biochemistry

Projekt: „RNA Processing and Localization in Xenopus oocytes“

Betreuer: Prof. PhD Paul Huber

10/2001 – 09/2007

Universität Bielefeld

Studium der Biochemie

Abschluss: Diplom Biochemiker

09/1991-06/2000

Clemens-Brentano-Gymnasium, Dülmen

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Würzburg, 30. Juli 2015

9.4 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt vor allem meinem Betreuer **Prof. Dr. Martin Eilers** für die stete Diskussionsbereitschaft, sowie die kontinuierliche Unterstützung und Förderung auch nach meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren danke ich den Mitgliedern meines *Thesis Committes*/Promotionskomitees, **Prof. Dr. Manfred Gessler**, **Prof. Dr. Thomas U. Mayer**, **Prof. Dr. Stefan Gaubatz** und **Prof. Dr. Utz Fischer**, für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die hilfreichen Vorschläge und Anregungen, sowie für die Begutachtung meiner Dr.-Arbeit.

Zudem möchte ich allen Ko-Autoren danken, insbesondere **Tobias Otto** und **Anne Carstensen**, die einen großen Anteil daran haben, dass diese Arbeit publiziert werden konnte.

Ausserdem danke ich der ganzen **AG Eilers**, **AG Popov**, **AG Wiegering**, **AG Murphy** und **AG Gallant** für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich **Renate** für die enorme Unterstützung im Labor. Ohne Dich würde ich heute noch Gele gießen. Auch ein besonderer Dank an **Steffi** für das Korrekturlesen vor anderthalb Jahren und den leckeren Weihnachtspunsch. Danke **Rosi** und **Andrea** für die ganzen organisatorischen Dinge, die neben der Laborarbeit auch wichtig sind. Vielen Dank **Theresia** für die tolle Zeit als LBN. Es gibt keinen besseren Labornachbarn als Dich. Schließlich möchte ich mich bei **Carsten**, **Elmar**, **Anneli**, **Giacomo**, **Francesca**, **Ksenia**, **Nikita** und ganz besonders bei **Laura** und **Dr. Björn von Heiß** bedanken. Ich hatte eine wunderschöne Zeit mit Euch.

Thanks to my **new lab members**, especially to **Thijn Brummelkamp** for supporting me to finish my thesis.

Katrin, vielen lieben Dank, dass du immer für mich da bist. Du bist großartig.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank **meinen Eltern** und dem Rest meiner Familie. Danke, dass ihr an mich geglaubt und mich stetig unterstützt habt.

9.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation

“Inhibition von Aurora-A als neue Therapiestrategie gegen *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome”

eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat

Ort, Datum

Unterschrift