

## Editorial

# Amplifikation von *MYCN* in Neuroblastomen: Paradigma für die klinische Anwendung einer Onkogenveränderung

M. Schwab

Institut für Experimentelle Pathologie, Deutsches Krebsforschungszentrum

### Zusammenfassung

Vermehrung der Dosis zellulärer Onkogene durch Amplifikation ist eine häufige Genomveränderung in Krebszellen. Die Anwesenheit amplifizierter zellulärer Onkogene äußert sich dabei in der Regel in typischen Chromosomenanomalien, insbesondere „double minutes“ (DMs) und „homogeneously staining regions“ (HSRs). Bei verschiedenen Formen humaner Krebserkrankungen tritt ein spezifisches Onkogen in amplifizierter Form auf. Insbesondere beim Neuroblastom, aber auch beim Brustkrebs, ist Amplifikation ein Merkmal für aggressiv wachsende Krebsformen und ein Indikator für ungünstige Prognose. Neuroblastome besitzen häufig Amplifikation des Gens *MYCN*. Die Amplifikation von *MYCN* gilt als unabhängiger Parameter zur Identifizierung von Patienten mit hohem Risiko, bei denen ein intensives Therapieschema angezeigt ist. Amplifikation von *MYCN* in Neuroblastomen ist die erste Onkogenveränderung, die praktische klinische Signifikanz erlangt hat.

### Amplifikation of *MYCN* in neuroblastomas: Paradigm for the clinical use of an oncogene alteration

Increase of the dosage of cellular oncogenes by DNA amplifications is a frequent genetic alteration of cancer cells. The presence of amplified cellular oncogenes is usually signalled by conspicuous chromosomal abnormalities, „double minutes“ (DMs) or „homogeneously staining regions“ (HSRs). Some human cancers carry a specific amplified oncogene at high incidence. Particularly in neuroblastomas and in breast cancers the amplification of cellular oncogenes has been found associated with aggressively growing cancers and is an indicator for poor prognosis. Neuroblastoma, a malignant tumor of the sympathetic nervous system of children, frequently carries amplification of the oncogene *MYCN*. The amplification of *MYCN* is of predictive value for identifying high risk neuroblastoma patients that require specific therapeutic regimen and is generally viewed as the first oncogene alteration that turned out to be of practical clinical significance.

### Einleitung

Amplifikation zellulärer Onkogene ist eine der häufigsten genetischen Veränderungen in Krebszellen. Während die normale Zelle in ihrem Genom eine Einzelkopie des Onkogens besitzt, kommt es im Genom der Krebszelle häufig zur selektiven Genvermehrung, als deren Resultat die Zelle mehrere hundert Genkopien besitzen kann. Amplifikation ist ein genetisches Ereignis auf der Ebene der DNA, als Folge der Amplifikation kommt es zur erhöhten Genexpression.

Vor allem durch Chromosomenuntersuchungen wurde die Aufmerksamkeit auf Amplifikation als genetische Veränderung in Krebszellen gelenkt. Bereits im Jahre 1965 wurden erstmals Chromosomenanomalien, die heute als „double minutes“ (DMs) bezeichnet werden, in Neuroblastomen entdeckt (Cox, Yuncken und Spriggs, 1965) (Abb. 1a). Und 1976 gelang ebenfalls in Neuroblastomzellen die Identifizierung einer „homogeneously staining region“ (HSR) in einem Markerchromosom (Biedler und Spengler, 1976) (Abb. 1b). Die Signifikanz beider Chromosomenanomalien sowie ihr genetischer Gehalt blieben lange Zeit unklar. Zwar wurden sowohl DMs als auch HSRs in verschiedenen Zelltypen als Orte von amplifizierten Genen identifiziert, welche Resistenz gegen Zytostatika, z. B. Methotrexat, bedingen (Schimke, 1984). Diese Erklärung konnte aber nicht in solchen Fällen zutreffen, in denen Krebszellen Zytostatika überhaupt nicht ausgesetzt waren. Im Jahre 1983 gelang erstmals der Nachweis, daß sowohl DMs als auch HSRs in Krebszellen Orte vielfältiger zellulärer Onkogene sind (Schwab et al. 1983a). Es zeichnet sich heute ab, daß zumindest in der Überzahl der Fälle die Chromosomenanomalien DMs und HSRs in Krebszellen amplifizierte zelluläre Onkogene an-

