

Die immunsuppressive Rolle von N-Myc im Neuroblastom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Julian Philipp Layer

aus Bonn

2018

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Hölzel
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Geyer

Tag der Mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2018

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. med. Gunther Hartmann

Gewidmet meinen Eltern und Großeltern, meinen Brüdern
und meiner Freundin Katharina.
Meiner Familie, der ich alles verdanke.

„So we beat on, boats against the current, borne back ceaselessly into the past.“

F. Scott Fitzgerald, *The Great Gatsby*

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	8
2. Hinweis auf vorhergehende wissenschaftliche Veröffentlichung.....	11
3. Einleitung.....	12
3.1 Ätiopathogenese, Epidemiologie und Klinik des Neuroblastoms.....	12
3.2 Die Bedeutung des <i>MYCN</i> -Onkogens im Neuroblastom.....	13
3.3 Aktueller Therapiestandard des Neuroblastoms.....	15
3.4 Die zunehmende Bedeutung von Immuntherapien in der Onkologie.....	15
3.5 Die Rolle von Neoantigenen in der Immunogenität von Tumoren.....	16
3.6 Ziel der Arbeit.....	17
4. Material und Methoden	18
4.1 Material.....	18
4.1.1 Zellkultur.....	18
4.1.2 Zytokine und Immunstimulantien.....	18
4.1.3 Transfektion und siRNAs.....	19
4.1.4 Puffer und Lösungen.....	19
4.1.5 Zellyse und Prozessierung der Proben.....	20
4.1.6 Kits.....	21
4.1.7 Antikörper.....	21
4.1.8 qRT-PCR-Primer.....	22
4.1.9 Verbrauchsmaterial.....	23
4.1.10 Technische Geräte.....	24
4.1.11 Software.....	25
4.2 Methoden.....	26
4.2.1 Zellkultur.....	26
4.2.2 Transfektion und Knockdown.....	28
4.2.3 Immunstimulation der Zellen.....	28
4.2.4 Proliferationsassay.....	28
4.2.5 Immunoblot-Analyse.....	28
4.2.6 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative real-time PCR.....	29
4.2.7 3'RNA-Sequenzierungsanalyse.....	30

4.2.8 Gene set enrichment-Analyse (GSEA)	31
4.2.9 Bioinformatische Analysen veröffentlichter Datensätze.....	32
4.2.10 Mutationsfrequenzanalysen.....	32
4.2.11 Durchflusszytometrie.....	33
4.2.12 Sandwich ELISA-Immunoassay.....	33
4.2.13 LacZ-Assay.....	34
4.2.14 T-Zell-Migrationsanalyse.....	35
4.2.15 Statistische Tests.....	36
4.2.16 Grafische Elemente.....	37
5. Ergebnisse	38
5.1 <i>MYCN</i> _{amp} geht mit verminderter Expression von Immunzellensignaturen einher..	38
5.2 Verminderte CD8-T-Zell-Infiltration bei <i>MYCN</i> -amplifizierten Tumoren.....	43
5.3 Geringeres Überleben bei verminderter Immunzellensignatur-Expression.....	45
5.4 Neoantigenlast ist nicht ausschlaggebend für ermittelte Immunogenität.....	46
5.5 <i>MYCN</i> _{amp} geht mit verminderter IFN-Signalweg-Signatur einher.....	48
5.6 <i>MYCN</i> -amplifizierte Zelllinien weisen verminderte IFN-Signatur auf.....	49
5.7 <i>MYCN</i> hemmt IFN-abhängige Transkription in humanen Neuroblastomzellen...50	
5.8 <i>MYCN</i> -Reduktion und IFN-Gabe stabilisieren IFN-abhängige Signalwege.....	53
5.9 <i>MYCN</i> -transgene murine Modelle sprechen auf RNAi und IFN-Stimulation an..	58
5.10 Behandlung mit STING-Agonisten zeigt mit IFN- γ vergleichbare Effekte	65
5.11 Bestätigung der Experimente in zwei weiteren murinen Zelllinien.....	73
5.12 RNAi und STING-Agonist induzieren Chemotaxis und T-Zellmigration.....	75
6. Diskussion.....	77
6.1 Die Notwendigkeit und Perspektive neuer risikoadaptierter Therapieansätze....	77
6.2 Ein dichotomes Phänotyp-Modell und dessen therapeutische Relevanz.....	77
6.3 <i>MYCN</i> als globaler Suppressor inflammatorischer Aktivität im Neuroblastom....	79
6.4 Die Bedeutung des Immunsystems für das extrem variable Neuroblastom.....	82
6.5 <i>MYCN</i> als Biomarker für ein Ansprechen auf eine Immuntherapie.....	83
6.6 Ein therapeutisches Konzept für <i>MYCN</i> -amplifizierte Neuroblastome.....	84
6.7 EZH2 als möglicher Angriffspunkt zur Inhibition der Wirkung von <i>MYCN</i>	86
6.8 STING und RIG-I-Liganden als Immunstimulantien des Typ I-IFN-Systems.....	87
6.9 Ergänzung bestehender Therapiekonzepte für das Neuroblastom.....	89

7. Zusammenfassung	90
8. Abbildung- und Tabellenverzeichnis	92
9. Literaturverzeichnis	96
10. Danksagung	108

1. Abkürzungsverzeichnis

ALK	Anaplastic lymphoma kinase
amp	Amplifikation (als Abkürzung tiefgestellt)
BSA	Bovines Serumalbumin
B2m	β_2 -Mikroglobulin
CAR	Chimeric antigen receptor
CCL	C-C motif chemokine ligand
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (cyclin-dependent kinase)
cGAS	zyklische GMP-AMP-Synthase (cyclic GMP-AMP synthase)
CPRG	Chlorphenolrot- β -D-Galactopyranosid
CSF1	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FLT3LG	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GD2	Disialogangliosid
GEMMs	genetisch erstellte Mausmodelle (genetically engineered mouse models)
GSEA	Gene Set Enrichment-Analyse
IFIT	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IRF	Interferon regulatory factor

I ¹³¹ -MBG	Iod ¹³¹ -Metaiodbenzylguanidin
LCK	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology 2
MAX	Myc-associated factor X
MDA5	Melanom-Differenzierungsantigen 5
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I (major histocompatibility complex class I)
mRNA	messenger RNA
MYCN	MYCN proto-oncogene
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
N-Myc	N-myc proto-oncogene protein
OAS1	2'-5'-Oligoadenylatsynthetase 1
OMS	Opsoklonus-Myoklonus-Syndroms
p	phosphoryliertes Protein
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death-ligand 1
PRKCQ	Proteinkinase C theta
qRT-PCR	quantitative real time-PCR
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (relative centrifugal force)
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
siRNA	small interfering RNA
STAT	signal transducer and activator of transcription
STING	Stimulator of interferone genes
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline)
TBST	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween 20

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLB	Triton-Lysepuffer (triton lysis buffer)
TMEM173	Transmembranprotein 173 (siehe STING)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Treg	regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UBC	Ubiquitin C

2. Hinweis auf vorhergehende wissenschaftliche Veröffentlichung

Die in dieser Dissertationsschrift vorgestellten Ergebnisse sind in Teilen bereits in der Publikation „Amplification of N-Myc is associated with a T-cell-poor microenvironment in metastatic neuroblastoma restraining interferon pathway activity and chemokine expression“ vom 28. April 2017 in der wissenschaftlichen Fachzeitschrift *Oncoimmunology* (Taylor & Francis Group) veröffentlicht. Der Autor dieser Dissertationsschrift ist Erstautor der Veröffentlichung. Es wird im Folgenden auf eine Zitierung verzichtet. Eine Genehmigung der an der Durchführung der Experimente beteiligten Koautoren zur Darstellung der Ergebnisse in dieser Arbeit liegt im Falle der Verwendung vor. Der jeweilige fremde Arbeitsanteil ist als solcher gekennzeichnet.

Die komplette Zitierung der Veröffentlichung lautet wie folgt:

Layer JP, Kronmüller MT, Quast T, van den Boorn-Konijnenberg D, Efferen M, Hinze D, Althoff K, Schramm A, Westermann F, Peifer M, Hartmann G, Tüting T, Kolanus W, Fischer M, Schulte JH, Hölzel M. Amplification of N-Myc is associated with a T cell-poor microenvironment in metastatic neuroblastoma restraining interferon pathway activity and chemokine expression. *Oncoimmunology* 2017; 6:6, e1320626

3. Einleitung

3.1 Ätiopathogenese, Epidemiologie und Klinik des Neuroblastoms

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor der Neuralleiste mit sehr variabler klinischer Manifestation und stark divergierendem Verlauf. Es ist der häufigste extrakranielle solide Tumor der Kindheit (Maris *et al.*, 2007). Das mittlere Alter bei Diagnose liegt bei etwa 18 Monaten (Brodeur, 2003). In der Regel treten spät unspezifische und von der Lokalisation des Tumors beziehungsweise seiner Metastasen abhängige Symptome wie tastbare Raumforderungen, Kompressionsschmerz, Dyspnoe oder neurologische Ausfälle auf. Das sogenannte Brillenhämatom bezeichnet periorbitale Ekchymosen und ist ein verhältnismäßig spezifischer Neuroblastomverdächtiger Befund. Oft werden Neuroblastome als Zufallsbefund im Rahmen bildgebender Verfahren festgestellt. Mögliche Manifestationsorte ergeben sich im gesamten Verlauf des sympathischen Nervengewebes. Typischste Lokalisationen sind die Nebennieren, die Grenzstränge sowie die Paraganglien. Durch fehlende Frühsymptome und oft noch nicht gegebene Artikulationsfähigkeit der betroffenen Kinder wird das Neuroblastom spät diagnostiziert. In etwa der Hälfte aller Fälle finden sich bereits Metastasen bei Erstdiagnose, woraus sich ein INSS-Stadium 4 ergibt (Cohn *et al.*, 2009).

Die INSS-Kriterien berücksichtigen in erster Linie die chirurgische Resektabilität und Tumorausdehnung (Brodeur *et al.*, 1993). Zunehmend wird zur Klassifikation des Neuroblastoms alternativ die INRG-Klassifikation verwendet, die eine Einteilung auf Grundlage der Bildgebung ermöglicht (Brisse *et al.*, 2011). Für die Prognose der Erkrankung spielt die reine Stadienzuordnung des Tumors immer mehr nur eine untergeordnete Rolle. Stattdessen erfolgt die Risikoabschätzung über eine Einteilung in Risikogruppen. Hier fließen neben den bildgebungsbasierten Risikofaktoren (image-defined risk factors) zahlreiche weitere Faktoren ein (Monclair *et al.*, 2009). Prognostisch günstige Low-Risk-Neuroblastome zeichnen sich grundsätzlich durch ein günstiges Staging-Ergebnis, ein Alter bei Erstdiagnose von jünger als einem Jahr beziehungsweise anderthalb Jahren, gute Tumorzellendifferenzierung und günstige molekulargenetische sowie histologische Kriterien aus (Pinto *et al.*, 2015).

Die Prognose unterscheidet sich erheblich zwischen Low-Risk- und High-Risk-Neuroblastomen, wobei die 5 Jahre-Überlebensrate bei einer Erkrankung des Stadiums 4 nach INSS trotz intensiver multimodaler Chemotherapie nur bei ca. 35 % liegt (De Bernardi *et al.*, 2003; Matthay *et al.*, 1999). Einer 5 Jahre-Überlebensrate von über 85 % bei Low-Risk-Neuroblastomen nach INRG steht generell eine Überlebenswahrscheinlichkeit von unter 50 % bei High-Risk-Neuroblastomen gegenüber (Cohn *et al.*, 2009). Aktuelle Veröffentlichungen zeigen eine weitere Präzisierung der Risikostratifikation durch Einbeziehung zusätzlicher Faktoren wie beispielsweise der Bestimmung von Genexpressionsmustern (Oberthuer *et al.*, 2015).

3.2 Die Bedeutung des *MYCN*-Onkogens im Neuroblastom

Neben dem Diagnosealter, der Tumorhistologie und der Ploidie des Tumors ist der wichtigste molekulargenetische Prognosefaktor des sporadischen Neuroblastoms die in etwa 25 % der Fälle vorliegende Amplifikation des *MYCN*-Onkogens. Sie ist mit einer deutlich schlechteren Prognose und einem rapiden Progress der Erkrankung assoziiert (Seeger *et al.*, 1985). *MYCN*, das auch als N-Myc bezeichnet wird, ist ein der Myc-Familie zugehöriger Transkriptionsfaktor, der unter anderem regulatorischen Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle hat (siehe Abb. 1).

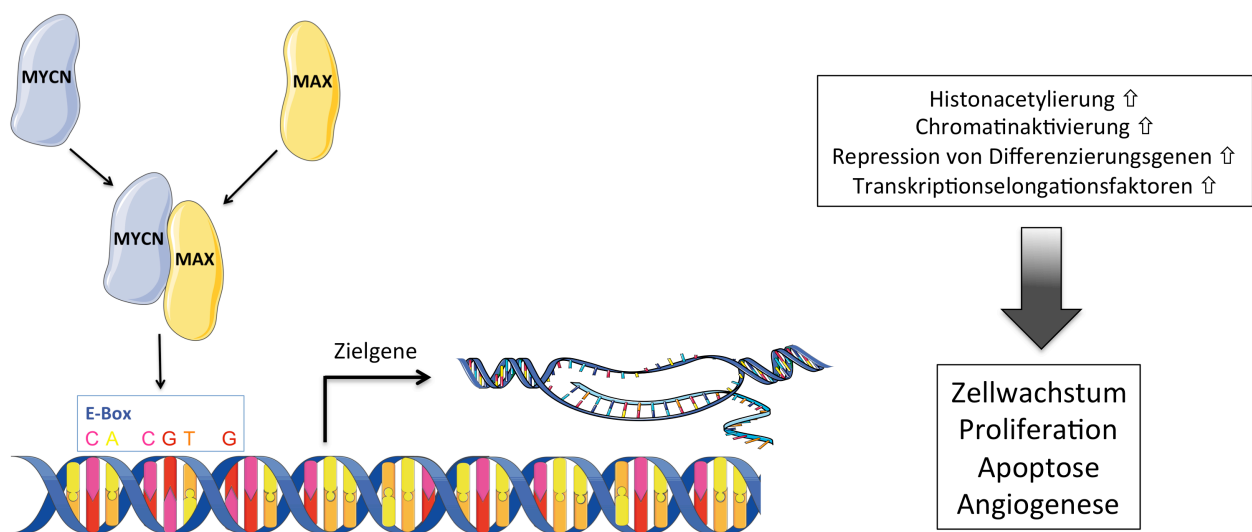


Abb. 1: Funktionsweise von *MYCN* – nach Lüscher und Vervoorts, 2012

Hierbei bildet MYCN ein Heterodimer mit seinem Partnerprotein MAX, welches sodann über Bindung an eine als Enhancer-Box (E-Box) bezeichnete DNA-Nukleotidfolge eine Aktivierung der Transkription initiieren kann (Blackwell *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 1993). Zu den zahllosen, teils noch nicht entschlüsselten Funktionen des Proto-Onkogens gehören eine Chromatin-aktivierende Rekrutierung der Histonacetyltransferase-Komplexe (Frank *et al.*, 2003) oder die Rekrutierung von Transkriptionselongationsfaktoren (Majello *et al.*, 1999). Neben den transkriptionsaktivierenden Funktionen sind für MYCN auch zahlreiche Funktionen als transkriptioneller Repressor bekannt (Gherardi *et al.*, 2013). So zeigte sich, dass fast die Hälfte aller MYC-Bindungsstellen keine E-Box-Sequenzen aufweist und somit insbesondere für repressive Effekte alternative Mechanismen der Interaktion infrage kommen (Zeller *et al.*, 2006). In anderen Tumorentitäten ist für MYC wie auch MYC-zugehörige Transkriptionsfaktoren ein Einfluss auf Immunsignalwege bekannt, über den auch MYCN antitumorale Effekte unterdrücken könnte (Casey *et al.*, 2016; Kortlever *et al.*, 2017; Riesenberg *et al.*, 2015; Schlee *et al.*, 2007; Topper *et al.*, 2017).

MYCN trägt neben dem Neuroblastom auch in zahlreichen weiteren Entitäten zur Tumorgenese bei. So findet sich eine *MYCN*-Amplifikation auch in neuroendokrinen Tumoren wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, dem Medulloblastom oder dem neuroendokrinen Prostatakarzinom (Beltran *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2006; Korshunov *et al.*, 2012). MYCN ist Teil der Signalwege zahlreicher Onkogene und kann daher auch ohne genetische Amplifikation pathologische Aktivität aufweisen (Valentijn *et al.*, 2012). In jüngster Zeit etablierten sich in der experimentellen Forschung erste Agentien, die auf eine Reduktion von MYCN zur Therapie des Neuroblastoms abzielen (Brockmann *et al.*, 2013; Chipumuro *et al.*, 2014). Sie befinden sich teils derzeit bereits in klinischen Studien, haben jedoch bislang nicht den Status klinischer Standardprozeduren erreicht.

3.3 Aktueller Therapiestandard der Neuroblastomtherapie

In der Regel erfolgt die Behandlung des Neuroblastoms in spezialisierten Zentren im Rahmen kontrollierter Studien. Nach wie vor ist der Goldstandard neben der operativen Resektion des Tumors eine multimodale Radiochemotherapie (Pinto *et al.*, 2015). Darüber hinaus hat sich die adjuvante Gabe von Differenzierung induzierender Retinoinsäure etabliert (Matthay *et al.*, 1999). Weitere neue therapeutische Ansätze beinhalten unter anderem die Behandlung mit GD2-Antikörpern, ALK-Inhibitoren oder die radiotherapeutische Applikation von I^{131} -MBG (Pinto *et al.*, 2015). Bei Low-Risk-Neuroblastomen kann jedoch auch das Abwarten einer spontanen Regression in Betracht kommen (Maris *et al.*, 2007). Gerade das junge Alter der Patienten in Kombination mit einem stark divergierenden klinischen Verlauf bedingt einen großen Bedarf an neuen Biomarkern und diagnostischen Verlaufsprädiktoren zwecks einer möglichst präzisen Risikostratifizierung einerseits und gezielteren, risikoadaptierten therapeutischen Ansätzen mit dem Anspruch verringerter Zytotoxizität im Langzeitverlauf andererseits.

3.4 Die zunehmende Bedeutung von Immuntherapien in der Onkologie

Eine recht neue Therapieoption für zahlreiche Malignome stellen die sogenannten Checkpoint-Inhibitoren dar, die im ebenfalls von der Neuralleiste abstammenden malignen Melanom Teilremissionen und ein deutlich verlängertes Gesamtüberleben im Fernmetastasierungsstadium erreichen konnten (Topalian *et al.*, 2014). Mittlerweile sind die Inhibitoren neben dem Melanom auch im metastasierten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zu einer Erstlinientherapie aufgestiegen (Gettinger *et al.*, 2016). Sie wirken durch spezifische Blockade bestimmter antiinflammatorischer T-Zell-Bindungsstellen. Wesentlich abhängig ist der Behandlungserfolg bei Applikation eines Checkpoint-Inhibitors von der individuellen T-Zell-Infiltration der direkten Tumorumgebung. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn der Tumor eine präexistente antitumorale Immunantwort aufweist, diese aber nur supprimiert hat (Bald *et al.*, 2014; Tumeh *et al.*, 2014). Ist jedoch keine ausreichende T-Zell-Infiltration des Tumors gegeben, kann sich eine Applikation der Checkpoint-Inhibitoren als wirkungslos erweisen.

Eine Option, um einerseits den Einsatz der Inhibitoren in einem solchen Fall zu ermöglichen und andererseits generell eine Immunantwort gegen den Tumor zu induzieren, ist die Konversion des T-Zell-armen Tumormikromilieus in ein T-Zell-reiches durch eine artifizielle, von außen erwirkte inflammatorische Aktivierung des Tumors. Als „small molecule drugs“ klassifizierte STING-Agonisten beispielsweise aktivieren durch strukturelle Vortäuschung einer viralen Infektion den zytosolische DNA erkennenden cGAS-STING-Signalweg und lösen dadurch eine IRF3-abhängige Transkription proinflammatorischer Gene aus, darunter die von Typ I Interferon sowie von Zytokin- und Chemokingenen (Cavlar *et al.*, 2013). Mit dieser Grundlage kann sich daraufhin ein entzündliches Tumormikromilieu durch Migration und Aktivierung von Immunzellen ausbilden. Eine zentrale Rolle speziell für die T-Zell-Rekrutierung nehmen die Chemokine CXCL9 und CXCL10 ein (Peng *et al.*, 2015).

3.5 Die Rolle von Neoantigenen in der Immunogenität von Tumoren

Neue Forschungsergebnisse zeigen des Weiteren, dass Neoantigene ebenso ein wichtiger Prädiktor des Ansprechens eines Tumors auf eine Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren sind (Rizvi *et al.*, 2015). Bei Neoantigenen handelt es sich um tumorspezifische Mutationen, die von Immunzellen erkannt werden können. In über eine sehr lange Zeit entstandenen Tumoren mit chronischem Noxeneinfluss wie etwa dem durch Zigarettenrauch induzierten Bronchialkarzinom finden sich daher auch große Mengen an Neoantigenen (Rizvi *et al.*, 2015). Hingegen weisen Tumoren verhältnismäßig kurzfristiger Genese wie das frühkindliche Neuroblastom eine deutlich geringere Frequenz dieser Exonmutationen auf (Pugh *et al.*, 2013), was eine geringere Effektivität einer Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren suggeriert. Zu beachten ist jedoch, dass für die Immunogenität des Tumors neben der Neoantigen-Menge beispielsweise auch Cancer/Testis-Antigene, eine Bezeichnung für in Tumoren häufig pathologisch reexprimierte Entwicklungsantigene, und sogenannte „cell lineage“ Antigene, also gewebspezifisch physiologisch exprimierte Antigene, wichtig sind.

Nichtsdestoweniger ergibt sich aus der beschriebenen geringen Exonmutationsfrequenz des Neuroblastoms eine Notwendigkeit für alternative Prädiktoren, um das Potential einer Therapie dieser Tumoren mit Immuncheckpoint-Inhibitoren einschätzen zu können.

3.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung molekulargenetischer Charakteristika, die eine Unterscheidung eines phänotypisch T-Zell-armen von einem T-Zell-reichen Subtyp des Neuroblastoms im Sinne einer Bewertung der präexistenten Immunresponsivität des Tumors ermöglichen. Damit einhergehend soll dieser molekulare Prädiktor für die T-Zell-Infiltration die Grundlage für eine mögliche Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren darstellen. Für diesen Zweck soll zu Anfang eine Analyse von RNA-Sequenzierungsdaten aus Biopsaten einer großen Fallzahl von Neuroblastompatienten erfolgen. Als Teil dieser Analyse wird auch die Einflussgröße hierbei festgestellter molekularer Unterscheidungsmerkmale auf den weiteren klinischen Verlauf untersucht. Weitergehend sollen die in dieser Arbeit etwaig ausgemachten antiinflammatorischen Tumorphänotypen in verschiedenen Zellkultur-basierten Experimenten auf eine mögliche therapeutische Reversibilität hin untersucht werden. Sekundäres Ziel dieser Arbeit ist daher neben der Identifikation möglicher Prädiktoren der T-Zell-Infiltration und deren molekulargenetischen Charakteristika im Neuroblastom auch die Beschreibung eines therapeutischen Ansatzes zur Konversion des T-Zell-armen Tumormikromilieus.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zellkultur

RPMI 1640 Medium	Life Technologies, Carlsbad, USA
L-Glutamine (200 mM)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin-Streptomycin (5.000 U/ml)	Life Technologies, Carlsbad, USA
B-27 [®] Supplement (50X), serum free	Life Technologies, Carlsbad, USA
N-2 Supplement (100X)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Fetal Bovine Serum, heat inactivated	Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA (0.05 %), phenol red	Life Technologies, Carlsbad, USA
DPBS (1X)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Opti-MEM [®] I Reduced Serum Medium	Life Technologies, Carlsbad, USA
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
4 % Paraformaldehyd	PBS + 4 % Paraformaldehyd
Einfriermedium	RPMI 1640 + 10 % DMSO
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Durchflusszytometrie-Puffer	PBS + 1 % BSA + 0,1 % Natriumazid

4.1.2 Zytokine und Immunstimulantien

Recombinant Human IFN- α	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Recombinant Human IFN- γ	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Recombinant Human TNF- α	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Recombinant Murine IFN- γ	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Recombinant Murine TNF- α	PeptoTech, Rocky Hill, USA
DMXAA (Vadimezan)	Selleckchem, Houston, USA
SIINFEKL (Ovalbumin ₂₅₇₋₂₆₄)	AG Kastenmüller, Universitätsklinikum Bonn, Deutschland

4.1.3 Transfektion und siRNAs

Lipofectamine® RNAiMAX

Life Technologies, Carlsbad, USA

Hs_MYCN_6

Qiagen, Hilden, Deutschland

Hs_MYCN_7

Qiagen, Hilden, Deutschland

ON-TARGETplus Non-targeting

Dharmacon, Lafayette, USA

Control Pool

Tab. 1: Sequenzen der verwendeten siRNAs gegen MYCN

<i>siRNA</i>	<i>Richtung</i>	<i>Sequenz</i>
Hs_MYCN_6 (siMYCN#1)	vorwärts	5'-UGCCGGAGUUGGUAAGAATT-3'
	rückwärts	5'-UUCUUUACCAACUCCGGCACG-3'
Hs_MYCN_7 (siMYCN#2)	vorwärts	5'-CAGCGAGCUGAUCCUCAATT-3'
	rückwärts	5'-UUUGAGGAUCAGCUCGCUGGA-3'

4.1.4 Puffer und Lösungen

1X Lämmli-Puffer

0,025 % Bromophenolblau
 2 % SDS
 10 % Glycerin
 10 mM Dithiothreitol
 100 mM Tris-HCl mit pH 6,8
 in destilliertes H₂O

1M Tris mit pH 6,8

121,1 g Tris
 +/- 90 ml 32 % HCl
 ad 1 l destilliertes H₂O

10X SDS Running buffer

29 g Tris
 144 g Glycin
 10 g SDS
 ad 1 l destilliertes H₂O

10X Tris-Glycin-Puffer

29 g Tris
 144 g Glycin
 ad 1 l destilliertes H₂O

1X Blotting buffer

100 ml 10X Tris-Glycin-Puffer
 200 ml Methanol

	<i>ad 1 l destilliertes H₂O</i>
10X TBS	80 g NaCl 30 g Tris pH auf 7,6 (+/- 16 ml HCl 37 %) <i>ad 1 l destilliertes H₂O</i>
10X PBS	80 g NaCl 11,6 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KH ₂ PO ₄ 2 g KCl <i>ad 1 l destilliertes H₂O</i>
TLB	1 % Triton X 100 in destilliertem H ₂ O 10 mM Tris 1 mM CaCl ₂ 3 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA pH 7,5
5X Z-Puffer	158 mM Na ₂ HPO ₄ 350 mM NaH ₂ PO ₄ 50 mM KCl 10 mM MgSO ₄ <i>ad 1 ml destilliertes H₂O</i>
LacZ-Assaysubstrat	200 µl 5X Z-Puffer 1 µl 0,5 M CPRG 1,4 µl β-Mercaptoethanol <i>ad 1 ml destilliertes H₂O</i>

4.1.5 Zelllyse und Prozessierung der Proben

1 % Triton X 100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa H ₂ O	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
unvergällter Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
RW1-Waschpuffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Zymo RNA-Waschpuffer	Zymo Research, Irvine, USA

All-in-One cDNA Synthesis SuperMix	Bimake, Houston, USA
5X EvaGreen QPCR-Mix II (ROX)	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
Synthese der qRT-PCR-Primer	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

4.1.6 Kits

Cxcl10-ELISA-Kit R&D Systems	R&D Systems, Minneapolis, USA
DuoSet #DY466-05	
forward QuantSeq 3'mRNA-Seq	Lexogen, Wien, Österreich
Library Prep Kit for Illumina	
D1000 High Sensitivity ScreenTape	Agilent, Santa Clara, USA
Purification module with magnetic beads	Lexogen, Wien, Österreich

4.1.7 Antikörper

Primärantikörper für die Immunoblot-Analyse

Tab. 2: In der Immunoblot-Analyse verwendete Primärantikörper

<i>Protein</i>	<i>Bestellnummer</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>
β-Aktin	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology	1:200
N-Myc	sc-53993	Santa Cruz Biotechnology	1:150
STAT1	sc-464	Santa Cruz Biotechnology	1:1.000
pSTAT1 (S707)	9177	Cell Signaling Technology	1:1.000
STAT3	sc-8019	Santa Cruz Biotechnology	1:200
pSTAT3 (Y705)	9145	Cell Signaling Technology	1:2.000

Bei jeder Immunoblot-Analyse wurde zum Vergleich der Proteingröße eine Proteinladder mit Broad Range Markers (Santa Cruz, Biotechnology, sc-2361) erstellt.