\* Arbeiten in meinem Labor werden gefördert durch Mittel des Haushaltes und des Sondervermögen des DKFZ, den Verein zur Förderung der Krebsforschung, die Dr. Mildred Scheel-Stiftung, die Deutsche Forschungsgemeinschaft über den Schwerpunkt „Tumorzytogenetik“ und den SFB 229 „Molekulare Mechanismen der Genexpression und Differenzierung“ und das Tumorzentrum Heidelberg-Mannheim.

Ich danke allen kooperierenden Mitgliedern der Neuroblastom-Studiengruppe für die Bereitstellung von Patientenmaterial, insbesondere C. R. Bartram (Ulm), F. Berthold (Köln), C. Bender-Götze (München), B. Dohrn (Krefeld), R. Ludwig (Heidelberg), D. Niethammer (Tübingen), H. Richm (Hannover), J. Ritter (Münster), L. Schweigerer (Heidelberg) und J. Treuner (Stuttgart). Ich danke ferner F. Berthold für die Durchsicht des Manuskripts.



**Abb. 1** Chromosomenanomalien, die Amplifikation zellulärer Onkogenen in Krebszellen signalisieren

- a. „double minutes“ (DMs) (arrowhead)  
 b. „homogeneously staining chromosomal region (HSR)“ (arrowhead)

zeigen (für eine Übersicht siehe Schwab, 1985; Schwab und Amler, 1990). Amplifikation ist offensichtlich eine genetische Veränderung, die vor allem in Zellen solider Tumoren auftritt. In Zellen hämatopoetischer Krebsformen wurde Amplifikation nur sporadisch beobachtet (Schwab und Amler, 1990).

#### MYCN Amplifikation in Neuroblastomen

Die Anwesenheit amplifizierter DNA in Neuroblastomzellen war auf der Basis von Chromosomenuntersuchungen seit langem bekannt. Aber erst 1983 konnte gezeigt werden, daß ein spezifisches Gen, MYCN in Neuroblastomen zwischen 10- und über 100fach amplifiziert ist (Schwab et al. 1983b). MYCN ist Mitglied einer Multigenfamilie dessen Prototyp das Gen MYC ist (Schwab, 1988). Mitglieder der MYC-Genfamilie liegen in verschiedenen humanen Tumortypen in amplifizierter Form vor. Dabei wurde das amplifizierte MYCN Gen ausschließlich in solchen Tumoren gefunden, die aus Zellen mit neuronalen Eigenschaften entstehen. MYCN Amplifikation tritt am häufigsten in Neuroblastomen, und in geringerer Häufigkeit in Retinoblastomen, Astrozytomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen auf (Schwab, 1988). Neuroblastome zeigten bisher ausschließlich MYCN Amplifikation, nicht aber Amplifikation eines anderen Mitgliedes der MYCN Genfamilie oder eines anderen zellulären Onkogens. Diese Spezifität deutet auf eine besondere Funktion des MYCN Gens bei der Neuroblastombildung hin.

#### Bedeutung der MYCN Amplifikation für Tumorgenese

Das MYCN Gen kodiert für ein Phosphoprotein, das im Zellkern lokalisiert ist. Als Resultat der Amplifikation kommt es zur erhöhten Expression sowohl auf der Ebene der RNA als auch des Proteins.

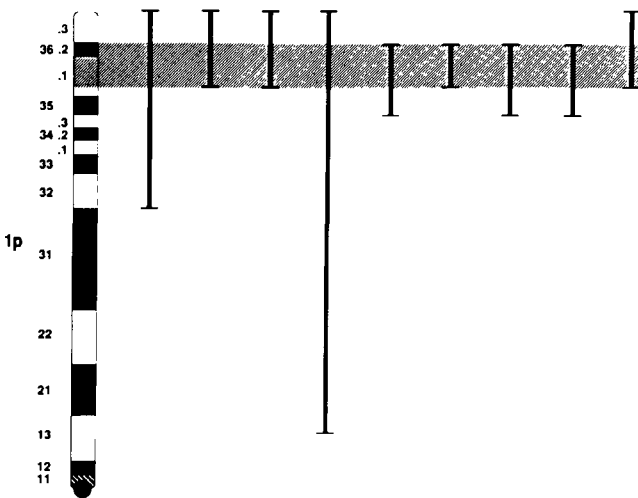
Um den Beitrag der erhöhten RNA und Proteinexpression auf das Wachstumsverhalten von Zellen abzuschätzen, wurden MYCN Expressionsvektoren in unterschiedlichen experimentellen Modellen geprüft. Diese Expressionsvektoren wurden dabei in Zellen eingeschleust und bewirken dort eine Expression entsprechend derjenigen nach Amplifikation. Die Versuche zeigten vor allem, daß erhöhte MYCN Expression einen Beitrag zur tumorigenen Konversion primärer Rattenzellen leistet (Schwab et al. 1985), etablierten, aber in der Maus nicht tumorigenen menschlichen Neuroblastomezellen Tumorigenität verleiht (Schweigerer et al. 1990), primäre Nagetierzellen immortalisiert (Schwab und Bishop, 1988), und in transgenen Mäusen Tumorgenese bedingt (Dildrop et al., 1989; Rosenbaum et al., 1989). Wenn auch diese Ergebnisse nicht direkt einen Beitrag der MYCN Amplifikation zum Neuroblastom nachweisen, so zeigen sie doch, daß abnormale, erhöhte Expression gravierenden Einfluß auf das Wachstumsverhalten von Zellen in vitro und in vivo hat.

Ein Hinweis auf einen Beitrag der Amplifikation zellulärer Onkogene zur Tumorgenese kommt auch aus unabhängigen Beobachtungen an anderen experimentellen Systemen. Versuche zur Zytostatikaresistenz haben ergeben, daß resistente Zellen die Amplifikation des Resistenzgens verlieren, sobald sie unter Zytostatika-freien Bedingungen kultiviert werden. Eine analoge Dynamik der Amplifikation läßt sich auch für das zelluläre Onkogen MYC nachweisen, das in den Zellen des Maustumors SEWA amplifiziert ist (Schwab et al., 1985). Unter Bedingungen der in vitro Kultur geht die Amplifikation verloren, und sie manifestiert sich wieder sobald die Zellen in vivo in der Maus einen Tumor bilden (Levan et al., 1977; Schwab et al., 1985). Darüber hinaus wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Grad der Amplifikation und der Tumorigenität der Zellen nachgewiesen (Martinsson et al., 1988). Generell ist also Amplifikation genetisch instabil und wird nur dann aufrechterhalten, wenn die Zellen durch Amplifikation einen Wachstumsvorteil in einer bestimmten Umgebung gewinnen. Amplifikation könnte also durch positive Modulation des Zellwachstums zur Entstehung von aggressiver wachsenden und damit höher malignen Klonen einer Tumorzellpopulation beitragen. Sie dürfte damit ein wesentliches genetisches Element im Rahmen von Konzepten über die klonale Entwicklung von Krebszellen (Nowell, 1976) und über die Progression von Tumoren (Foulds, 1958) darstellen.

Bei der Einschätzung des Stellenwertes von Amplifikation bei der Tumorgenese muß berücksichtigt werden, daß Krebszellen häufig weitere genetische Veränderungen besitzen. Beim Neuroblastom dürfte hierbei die Deletion von genetischem Material aus dem kurzen Arm des Chromosom I besonders bedeutsam sein. Die 1p Deletion wurde ursprünglich durch Chromosomenanalysen nachgewiesen (Brodeur et al., 1981) und in neuerer Zeit auf die Banden 1p36.1-2 eingengt (Martinsson et al., 1989;

Christiansen und Lampert, 1988). Durch den Einsatz polymorpher molekularer Proben gelang der Nachweis der 1p Deletion in nahezu allen bisher geprüften Neuroblastomen, auch in Fällen, in denen die Chromosomenanalyse die Deletion wegen ihrer geringen Größe nicht erkennen ließ (Abb. 2; Weith et al., 1989). Eine direkte Beziehung zwischen 1p Deletion und MYCN Amplifikation scheint aber nicht zu bestehen: Lediglich zwei von zehn Fällen mit Deletion besaßen auch Amplifikation. Darüber hinaus ist MYCN auf einem anderen Chromosom lokalisiert (2p23-24; Schwab et al., 1984).