Sekundärantikörper für die Immunoblot-Analyse

LI-COR Biosciences, Lincoln, USA

Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tab. 3: In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper

<i>Antikörper (Klon)</i>	<i>Bestellnummer</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>
Anti-CD274 (MIH1)	17-5983-41	eBioscience Inc.	1:200
Anti-Mouse H-2K ^b (AF6-88.5)	550550	BD Pharmingen	1:100
Anti-Mouse CD274 (B7-H1)	12-5982-82	eBioscience Inc.	1:200
Brilliant Violet 421 Streptavidin	405225	BioLegend	1:700

4.1.8 qRT-PCR-Primer

Tab. 4: Sequenzen der verwendeten qRT-PCR-Primer

<i>Gen</i>	<i>Richtung</i>	<i>Sequenz</i>
<i>B2m</i>	vorwärts	TTTCCCGTTCTTCAGCATT
	rückwärts	TTTCCCGTTCTTCAGCATT
<i>CCL2</i>	vorwärts	AGGTGACTGGGGCATTGAT
	rückwärts	GCCTCCAGCATGAAAGTCTC
<i>Ccl5</i>	vorwärts	CCACTTCTTCTCTGGGTTGG
	rückwärts	GTGCCACGTCAAGGAGTAT
<i>CD274</i>	vorwärts	ATTTGGAGGATGTGCCAGAG
	rückwärts	CCAGCACACTGAGAATCAACA
<i>Cd274</i>	vorwärts	CCACGGAAATTCTCTGGTTG
	rückwärts	TGCTGCATAATCAGCTACGG
<i>CXCL9</i>	vorwärts	TCACATCTGCTGAATCTGGG
	rückwärts	CCTTAAACAATTTGCCCAA
<i>Cxcl10</i>	vorwärts	CCTATGGCCCTCATTCTCAC
	rückwärts	CTCATCCTGCTGGGTCTGAG
<i>IFIT1</i>	vorwärts	TCAGGCATTTTCATCGTCATC

	rückwärts	CCTGGCTAAGCAAACCCT
<i>I16</i>	vorwärts	TGGTACTCCAGAAGACCAGAGG
	rückwärts	AACGATGATGCACTTGCAGA
<i>MYCN</i>	vorwärts	CACAGTGACCACGTCGATTT
	rückwärts	CACAAGGCCCTCAGTACCTC
<i>OAS1</i>	vorwärts	GAGCTCCAGGGCATACTGAG
	rückwärts	CCAAGCTCAAGAGCCTCATC
<i>Oas1</i>	vorwärts	AGTTCTCCTCCACCTGCTCA
	rückwärts	GGCTGTGGTACCCATGTTTT
<i>Stat1</i>	vorwärts	CTGAATATTTCCCTCCTGGG
	rückwärts	TCCCGTACAGATGTCCATGAT
<i>Tmem173</i>	vorwärts	AACACCGGTCTAGGAAGCAG
	rückwärts	CATATTTGGAGCGGTGACCT
<i>UBC</i>	vorwärts	CAGGGTACGACCATCTTCCAG
	rückwärts	GGAGCCGAGTGACACCATTG
<i>Ubc</i>	vorwärts	CCATCACACCCAAGAACAAGCACA
	rückwärts	AGGCAAGACCATCACCTTGGACG

4.1.9 Verbrauchsmaterial

Zymo Spin I Säule	Zymo Research, Irvine, USA
Zymo Spin II Säule	Zymo Research, Irvine, USA
6/12/24/48/96-Well-Platte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Greiner High binding 96-Well-Platte	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rundbodenplatte	TPP, Trasadingen, Schweiz
T25/T75-Flasche	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
12 ml-Falcon	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
50 ml-Falcon	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1,5/2 ml-Tube	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
5 ml-Tube	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Durchflusszytometrie-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen (2 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nitril-Handschuhe	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland

5/10/25 ml-Pipetten	Corning, Corning, USA
Pipettenspitzen	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Sterile Filter-Pipettenspitzen	STARLAB, Hamburg, Deutschland
5/10/20 ml-Spritzen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Pipettensets 1	Mettler-Toledo Rainin, Oakland, USA
Pipettensets 2	VWR, Radnor, USA
Amersham Protran Premium 0,2 µm	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St. Giles, Vereinigtes Königreich
Laborglasflaschen	VWR, Radnor, USA
4.1.10 Technische Geräte	
Inkubator 1 - Heracell™ 240	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubator 2 – MCO-20AIC	Sanyo, Moriguchi, Japan
Inkubator 3 – C170	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad TW20	Julabo, Seelbach, Deutschland
Zellzähler TC20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Pipettierhilfe PIPETBOY	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Mikroskop Axio Vert.A1	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Vortexer Labdancer	VWR, Radnor, USA
Vortexer VV3	VWR, Radnor, USA
Waage Modell Sartorius	VWR, Radnor, USA
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge MiniStar	VWR, Radnor, USA
Zentrifuge MicroStar	VWR, Radnor, USA
Heizblock	VWR, Radnor, USA
Schüttler Thermomix compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rollenmischer RM5	CAT, Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Clean Air EN 12469	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sicherheitswerkbank Herasafe KS15	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank 1 (4° C)	Robert Bosch, Stuttgart, Deutschland

Kühlschrank 2 (4° C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank 1 (-20° C)	Siemens, München, Deutschland
Gefrierschrank 2 (-20° C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank 3 (-80° C)	Panasonic, Kadoma, Japan
PCR-Cycler FlexCycler	Analytik Jena, Jena, Deutschland
PCR-Cycler T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Odyssey Sa Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Power Source 300 V	VWR, Radnor, USA
Tecan Infinite M200 Pro	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
FACSCanto Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen, Carlsbad, USA
4.1.11 Software	
ZEN2011	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Odyssey-Sa	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
R2 Genomic Analysis and Visualization	Academic Medical Center, Amsterdam, Niederlande (http://r2.amc.nl)
Primer-BLAST	NCBI, USA (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)
FlowJo, Version 8.7 für Mac	FlowJo LLC, Ashland, USA
R	freie Software unter GNU-Lizenz
R-Package Bioconductor	freie Software unter GNU-Lizenz
R-Package limma	freie Software unter GNU-Lizenz
R-Package RSubread aligner	freie Software unter GNU-Lizenz
BROAD javaGSEA	Broad Institute, Massachusetts Institute of Technology and Regents of the University of California, USA
Microsoft Office Excel	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft Office Powerpoint	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft Office Word	Microsoft Corp., Redmond, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Im Rahmen dieses Projekts kamen für unterschiedliche Fragestellungen folgende Neuroblastomzelllinien zum Einsatz: SKNBE, NMB, CHP-134, IMR-32, SH-SY5Y, mNB-A1, mNB-A2 und Nho2a.

SKNBE, NMB, CHP-134 sowie IMR-32 sind hochaggressive, humane *MYCN*-amplifizierte Zelllinien, SH-SY5Y eine nicht *MYCN*-amplifizierte humane Zelllinie. Bei den murinen Neuroblastomzelllinien mNB-A1 und mNB-A2 handelt es sich um zwei von LSL-*MYCN*;Dbh-iCre transgenen Mäusen isolierte Modelle (Althoff *et al.*, 2014). Hierbei wurde ein humanes *MYCN*-Transgen über Cre-konditionelle Aktivierung selektiv in Dopamin- β -Hydroxylase (Dbh)-exprimierenden Zellen aktiviert, wodurch es in den Versuchsmäusen spontan zur Ausbildung von Neuroblastomen kam (siehe Abb. 2). Diese Tumoren wurden biopsiert und das so gewonnene Zellmaterial anschließend kultiviert. mNB-A1 und mNB-A2 bieten daher die Möglichkeit, die Effekte einer *MYCN*-Überexpression *in vivo* wie *in vitro* in einem ansonsten genetisch gesichert weitgehend unauffälligen Kontext zu untersuchen. Bei der Zelllinie Nho2a handelt es sich um eine bereits länger etablierte transgene Zelllinie aus dem TH-*MYCN*-Modell, in dem es in Mäusen zur spontanen Ausbildung von Neuroblastomen durch gewebsspezifische Expression eines hinter den Tyrosinhydroxylase-Promotor ligierten *MYCN* kommt (Weiss *et al.*, 1997). Zuletzt wurde die T-Zellhybridom-Linie B3Z genutzt. Für genauere Angaben zur Kultur und Verwendung dieser Zelllinie siehe den Abschnitt 4.2.13 (LacZ-Assay).

Keine der genutzten Zelllinien steht auf der ICLAC Liste für fehlerhaft identifizierte Krebszelllinien. Alle verwendeten Zellen wurden in einem befeuchteten Inkubator unter 5 % CO₂ bei 37° C kultiviert. Dem verwendeten RPMI 1640 Medium wurden 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Die Zelllinien mNB-A1 und mNB-A2 erhielten darüber hinaus die Zusätze B-27 und N-2. Sämtliche verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen überprüft. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % gesplittet. Hierfür wurde die gesamte zellbewachsene Oberfläche nach Abnahme des Mediums zunächst vorsichtig mit PBS gewaschen, um

verbliebene Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen die Oberfläche bedeckend mit 0,05 % Trypsin-EDTA benetzt und für etwa drei Minuten im Inkubator belassen, bis die Zellen sich abgelöst hatten und nach erneuter Mediumzugabe im gewünschten Verhältnis zwischen 1:3 bis 1:10 vereinzelt werden konnten. Zur längerfristigen Lagerung erfolgte die Aufbewahrung der Zellen bei -80°C in einem speziellen DMSO-versetzten Einfriermedium. Beim Auftauen der Zellen wurde auf eine möglichst rasche Elimination des DMSO im Medium geachtet.

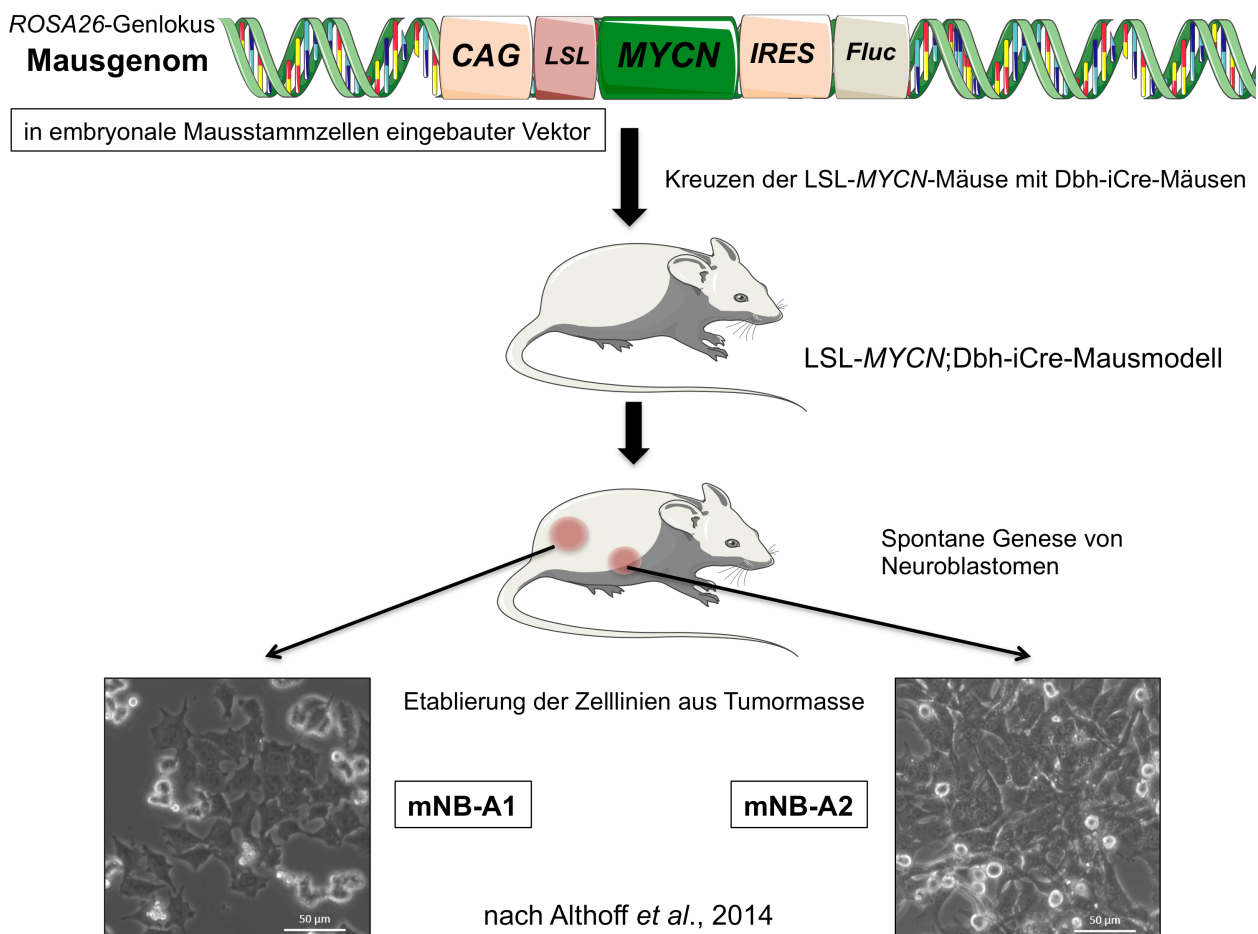


Abb. 2: Schematische Darstellung der Generierung des LSL-MYCN; Dbh-iCre-Modells und der Zelllinien mNB-A1 und mNB-A2 nach Althoff *et al.* (2014). CAG: Hühner-Aktin-Promotor; LSL: *loxP*-flankierte Polyadenyl-Stoppsequenz; MYCN: offenes Leseraster von humanem MYCN; IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle; Fluc: Luciferase-Gen.

4.2.2 Transfektion und Knockdown

Die Zellen wurden in hoher Dichte in einer 12-Well-Platte ausgesät und für die Transfektion gemäß den Herstellerangaben simultan mit 3 µl Lipofectamine RNAiMAX sowie 30 pmol siRNA in 100 µl Opti-MEM-Medium versetzt. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte ein Austausch des Mediums. Für alle dargestellten Experimente wurden die gegen *MYCN* gerichteten siRNAs Hs_MYCN_6 und Hs_MYCN_7 verwendet, die hier aus Gründen der Übersichtlichkeit als siMYCN#1 und siMYCN#2 bezeichnet werden. Als negative Kontrolle fungierte ein non-targeting siRNA-Kontrollpool. Die Sequenzen der siRNAs finden sich in Tab. 1 im Materialteil unter 4.1.3.

4.2.3 Immunstimulation der Zellen

24 Stunden nach der Transfektion mit der siRNA wurden die Zellen für weitere 24 Stunden immunstimuliert. Die humanen Zelllinien wurden hierfür mit den Zytokinen TNF- α , IFN- α oder IFN- γ , jeweils in einer Konzentration von 1.000 U/ml, behandelt. Die murinen Zellen wurden mit 100 U/ml Tnf- α oder 250 U/ml Ifn- γ behandelt. Die Behandlung der Zellen mit einem STING-Agonisten erfolgte mit in DMSO gelöstem DMXAA in einer Konzentration von 25 µM oder 50 µM; als Negativkontrolle diente eine äquivalente Menge DMSO.

4.2.4 Proliferationsassay

Die Zellen wurden in biologischen Triplikaten in sehr niedriger Dichte ausgesät, dem Experiment entsprechend behandelt und bei täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle der Zelldichte nach Erreichen der gewünschten Konfluenz mit 4 % Paraformaldehyd bedeckt fixiert. An mehrere Waschschriffe schloss sich eine Färbung der Zellen mit 0,05 % Kristallviolett für etwa 30 Minuten an. Nach drei weiteren Waschschriffen und dem Trocknen der Platten wurden diese im Odyssey Sa Imaging System bei einer Wellenlänge von 800 nm eingelesen. Die Quantifizierung der Proliferation erfolgte durch Messung der Signalintensitäten in selbigem Lesegerät.

4.2.5 Immunoblot-Analyse

Die Zellen wurden in 1X Lämmli-Puffer lysiert (2.000 Zellen pro µl Lämmli-Puffer) und anschließend für drei Minuten bei 95° C inkubiert. Je 20 µl der Lysate wurden in die

Lauffaschen eines 10 % SDS-Polyacrylamidgels gegeben und die Proteine anschließend bei 140 V nach ihrer Masse aufgetrennt. Zur Differenzierung der Proteingröße erfolgte eine Marker-Beladung einer Tasche mit Broad Range Markers. Das Gel wurde dann nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durch Wet Blotting bei 450 mA für 90 Minuten auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde danach für eine Stunde auf einem Roller bei Raumtemperatur mit 5 % BSA in TBST gegen unerwünschte Proteinbindungen geblockt. Die primären Antikörper wurden in 5 % BSA in TBST bei 4° C über Nacht auf einem Roller auf die Membran gegeben. Am nächsten Tag erfolgte dann nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST für eine Stunde die Zugabe der sekundären Antikörper in 3 % BSA in TBST zu der Membran. Bei den sekundären Antikörpern handelte es sich um die Fluoreszenzgekoppelten IRDye680LT- oder IRDye800CW-Antikörper. Nach zwei weiteren Waschschritten mit TBST und einem finalen Waschschrift mit TBS erfolgte die Proteindetektion durch Messung bei einer Wellenlänge von 700 oder 800 nm im Odyssey Sa Imaging System. Alle Experimente mit anschließender Immunoblot-Analyse wurden im biologischen Triplikate durchgeführt; bei den veröffentlichten Abbildungen handelt es sich um repräsentative Resultate. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper finden sich in Tab. 2 und Tab. 3 im Materialteil 4.1.7.

4.2.6 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative real-time PCR

Die behandelten Zellen wurden nach Abnahme des Mediums in 350 µl RLT-Puffer lysiert und dann für mindestens 15 Minuten bei -80° C tiefgefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurde den Lysaten eine äquivalente Menge 70 % unvergällter Ethanol hinzugefügt und dieses Volumen sorgfältig vermischt. Das komplette Lysat wurde daraufhin in eine Zymo Spin II Säule überführt und für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Es folgten weitere Waschschrritte mit RW1-Waschpuffer und Zymo RNA-Waschpuffer mit jeweilig anschließender Zentrifugation bei 10.000 rpm. Nach einer zusätzlichen Trockenzentrifugation für zwei Minuten wurde die RNA in RNase-freiem H₂O eluiert. Es erfolgte eine Messung der RNA-Konzentration mittels NanoDrop 2000c. Die anschließende cDNA-Synthese erfolgte in einem Volumen von 10 µl durch Verwendung des All-in-One cDNA Synthesis SuperMix mit einer definierten Menge zwischen 100 bis 1.000 ng RNA gemäß den Herstellerangaben. Hierzu folgte auf eine

Inkubation bei 42° C für 15 Minuten eine Inaktivierung bei 85° C für zwei Minuten. Die qRT-PCR wurde stets in technischen Duplikaten und einem totalen Volumen von 10 µl angesetzt. Hierfür fanden pro Well der 96-Well-Platte 2 µl 5X EvaGreen QPCR-Mix II (ROX), 0,6 µl Primer, 6,4 µl RNase-freies Wasser und zuletzt 1 µl cDNA Verwendung. Die qRT-PCR wurde im Roche Light Cycler 480 gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die cDNA wurde unter den in Tab. 5 folgenden Konditionen amplifiziert:

Tab. 5: Schema der cDNA-Amplifikation in der qRT-PCR

<i>Schritt</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
Denaturierung	1	95 °C	10 min
Amplifikation	40	95 °C (Denaturierung)	10 sek
		60 °C (Primerhybridisierung)	15 sek
		72 °C (Elongation)	15 sek
Schmelzen	1	95 °C	10 sek
		45 °C	30 sek
Kühlung	1	40 °C	2 min

Die Messungen wurden für jeden Primer stets durch eine aus allen Proben gepoolte Verdünnungsreihe standardisiert. Die quantifizierten Messwerte wurden ferner um Pipettierfehler auszugleichen ins Verhältnis zum ubiquitär exprimierten Gen Ubiquitin gesetzt. Die erstellten Primer wurden mittels Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) vor der Bestellung nochmals überprüft. Die Sequenzen der verwendeten Primer finden sich in Tab. 4 des Materialteils 4.1.8.

4.2.7 3'RNA-Sequenzierungsanalyse

Die Zellen wurden nach Abnahme des Mediums in 200 µl RLT-Puffer lysiert und für 15 Minuten bei -80° C tiefgefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurde den Lysaten 200 µl 70 % unvergällter Ethanol hinzugefügt und dieses Volumen sorgfältig vermischt. Im nächsten Schritt wurde das komplette Lysat in eine Zymo Spin I-Säule überführt und eine Minute lang bei 10.000 rpm zentrifugiert. Weitere Waschschrte mit RW1-Waschpuffer und Zymo RNA-Waschpuffer mit jeweiliger Zentrifugation bei 10.000 rpm

schlossen sich an. Nach einer zusätzlichen zweiminütigen Trockenzentrifugation wurde die RNA in 8 µl RNase-freiem H₂O eluiert. Die Messung der RNA-Konzentrationen wurde mit Qubit durchgeführt. Die Erstellung der Libraries erfolgte durch die NGS Core Facility des Universitätsklinikums Bonn. Für die Präparierung der Sequenzierungs-Library wurde hierbei gemäß den Herstellerangaben das forward QuantSeq 3'mRNA-Seq Library Prep Kit for Illumina verwendet. Nach Erfolgen der PCR wurde die Größenverteilung und Ausbeute der 3'-mRNA-Seq Library vor dem Poolen der etikettierten Libraries mittels D1000 High Sensitivity ScreenTape ermittelt. Diese gepoolten Libraries wurden auf die Illumina HiSeq2500-Plattform geladen und in einem 50 Zyklen umfassenden Rapid Mode mit on-cartridge Clustering analysiert. Die Rohdaten dieser Durchläufe sind über das Sequence Read Archive (SRA) unter der Kennung ENA-Projekt PRJEB20874/ERP023066 abrufbar. Es erfolgte eine bioinformatische Auswertung der gewonnenen Rohdaten mittels der Software R und dem zugehörigen Paket Bioconductor. Die FASTQ-Daten wurden über das RSubread aligner-Paket dem humanen Referenzgenom hg38 oder dem Mausreferenzgenom mm10 angepasst (Liao *et al.*, 2013). Zur Normalisierung und linearen Modellierung der Daten fand die voom-Methode des limma-Pakets Verwendung (Law *et al.*, 2014). Die Expressionswerte der mRNA wurden in logarithmischer Skala in read counts per million (rpm) übertragen. Für die GSEA wurden gar nicht oder nur sehr gering exprimierte Gene ausgeschlossen, sodass sich insgesamt eine Zahl von etwa 6.000 robust exprimierten Genen ergab. Sämtliche Experimente sowie auch deren Auswertung in der 3'RNA-Sequenzierungsanalyse erfolgten auf der Basis biologischer Triplikate.

4.2.8 Gene set enrichment-Analyse (GSEA)

Die Durchführung der GSEA erfolgte durch Nutzung der BROAD javaGSEA-Software des Broad Instituts (Broad Institute, Massachusetts Institute of Technology and Regents of the University of California, <http://www.broadinstitute.org/gsea/downloads.jsp>) und der ebenfalls dort abrufbaren „hallmark gene sets collection“ (BROAD molecular signature database, MSigDbv5.1). Es wurden die Standardeinstellungen von 1.000 Permutationen und dem „gene-set permutation mode“ verwendet. Ferner wurde der „empirical Bayes moderated t-test“ als „ranked metric input“ für den Algorithmus der vorsortierten GSEA Genliste gewählt.

Gezeigt werden in dieser Arbeit lediglich die als für diese Thematik relevant befundenen Anteile der GSEA.

4.2.9 Bioinformatische Analysen veröffentlichter Datensätze

Auf der „R2 Genomics Analysis and Visualization Platform“ (<http://r2.amc.nl>) öffentlich zugängliche, präprozessierte und normalisierte Datensätze von RNA-Sequenzierungen aus Tumorbiopsaten von Neuroblastompatienten (GSE49711/GSE62564) wurden auf die im Ergebnisteil beschriebenen konkreten Fragestellungen hin bioinformatisch und statistisch analysiert. Die Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde unter Nutzung der Plattform-eigenen Analysetools sowie mittels der Open-Source-Software R und deren Erweiterungstool Bioconductor nach Standardverfahren durchgeführt. Hierbei erfolgte neben der Nutzung der RNA-Expressionsdaten des Weiteren ein Rückgriff auf die hinterlegten klinischen Annotationen und den *MYCN*-Amplifikationsstatus. Die Immunzell-Gensignaturen wurden der Veröffentlichung von Bindea *et al.* (2013) entnommen. Die Expressionslevel der Signatur sind definiert als Mittelwerte der in eine logarithmische Skala transformierten Genexpressionswerte. Um eine genaue Aufteilung der Kontribution einzelner Immunzellsubgruppen zu ermöglichen, erfolgte ebenfalls mit R zudem eine bioinformatische Analyse nach der CIBERSORT-Methode (Newman *et al.*, 2015).

4.2.10 Mutationsfrequenzanalysen

Prozessierte Datensätze über nonsynonyme Mutationen und den *MYCN*-Amplifikationsstatus in insgesamt 235 als High-Risk klassifizierten Neuroblastomen wurden aus der kürzlich veröffentlichten Arbeit von Pugh *et al.* (2013) entnommen und gemeinsam mit der eigenen Patientenkohorte (GSE49711/GSE62564) auf die dargelegten Fragestellungen hin analog zu den anderen bioinformatischen Untersuchungen mittels R analysiert. Die Daten über die Mutationsfrequenzen aus der 498 Patienten großen eigenen Kohorte wurden von Matthias Fischer aus dem Universitätsklinikum Köln zur Verfügung gestellt.