Die Bedeutung der 1p Deletion ist bisher ungeklärt. Es wird zu prüfen sein, ob innerhalb der für molekulargenetische Analysen noch recht großen Region ein bestimmtes Gen durch die Deletion verlorengeht. Erst dann ist eine Aussage darüber möglich, ob es sich bei diesem Gen um ein „Tumor-Suppressorgen“ handelt.



**Abb. 2** Deletion genetischer Information aus dem kurzen Arm des Chromosom 1. Die Darstellung illustriert schematisch den kurzen Arm des Chromosom 1. Durch polymorphe DNA-Proben wurde gezeigt, daß die deletierte Region in unterschiedlichen Tumoren variiert (dargestellt durch senkrechte Linien). Allen Tumoren gemeinsam ist eine Konsensus-Deletion (schraffiert)



**Abb. 3** Strukturelle Anordnung amplifizierter MYCN-Genkopien in HSRs von Neuroblastomzellen. Der überwiegende Teil von MYCN-Genkopien ist als Tandemrepetition arrangiert. Dabei ist die amplifizierte DNA um ein Vielfaches größer als das MYCN Gen. In der Darstellung zeigt der Pfeil auf das MYCN Gen, der offene und solide Stern auf die linke bzw. rechte Portion der flankierenden DNA

### Struktur der amplifizierten DNA

In neuerer Zeit gelangen erstmals direkte Einblicke in die strukturelle Anordnung der amplifizierten DNA (Amler und Schwab, 1989). Es zeigte sich, daß der Umfang der amplifizierten DNA sehr viel größer ist als das MYCN Gen. Während MYCN lediglich etwa 10 Kilobasenpaare (Kbp) umfaßt, ist die amplifizierte DNA in verschiedenen Tumoren jeweils mehrere hundert Kbp bis über 1000 Kbp lang. Interessant ist dabei, daß diese langen DNA Einheiten häufig als präzise Tandemrepetitionen angeordnet sind, innerhalb derer das MYCN Gen liegt (Abb. 3). Die geordnete Struktur der amplifizierten DNA weist auf einem spezifischen Mechanismus der Amplifikation hin, der bisher nur in wenigen Elementen verstanden ist (Schwab und Amler, 1990).

### Klinische Bedeutung der MYCN Amplifikation

Wesentliche Parameter für das Neuroblastom sind das klinische Stadium und das Alter des Patienten bei der Diagnose. Patienten mit Stadium 1 und 2 Neuroblastomen haben zumeist gute Prognosen mit 75–90% 2-Jahresüberlebenszeit, bei Patienten mit Stadium 3 und 4 Tumoren ist die Prognose ungünstiger. Dabei wurden für das Stadium 3 erhebliche Unterschiede der Prognose von der US und der Deutsche Neuroblastomstudiengruppe festgestellt. Während in den USA die Prognose für Stadium 3 Tumoren ähnlich derjenigen von Stadium 4 liegt (10–30%; siehe Brodeur et al., 1984), wurde in der Bundesrepublik ein wesentlich günstigerer Wert beobachtet (um 60%; Berthold et al., 1986; Berthold, 1990). Der Grund für diesen Unterschied ist unklar. Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen haben unabhängig von einander eine signifikante Korrelation zwischen der Amplifikation von MYCN und den Stadien 3 und 4 ergeben. Diese Beziehung wurde erstmals im Rahmen einer Studie an 63 Neuroblastomen erkannt; Amplifikation wurde in keinem von 15 Stadium 1 und 2 Tumoren, aber in 24 von 48 (50%) Stadium 3 und 4 Tumoren beobachtet (Brodeur et al., 1984). Darauf folgende Untersuchungen anderer Autoren haben diese Korrelation bestätigt, kamen aber zu geringerer prozentualer Häufigkeit der Amplifikation (zwischen 20 und 30%; Bartram und Berthold, 1987; Nakagawara et al., 1988; Sansone et al., 1989).

Eine signifikante Korrelation zwischen schlechter Prognose und MYCN Amplifikation ergab sich auch bei einem Vergleich von Patienten älter und jünger als 1 Jahr. Die Prognose von Patienten über 1 Jahr, insbesondere mit Stadium 3 und 4 Tumoren, ist besonders ungünstig. In einer Studie zeigten mehr als 50% der Patienten, die älter als 1 Jahr waren, MYCN-Amplifikation, während Amplifikation bei jüngeren Patienten seltener auftrat (Nakagawara et al., 1988; für weitere Details siehe Berthold et al., 1990).

Insgesamt ist Amplifikation offensichtlich mit aggressiv wachsenden Neuroblastomen assoziiert. Es sei hier nur erwähnt, daß in neuerer Zeit eine analoge Korrelation zwischen Amplifikation des Onkogens ERBB2 und aggressiv wachsenden Formen von Brustkrebs nachgewiesen wurde (Slamon et al., 1989).

**Tab. 1** Risikogruppen beim Neuroblastom\*

Risikogruppe (% Überleben)	Tumor
A (90–100%)	Tumor lokalisiert (fast) komplett resezierbar Stadium I: mikroskopischer Resttumor möglich Stadium 2A: minimaler makroskopischer Resttumor möglich; < 10% Ausschlusskriterien: Amplifikation und/oder 1p Deletion
B (65–80%)	Tumor lokalisiert, meist nur inkomplett resezierbar Stadium 2A: makroskopischer Resttumor; < 10% Stadium 2B: ipsilateraler Lymphknotenbefall Stadium 3: Infiltration über die Mittellinie Ausschlusskriterien: Amplifikation und/oder 1p Deletion
C (20–30%)	Tumor metastasiert Risikogruppen A und B bei Nachweis von <i>MYCN</i> -Amplifikation und /oder 1p Deletion
D (75–80%)	Stadium 4s

\* Kriterien entsprechend dem Pilotprotokoll der Neuroblastomstudienengruppe NB 90 P vom 1. 8. 89 (Studienleitung F. Berthold, Köln): Die Einordnung erfolgt bei Vorliegen von *MYCN* Amplifikation oder 1p Deletion unabhängig von anderen Parametern immer in Risikogruppe C.

Gegenwärtige Therapieschemata für das Neuroblastom werden in Abhängigkeit von der Überlebensprognose durchgeführt, die auf der Basis von Tumorstadium, dem Grad der operativen Resektabilität sowie nach Analyse genetischer Veränderungen abgeschätzt wird. Die Pilotstudie der Deutschen Neuroblastomstudienengruppe empfiehlt die Therapie entsprechend Schemata, die spezifisch für jeweils eine von vier Risikogruppen sind (Tabelle 1). Risikogruppe A schließt Patienten mit einem lokalisierten Tumor ein, der zumindest zu 90% reseziert werden kann (Prognose 90–100%). Zur Risikogruppe B zählen Patienten mit einem Tumor, der über das Ursprungsorgan hinausgeht und gewöhnlich nicht vollständig beseitigt werden kann (Prognose 65–80%). Risikogruppe C schließt Patienten mit einem metastasierenden Tumor ein, oder einem lokalisierten Tumor der auch durch 4 Zyklen von Chemotherapie nicht in Regression übergeht (Prognose 20–30%). Zur Risikogruppe D zählen ausschließlich Patienten mit Stadium IVs Tumoren, die häufig spontane Regression zeigen (Prognose 75–80%).

Patienten der Risikogruppe C werden entsprechend dem intensivsten Therapieschema behandelt. Sowohl Amplifikation von *MYCN* als auch 1p-Deletion sind Ausschlusskriterien für eine Aufnahme in Risikogruppen mit günstiger Prognose, auch wenn der Tumor lokalisiert ist. Alle Patienten mit Amplifikation werden der Risikogruppe C zugeordnet und entsprechend intensiv therapiert. Dies gilt allerdings nur für Tumoren der Stadien I–III, für das Stadium IV wurde ein Unterschied in der Prognose von Patienten positiv oder negativ für Amplifikation nicht beobachtet (für detaillierte Ausführungen siehe Berthold et al., 1986; Berthold, 1990).