4.2.11 Durchflusszytometrie

Die ausgesäten Zellen wurden nach vorsichtiger Abnahme des Mediums mit PBS gewaschen und sofern nötig durch kurze Zugabe von 0,05 % Trypsin abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in identische Mengen Puffer aus PBS mit 1 % BSA und 0,1 % Natriumazid resuspendiert und in eine 96-Well-Rundbodenplatte auf Eis überführt. Es folgte eine Zentrifugation der Platte bei 400 g und 4° C für zwei Minuten. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Platte kurz geschüttelt, bis sich das sichtbare Zellpellet wieder gelöst hatte. Die Wells wurden zum Auswaschen der Zellen zwei weitere Male mit identischer Puffer-Lösung gefüllt und zentrifugiert wie zuvor beschrieben. Zur Färbung wurden die Zellen in selbiger Lösung mit Fluorchrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern für 30 Minuten bei Dunkelheit resuspendiert. Als Kontrollen wurden Zellen auch jeweils einzeln beziehungsweise gar nicht gefärbt. Eine Aufstellung der verwendeten Antikörper findet sich in Tab. 4 im Materialteil 4.1.7. Zur Lagerung wurden die Zellen in dem Puffer zusätzlich mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und über Nacht bei 4° C dunkel aufbewahrt. Die Messung der Signalstärke der Antikörper in den Proben erfolgte dann am Folgetag mit dem FACSCanto Flow Cytometer, die Auswertung mittels der Software FlowJo. Alle Experimente wurden als biologisches Triplikat durchgeführt und ausgewertet; bei den gezeigten Resultaten handelt es sich um repräsentative Ergebnisse.

4.2.12 Sandwich ELISA-Immunoassay

Die Überstände der behandelten Zellen wurden bei 80- bis 90-prozentiger Konfluenz der Zellen abgenommen und bei 300 g drei Minuten lang zentrifugiert. Zur Aufbewahrung wurden die Proben für eine kurze Zeit bei -80° C gelagert und dann vor Verwendung auf Eis aufgetaut. Der ELISA wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem Cxcl10-ELISA-Kit in einer high binding ELISA-Platte durchgeführt. Die Extinktion der Proben wurde mittels Tecan Infinite M200 Pro gemessen. Um hierbei materialbedingte Messungenauigkeiten zu korrigieren, wurde die gemessene Extinktion bei 570 nm von der bei 450 nm Lichtwellenlänge abgezogen. Die Cxcl10-Konzentration in den Proben ergibt sich durch die Relation der gemessenen jeweiligen Extinktionswerte zu der mit dem vom Hersteller bereitgestellten Standard erstellten Standardreihe.

4.2.13 LacZ-Assay

Für dieses Testverfahren wird die Zelllinie B3Z eingesetzt, bei der es sich um eine immortalisierte CD8-positive T-Zellhybridom-Linie handelt, die einen für das über H2-K^b präsentierte Peptid Ovalbumin₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) spezifischen T-Zellrezeptor exprimiert. Zudem verfügt die Linie über ein bakterielles β -Galaktosidase-Gen (LacZ), das transkriptionell durch den NFAT-Transkriptionsfaktor kontrolliert wird und somit als Reporter für eine Aktivierung der B3Z-Zelle genutzt werden kann (Karttunen *et al.*, 1992). Die B3Z-Zellen werden in den Überstand zuvor bereits behandelter und dann temporär mit SIINFEKL versetzter Zielzellen gegeben und für 18 Stunden koinkubiert. In diesem Zeitraum können sich im Falle einer gegebenen SIINFEKL-Antigenpräsentation über MHC-I auf den Zielzellen eine Bindung der B3Z-Zellen über ihren T-Zellrezeptor sowie eine Aktivierung der T-Zelle ergeben. Diese unter anderem über NFAT-vermittelte Aktivierung wiederum würde dann das LacZ-Gen aktivieren. Nach Isolation der Zielzell-B3Z-Zell-Bindungen durch Waschschriffe wird ein CPRG-enthaltendes Assaysubstrat hinzugegeben. CPRG enthält mit Phenolrot einerseits einen bei leicht saurem pH roten pH-Indikator und andererseits in Form von β -D-Galaktopyranosid ein durch LacZ katalysiert hydrolysierbares Galaktosidanalagon. Im Falle der Aktivierung des LacZ-Gens resultiert daher durch die katalysierte Hydrolyse des Galaktosids eine zügigere Freisetzung des Phenolrots und hierbei eine dunkelrote Färbung der zunächst orange-gelben Substratlösung durch das Phenolrot.

Die behandelten mNB-A1-Zellen wurden für dieses Experiment in eine 96 Well-Platte ausgesät und mit 50 μ M DMXAA in 1 % FCS-enthaltendem Medium stimuliert. Die niedrige Konzentration an FCS sollte später eine FCS-vermittelte T-Zell-Aktivierung verhindern. Drei Stunden vor Ende der Stimulation wurden jedem Well 0,05 μ g/ml Ovalbumin₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) hinzugefügt. Mit Ablauf der Stimulation wurde das Medium dann abgenommen und ersetzt durch 1 % FCS-Medium mit 50.000 B3Z-Zellen. Nach 18 Stunden Koinkubation der mNB-A1- und B3Z-Zellen wurde erneut alles Medium abgenommen und die Wells wurden vorsichtig mit PBS ausgewaschen. Es folgte eine zehnmünütige Lyse der Zellen mit 20 μ l TLB pro Well bei Raumtemperatur auf einem Roller. Im nächsten Schritt wurde das CPRG enthaltende Assaysubstrat zugegeben. Es erfolgte eine serielle Messung der Extinktion bei 562 nm mit dem Tecan Infinite 200 Pro

bei 37° C. Als Kontrollen fungierten mNB-A1-Zellen ohne zugesetztes SIINFEKL, nur SIINFEKL-enthaltendes Medium, B3Z-T-Zellen ohne SIINFEKL sowie reiner Lysepuffer. Die Durchführung des Experiments erfolgte im biologischen Triplikат.

4.2.14 T-Zell-Migrationsanalyse

Zur Prävention einer durch FCS-Bestandteile induzierten Chemotaxis erfolgte für die entsprechenden Experimente eine Kultur der mNB-A1-Zellen in auf 1 % FCS reduziertem Medium, wobei die sonstige, bereits beschriebene Zusammensetzung unverändert blieb. Nach Abschluss des Experiments wurden die Überstände von den Zellen abgenommen und bei 400 rcf drei Minuten lang zentrifugiert. Zur Aufbewahrung wurden die Proben kurze Zeit bei -80° C gelagert und dann vor Verwendung auf Eis aufgetaut.

Die Migrationsanalyse erfolgte in einer Microfluidic-Kammer mit μ -slide III 3-in-1 (Ibidi) Kanal-Kammern. Zunächst wurden CD8-positive T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten von OT-1-Mäusen durch MACS-Separierung mit negativer Selektion gemäß den Herstellerangaben (Miltenyi) isoliert. Anschließend wurden die selektionierten T-Zellen für 120 Stunden mit Ovalbumin gepulsten dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von C57BL/6JRcc-Mäusen aktiviert. Die Slides der Kanal-Kammern wurden mit 13 μ g/ml anti-humanen IgG-Antikörpern der Ziege (Dianova) beschichtet und dann mit 1 % BSA in PBS bei Raumtemperatur für eine Stunde geblockt. 50 μ g/ml murines ICAM-1/FC (R&D Systems) wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Antikörper-beschichtete Oberfläche gegeben. Sämtliches in der Kammer verwendetes Medium wurde zuvor mit 5 mM Mg^{2+} versetzt. Als Negativkontrolle gegenüber den Proben in der Microfluidics-Kammer fungierte ebenfalls 1 % FCS enthaltendes Medium, das zudem mit 50 μ M DMXAA versetzt wurde. Zweimal 10⁵ der vorbereiteten CD8-positiven T-Zellen wurden in dieses Kontrollmedium überführt und in den Kanal transferiert. Durch einen jeweils über Spritzenpumpen kontrollierten Einstrom der konditionierten mNB-A1-Zell-Überstände und des Kontrollmediums bei einer Geschwindigkeit von 10 μ l/min wurde ein Gradient aufgebaut. Über ein vollautomatisches Olympus Fluoview 1000 Invers-Konfokalmikroskop mit motorisiertem xyz-Objektisch (Märzhäuser) konnten in Echtzeit Lebendzell-Aufnahmen der adhärenen CD8-positiven T-Zellen erstellt werden. Die Chemotaxis der T-Zellen

wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten bei Aufnahme von Differentialinterferenzkontrast-Bildern mittels eines 0.40 UPLAPO 10x Objektivs (Olympus) im Abstand von 60 Sekunden aufgezeichnet. Aufgrund des mit den meisten Chemokinen vergleichbaren Molekulargewichts wurde 5 μ M FITC-Dextran-Lösung (10 kDa, Invitrogen) verwendet, um das Konzentrationsprofil der Zellüberstände zu charakterisieren. Migratorische Parameter der beweglichen Zellen wurden mit den Manual Tracking and Chemotaxis Tool Plugins in ImageJ berechnet. Die Durchführung und Auswertung der Migrationsanalysen in den vorbereiteten Überständen erfolgte wie hier beschrieben durch M. T. Kronmüller und T. Quast aus der Abteilung für molekulare Immunologie und Zellbiologie, Life & Medical Sciences Institute (LiMES) Bonn. Die Ergebnisse sind in der eingangs genannten gemeinsamen Veröffentlichung dargestellt.

4.2.15 Statistische Tests

Die Berechnung aller statistischen Tests erfolgte mit R und ist in den entsprechenden Abbildungen präzisiert. Für die qRT-PCR-Analysen, wie auch die Ergebnisse aus ELISA-Untersuchungen, wurde als statistischer Test der Whitney-Mann-U-Test, der auch als Wilcoxon rank test bekannt ist, gewählt. Grundlage für diese Wahl ist die nicht parametrische Datenlage, bei der eine Normalverteilung zwar theoretisch denkbar, jedoch aber nicht gesichert ist. Zu berücksichtigen ist insbesondere, dass es sich bei den statistischen Bewertungen um eine rechnerische Annäherung an in komplexen Experimenten gemessene biologische, nicht direkt zählbare Zusammenhänge handelt. So wurden etwa die qRT-PCRs auf Grundlage relativer Expressionen in humanen oder murinen Zellen ausgewertet.

Einzelne Verfahren, wie beispielsweise die Durchflusszytometrie oder der Immunoblot, ziehen ihre Validität ohne Möglichkeit einer statistischen Prüfung direkt aus den Ergebnissen der Beobachtung und Messung. Um insbesondere auch hier das Risiko einer Fehlannahme zu reduzieren, erfolgte die Durchführung sämtlicher Experimente in voneinander unabhängigen biologischen, sowie teils zusätzlich auch technischen Replikaten. Eine präzisierte Angabe zur Zahl der Replikate (n) findet sich in den Legenden der jeweiligen Abbildungen.

Die bioinformatischen Analysen beinhalteten im Vergleich zu den zellexperimentellen Versuchsauswertungen erheblich größere Stichprobengrößen, die zudem einem

Kollektiv von Patienten oder Zelllinien entstammen. Hier kann neben der Varianzhomogenität von einer Normalverteilung der Messwerte ausgegangen werden. Einzelne Analysen der Datensätze beinhalteten daher als statistische Testung eine Varianzanalyse (ANOVA). Um das Risiko einer Alphafehler-Kumulierung zu berücksichtigen, fand gemäß der Angabe in den Legenden bei multiplen Vergleichen von Mittelwerten eine korrigierende statistische Testung in Form des TukeyHSD-Test statt.

Die Annahme der Signifikanz eines Messunterschiedes erfolgte generell ab einem p-Wert $< 0,05$. Die in Graphen angegebenen Signifikanzen sind wie folgt zu verstehen: n.s.: nicht signifikant ($p > 0,05$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.2.16 Grafische Elemente

Sämtliche Abbildungen, Tabellen und Grafiken in dieser Arbeit sind selbst erstellt. Einige grafische Elemente entstanden unter Zuhilfenahme von unter Creative Commons License stehenden und selbst weiter nachbearbeiteten Vorlagen von Servier Medical Art (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>). Es handelt sich bei allen schematischen Abbildungen um eine vereinfachende Darstellung ausgewählter Zusammenhänge. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind bestimmte Prozesse teilweise grafisch im Detail nicht korrekt wiedergegeben.

5. Ergebnisse

5.1 $MYCN_{amp}$ geht mit verminderter Expression von Immunzellensignaturen einher

Zur Evaluation der T-Zell-Infiltration in Neuroblastomen wurde zunächst ein öffentlich verfügbarer Genexpressionsdatensatz aus einer 3'-RNA-Sequenzierung einer Kohorte von 498 zuvor beschriebenen primären Neuroblastomen mit klinischen Annotationen und bekanntem $MYCN$ -Amplifikationsstatus auf mögliche erkennbare Zusammenhänge zwischen einem proinflammatorischen Phänotyp und hierfür prädiktiven Faktoren hin analysiert und ausgewertet (siehe Abb. 3). Eine detailliertere Darstellung der methodischen Herangehensweise findet sich im Methodenteil dieser Arbeit. Die Proben wurden in einem ersten Schritt aufsteigend nach ihrer Expression einer T-Zell-Signatur sortiert.

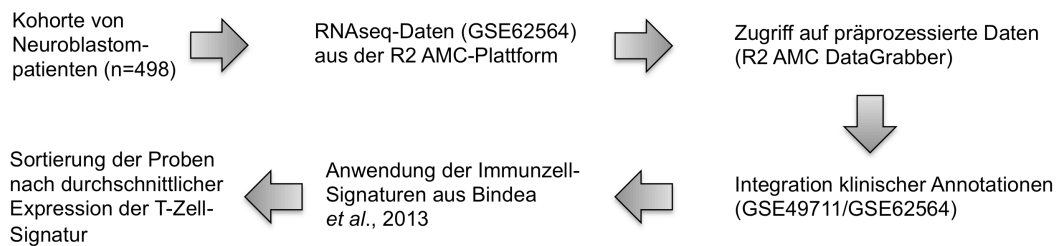


Abb. 3: Schematische Darstellung des Vorgehens zur bioinformatischen Analyse der Sequenzierungsdaten von 498 Neuroblastompatienten

Diese verwendete Signatur wurde der Veröffentlichung von Bindea *et al.* (2013) entnommen und setzte sich zusammen aus einem Panel verschiedener mit T-Zellen sowie deren Aktivierung assoziierter Gene wie $CD2$, $CD3D$, $CD6$, $CD28$, $CD247$, LCK oder $PRKCQ$. Es ergab sich durch die beschriebene Sortierung eine deutliche Häufung der $MYCN$ -amplifizierten Neuroblastome unter den Tumoren mit geringer Expression der T-Zell-Signatur (siehe Abb. 4A). Um auszuschließen, dass spezifische Sonderfälle wie beispielsweise sich bereits in Spontanremission befindliche Neuroblastome des Stadiums 1 eine Perturbation der Ergebnisse herbeiführen, erfolgte eine identische Analyse ausschließlich mit der prognostisch ungünstigen Subgruppe der metastasierten

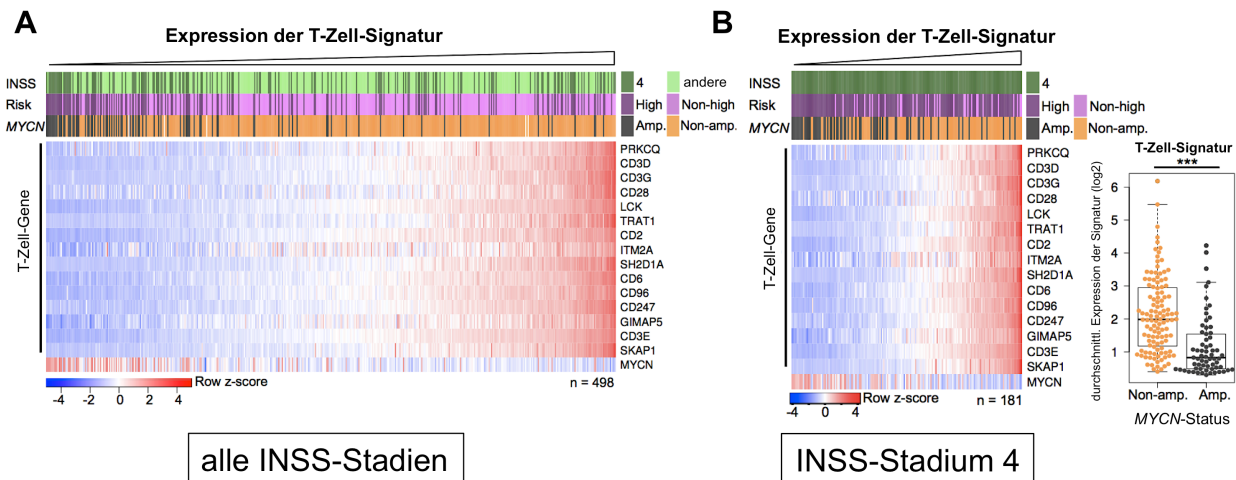


Abb. 4: *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome zeigen eine niedrigere Expression einer T-Zell-Signatur. **A** Heatmap-Darstellung der Expressionstärke der Gene einer T-Zell-Signatur mit nach Bindea *et al.* (2013) definierten berücksichtigten Genen. Die Rohdaten entstammen präprozessierten, öffentlich zugänglichen Datensätzen aus 3'-mRNA-Sequenzierungen von Tumorbiopsaten (n=498). **B** Links: Heatmap-Darstellung einer identischen Analyse, hier jedoch nur mit den Patientenproben, die dem Stadium 4 nach INSS zugeordnet worden sind (n=181). Rechts: Boxplot-Vergleich der gesamten T-Zell-Signatur-Expression zwischen *MYCN*-amplifizierten und nicht amplifizierten Neuroblastomen aus der gleichen Analyse. ***p<0,001; Whitney-Mann-U-Test.

Neuroblastome im Stadium 4 nach INSS des gleichen Kollektivs. Auch hier war sowohl die *MYCN*-Amplifikation als auch eine hohe Expression von *MYCN*-mRNA mit einer mangelhaften Expression der T-Zell-Signatur assoziiert (siehe Abb. 4B). Ein ähnliches Bild ergab sich bei Wiederholung der Analyse mit einer zytotoxischen Immunzell-Gensignatur (siehe Abb. 5). Auch hier war die Signatur in den nicht-*MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen deutlich stärker exprimiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine Aufschlüsselung der untersuchten Proben nach anatomischer Lokalisation gegenüber der Gesamtzahl, dem *MYCN*-Amplifikationsstatus, dem INSS-Stadium und der Risikogruppe (siehe Tab. 6). Die anatomische Verteilung der Proben in den jeweiligen Gruppen ergab ein relativ gleichmäßiges Bild. Etwa 75 % der Biopsate stammen insgesamt aus den Nebennieren oder dem Abdomen und Becken, den Regionen in denen Neuroblastome auch statistisch am häufigsten auftreten. Eine Wiederholung der zuvor mit der Gesamtzahl aller Proben durchgeführten Analysen bei Reduktion der erfassten Biopsate auf die Nebennieren (siehe Abb. 6, n=197) sowie Abdomen und

Becken (siehe Abb. 7, n=116) als Ursprungsort ergab weder für die T-Zell-, noch für die zytotoxische Immunzell-Signatur ein abweichendes Resultat.

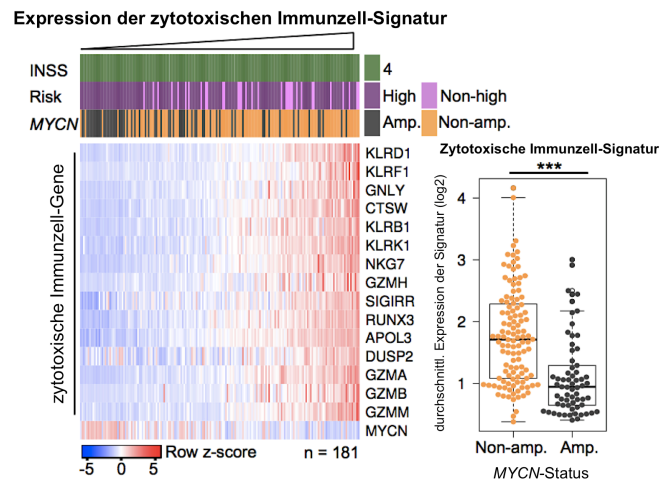


Abb. 5: *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome des Stadiums 4 nach INSS zeigen eine niedrigere Expression einer zytotoxischen Immunzell-Signatur. Links: Heatmap-Darstellung der Expressionsstärke der Gene einer zytotoxischen Immunzell-Signatur mit nach Bindea *et al.* (2013) definierten enthaltenen Genen. Die Rohdaten entstammen präprozessierten, öffentlich zugänglichen Datensätzen aus 3'-mRNA-Sequenzierungen von Tumorbiopsaten (n=181). Rechts: Boxplot-Vergleich der zytotoxischen Immunzell-Signatur-Expression zwischen *MYCN*-amplifizierten und nicht amplifizierten Neuroblastomen aus der gleichen Analyse. ***p<0,001; Whitney-Mann-U-Test.

Tab. 6: Verteilung der Lokalisationen der für die RNAseq (GSE62564) biopsierten Tumoren, die den bioinformatischen Analysen zugrunde liegen

Ursprung	Abdomen/ Becken	Lymph- knoten	Hals	Haut/ Weichteile	Hoden	Knochen	Leber	Neben- nieren	Ovarien	sonstiges	Thorax	Σ
Metastase	0	17	0	7	1	5	16	0	2	0	0	48
Primärtumor	116	0	10	0	0	0	0	197	0	1	48	372
gesamt	116	17	10	7	1	5	16	197	2	1	48	420
MYCN-Status												
Non-amp.	96	11	10	6	1	2	13	156	0	1	47	343
Amp.	20	6	0	1	0	3	1	39	2	0	0	72
NA	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1	5
INSS												
1	24	0	2	0	0	0	0	65	0	1	14	106
2	23	0	3	0	0	0	0	32	0	0	15	73
3	27	0	2	0	0	0	0	19	0	0	12	60
4	35	17	3	4	0	5	4	52	2	0	6	128
4S	7	0	0	3	1	0	12	29	0	0	1	53
Risk												
Non High-risk	74	1	10	5	1	2	14	138	0	1	44	290
High-risk	42	16	0	2	0	3	2	59	2	0	4	130

nur Nebennieren

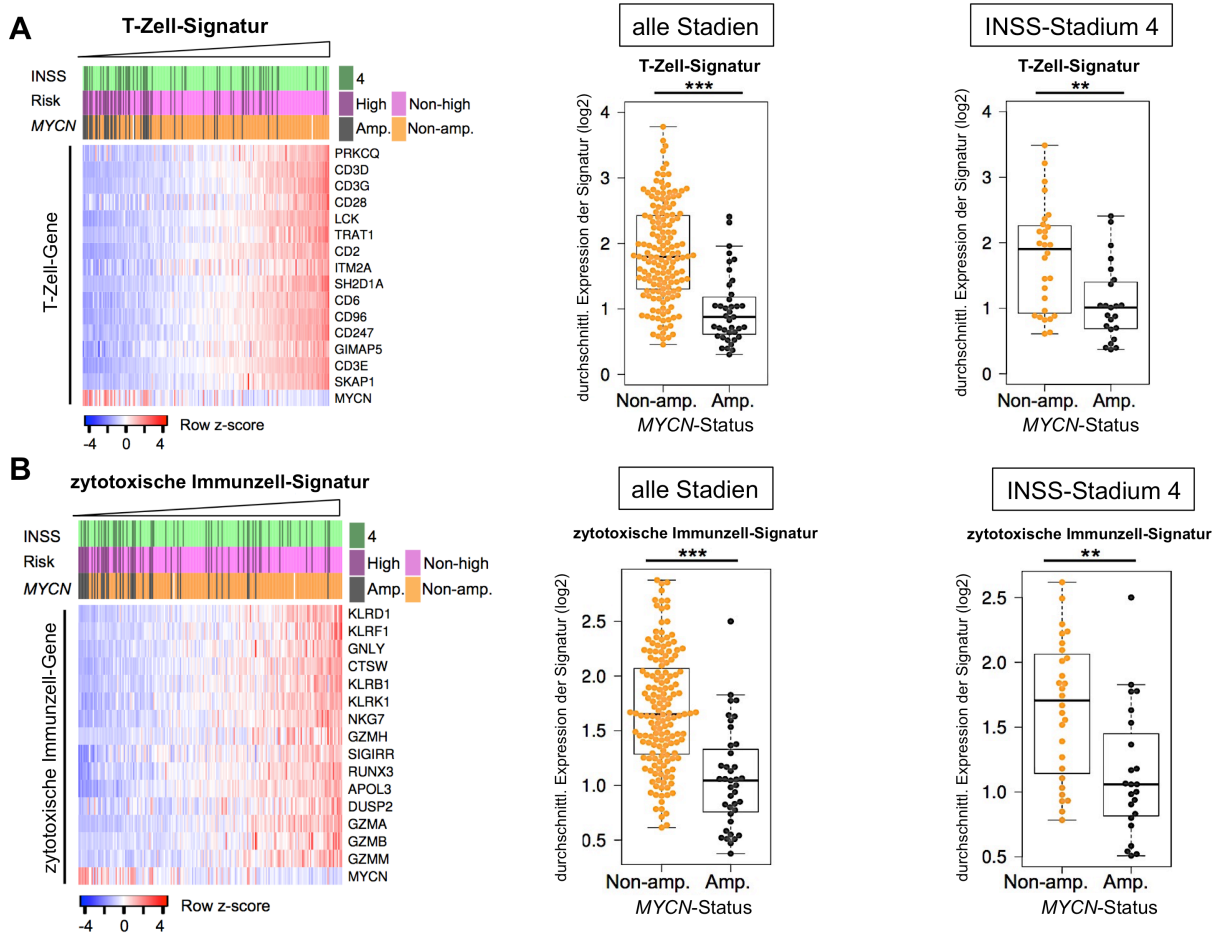


Abb. 6: Reduktion der für die Analysen verwendeten Proben auf die Lokalisation der Nebennieren. **A** Links: Heatmap-Darstellung der Expressionsstärke der Gene einer T-Zell-Signatur mit nach Bindea *et al.* (2013) definierten beinhalteten Genen. Die untersuchten Rohdaten entstammen präprozessierten, öffentlich zugänglichen Datensätzen aus 3'-mRNA-Sequenzierungen von Tumorbiopsaten. Erfasst wurden im Unterschied zu den vorhergehenden Abb. nur die Proben, deren Ursprungsgewebe die Nebennieren sind (n=197). Rechts: Boxplot-Vergleich der zytotoxischen Immunzell-Signatur-Expression zwischen *MYCN*-amplifizierten und nicht amplifizierten Neuroblastomen aus der gleichen Analyse. Hierbei wurden zunächst Proben von Neuroblastomen aller Stadien und anschließend ausschließlich des INSS-Stadiums 4 betrachtet. ***p<0,001; **p<0,01; Whitney-Mann-U-Test. **B** Gleiche Analysen wie in (A), allerdings unter Verwendung der ebenfalls bereits in den Abb. zuvor verwendeten zytotoxischen Immunzell-Signatur.

nur Abdomen und Becken

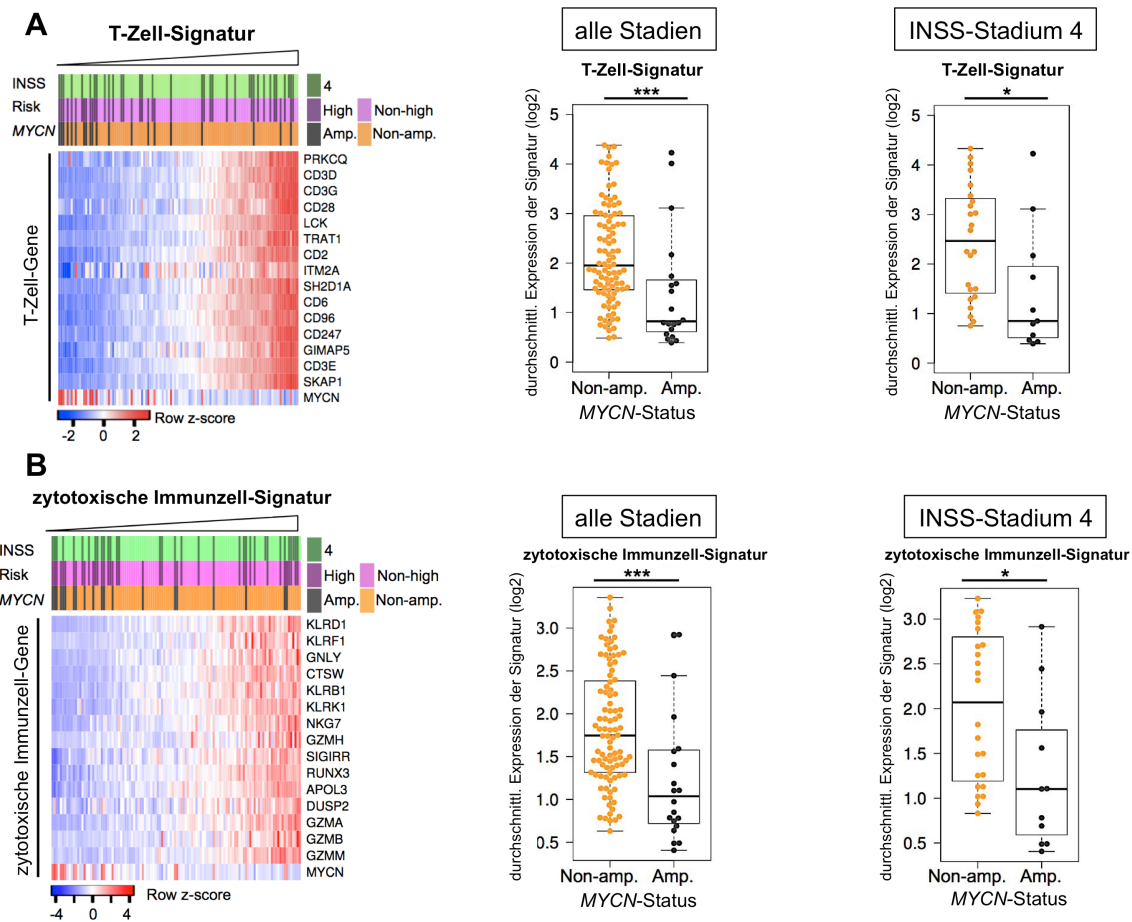


Abb. 7: Reduktion der für die Analysen verwendeten Proben auf die Lokalisationen Abdomen und Becken. **A** Links: Heatmap-Darstellungen der Expressionsstärke der Gene einer T-Zell-Signatur mit nach Bindea *et al.* (2013) definierten beinhalteten Genen. Die untersuchten Rohdaten entstammen den in den vorherigen Abb. beschriebenen Datensätzen. Erfasst wurden nur die Proben, die durch Biopsien in Abdomen oder Becken gewonnen worden waren ($n=116$). Rechts: Boxplot-Vergleich der zytotoxischen Immunzell-Signatur-Expression zwischen *MYCN*-amplifizierten und nicht amplifizierten Neuroblastomen aus der gleichen Analyse analog zu Abb. 6. *** $p<0,001$; * $p<0,05$; Whitney-Mann-U-Test. **B** Gleiche Analysen wie in (A), allerdings unter Verwendung der bereits in den Abb. zuvor verwendeten zytotoxischen Immunzell-Signatur.