*MYCN* Amplifikation ist demnach ein unabhängiger Parameter bei der Abschätzung der Prognose des Neuroblastoms. Dies ist im Gegensatz zur Situation beim Brustkrebs, bei der Amplifikation von *ERBB2* und Lymphknotenbefall gleichwertige und nicht unabhängige Prognoseparameter darstellen.

### Perspektiven

Der molekulargenetisch orientierten Krebsforschung stellen sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt vor allem drei Aufgaben. Erstens erscheint es wichtig, das Spektrum genetischer Veränderungen in unterschiedlichen Tumoren zu identifizieren und zu prüfen, ob nicht-zufällige Veränderungen auftreten. Zweitens ist ein wesentlicher Punkt, zu untersuchen, ob bestimmte nicht zufällige genetische Veränderungen als Parameter bei der Diagnose von Krebserkrankungen einsetzbar sind und Entscheidungshilfen für den Einsatz bestimmter, bereits erprobter therapeutischer Maßnahmen geben können. Und drittens erscheint es wesentlich, Kenntnisse über die biologische Funktion von genetischen Veränderungen in der Krebszelle zu erhalten, um Ansatzpunkte für eine Kausaltherapie zu gewinnen.

Im Rahmen dieser Zielsetzung kommt der Analyse der Rolle von Veränderungen zellulärer Onkogene und Tumor-Suppressorgene eine besondere Rolle zu. Spezifische strukturelle Anomalien beider Gengruppen treten häufig in bestimmten Krebserkrankungen auf. Diese genetischen Veränderungen haben damit zum Einen ein diagnostisches Potential. Zum Anderen könnten Kenntnisse über die Funktion dieser genetischen Veränderungen in der Zelle die Grundlage für Ansätze zur Kausaltherapie von Krebserkrankungen legen, da sowohl zelluläre Onkogene als auch Tumor-Suppressorgene bei der Metamorphose der Zelle vom normalen zum malignen Status offensichtlich eine zentrale Rolle spielen.

### Literatur

- Amler, L. C., M. Schwab: Amplified N-myc in human neuroblastoma cells is often arranged as clustered tandem repeats of differently recombined DNA. *Molec. Cell. Biol.* 9 (1989) 4903–4913
- Bartram, C. R., F. Berthold: Amplification and expression of the N-myc gene in neuroblastoma. *Eur. J. Pediatr.* 146 (1987) 162–165
- Berthold, F., W. E. Brandeis, F. Lampert: Neuroblastoma: Diagnostic advances and therapeutic results in 370 patients: in Falkner, Kretschmer, Rossi (eds), *Monographs in Paediatrics*, Vol. 18, pp. 206–223 (Karger, Basel) (1986)
- Berthold, F.: Overview biology of neuroblastoma: in Pochadly, Tebbi (eds), *Critical Reviews in Oncogenesis*, Vol xx, pp.xx–xx (CRC Press, Inc., Boca Raton) (1990)
- Berthold, F., D. H. Hunneman, K. Bertram, R. Erttmann, F. H. Schilling, J. Treuner, J. Zieschang: Neuroblastoma screening: Pro's and Con's from the German trials NB79, NB82, NB85. *Am. J. Pediatric Hematol. Oncol.* (submitted) (1990)
- Biedler, J. L., B. A. Spengler: Metaphase chromosome anomaly: Association with drug resistance and cell-specific products. *Science* 191 (1976) 185–187
- Brodeur, G. M., A. A. Green, F. A. Hayes, K. G. Williams, D. L. Williams, A. A. Tsatis: Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res.* 41 (1981) 4678–4686
- Brodeur, G., R. C. Seeger, M. Schwab, H. E. Varmus, J. M. Bishop: Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224 (1984) 1121–1124