Auch hier zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen *MYCN*-Amplifikation oder -Expression und den beiden Immunzell-Signaturen. Ebenso ergaben sich zwischen den Lokalisationen keine relevanten Unterschiede in den Analysen. Durch diese Auftrennung der Proben konnte ausgeschlossen werden, dass lokale Besonderheiten, wie beispielsweise bei Punktion eines Lymphknotens, die T-Zell-Analyse konfundieren.

5.2 Verminderte CD8-T-Zell-Infiltration bei *MYCN*-amplifizierten Tumoren

Der Schwerpunkt der mittels der T-Zell-Signatur untersuchten Gene liegt auf in aktivierten CD4- und vor allem CD8-positiven T-Zellen exprimierten Genen. Jedoch ist die Expression der Signaturgene nicht spezifisch für diese Untergruppen adaptiver Immunabwehr. Um eine Perturbation der Resultate aus dem Genexpressionsdatensatz etwa durch eine überdurchschnittliche Kontribution immunsupprimierender regulatorischer T-Zellen (Treg-Zellen) zur T-Zell-Gesamtpopulation auszuschließen, schloss sich eine bioinformatische CIBERSORT-Analyse an, die eine Abschätzung des relativen Anteils bestimmter Immunzellsubtypen ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden zunächst die T-Zell- und die zytotoxische Immunzell-Signatur in eine neue, kombinierte Signatur, die auch Markergene für weitere Subgruppen wie Natürliche Killerzellen enthielt, integriert und die Proben dann nach der Stärke ihrer Gesamtexpression der Signatur sortiert. Die Anwendung der CIBERSORT-Methode über die Software R erlaubte dann die Schätzung der Fraktionsstärke bestimmter Leukozyten-Subtypen in der RNA-Expression der Signatur (siehe Abb. 8).

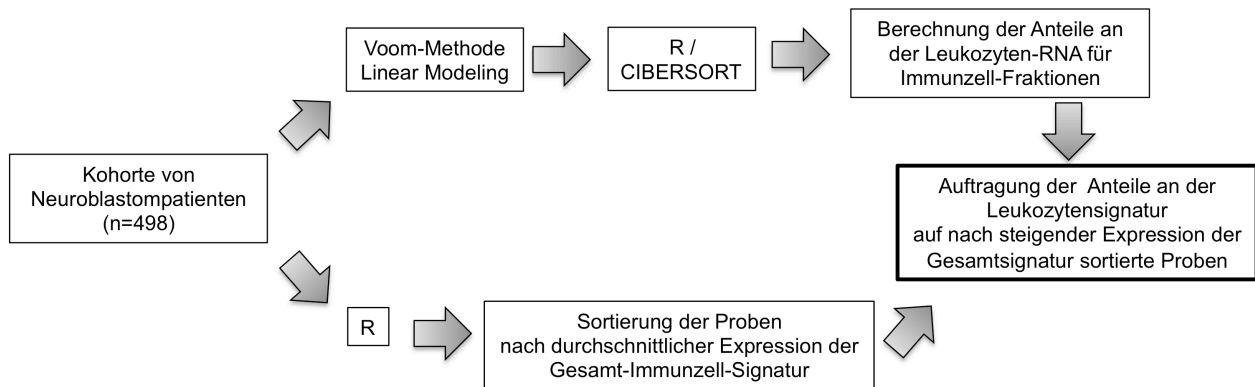


Abb. 8: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Anwendung der CIBERSORT-Methode

Die gemäß dem Schema im ersten Schritt zunächst angefertigte Gesamt-Immunzell-Signatur beinhaltet Gene für CD4-positive und CD8-positive T-Zellen, Treg-Zellen, Natürliche Killerzellen, zytotoxische Immunzellen sowie auch Gene für Immun-Checkpoints. Die Proben wurden nach der Expressionsstärke dieser kombinierten Signatur sortiert (siehe Abb. 9).

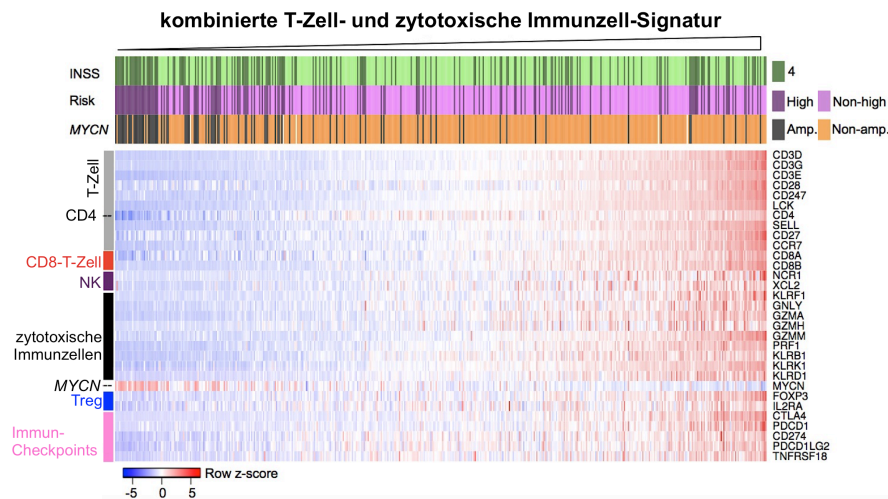


Abb. 9: Nach Expression einer kombinierten T-Zell- und zytotoxischen Immunzellsignatur sortierte Proben von Neuroblastombiopsien. Heatmap-Darstellung der Expressionsstärke der Gene einer erweiterten und kombinierten T-Zell- und zytotoxischen Immunzell-Signatur. Die Sortierung der Proben erfolgte aufsteigend nach gesamter Expressionsstärke der Signatur. Die exakte Gen-Zusammensetzung der Signatur ist der Beschriftung zu entnehmen und zudem farbkodiert. Die untersuchten Rohdaten entstammen präprozessierten, öffentlich zugänglichen Datensätzen aus 3'-mRNA-Sequenzierungen von Tumorbiopsaten (n=498).

Hierbei zeigte sich mit steigender Expression der Gesamt-Immunzell-Signatur ein ebenfalls steigender relativer Anteil an CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen. Somit bestätigte die Anwendung von CIBERSORT den bereits in den vorhergehenden Analysen gezeigten Trend einer reduzierten Infiltration mit CD8-positiven T-Zellen bei Vorliegen einer *MYCN*-Amplifikation (siehe Abb. 10A). In geringerem Maße nahm auch der Anteil regulatorischer T-Zellen zu, was jedoch am ehesten auf eine negative Rückkopplung des Immunsystems, sichtbar auch in Form gesteigerter Expression von Immuncheckpoint-Genen wie *CD274* oder *CTLA4*, zurückzuführen ist. Zugleich nahm der Anteil aktivierter Natürlicher Killerzellen mit steigender Expression der Signatur ab, der nicht aktivierter hingegen zu (siehe Abb. 10B). Eine vertiefte Untersuchung dieser Beobachtung wäre experimentell denkbar, ging jedoch über die Fragestellung dieser Arbeit hinaus. Monozyten und Makrophagen verzeichneten bei steigender Expression der Signatur konstante bis leicht steigende Anteile, der Anteil der proinflammatorischen Makrophagen (M1-Subtyp) nahm jedoch deutlich zu (siehe Abb. 10C).

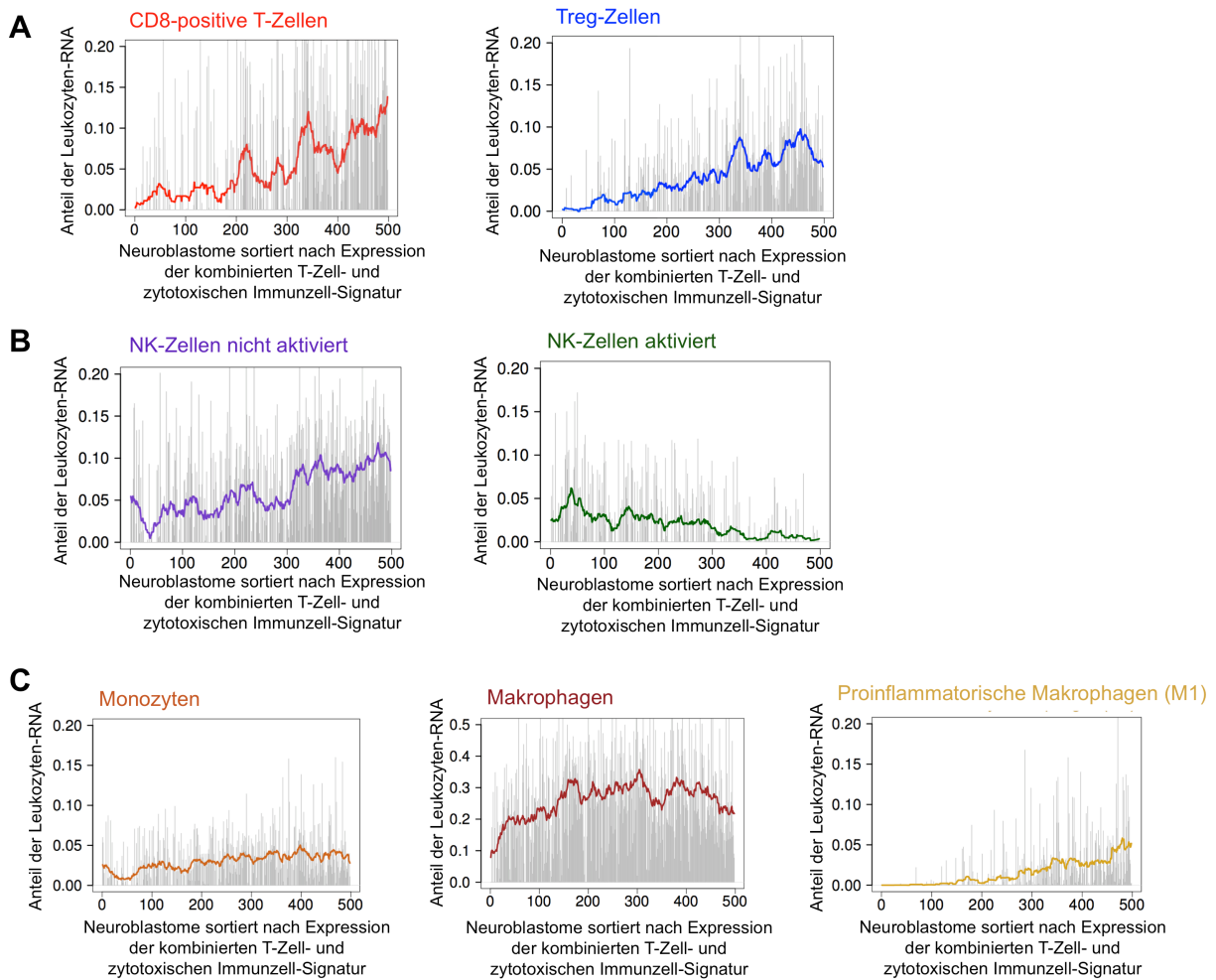


Abb. 10: Aufschlüsselung des Anteils einzelner Immunzellsubtypen an der Gesamt-Leukozyten-RNA mittels einer CIBERSORT-Analyse. Gezeigt werden die Kontributionen von CD8-positiven und regulatorischen T-Zellen (**A**), NK-Zellen (**B**) sowie von Monozyten und Makrophagen (**C**). Die Bestimmung erfolgte mittels der CIBERSORT-Methode. Die Proben wurden steigend nach ihrer Expression der in Abb. 9 gezeigten kombinierten T-Zell- und zytotoxischen Immunzell-Signatur sortiert. Die vertikalen hellgrauen Linien verdeutlichen den jeweiligen Immunzellanteil in der individuellen Probe. Bei der farbkodierten Linie handelt es sich um die durch Berechnung des gleitenden Mittelwerts bestimmte Trendlinie der gesamten Kohorte (n=498).

5.3 Geringeres Überleben bei verminderter Immunzellsignatur-Expression

Unter Rückgriff auf die klinischen Annotationen zeigte sich in einer im nächsten Schritt erstellten Kaplan-Meier-Kurve, dass eine niedrigere Expression sowohl der T-Zell- als auch der zytotoxischen Immunzell-Gensignatur ebenso wie die *MYCN*-Amplifikation mit einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten einherging (siehe Abb. 11). Als Cutoff-Wert zur Definierung der jeweiligen gegenübergestellten Gruppen „High“ und

„Low“ fungierte der Median der Expression. Die Überlebenskurven belegen einerseits eine Ähnlichkeit der klinischen Verläufe von Patienten mit hoher *MYCN*- und niedriger T-Zell-Signatur-Expression und unterstützen somit die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen dem Onkogen und den adaptiven Immunzellen. Andererseits zeigen sie die prognostische Relevanz eines intakten Immunsystems bei Neuroblastompatienten.

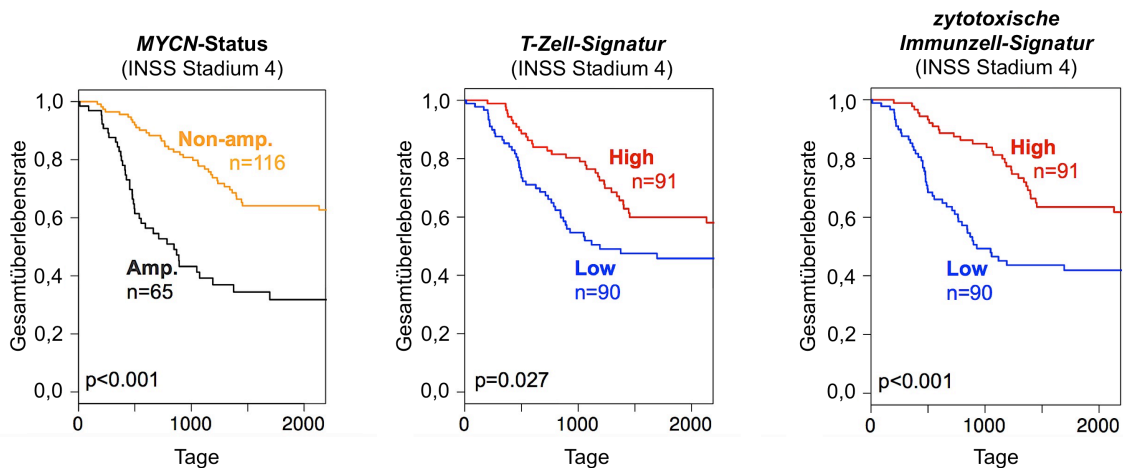


Abb. 11: Ebenso wie der *MYCN*-Status bedeutet auch die Expression einer T-Zell- oder zytotoxischen Immunzellensignatur einen signifikanten Unterschied für das Gesamtüberleben von Neuroblastom-Patienten. Darstellung des Gesamtüberlebens der Neuroblastom-Patienten im INSS-Stadium 4 aus der für die bioinformatischen Analysen verwendeten Kohorte in Kaplan-Meier-Graphen ($n=181$). Grundlage hierfür waren die enthaltenden klinischen Annotationen, die den Sequenzierungsproben zugeordnet wurden. Von links nach rechts erfolgte eine Auftragung des Gesamtüberlebens über die angegebenen Tage für den *MYCN*-Status und die Expression der in den vorherigen Abb. bereits beschriebenen T-Zell- bzw. zytotoxischen Immunzell-Signatur. Die Zuordnung der Proben in die jeweiligen Gruppen „High“ oder „Low“ für die Immunzell-Signaturen erfolgte durch die Festlegung eines Cut off-Wertes durch den Median der gemessenen Expressionen. Die in den jeweiligen Graphen angegebenen p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen log-rank-Tests bestimmt.

5.4 Neoantigenlast ist nicht ausschlaggebend für ermittelte Immunogenität

Theoretisch könnten verschiedentlich ausgeprägte Neoantigen-Mengen die Ursache für die festgestellte divergierende T-Zell-Expression bei den Neuroblastompatienten sein. Obwohl das Neuroblastom generell, wie eingangs erwähnt, verhältnismäßig wenige Neoantigene aufweist, wurde die Zahl nonsynonymer Mutationen, die für 121 Proben

bestimmt worden war, näher analysiert und in Korrelation zur T-Zell-Signatur gesetzt. Nicht-*MYCN*-amplifizierte High-Risk-Neuroblastome hatten signifikant mehr nonsynonyme Mutationen (Median: 17 Mutationen, n=35) als *MYCN*-amplifizierte High-Risk-Neuroblastome (Median: 11 Mutationen, n=36). Diese wiederum hatten signifikant mehr der selbigen als Nicht-High-Risk-Neuroblastome (Median: 4 Mutationen, n=50) (siehe Abb. 12A).

Nur in den High-Risk-Neuroblastomen korrelierte die T-Zell-Signaturexpression signifikant mit der Mutationslast (n=71; r=0,26; p=0,03), wobei dieser Zusammenhang primär vom *MYCN*-Status abhängt, da sich bei isolierter Betrachtung der Subgruppen *MYCN*-amplifizierter und nonamplifizierter High-Risk-Neuroblastome jeweils keine signifikanten Korrelationen ergaben (siehe Abb. 12B und C). Obgleich ein gewisser Einfluss der Mutationslast auf die Immunogenität der High-Risk-Neuroblastome daher nicht ausgeschlossen werden kann, legt die Gesamtschau der Daten dennoch vor allem eine funktionelle Rolle von *MYCN* nahe.

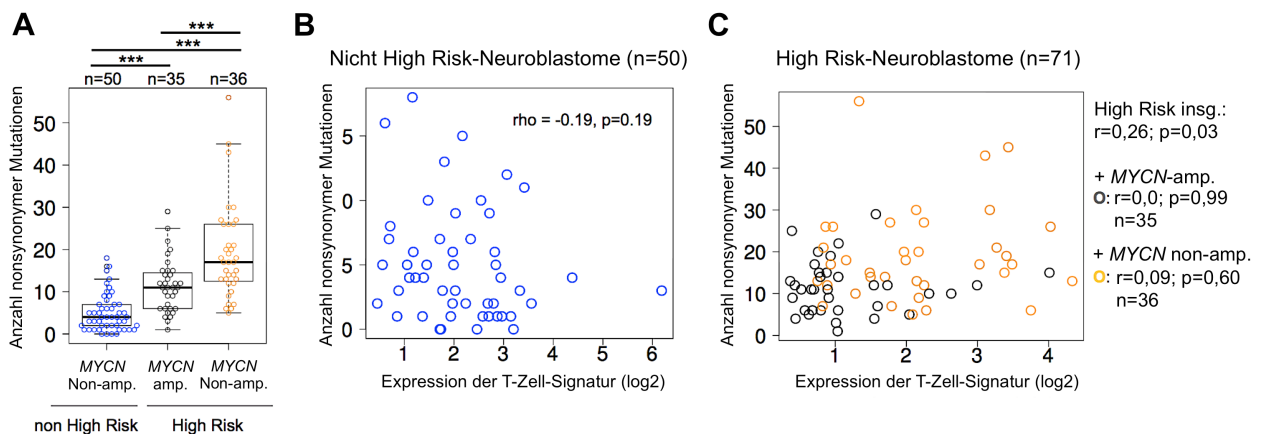


Abb. 12: Nur in High-Risk-Neuroblastomen und vermutlich sekundär abhängig vom *MYCN*-Status korreliert die Mutationslast mit der Expression einer T-Zell-Signatur. **A** Vergleich der Mutationslast in Non-High-Risk- sowie den nach *MYCN*-Amplifikationsstatus weiter aufgeteilten High-Risk-Neuroblastomen (insgesamt n=121). ***p<0,001; Whitney-Mann-U-Test mit False Discovery Rate-Kontrolle. **B** Korrelationsanalyse zwischen der Expression einer T-Zell-Signatur und der Zahl nonsynonymer Mutationen in Nicht-High-Risk-Neuroblastomen und High-Risk-Neuroblastomen (**C**), die farbkodiert weiter nach *MYCN*-Status aufgeteilt wurden. r berechnet nach Spearman rank correlation, p bestimmt durch zweiseitigen Spearman rank correlation test mit Kontinuitätskorrektur.

5.5 $MYCN_{amp}$ geht mit verminderter IFN-Signalweg-Signatur einher

Da T-Zell-reiche Melanome, wie in der Einleitung erläutert, auch einen aktivierten IFN-Signalweg aufweisen, stellte sich die konkrete Frage nach einem Einfluss von $MYCN$ auf die Regulation dieser Signalwege oder auch auf die Chemokinsekretion. Die Expression einer aus einem Melanom-Datensatz entnommenen IFN-Signalweg-Signatur korrelierte gut mit der T-Zell-Signatur der metastasierten Neuroblastome (siehe Abb. 13A). Tatsächlich zeigte sich in den Datensätzen sowohl eine starke Reduktion der IFN-Signalweg-Aktivität insgesamt (siehe Abb. 13B) als auch eine verminderte $CD274$ ($PD-L1$)-Expression (siehe Abb. 13C) in $MYCN$ -amplifizierten Neuroblastomen. Obgleich in seiner Aussagekraft als singulärer Marker eingeschränkt, ist das durch den IFN-Signalweg regulierte PD-L1 oft ein guter Prädiktor für ein Ansprechen auf eine Anti-PD-1/PD-L1-Therapie.

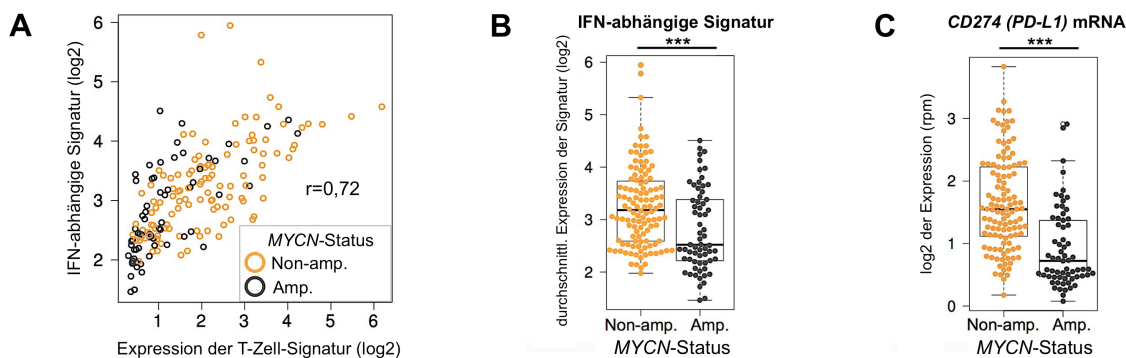


Abb. 13: $MYCN$ -amplifizierte Neuroblastome weisen eine reduzierte, mit T-Zell-Infiltration korrelierende Interferon-Signalweg-Signatur auf. **A** Scatter Dot Plot mit aufgetragenen korrespondierenden Werten für die Expression der IFN-abhängigen sowie der T-Zell-Signatur in den jeweiligen Proben der INSS-Stadium 4-Neuroblastome. Farbkodiert ist der Amplifikationsstatus von $MYCN$ vermerkt. Die Korrelation der Signaturen ($r=0,72$) ist mittels des Spearman rank correlation-Wertes ermittelt worden. **B** Boxplot-Vergleich der Expression der IFN-abhängigen Signatur in Abhängigkeit vom $MYCN$ -Amplifikationsstatus. *** $p<0,001$; Whitney-Mann-U-Test; $MYCN$ -amp.: $n=65$; non- $MYCN$ -amp.: $n=116$. **C** Identische Analyse zu B mit logarithmischer Auftragung der mRNA-Expression (reads per million) von $CD274$ ($PD-L1$).

In $MYCN$ -amplifizierten Neuroblastomen des Kollektivs stellten sich weiterhin ebenso wie zuvor bei den mit T-Zell-Aktivität assoziierten Genen die Expressionslevel von sowohl zahlreichen Zytokin- als auch Chemokin-kodierenden Genen erniedrigt dar

(siehe Abb. 14). Eine aus den Chemokingenen erstellte Chemokin-Signatur bestätigte diese Minderexpression auch im Gesamtbild. Dies kann im Sinne einer möglicherweise resultierenden mangelhaften Chemotaxis ursächlich für ein T-Zell-armes Mikromilieu der betroffenen Neuroblastome sein.

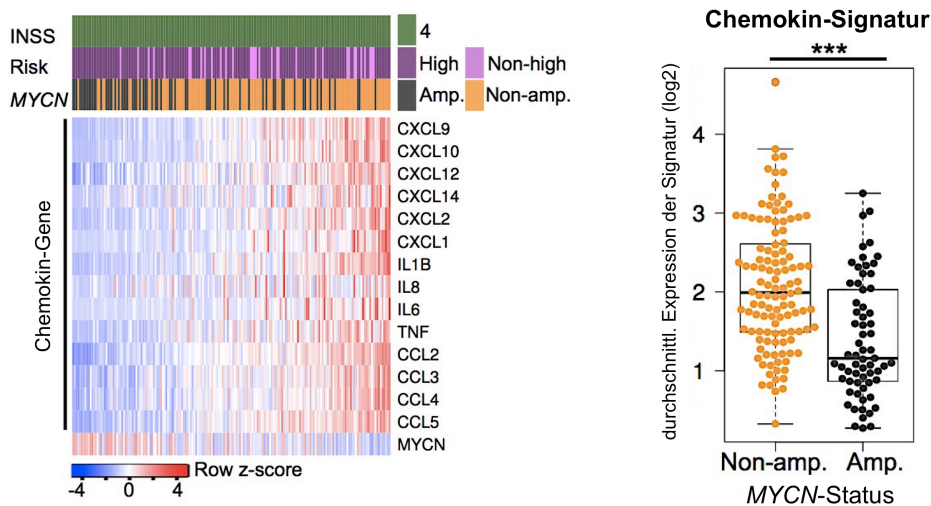


Abb. 14: Die Expression von Chemokin-Genen ist in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen deutlich vermindert. Links: Z-Score transformierte Heatmap-Darstellung der log₂-Expression ausgewählter Zytokin- und Chemokin-Genen in Neuroblastomen des INSS-Stadiums 4. Sortierung der Proben nach Expressionsstärke der Signatur. Klinische und genomische Annotationen wie in der Legende beschrieben. Rechts: Boxplot-Vergleich der Expression der Chemokin-Signatur zwischen *MYCN*-amplifizierten und nicht-amplifizierten Neuroblastomen. *** $p < 0,001$; Whitney-Mann-U-Test. *MYCN*-amp.: $n=65$; non-*MYCN*-amp.: $n=116$.

5.6 *MYCN*-amplifizierte Zelllinien weisen verminderte IFN-Signatur auf

Es stellte sich die Frage, ob diese Ergebnisse von aus Tumorbiopsien gewonnenen Sequenzierungsdaten auch *in vitro* experimentell bestätigt werden können. In einem Vergleich der IFN-Signalwegaktivität in einem ebenso öffentlich verfügbaren Genexpressionsdatensatz 24 humaner Neuroblastomzelllinien ergab sich auch dort über alle Linien hinweg das Bild einer verminderten IFN-Signalwegaktivität in *MYCN*-amplifizierten Zelllinien verglichen mit denjenigen ohne diese Amplifikation (siehe Abb. 15).

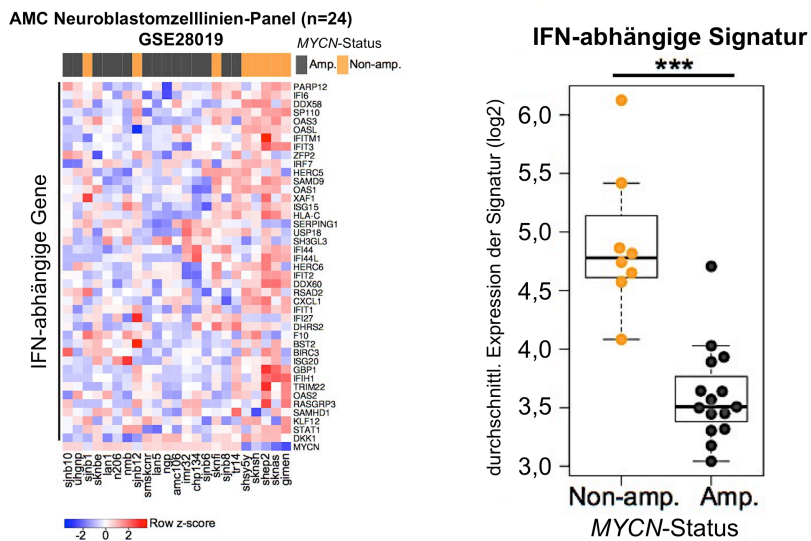


Abb. 15: Auch in Sequenzierungsanalysen humaner Neuroblastomzelllinien ergibt sich eine vermindert exprimierte IFN-Signalweg-Signatur bei Vorliegen einer MYCN-Amplifikation. Links: Z-Score transformierte Heatmap-Darstellung der Expression der IFN-abhängigen Gensignatur der auf der X-Achse betitelten 24 humanen Neuroblastomzelllinien. In der Legende über der Heatmap findet sich farbkodiert der jeweilige MYCN-Amplifikationsstatus. Rechts: Boxplot-Vergleich der Expression der IFN-Signalweg-Signatur zwischen MYCN-amplifizierten und nicht-amplifizierten Neuroblastomen. *** $p < 0,001$; Whitney-Mann-U-Test. MYCN-amp.: n=16; non-MYCN-amp.: n=8.

5.7 MYCN hemmt IFN-abhängige Transkription in humanen Neuroblastomzellen

Von besonderer Relevanz und ausschlaggebend für eine mögliche therapeutische Konsequenz war in einem nächsten Schritt, zu eruieren, ob es sich hierbei um reversible und durch das Onkogen direkt verursachte Effekte handelte. Eine experimentell häufig genutzte Methode, um starke Proteinexpressionen zu verringern, ist die RNAi. Hierbei wird durch eine speziell entwickelte sogenannte siRNA, die eine spezifische Sequenz für ein Zieltranskript aufweist, die komplementäre mRNA dieses Gens gebunden und der Degradation zugeführt. Dadurch können folgende Schritte der Translation nicht mehr ablaufen und die Proteinbiosynthese wird unterbrochen. MYCN ist ein sehr kurzlebiges Protein mit einem hohen Umsatz und daher potenziell besonders anfällig für diese Behandlung.

Es wurde zunächst ein Panel von fünf verschiedenen, gegen MYCN gerichteten siRNAs in fünf verschiedenen kultivierten MYCN-überexprimierenden Neuroblastomzelllinien getestet, um zwei effiziente siRNAs zu bestimmen. In den gut etablierten humanen

MYCN-amplifizierten Neuroblastomzelllinien SKNBE und NMB resultierte die Verminderung der *MYCN*-Expression durch diese zwei unabhängigen siRNAs etwa in der exemplarisch dargestellten Induktion des IFN-abhängigen Gens *OAS1* (siehe Abb. 16). Zugleich zeigte sich als Hinweis auf einen effizienten Knockdown eine deutlich verringerte Menge von *MYCN*-mRNA.

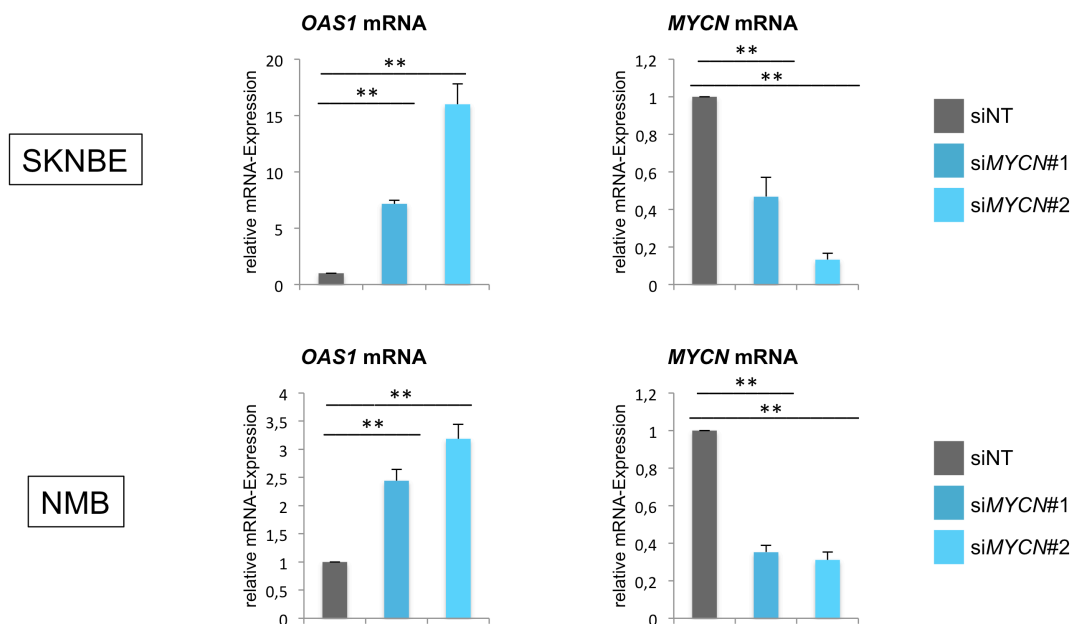
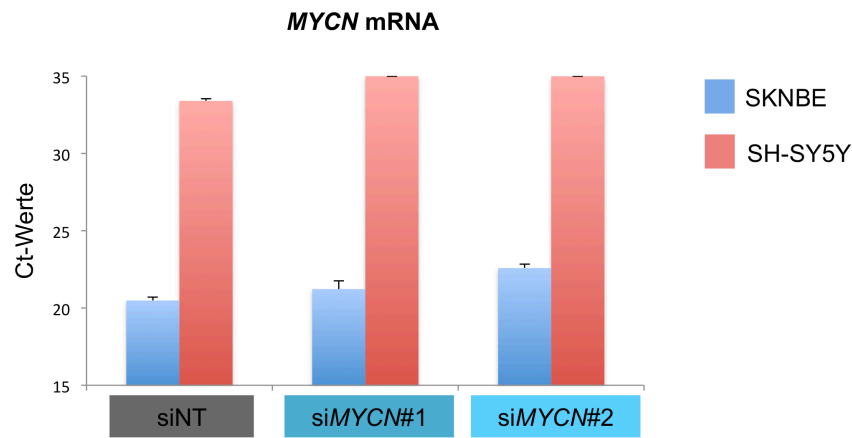


Abb. 16: Eine Reduktion von *MYCN* durch siRNA bewirkt einen Anstieg der Transkription des IFN-abhängigen *OAS1* in den humanen Neuroblastomzelllinien SKNBE und NMB. Ergebnisse einer im biologischen Triplikat mit technischer Doppelbestimmung durchgeführten qRT-PCR-Analyse ($n=3$). Zelllinien, Behandlung und Gentranskripte wie angegeben. Im Balkendiagramm dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen relativen mRNA-Expression bei 24-stündiger Behandlung der Zellen mit siNT (non targeting siRNA-Pool) oder zwei unabhängigen siRNAs gegen *MYCN*. Berücksichtigt ist die im Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung. Es erfolgte eine Normalisierung der Expressionswerte mit Expressionswerten für *UBC*. $**p<0,01$; Whitney-Mann-U-Test.

Theoretisch könnten auch mögliche „off target“-Effekte der siRNAs, also nicht zielgerichtete und unerwünschte Nebenwirkungen, für den Anstieg der IFN-regulierten Gentranskription verantwortlich sein.

A



B

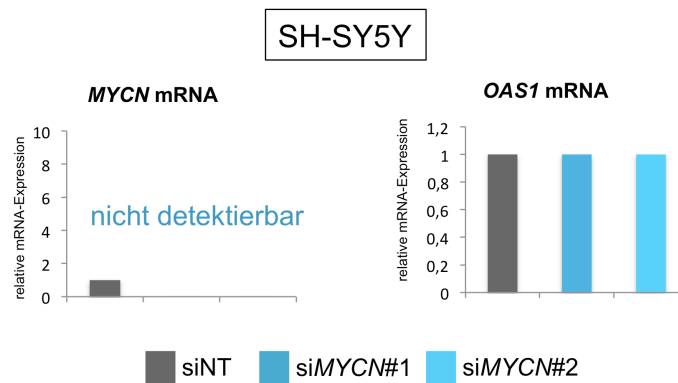


Abb. 17: Ausschluss von off target-Effekten als Ursache der Induktion von IFN-Signalwegen durch siMYCN. qRT-PCR-Analyse in der mit siNT (non targeting siRNA-Pool) oder zwei unabhängigen siRNAs gegen MYCN behandelten humanen, nicht MYCN-amplifizierten Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y. **A** Darstellung des in qRT-PCR-Analysen ermittelten Zeitpunkts des exponentiellen Anstiegs der Fluoreszenz (Ct-Wert) für MYCN im Vergleich zwischen SKNBE- und SH-SY5Y-Zellen (n=3). **B** Ergebnisse einer im biologischen Duplikat mit technischer Doppelbestimmung durchgeführten qRT-PCR-Analyse (n=2) in SH-SY5Y-Zellen nach angegebener Behandlung. Im Balkendiagramm dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen mRNA-Expression unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Es erfolgte eine Normalisierung der Expressionswerte mit Expressionswerten für UBC. Alle $p > 0,05$ (keine Signifikanz); Whitney-Mann-U-Test.

Diesbezüglich ließ sich zeigen, dass es in der humanen nicht-MYCN-amplifizierten Zelllinie SH-SY5Y bei ohnehin im Vergleich zur MYCN-amplifizierten Linie SKNBE kaum nachweisbarer MYCN-Expression (siehe Abb. 17A) nur zu einer sehr geringfügigen Abnahme der MYCN-Transkription bis unter die Nachweisgrenze der qRT-PCR kam.

Die Behandlung der Zellen mit der siRNA bewirkte keinerlei messbare Induktion der Transkription IFN-regulierter Gene (siehe Abb. 17B). Neben dem dargestellten *OAS1* wurden auch *CD274*, *ISG15* und *CXCL10* bei gleichem Resultat untersucht.

Insgesamt unterstützten die Resultate der Messungen in den nicht *MYCN*-amplifizierten SH-SY5Y-Zellen daher die Vermutung, dass nicht eine unspezifische Nebenwirkung der siRNA, sondern ihre spezifische Wirkung auf *MYCN* für einen immunstimulatorischen Effekt mit Anstieg der mRNA IFN-regulierter Gene in den *MYCN*-amplifizierten Zelllinien verantwortlich ist.

5.8 *MYCN*-Reduktion und IFN-Gabe stabilisieren IFN-abhängige Signalwege

Das proinflammatorische Mikromilieu eines Tumors ist in erheblicher Weise abhängig von einer andauernden Selbsterhaltung und Induktion der T-Zell-Aktivität durch autokrine Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ oder TNF- α , was gemeinhin auch als „feed-forward loop“ bezeichnet wird. Weiter verstärkt wird dieser Effekt durch die Sekretion von Chemokinen wie *CXCL10* aus Tumorzellen oder beispielsweise myeloiden Zellen, die durch die Zytokinproduktion der T-Zellen ausgelöst wird und reziprok erneut eine Rekrutierung von T-Zellen bewirkt. Die *in vitro*-Stimulierbarkeit der Neuroblastomzellen mit diesen Zytokinen ist daher eine wichtige Voraussetzung für *in vivo*- und, noch einmal einen Schritt weitergehend, klinisch-therapeutische Ansätze, die auf einer Immunstimulation basieren. Die Immunoblot-Analyse einer Behandlung von SKNBE- und NMB-Zellen mit gegen *MYCN* gerichtete siRNA sowie mit TNF- α , IFN- α oder IFN- γ zeigte auf Proteinebene einen deutlichen Anstieg sowohl des IFN-Signalweg-Proteins STAT1 insgesamt als auch des an Serin727 phosphorylierten und somit aktivierten pSTAT1. Ebenso verhielt sich dies für STAT3 sowie dessen an Tyrosin705 phosphorylierte aktivierte Form pSTAT3 (siehe Abb. 18).

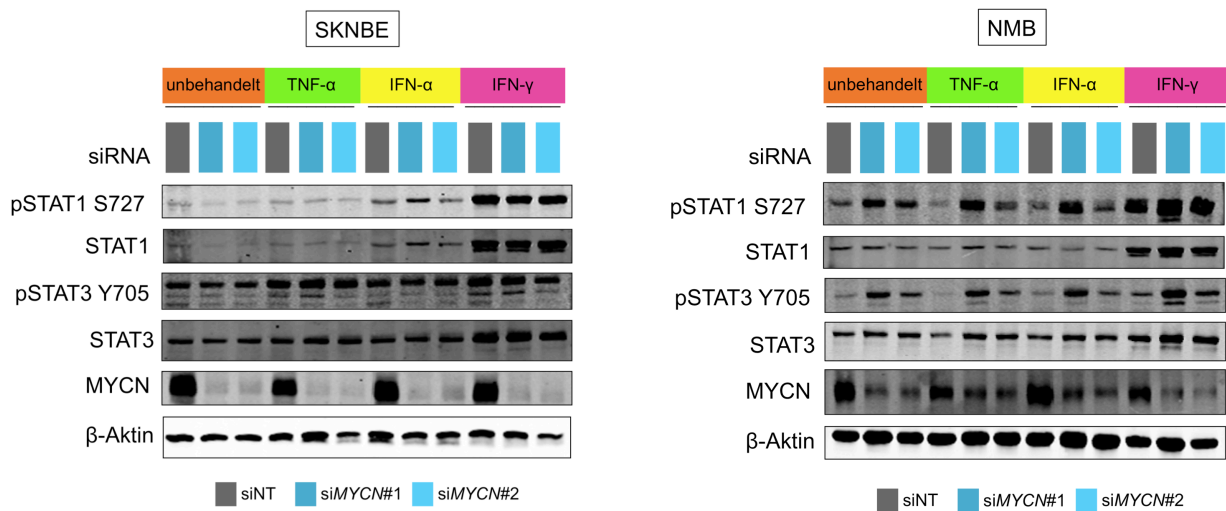


Abb. 18: Ein MYCN-Knockdown führt in den humanen Neuroblastomzelllinien SKNBE und NMB zu einer gesteigerten Proteinexpression sowie Aktivierung der IFN-Signalwegproteine STAT1 und STAT3 nach Stimulation mit Zytokinen. Immunoblot-Analyse auf MYCN, STAT1, pSTAT1 (S727), STAT3, pSTAT3 (Y705) und β -Aktin in den wie angegeben mit siRNA transfizierten und mit den Zytokinen TNF- α , IFN- α und IFN- γ behandelten Zellen. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von biologischen Triplikaten (n=3).

Darüber hinaus induzierte die Gabe der Zytokine eine deutlich gesteigerte Transkription von IFN-abhängigen Genen wie *OAS1* oder *IFIT1* in beiden Linien (siehe Abb. 19A). Bemerkenswert ist, dass die Kombination dieser Zytokin-Stimulation mit der siRNA gegen *MYCN* ebenso wie im Immunoblot synergistisch mit einer weiteren deutlichen Induktion besagter Transkripte einherging. Auch für Chemokine kodierende Gene wie *CCL2* oder *CXCL9* verzeichneten in SKNBE-Zellen in der qRT-PCR starke mRNA-Anstiege (siehe Abb. 19B). Ebenfalls in der qRT-PCR zeigte sich unter Behandlung der SKNBE- und NMB-Zellen mit siMYCN und Interferonen jeweils eine Zunahme der *CD274*-mRNA, die für den Immuncheckpoint-Liganden PD-L1 kodiert (siehe Abb. 20A). Eine durchflusszytometrische Untersuchung auf die tatsächliche Oberflächenexpression des IFN- γ -abhängigen Proteins in behandelten SKNBE- und NMB-Zellen bestätigte dieses Ergebnis (siehe Abb. 20B). Sowohl die Gabe von IFN- γ als auch die synergistische Kombinationsbehandlung mit einem *MYCN*-Knockdown führten vergleichbar mit den Resultaten der qRT-PCR zu deutlich gesteigerter Expression des therapeutisch relevanten Oberflächenmarkers.

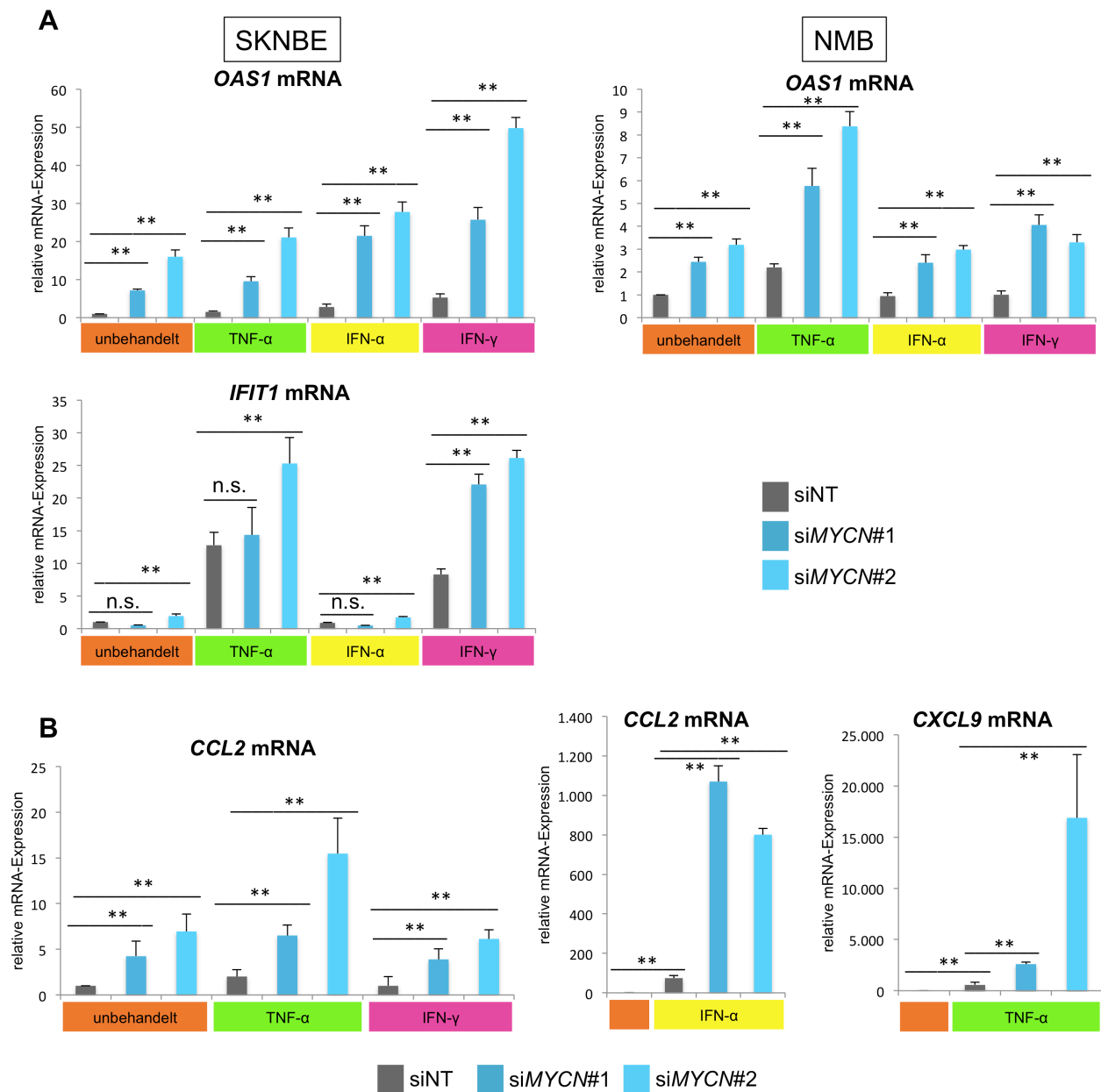


Abb. 19: Gegen *MYCN* gerichtete siRNAs und eine Stimulation mit den Zytokinen TNF- α , IFN- α oder IFN- γ bewirken in den humanen *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinien SKNBE und NMB eine proinflammatorische Aktivierung auf mRNA-Ebene. qRT-PCR-Analyse auf IFN-Signalweg-Gene in den mit siNT (non targeting siRNA-Pool) oder zwei unabhängigen siRNAs gegen *MYCN* sowie den Zytokinen TNF- α , IFN- α oder IFN- γ behandelten humanen Neuroblastomzelllinien SKNBE und NMB (**A**). In SKNBE erfolgte zudem eine Testung auf Chemokin-Gene (**B**). Ergebnisse einer im biologischen Triplikat mit technischer Doppelbestimmung durchgeführten qRT-PCR-Analyse (n=3). Zelllinien, Behandlung und Gentranskripte wie angegeben. Im Balkendiagramm dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen relativen mRNA-Expression; berücksichtigt ist die im Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung. Es erfolgte eine Normalisierung der Expressionswerte mit Expressionswerten für *UBC*. n.s.:p>0,05; **p<0,01; Whitney-Mann-U-Test.

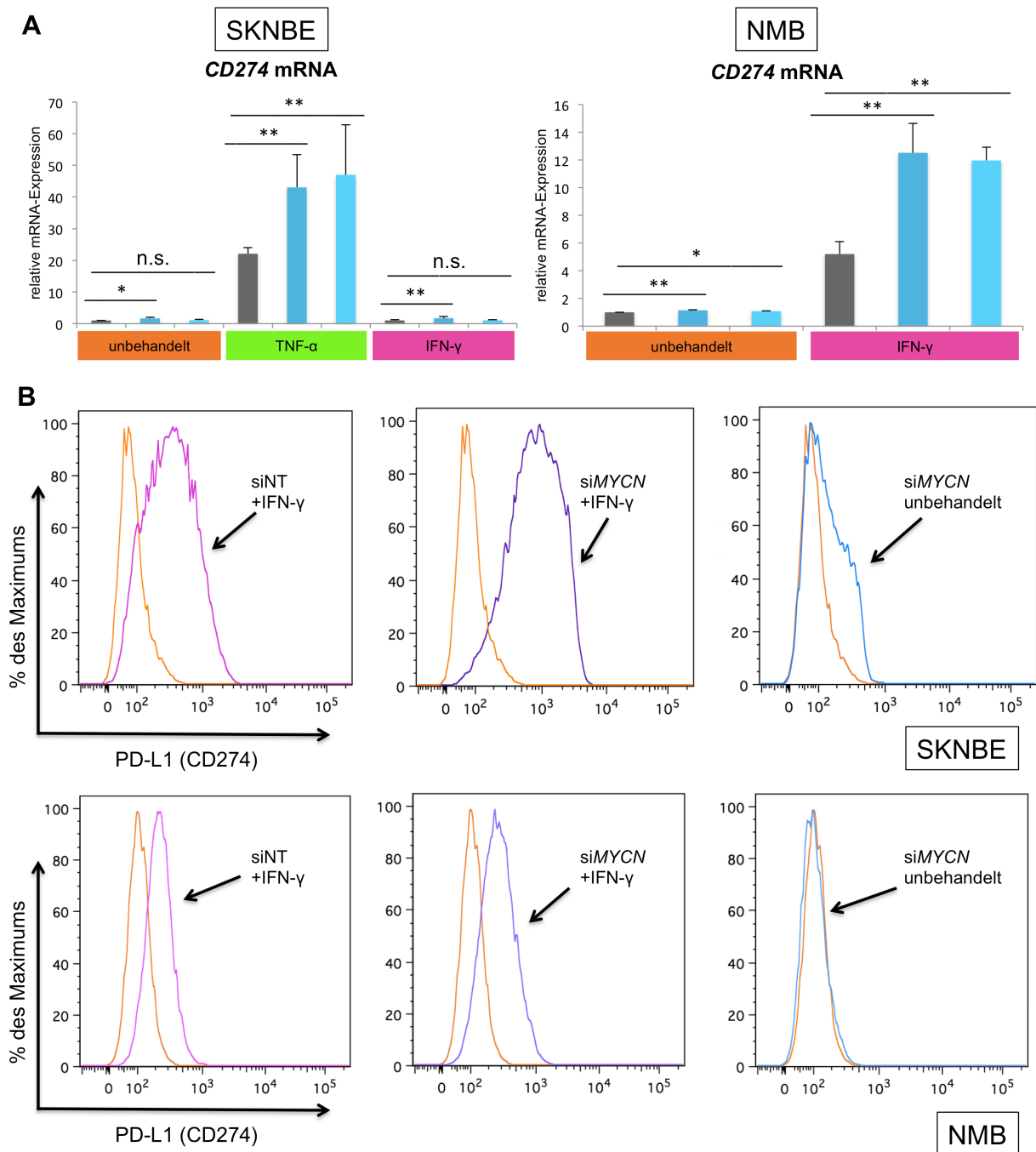


Abb. 20: Die Behandlung der *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinien SKNBE und NMB mit gegen *MYCN* gerichteter siRNA sowie einer Zytokinstimulation resultiert in einer deutlichen Zunahme der PD-L1-Expression. **A** Ergebnisse einer im biologischen Triplikat mit technischer Doppelbestimmung durchgeführten qRT-PCR-Analyse auf *CD274* (*PD-L1*) in den wie beschrieben mit siRNA sowie TNF- α und IFN- γ behandelten humanen Linien SKNBE und NMB ($n=3$). Im Balkendiagramm dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen relativen mRNA-Expression; berücksichtigt ist die im Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung. Es erfolgte eine Normalisierung der Expressionswerte mit Expressionswerten für *UBC*. n.s.: $p>0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; Whitney-Mann-U-Test. **B** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung auf

PD-L1 in denselben Linien mit angegebenen Behandlungen. Der orangefarbene Graph repräsentiert jeweils die unbehandelte Kontrolle. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von den im biologischen Triplikate durchgeführten Experimenten (n=3).