- Christiansen, H., F. Lampert: Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *British J. Cancer* 57 (1988) 121–126
- Cox, D., C. Yuncken, A. Spriggs: Minute chromatin bodies in malignant tumours of childhood. *Lancet* 2 (1965) 55–58
- Dildrop, R., A. Ma, K. Zimmermann, E. Hsu, A. Tesfaye, R. de Pinho, F. Alt: IgH enhancer-mediated deregulation of N-myc gene expression in transgenic mice: generation of lymphoid neoplasias that lack c-myc expression. *EMBO J* 8 (1989) 1121–1128
- Foulds, L.: The natural history of cancer. *J. Chronic. Dis.* 8 (1958) 2–37
- Levan, G., N. Mandahl, B. O. Bengtsson, A. Levan: Experimental elimination and recovery of double minute chromosomes in malignant cell populations. *Hereditas* 86 (1977) 57–90
- Martinsson, T., A. Weith, C. Cziepluch, M. Schwab: Chromosome 1 deletions in human neuroblastomas: Generation and fine mapping of microclones from the distal 1p region. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1 (1989) 67–78
- Nakagawara, A., K. Ikeda, T. Tsuda, K. Higashi: Biological characteristics of NMYC amplified neuroblastomas in patients over one year of age: in Evans, D'Angio, Seeger (eds), *Advances in Neuroblastoma Research*, Vol 2, pp. 31–39 (Alan R Liss, Inc., New York) (1988)
- Nowell, P.: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194 (1976) 23–28
- Sansone, R., D. di Martino, P. Cornaglia-Ferraris, G. P. Tonini, E. Lanino, B. de Bernardi, P. Strigini, V. Fontana, N. Marchese: N-MYC amplification and its correlation with prognosis and with other bio-clinical markers in neuroblastoma fresh tumors. *Clin. Chem. Enzym. Comm.* 2 (1989) (im Druck)
- Schimke, R. T.: Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* 37 (1984) 705–713
- Schwab, M., K. Alitalo, K. H. Varmus, J. M. Bishop, D. George: A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumor cells. *Nature* 303 (1983a) 497–501
- Schwab, M., K. Alitalo, K. H. Klempnauer, H. E. Varmus, J. M. Bishop, F. Gibert, G. Brodeur, M. Goldstein, J. Trent: Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor. *Nature* 305 (1983b) 245–248
- Schwab, M., H. E. Varmus, J. M. Bishop, K. H. Grzeschik, S. Naylor, A. Sakaguchi, G. Brodeur, J. Trent: Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 308 (1984) 288–291
- Schwab, M., H. E. Varmus, J. M. Bishop: The human N-myc gene contributes to tumorigenic conversion of mammalian cells in culture. *Nature* 316 (1985) 160–162
- Schwab, M., G. Ramsay, K. Alitalo, H. E. Varmus, J. M. Bishop, T. Martinsson, G. Levan, A. Levan: Amplification and enhanced expression of the c-myc oncogene in mouse SEWA tumor cells. *Nature* 315 (1985) 345–347
- Schwab, M.: Amplification of N-myc in human neuroblastomas. *Trends Genet.* 1 (1985) 271–275
- Schwab, M.: The MYC-box oncogenes: in Reddy, Skalka, Curran (eds), *The Oncogene Handbook*, pp. 381–391 (Elsevier Science Publishers B. V.) (1988)
- Schwab, M., J. M. Bishop: Sustained expression of the human protooncogene MYCN rescues rat embryo cells from senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 9585–9589
- Schwab, M., L. Amler: Amplification of cellular oncogenes: A predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1 (1990) 180–193
- Schweigerer, L., S. Breit, A. Wenzel, K. Tsunamoto, R. Ludwig, M. Schwab: Augmented MYCN expression advances the malignant phenotype of human tumor cells. *Cancer. Res.* (im Druck)
- Seeger, R. C., G. M. Brodeur, H. Sather, A. Dalton, S. E. Siegel, K. Y. Wong, D. Hammond: Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N. Engl. J. Med.* 313 (1985) 1111–1116
- Slamon, D. J., W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, M. F. Press: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244 (1989) 707–712
- Weith, A., T. Martinsson, C. Cziepluch, S. Bruderlein, L. C. Amler, F. Berthold, M. Schwab: Neuroblastoma consensus deletion maps to chromosome 1p36.1–2. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1 (1989) 159–166

---

Dr. Manfred Schwab

Institut für Experimentelle Pathologie  
Deutsches Krebsforschungszentrum  
D-6900 Heidelberg