Um die Einflüsse der vorgestellten Zellbehandlung auf das Transkriptom insgesamt abschätzen zu können, schloss sich eine 3'mRNA-Sequenzierungsanalyse gleichermaßen behandelter SKNBE-Zellen an. Diese bestätigte die festgestellte Hochregulation der bereits getesteten IFN-Zielgene. Darüber hinaus zeigte sich der Effekt nicht nur auf vereinzelte Gene beschränkt, sondern generalisiert auf zahlreiche IFN-abhängige Gene (siehe Abb. 21).

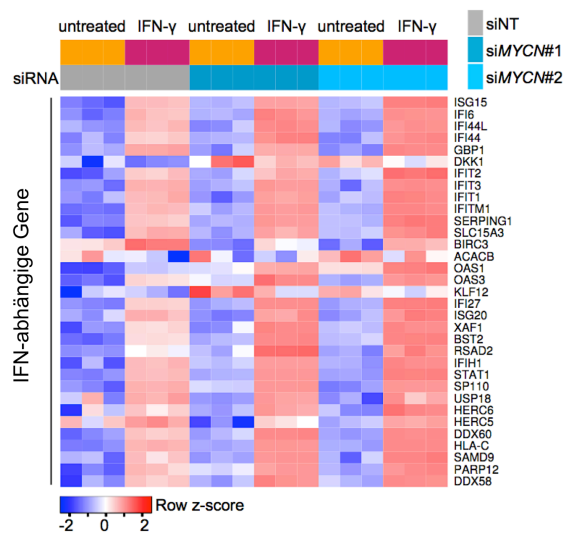


Abb. 21: In der humanen *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinie SKNBE zeigt sich nach *MYCN*-Knockdown und IFN- γ -Gabe eine gesteigerte Transkription von IFN-Signalweg-Genen. Z-Score transformierte Heatmap-Darstellung der mittels RNAseq ermittelten log₂-Expression der IFN-abhängigen Gensignatur unter den beschriebenen Konditionen nach siRNA-Behandlung und IFN- γ -Stimulation. Dargestellt sind für jede Kondition die Ergebnisse aller drei biologischen Replikate (n=3).

Im gesamten Panel der IFN-Signaturgene waren deutlich gesteigerte mRNA-Expressionen nachweisbar, gleiches galt zudem auch für die Chemokingene, die in Form von *CXCL9*, *CXCL10*, *CSF1* und *FLT3LG* in Boxplots noch einmal gesondert dargestellt sind (siehe Abb. 22).

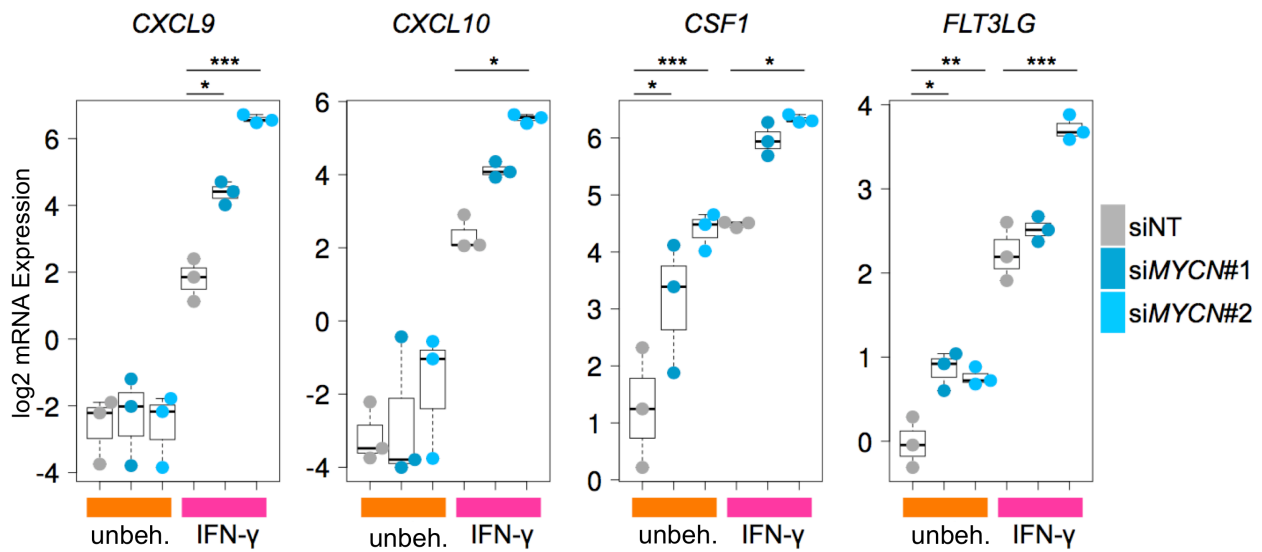


Abb. 22: Exemplarische Darstellung der gesteigerten Transkription von Chemokin-Genen in der humanen *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinie SKNBE nach Behandlung mit si*MYCN* und IFN- γ -Gabe. Boxplot-Vergleich der mittels RNAseq ermittelten Expressionen der angegebenen Chemokin-Genen unter den verschiedentlichen beschriebenen Konditionen. Das Experiment erfolgte in biologischen Triplikaten (n=3). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ANOVA mit TukeyHSD-Test.

Zusammengefasst ließ sich auf Transkriptionsebene und auf Proteinebene, speziell auch auf der Ebene der Oberflächenexpression wichtiger IFN-regulierter Proteine, ein übereinstimmender Effekt der Behandlung der Zellen zeigen. In jedem einzelnen der Fälle hatten siRNA und IFN-Stimulation für sich genommen bereits eine gewisse bis deutliche, verstärkende Wirkung auf die untersuchten Gene und Proteine, jedoch entfalteten sie in der Kombination einen noch einmal signifikant stärkeren, additiven bis teilweise synergistischen Effekt.

5.9 *MYCN*-transgene murine Modelle sprechen auf RNAi und IFN-Stimulation an

Ein wichtiges Werkzeug für die präklinische Evaluation immuntherapeutischer Ansätze stellen sogenannte „genetically engineered mouse models“ (GEMMs) dar. Die murinen *MYCN*-transgenen Zelllinien mNB-A1 und mNB-A2, die im Methodenteil 4.2.1 näher beschrieben wurden, wurden aus solch einem GEMM für das *MYCN*-getriebene Neuroblastom generiert. Da sie wie die humanen Neuroblastomzellen transgen humanes *MYCN* exprimieren, sind sie ebenso wie diese Zellen Ziel einer siRNA gegen humanes *MYCN*. Eine Reduktion von *MYCN* durch die beiden unabhängigen siRNAs

fürte zu einem deutlichen Proliferationsarrest in der Kultur der mNB-A1-Zellen, was neben der Wirksamkeit der siRNAs auch die Funktionalität und proliferative Aggressivität des *MYCN*-Konstrukts demonstriert (siehe Abb. 23).

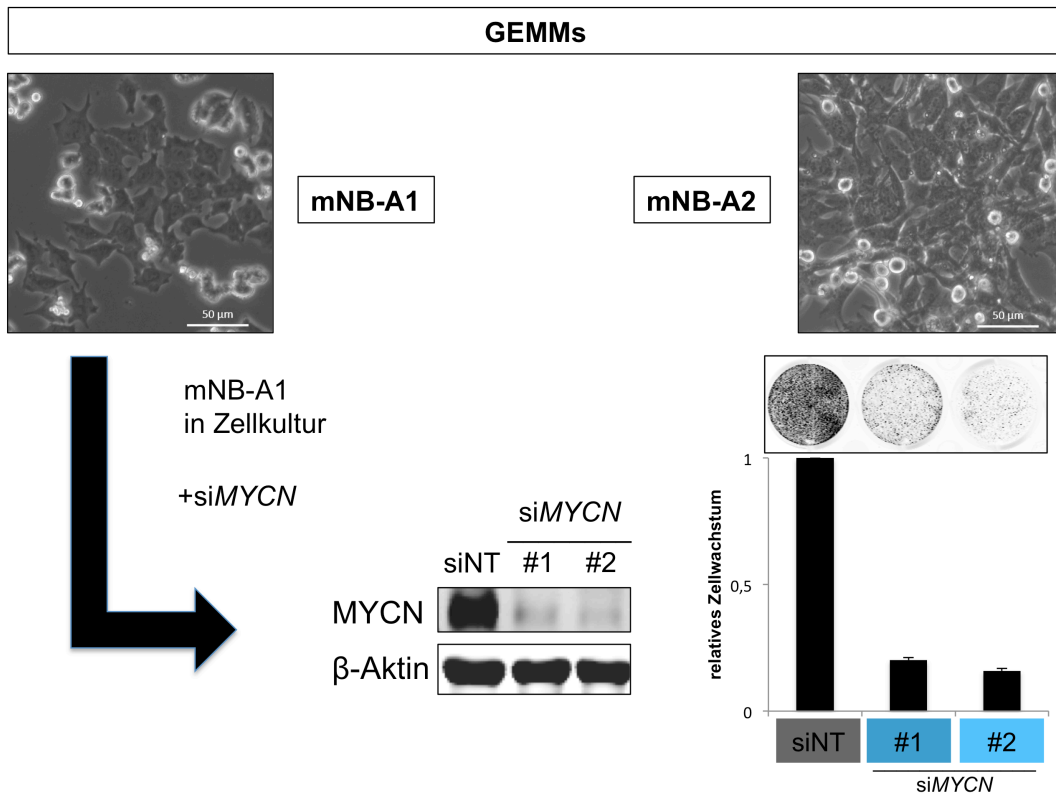


Abb. 23: Die murine transgene Neuroblastomzelllinie mNB-A1 spricht auf eine Behandlung mit siRNA gegen *MYCN* an. Immunoblot-Analyse auf *MYCN* und β -Aktin in den wie angegeben mit siRNA transfizierten Zellen. Rechts daneben ein Proliferationsassay mittels Kristallviolett-Färbung. Darunter Quantifizierung der hierbei im biologischen Triplikate gemessenen Intensitätswerte der Färbung. Graphisch dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von biologischen Triplikaten (n=3).

Um die globalen Konsequenzen einer *MYCN*-Reduktion mittels RNA-Interferenz (RNAi) auf die Signalwege der murinen Zellen untersuchen zu können, erfolgte eine 3'mRNA-Sequenzierungsanalyse. In einer zunächst durchgeführten Gene Set Enrichment-Analyse (GSEA) zeigte sich eine Hochregulation der Irfn-Signalwegaktivität nach *MYCN*-Knockdown (siehe Abb. 24). Außerdem kam es in Konsistenz zu dem Proliferationsassay zu einer Herunterregulation proliferativer E2F- und Myc-Signaturen.

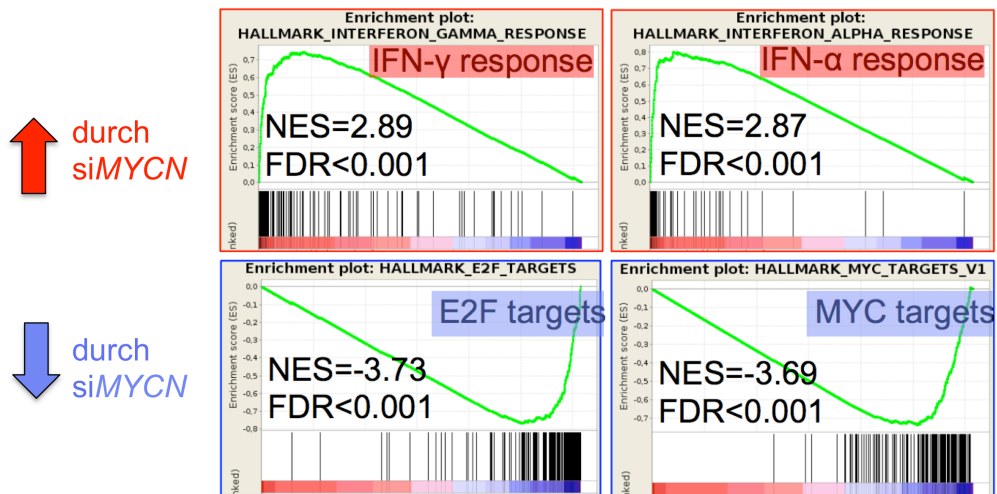


Abb. 24: Eine N-Myc-Reduktion durch RNA-Interferenz in murin-transgenen Neuroblastomzellen hemmt die Transkription proliferativer Signalwege, während sie die Transkription proinflammatorischer Signalwege steigert. Gezeigt sind die in einer Gene Set Enrichment-Analyse aus RNAseq-Daten am stärksten durch einen *MYCN*-Knockdown beeinflussten „hallmark gene sets“ in mNB-A1-Zellen. NES: normalized enrichment score; FDR: false discovery rate mit q-Wert.

In einem nächsten Schritt wurde das zuvor bereits in den humanen Linien getestete Therapieschema auch auf mNB-A1-Zellen angewendet. Im Immunoblot zeigte sich auch hier bei Behandlung mit einer siRNA gegen *MYCN* sowie einer Gabe von Tnf- α oder Ifn- γ eine deutliche Zunahme der Proteinmengen von STAT1 und STAT3 sowie darüber hinaus eine gesteigerte Phosphorylierung und somit Aktivierung derselben (siehe Abb. 25). Bemerkenswerter Weise war STAT1 in den unbehandelten Kontrollen nahezu gar nicht exprimiert.

In der qRT-PCR zeigte sich darüber hinaus ein Anstieg der Transkription von Ifn-Signalweggenen wie dem hier exemplarisch gezeigten *Oas1* unter der Behandlung (siehe Abb. 26). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für zahlreiche weitere Ifn-abhängige Gene wie *Ifit1*, *Cd274*, *Stat1* oder *Irf1*.

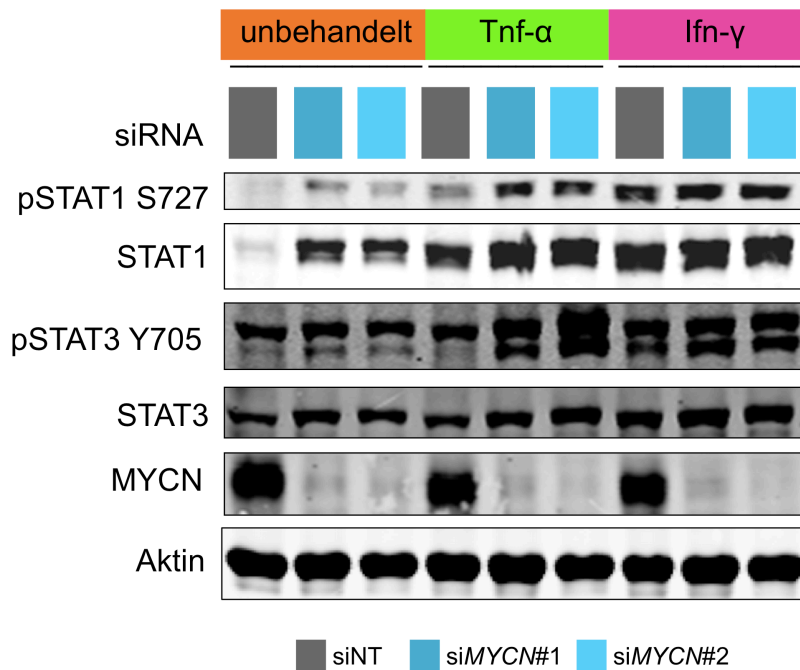


Abb. 25: Die Behandlung der murinen transgenen Neuroblastomzelllinie mNB-A1 mit siRNA gegen *MYCN* sowie einer Stimulation mit Zytokinen geht mit einer verstärkten Proteinexpression und -phosphorylierung der lfn-Signalweg-Proteine STAT1 und STAT3 einher. Immunoblot-Analyse auf MYCN, STAT1, pSTAT1 (S727), STAT3, pSTAT3 (Y705) und β -Aktin in den wie angegeben mit siRNA transfizierten und mit den Zytokinen Tnf- α und lfn- γ behandelten Zellen. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von biologischen Triplikaten (n=3).

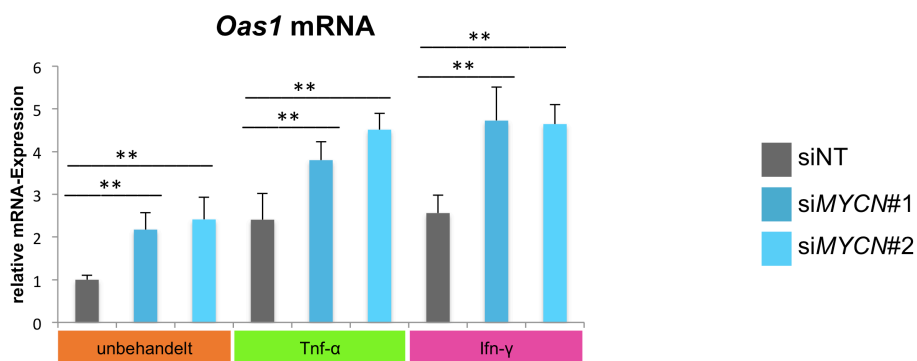


Abb. 26: Die Behandlung der murinen transgenen Neuroblastomzelllinie mNB-A1 mit siMYCN und Zytokinen führt zu einer verstärkten Transkription von Interferon-Signalweggenen. Ergebnisse einer im biologischen Triplikat mit technischer Doppelbestimmung durchgeführten qRT-PCR-Analyse auf *OAS1* in der wie beschrieben mit siRNA sowie Tnf- α und lfn- γ behandelten Linie mNB-A1 (n=3). Im Balkendiagramm dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen relativen mRNA-Expression; berücksichtigt ist die im Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung. Es erfolgte eine Normalisierung der Expressionswerte mit Expressionswerten für *Ubc*. **p<0,01; Whitney-Mann-U-Test.

Ebenso wichtig für eine antitumorale Immunantwort ist überdies auch die Kenntnis über den Besatz der Tumorzellen mit bestimmten Oberflächenmarkern. Insbesondere zu nennen sind hier die Expression von PD-L1 als potenzieller Hemmfaktor dieser Immunantwort und eine funktionierende, über MHC-I ermöglichte Antigenpräsentation. Eine Validierung mittels qRT-PCR (hier nicht gezeigt) und eine durchflusszytometrische Untersuchung (siehe Abb. 27 und 28) zeigten in Einklang zu den Ergebnissen der vorherstehenden Analysen eine Zunahme der Expression beider getesteter Oberflächenmarker auf mit Tnf- α , Ifn- γ oder siMYCN behandelten mNB-A1-Zellen. Die besten Ergebnisse erzielte erneut die Kombinationsbehandlung.

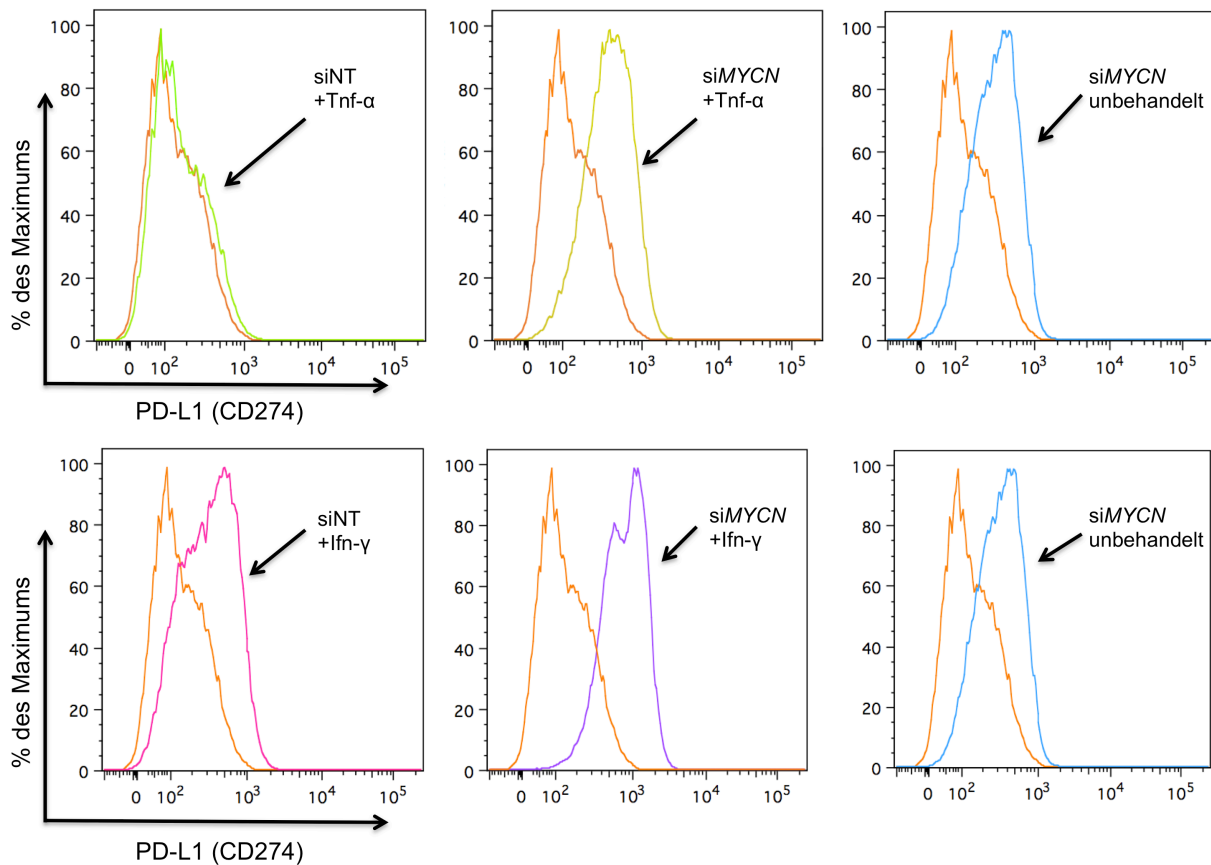


Abb. 27: Gegen *MYCN* gerichtete siRNA verstärkt den positiven Effekt einer Zytokinstimulation auf Transkription und Proteinexpression des Oberflächenmarkers PD-L1 auf mNB-A1-Zellen. Durchflusszytometrische Untersuchung auf CD274 (PD-L1) in wie angegeben mit Tnf- α , Ifn- γ sowie siMYCN behandelten mNB-A1-Zellen. Der orangefarbene Graph repräsentiert jeweils die unbehandelte Kontrolle. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von den im biologischen Triplikate durchgeführten Experimenten (n=3).

Eine 3'-RNA-Sequenzierungsanalyse auf ein Panel von Chemokingen-Transkripten bei gleichen Versuchsbedingungen in mNB-A1-Zellen untermauerte die Beobachtungen aus den humanen Neuroblastomzellen (siehe Abb. 29). Zahlreiche Chemokingene, hierunter *Ccl2*, *Ccl5*, *Cxcl9* und *Cxcl10* oder aber auch *Il6* wiesen eine deutlich gesteigerte Transkription auf. Auch qRT-PCRs auf *Ccl2*, *Ccl5* und *Cxcl9* bestätigten diese Ergebnisse.

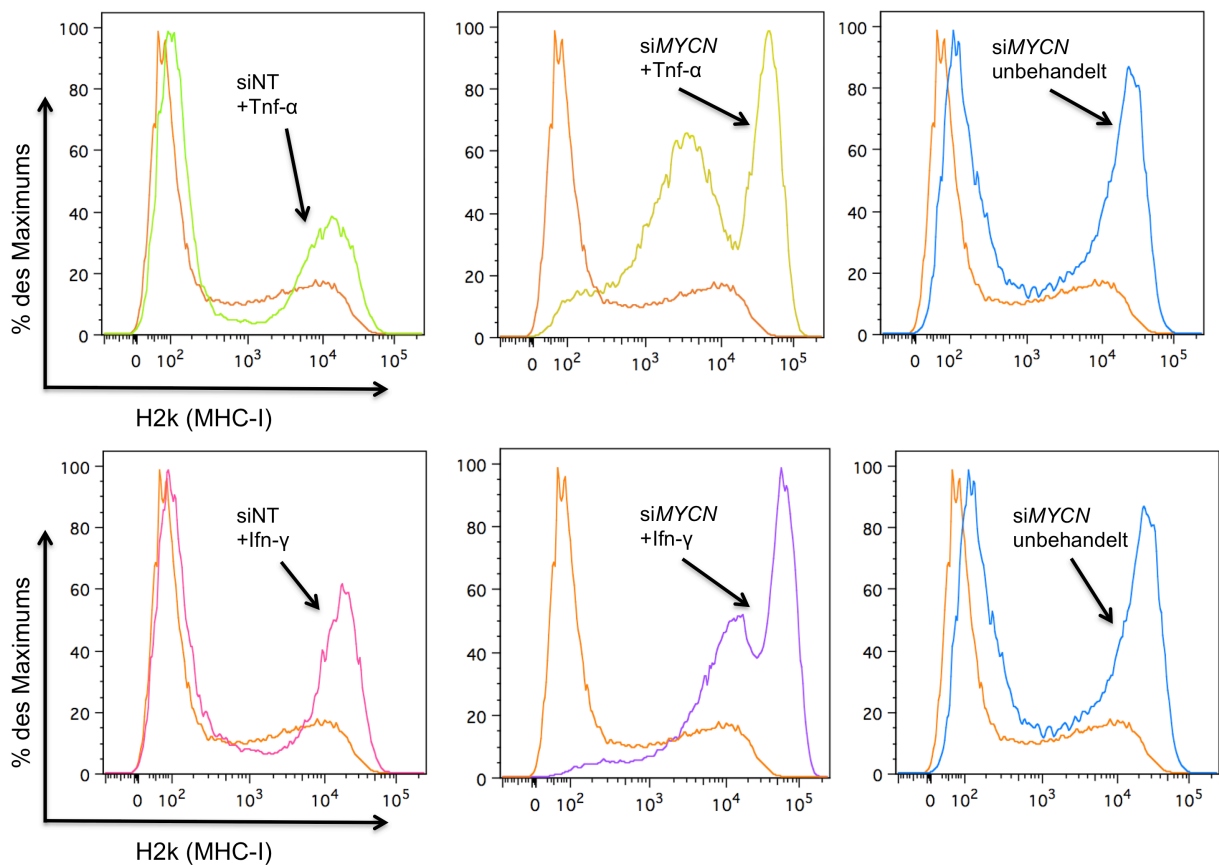


Abb. 28: Gegen *MYCN* gerichtete siRNA verstärkt den positiven Effekt einer Zytokinstimulation auf Transkription und Proteinexpression des Oberflächenmarkers MHC-I auf mNB-A1-Zellen. Durchflusszytometrische Untersuchung auf H2k (MHC-I) in wie angegeben mit Tnf- α , Ifn- γ sowie si*MYCN* behandelten mNB-A1-Zellen. Der orangefarbene Graph repräsentiert jeweils die unbehandelte Kontrolle. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von den im biologischen Triplikate durchgeführten Experimenten (n=3).

Die ebenfalls zur Bestätigung durchgeführte qRT-PCR auf das maßgeblich für T-Zell-Rekrutierung verantwortliche *Cxcl10* zeigte einen massiven Anstieg der Transkription sowohl unter Knockdown als auch unter *lfn-γ*, wobei der synergistische Effekt der Kombinationsbehandlung mit siRNA und *lfn-γ* eine über 500-fach höhere Transkription von *Cxcl10* im Vergleich zur Negativkontrolle offenbarte (siehe Abb. 30A). Entsprechend diesen Erkenntnissen resultierte die Behandlung auch in einem ELISA auf *Cxcl10* in sehr deutlich erhöhten Konzentrationen des Chemokins im Überstand der Zellen (siehe Abb. 30 B).

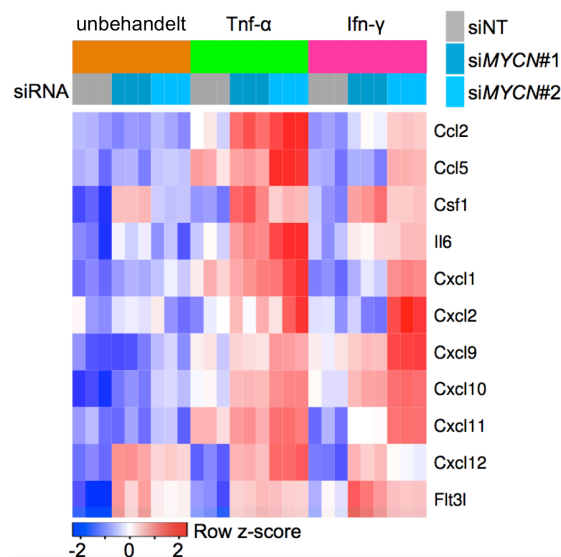


Abb. 29: Die Transkription von Chemokin-Genen lässt sich in der transgenen Mauszelllinie mNB-A1 signifikant durch Behandlung mit einer siRNA gegen *MYCN* sowie einer Zytokinstimulation steigern. Z-Score transformierte Heatmap-Darstellung der \log_2 -Expression ausgewählter Zytokin- und Chemokin-Gene in mNB-A1-Zellen aus einer RNAseq-Analyse unter farbkodierten sowie annotierten Konditionen. Die Behandlung der Zellen mit siRNA und den Zytokinen erfolgte analog zu Abb. 26. Gezeigt werden die Messergebnisse aller drei biologischen Replikate nebeneinander (n=3).

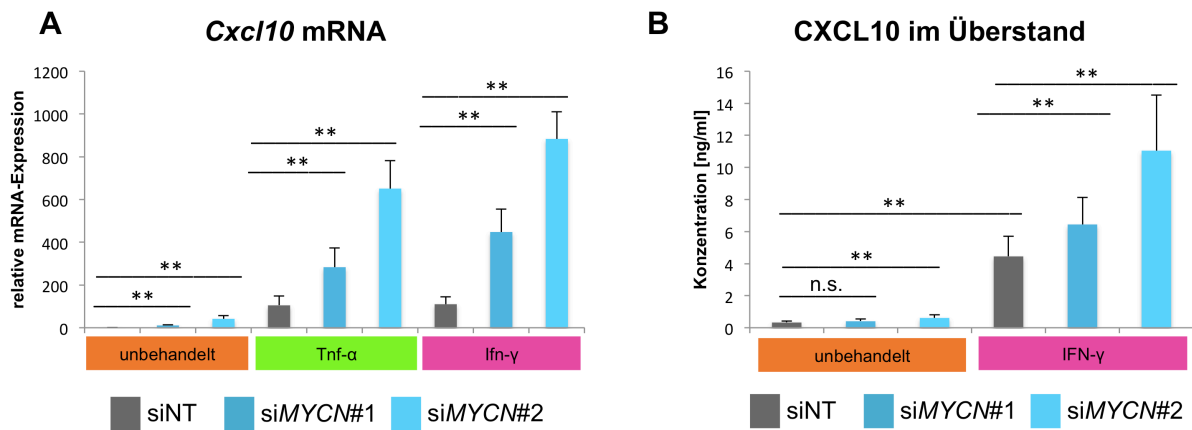


Abb. 30: Die Behandlung von mNB-A1-Zellen mit siRNA gegen *MYCN* unterstützt signifikant die Zytokin-induzierte Transkription und Sekretion des T-Zell rekrutierenden Chemokins CXCL10. **A** Im biologischen Triplikate mit technischer Doppelbestimmung durchgeführte qRT-PCR-Analyse auf *CXCL10* in der wie beschrieben mit siRNA sowie Tnf- α und lfn- γ behandelten Linie mNB-A1 (n=3). Im Balkendiagramm dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen relativen mRNA-Expression; berücksichtigt ist die im Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung. Es erfolgte eine Normalisierung der Expressionswerte mit Expressionswerten für *Ubc*. **p<0,01; Whitney-Mann-U-Test. **B** Im ELISA gemessene CXCL10-Proteinkonzentration im Überstand wie annotiert behandelter mNB-A1-Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus biologischen Triplikaten mit technischer Doppelbestimmung (n=3). n.s.: nicht signifikant (p>0,05); **p<0,01; Whitney-Mann-U-Test.

5.10 Behandlung mit STING-Agonisten zeigt mit IFN- γ vergleichbare Effekte

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob neben einer Stimulation der Neuroblastomzellen mit Interferonen auch gezieltere immunstimulative Methoden wirksam wären. Auf Gabe von Substanzen wie STING-Agonisten, die strukturell eine virale Infektion der Zelle simulieren, würden die Tumorzellen in diesem Fall mit der Entwicklung gesteigerter Immunogenität und eines entzündlichen Tumormikromilieus reagieren. Nach Behandlung der murinen Neuroblastomzellen mNB-A1 mit siRNA gegen *MYCN* sowie des Weiteren mit der als therapeutischen Bereich identifizierten und zuvor experimentell titrierten Konzentration von 25 respektive 50 μ M des murinen STING-Agonisten DMXAA zeigte sich im Immunoblot relativ analog zu den Vorexperimenten mit lfn- γ eine prägnant verstärkte Expression und Aktivierung von STAT1 und STAT3 (siehe Abb. 31).

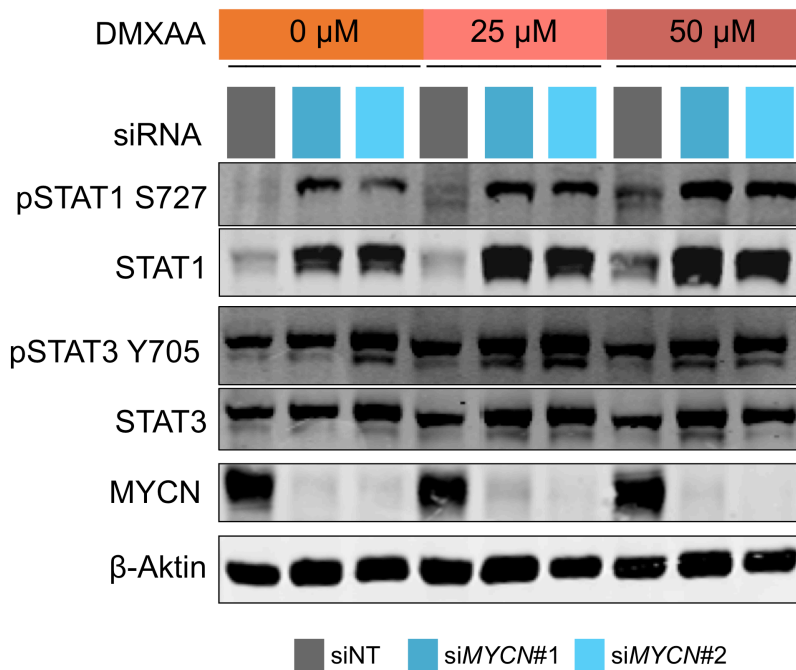


Abb. 31: Der STING-Agonist DMXAA verstärkt den Effekt einer Reduktion von MYCN in der *MYCN*-transgenen Linie mNB-A1 mittels RNA-Interferenz auf die gesteigerte Proteinexpression und -aktivierung der Ifn-Signalwegproteine STAT1 und STAT3. Immunoblot-Analyse auf MYCN, STAT1, pSTAT1 (S727), STAT3, pSTAT3 (Y705) und β-Aktin in den wie angegeben mit siRNA transfizierten und mit DMXAA behandelten Zellen. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von biologischen Triplikaten (n=3).

Ebenso wie zuvor mit den Interferonen, wirkten die eingesetzten Agentien erneut synergistisch. In einem direkten Folgeexperiment wurde nach 24-stündiger Stimulation der mNB-A1-Zellen mit DMXAA das Medium abgenommen. Dieser akquirierte Überstand wurde für 15 Minuten auf kurz zuvor frisch ausgesäte, unbehandelte Zellen der gleichen Zelllinie gegeben. Anschließend erfolgte unverzüglich und äquivalent zum Vorexperiment eine Auswertung der Proteinexpression und des Phosphorylierungsstatus von STAT1 und STAT3 im Immunoblot (siehe Abb. 32). Hierbei zeigte sich, dass alleine durch die Überstände der stimulierten Zellen ein Anstieg der Proteinexpression von vor allem pSTAT3 zu verzeichnen war. Der Effekt war deutlich am stärksten in den Überständen zuvor kombinatorisch behandelte Zellen. Somit kann er auch nicht alleinig auf das noch vorhandene DMXAA im Medium zurückgeführt werden, da dies in allen Proben gleichermaßen vorhanden, beziehungsweise bei den unstimulierten Proben jeweils nicht vorhanden, war.

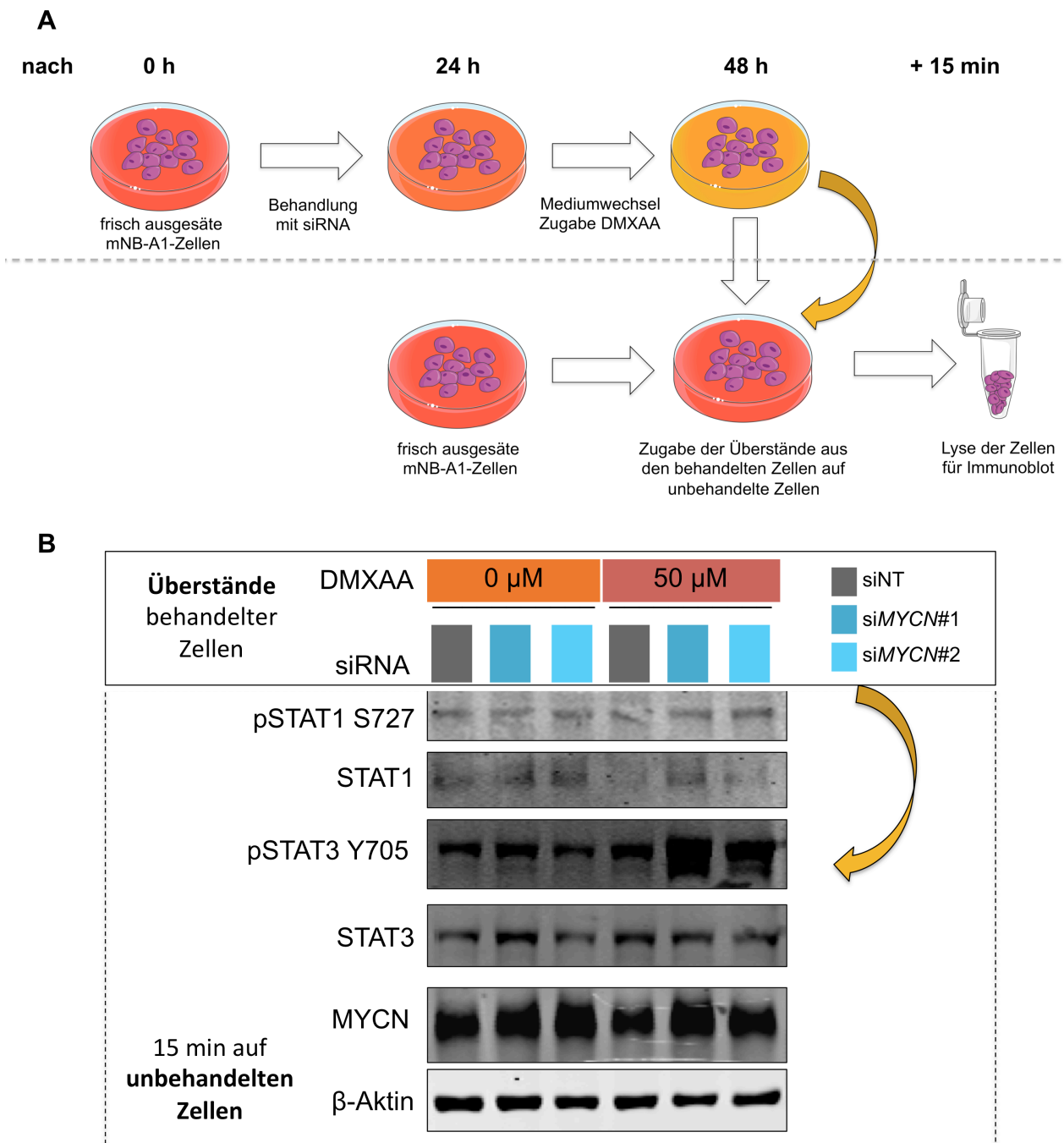


Abb. 32: Der Überstand mit siMYCN und DMXAA behandelter mNB-A1-Zellen wirkt stimulierend auf Expression und Aktivierung von STAT1 und STAT3 in unbehandelten Zellen. **A** Schematische Darstellung des Experiments. **B** Immunoblot-Analyse auf MYCN, STAT1, pSTAT1 (S727), STAT3, pSTAT3 (Y705) und β -Aktin in den für 15 Minuten mit Überständen aus wie angegeben mit siRNA transfizierten und mit DMXAA behandelten Zellen kokubierten mNB-A1-Zellen. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von biologischen Triplikaten (n=3).

Dies legt den Schluss nahe, dass die mit siRNA und Zytokinen behandelten Zellen eine proinflammatorische Sekretion von Zytokinen und Chemokinen in den Überstand geleistet haben. Das Maß dieser Sekretion war ausreichend, um unbehandelte Zellen binnen kurzer Zeit in einem gewissen Maße inflammatorisch zu aktivieren. In der in einem weiteren Schritt durchgeführten 3'-RNA-Sequenzierungsanalyse ergab sich bei gleicher Behandlung wie in den Abb. 29 und 30 ein genereller synergistischer Effekt auf die Expression Ifn-abhängiger Gene, darunter sowohl Gene für Zytokine als auch für Chemokine oder für die Antigenpräsentation (siehe Abb. 33). Diese Ergebnisse wurden darüber hinaus überprüft durch exemplarische qRT-PCR-Analyse der Transkription von ausgewählten Ifn-abhängigen Genen verschiedener Kategorien (siehe Abb. 34A bis C).

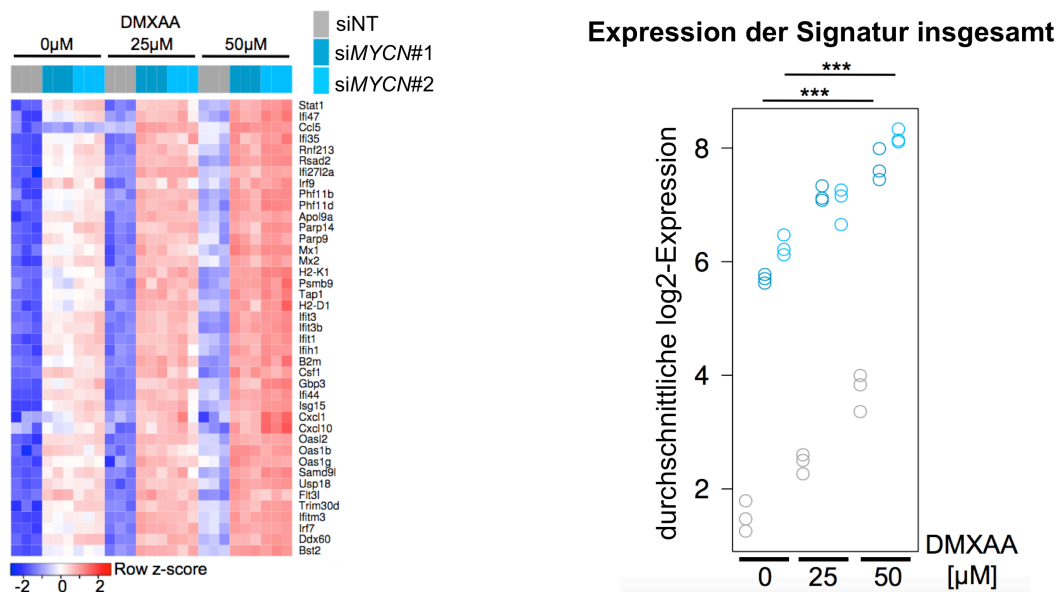


Abb. 33: Die Behandlung der transgenen murinen Neuroblastomzelllinie mNB-A1 mit siRNA gegen MYCN und dem STING-Agonisten bewirkt synergistisch eine globale Hochregulation Ifn-abhängiger Transkription. Links: Z-Score-transformierte Heatmap-Darstellung der mittels RNAseq ermittelten log₂-Expression Ifn-abhängiger Gene in mNB-A1-Zellen nach annotierter Behandlung mit siRNA und DMXAA oder DMSO als Negativkontrolle. Rechts: Boxplot-Darstellung der durchschnittlichen Gesamtexpression der einzelnen Gene der links aufgeführten Signatur. ***p<0,001, ANOVA mit angeschlossenen TukeyHSD-Test.

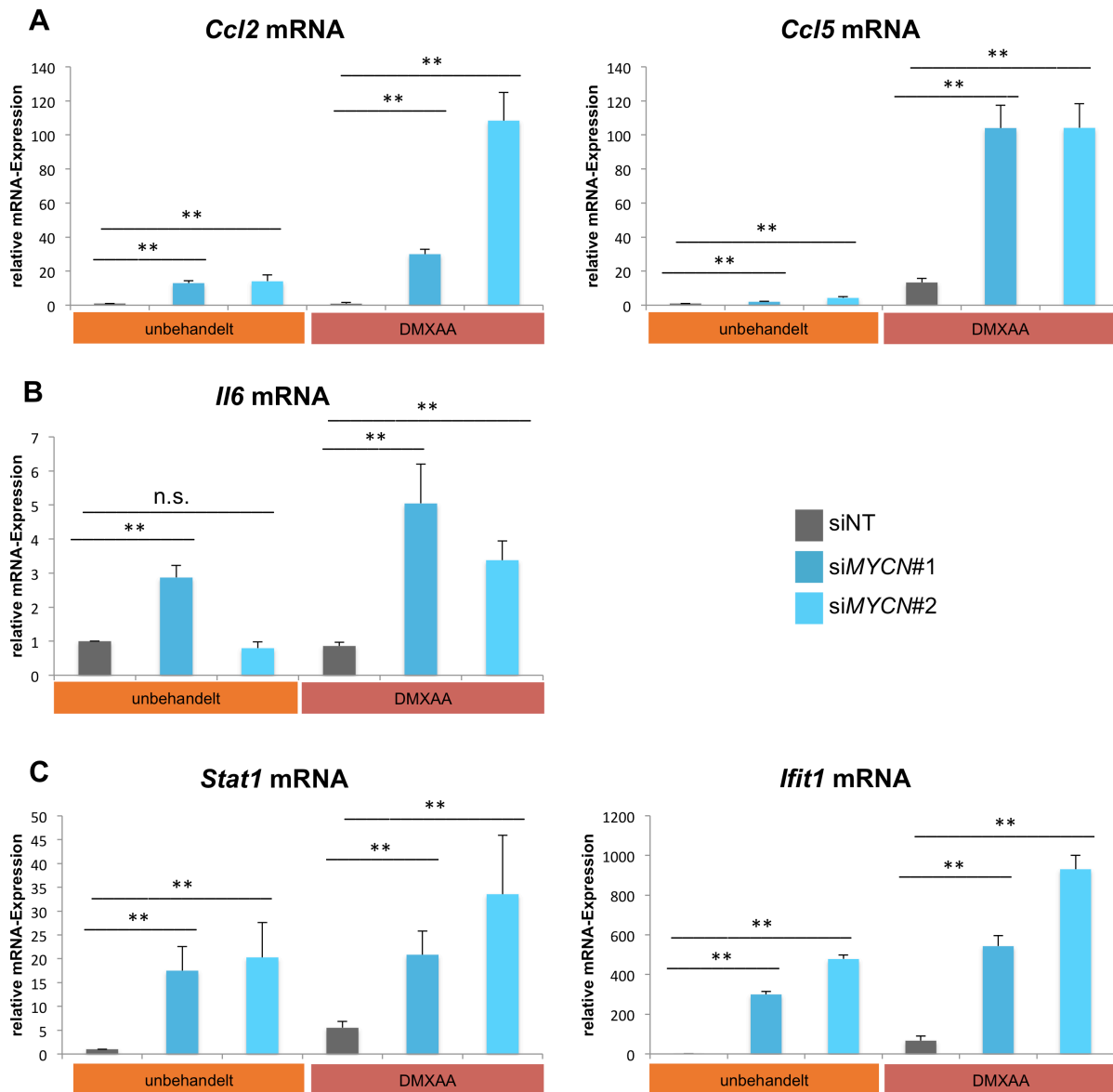


Abb. 34: Bestätigung der in der RNAseq nachgewiesenen globalen Wirkung der Kombinationstherapie aus siRNA und DMXAA mittels qRT-PCR. Im biologischen Triplikate mit technischer Doppelbestimmung durchgeführte qRT-PCR-Analysen auf ausgewählte Gene für Chemokine (**A**), Zytokine (**B**) sowie Ifn-Signalwegsproteine (**C**) in der wie beschrieben mit siRNA sowie DMXAA behandelten Linie mNB-A1 (n=3). Im Balkendiagramm dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen relativen mRNA-Expression; berücksichtigt ist die im Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung. Es erfolgte eine Normalisierung der Expressionswerte mit Expressionswerten für *Ubc*. n.s.: nicht signifikant ($p > 0,05$); ** $p < 0,01$; Whitney-Mann-U-Test.

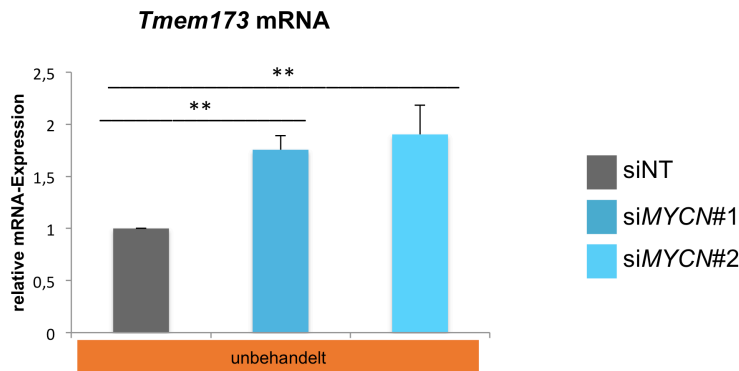


Abb. 35: Die Behandlung von mNB-A1-Zellen mit siRNA gegen *MYCN* resultiert in leicht erhöhter Transkription von *Tmem173* (*STING*). Im biologischen Triplikate mit technischer Doppelbestimmung durchgeführte qRT-PCR-Analyse auf *Tmem173* in der wie beschrieben mit siRNA behandelten Linie mNB-A1 (n=3). Dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen relativen mRNA-Expression; zudem angegeben ist die im Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung. Es erfolgte eine Normalisierung der Expressionswerte mit Expressionswerten für *Ubc*. **p<0,01; Whitney-Mann-U-Test.

Neben diesen verschiedenen Klassen von Ifn-regulierten Genen wie beispielsweise den Signalweggenen *Stat1* und *Ifit1*, den Chemokingenen *Ccl2* und *Ccl5* oder Interleukingenen wie *Il6*, zeigte auch *Tmem173*, das für STING kodierende Gen selbst, durch den *MYCN*-Knockdown eine verstärkte Transkription (siehe Abb. 35).

Analog zu den Experimenten mit Ifn- γ als Immunstimulans erfolgte auch für die Behandlung der Zellen mit DMXAA eine qRT-PCR auf die Oberflächenmarker PD-L1 und MHC-I (siehe Abb. 36A), die mittels einer durchflusszytometrischen Analyse bestätigt wurde (siehe Abb. 36B und C). Für MHC-I erfolgte in der qRT-PCR dafür eine Untersuchung auf die Expression des für eine MHC-I-Untereinheit kodierenden *B2m*. Erneut erzielte die Kombination aus siRNA und DMXAA ähnlich gute Ergebnisse wie zuvor die mit den Interferonen. Die MHC-I- und PD-L1-Expression nahm transkriptionell wie auch auf Proteinebene deutlich zu. Fraglich blieb hierbei zunächst aber, ob aus dieser verstärkten Expression von MHC-I auch eine stärkere Antigenpräsentation resultieren würde und ob diese fähig wäre, T-Zellen nach Kontakt auch zu aktivieren.

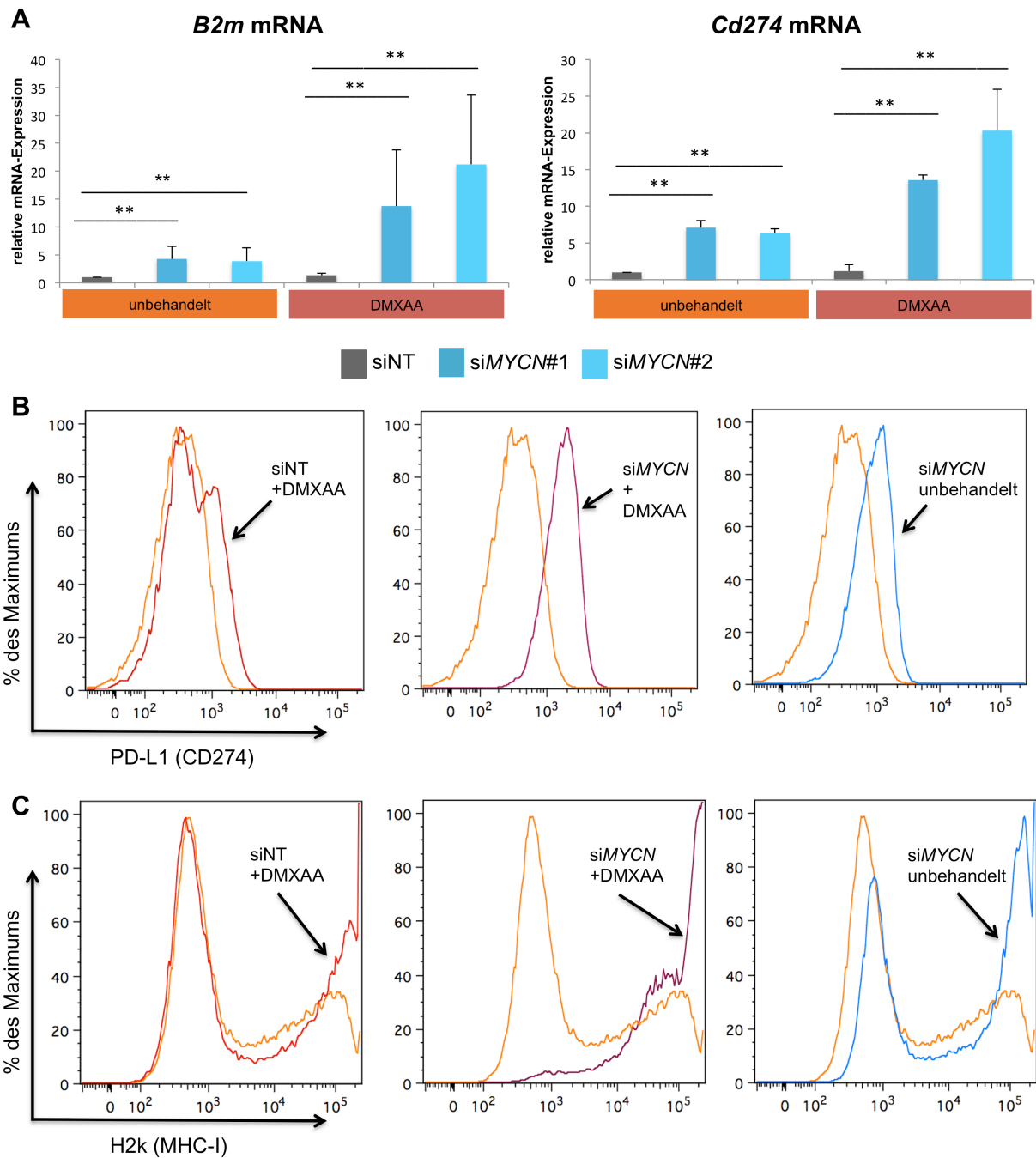


Abb. 36: Mit siMYCN und DMXAA behandelte mNB-A1-Zellen zeigen eine verstärkte Expression der therapeutisch relevanten Oberflächenmarker PD-L1 und MHC-I. **A** Im biologischen Triplikate mit technischer Doppelbestimmung durchgeführte qRT-PCR-Analysen auf *B2m* und *Cd274* (*Pd-L1*) in der wie beschrieben mit siRNA sowie DMXAA behandelten Linie mNB-A1 (n=3). Im Balkendiagramm dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen relativen mRNA-Expression; berücksichtigt ist die im Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung. Es erfolgte eine Normalisierung der Expressionswerte mit Expressionswerten für *Ubc*. **p<0,01; Whitney-Mann-U-Test. **B, C** Durchflusszytometrische Untersuchung auf CD274 (PD-L1) (**B**) und H2k (MHC-I) (**C**) in der gleichen Zelllinie mit den angegebenen, zu A identischen Konditionen. Der

orangefarbene Graph repräsentiert jeweils die unbehandelte Kontrolle. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von den im biologischen Triplikat durchgeführten Experimenten (n=3).

Um dies zu eruieren, erfolgte im nächsten Schritt ein LacZ-Assay. Durch Antigenpräsentation aktivierte T-Zellhybridome induzieren hierbei β -Galaktosidase, die durch Bindung ihres Substrats einen Farbumschlag der Indikator enthaltenden Lösung bedingt. Durch Bestimmung der Absorption der Substratlösung kann die Aktivierung der T-Zellen daher gemessen werden kann. Eine genauere Erklärung der Methodik sowie ihrer Durchführung findet sich im Methodenteil unter 4.2.13. Bei der wie beschrieben erfolgten Durchführung des Experiments ergab die sich anschließende Messung der β -Galaktosidase-Aktivität über einen Zeitverlauf von mehreren Stunden zu jedem Messpunkt eine deutlich höhere Absorption und somit eine stärkere Antigenpräsentation und Aktivierung der T-Zellhybridome in den Kulturschalen der mit DMXAA und siMYCN behandelten mNB-A1-Zellen (siehe Abb. 37).

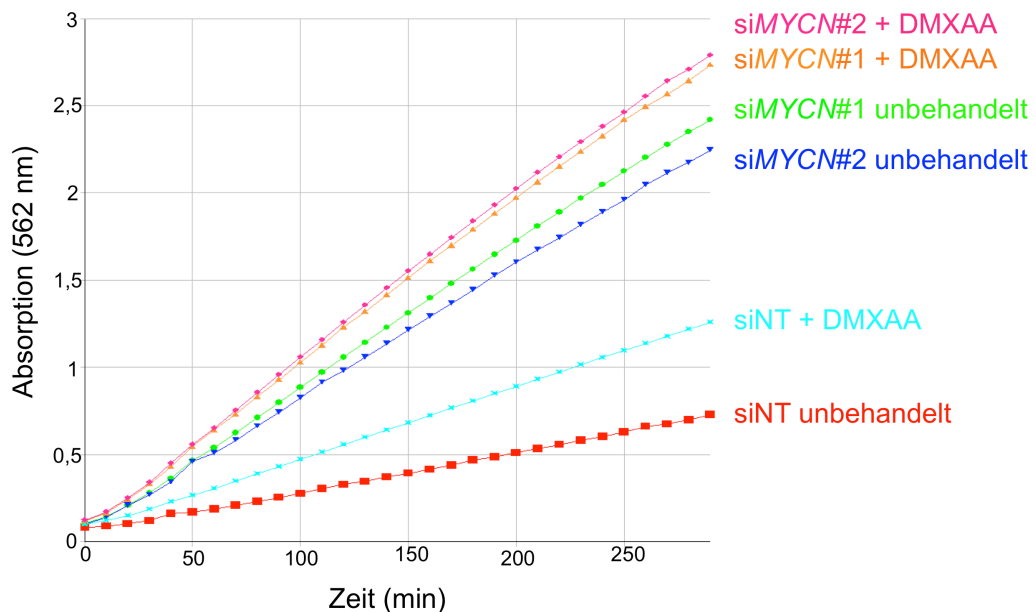


Abb. 37: Durch die Behandlung von mNB-A1-Zellen mit siMYCN und DMXAA kommt es zu verstärkter Antigenpräsentation und damit einhergehender T-Zellaktivierung. Auswertung eines LacZ-Assays in wie beschrieben behandelten mNB-A1-Zellen. Die Zellen wurden nach der jeweiligen Behandlung zunächst mit Ovalbumin₂₅₇₋₂₆₄

(SIINFEKL) und dann mit B3Z-Zellen koinkubiert. Es erfolgte nach Zugabe des CPRG-enthaltenden Substrats eine serielle Messung der Absorption desselbigen bei 562 nm Lichtwellenlänge. Die Durchführung des Experiments erfolgte in biologischen Triplikaten (n=3).

Zusammengefasst kam es in allen Untersuchungsmethoden zu höheren Messwerten durch die siRNA und den STING-Agonisten, bei einer stets synergistischen Wirkung der beiden Agentien bei kombinatorischer Behandlung der Zellen. Die Versuche mit DMXAA als Immunstimulans zeigten eine Wirksamkeit in einer mit der Gabe von Ifn- γ vergleichbaren Größenordnung. Ebenso wie unter Ifn- γ beschränkte sich auch mit DMXAA diese Stimulation von Ifn-abhängigen Genen nicht auf bestimmte Teilbereiche der inflammatorischen Regulation, sondern betraf gleichermaßen Ifn-Signalkaskaden, Chemokine, Interleukine, Immuncheckpoints und die Antigenpräsentation. Dies wirkte sich wiederum gleichermaßen auf die Transkription und die intrazelluläre Proteinexpression beziehungsweise Oberflächenexpression aus.

5.11 Bestätigung der Experimente in zwei weiteren murinen Zelllinien

Sämtliche Experimente mit dem murinen STING-Agonisten DMXAA beschränkten sich bislang allerdings auf eine einzelne Neuroblastom-Mauszelllinie. Um daher die Aussagekraft der Analysen zusätzlich zu stützen, wurde neben der bereits zuvor verwendeten Zelllinie mNB-A1 zusätzlich auf die aus dem gleichen Mausmodell entstandene Linie mNB-A2 zurückgegriffen. Ferner erfolgte ein identisches Experiment mit der *MYCN*-transgenen murinen Neuroblastomzelllinie Nho2a, die ebenfalls im Methodenteil 4.2.1 näher charakterisiert ist. Es ergab sich in allen drei murinen Zelllinien und somit überdies auch in Linien aus zwei verschiedenen GEMMs in der qRT-PCR ein vergleichbares Bild deutlich gesteigerter Expression der exemplarisch getesteten *B2m*, *Cd274*, *Ccl5*, *Cxcl10* sowie auch der hier nicht gezeigten Gene *Isg15*, *Oas1* und *Stat1* im *MYCN*-Knockdown wie unter DMXAA-Stimulation (siehe Abb. 38).

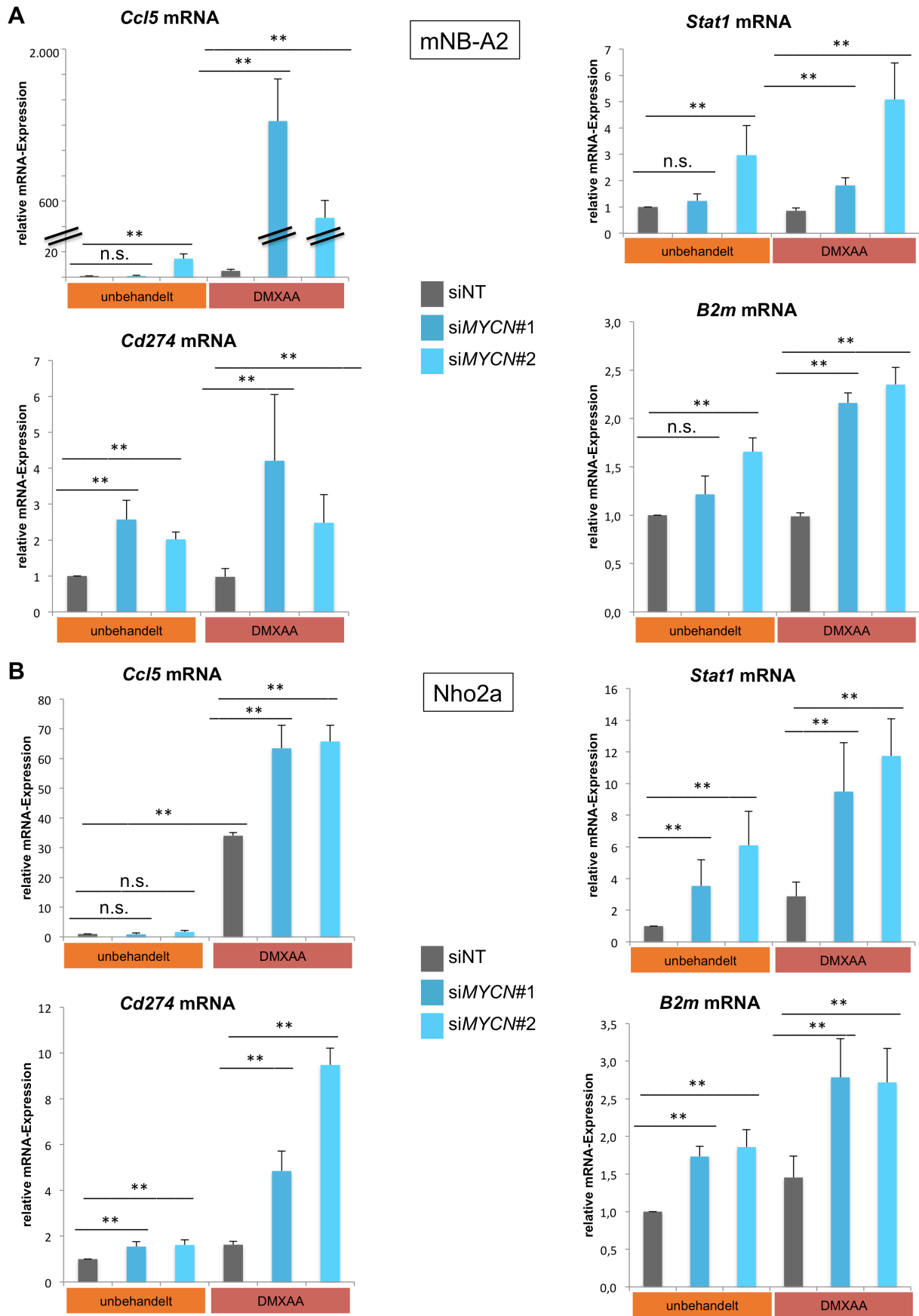


Abb. 38: Die in mNB-A1 observierten immunstimulierenden Effekte einer Behandlung mit siMYCN und DMXAA bestätigen sich auch in den weiteren transgen-murinen Zelllinien mNB-A2 und Nho2a. Im biologischen Triplikate mit technischer Doppelbestimmung durchgeführte qRT-PCR-Analysen auf angegebene Gene in den wie beschrieben mit siMYCN sowie DMXAA behandelten Linien mNB-A2 (**A**) und Nho2a (**B**) (jeweils n=3). Im Balkendiagramm dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen relativen mRNA-Expression; berücksichtigt ist die im Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung. Es erfolgte eine Normalisierung der Expressionswerte mit Expressionswerten für *Ubc*. n.s.: nicht signifikant ($p>0,05$); $**p<0,01$; Whitney-Mann-U-Test.

5.12 RNAi und STING-Agonist induzieren Chemotaxis und T-Zellmigration

Von entscheidender Bedeutung für die T-Zell-Rekrutierung ist wie bereits erläutert die Sekretion von Chemokinen, wobei dem zuvor schon auf transkriptioneller Ebene untersuchten CXCL10 (siehe Abb. 39A) eine Schlüsselrolle zukommt.

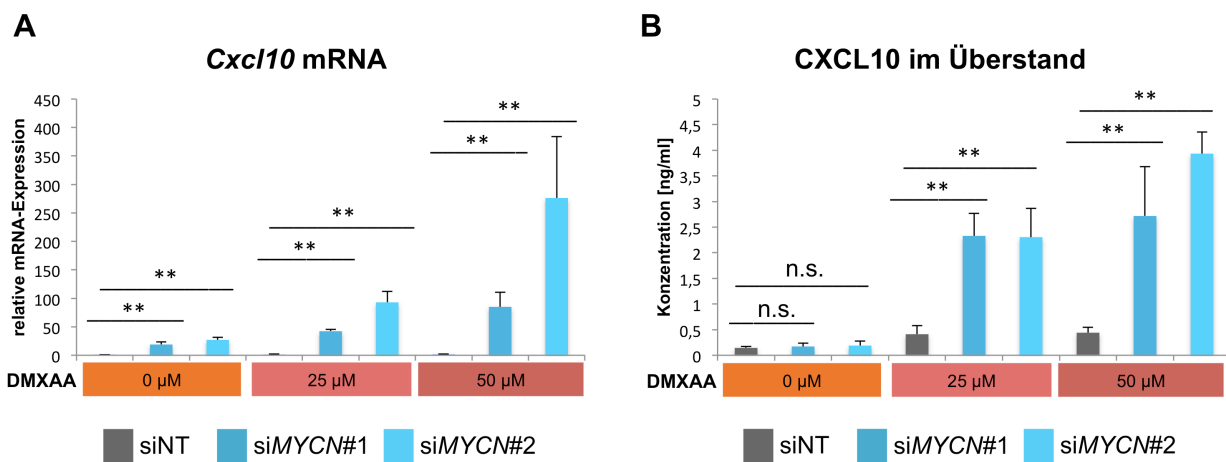


Abb. 39: Die Behandlung der transgen-murinen Zelllinie mNB-A1 mit siRNA gegen *MYCN* sowie DMXAA führt zu einer gesteigerten Transkription sowie auch Sekretion des T-Zell-rekrutierenden CXCL10. **A** Im biologischen Triplikate mit technischer Doppelbestimmung durchgeführte qRT-PCR-Analyse auf *Cxcl10* in der wie beschrieben mit siMYCN sowie DMXAA behandelten Linie mNB-A1 (n=3). Im Balkendiagramm dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen relativen mRNA-Expression; berücksichtigt ist die im Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung. Es erfolgte eine Normalisierung der Expressionswerte mit Expressionswerten für *Ubc*. $**p<0,01$; Whitney-Mann-U-Test. **B** Im ELISA gemessene CXCL10-Proteinkonzentration im Überstand wie annotiert behandelter mNB-A1-Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus biologischen Triplikaten mit technischer Doppelbestimmung (n=3). n.s.: nicht signifikant ($p>0,05$); $**p<0,01$; Whitney-Mann-U-Test.

Es zeigte sich im ELISA, dass die Behandlungskombination aus siRNA und DMXAA ebenfalls einen massiven Anstieg der CXCL10-Konzentration im Überstand der behandelten Zellen zur Folge hatte (siehe Abb. 39B), auch wenn dieser insgesamt etwas geringer ausfiel als bei der Behandlung der Zellen mit Ifn- γ . Diese experimentell beobachtete Cxcl10-Freisetzung ist wie in der Einleitung erläutert eine mögliche Grundlage für eine Chemotaxis im Tumorgewebe, stellt jedoch unter physiologischen Bedingungen keinesfalls den einzigen Faktor hierfür dar.

Aus diesem Grunde schloss sich eine videographische Analyse des faktischen Migrationsverhaltens CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen aus OT1-Mäusen unter der Anwesenheit der wie im Methodenteil unter 3.2.14 beschrieben generierten Überstände an. Hierfür wurden die frisch aus der Milz und den Lymphknoten von OT-1-Mäusen isolierten und in Kontrollmedium suspendierten T-Zellen von M. T. Kronmüller und T. Quast über Schläuche in eine Kammer infundiert, die je zu einer Hälfte von Kontrollmedium und den konditionierten Überständen durchflossen wurde. Bei einer gleichen molekularen Zusammensetzung von Überstand und Kontrollmedium wäre ein Durchfließen der Kammer und ein Verteilungsmuster ohne Richtungstendenzen zu erwarten gewesen. Insbesondere bei den Überständen aus kombinatorischer Behandlung mit *MYCN*-siRNA und DMXAA zeigten die T-Zellen jedoch eine deutlich messbare, wie auch optisch und kameradokumentiert ersichtliche Migration in Richtung des konditionierten Überstandes. Zudem wiesen die Zellen auch eine signifikant höhere Migrationsgeschwindigkeit auf. Die vollumfänglichen Resultate und Auswertungen der T-Zell-Migrationsassays können der eingangs aufgeführten Publikation entnommen werden.

Insgesamt belegten die Ergebnisse, dass eine therapeutische Reduktion von *MYCN* kombiniert mit der Gabe eines STING-Agonisten durch gesteigerte Chemokinfreisetzung zumindest unter den hier beschriebenen kontrolliert-experimentellen Konditionen auch T-Zell-Migration fördern kann.

6. Diskussion

6.1 Die Notwendigkeit und Perspektive neuer risikoadaptierter Therapieansätze

Das Neuroblastom ist ein in absoluten Zahlen recht seltener Tumor, dennoch ist er ursächlich für circa 15 Prozent aller krebsbedingten Todesfälle bei Kindern (Maris *et al.*, 2007). Der Umstand der noch nicht abgeschlossenen Entwicklung und das sehr junge Alter der Patienten verschärfen die Problematik sowohl physischer (Escobar *et al.*, 2006; Perwein *et al.*, 2011) als auch psychischer (Zeltzer *et al.*, 2009) Nebenwirkungen von multimodaler Chemotherapie und Bestrahlung. In diesem Kontext müssen vor allem die Langzeitschäden der Therapie beachtet werden, die teils erst mehrere Jahrzehnte später manifest werden und bei Kindern deutlich stärker ins Gewicht fallen. Dies liegt einerseits darin begründet, dass letztlich rein stochastisch betrachtet mit einer hohen verbleibenden Lebenserwartung nach dem Zeitpunkt der Therapie auch das Risiko für das Auftreten von Sekundärmalignomen durch Spontan- und Folgemutationen steigt. Andererseits ist die frühe Kindheit aber auch eine besonders vulnerable Phase, in der durch die noch voranschreitende körperliche Entwicklung und Differenzierung der Organe ein erhöhtes Risiko für Sekundärmalignome und bleibende Therapieschäden besteht.

Aus den geschilderten Komplikationen ergibt sich gleichermaßen wie aus dem hochvariablen Verlauf des Neuroblastoms eine sehr dringliche Notwendigkeit zur verlässlichen Stratifizierung des individuellen Risikos über molekularbiologische Prädiktoren und der daraus abzuleitenden möglichst gezielten, *ex aequo* schonenden wie effektiven weitergehenden Therapie des Tumors. Die hier dargestellten Ergebnisse aus Sequenzierungsanalysen primärer Tumorbiopsate, die Verbindung dieser mit klinischen Annotationen, die Sequenzierungsanalysen aus Datensätzen von 24 Neuroblastomzelllinien, sowie die multimethodischen *in vitro*-Versuche in jeweils mehreren humanen und transgenen murinen Zelllinien bieten in beide dieser Richtungen einen möglichen Ansatz.

6.2 Ein dichotomes Phänotyp-Modell und dessen therapeutische Relevanz

Einerseits identifizierten die bioinformatischen Auswertungen eine hohe Expression von *MYCN* als Biomarker für einen T-Zell-deprivierten Phänotyp, der mit einer schlechten

Prognose assoziiert ist. Ursächlich für diesen Zusammenhang ist anzunehmender Weise die Wirkung von *MYCN* als globaler Suppressor IFN-abhängiger Signalwege und als Inhibitor der Chemokinsekretion. Das Zusammenspiel dieser Faktoren resultiert letztlich in der Unterdrückung einer T-Zell-Migration zum Tumorgewebe. Somit lassen sich gemäß den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen im Wesentlichen zwei Phänotypen des Tumors gegenüberstellen (siehe Abb. 40): das T-Zell-arme *MYCN* high-Neuroblastom und das T-Zell-reiche *MYCN* low-Neuroblastom.

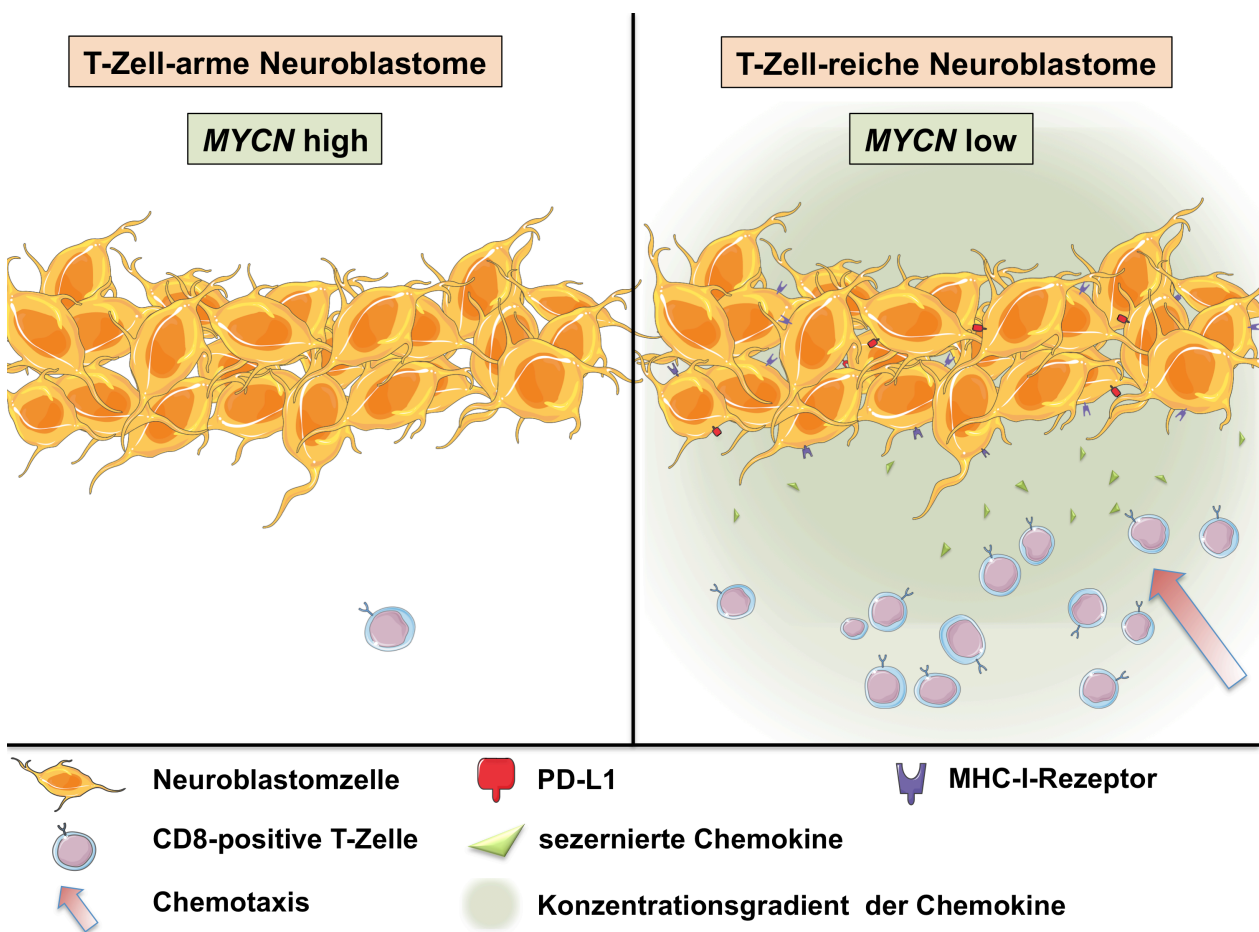


Abb. 40: Schematische Darstellung der beiden in dieser Arbeit herausgestellten gegensätzlichen tumorinflammatorischen Phänotypen in Abhängigkeit von der *MYCN*-Expression. *MYCN* hemmt die Transkription IFN-abhängiger Gene, reduziert die Expression von Oberflächenrezeptoren und verhindert somit eine über Chemokinsekretion in T-Zell-Migration resultierende proinflammatorische Aktivierung der Zelle. Das etablierte Konzept des *MYCN* high- und *MYCN* low-Neuroblastoms wird daher kontrastiert durch die davon abhängige und ebenfalls prognostisch relevante, komplementäre Einteilung in T-Zell-arme und T-Zell-reiche Neuroblastome.

Andererseits bietet dieses Modell die theoretische Grundlage zur weiteren Erprobung des hier vorgestellten therapeutischen Konzepts aus präziser MYCN-Reduktion und immunstimulatorischer Behandlung durch einen STING-Agonisten als adjuvante Therapie im *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom. Dieses Konzept sollte im Einklang mit den hier gezeigten experimentellen Daten kombiniert werden mit einer gezielten sogenannten Checkpoint-Inhibition.

6.3 MYCN als globaler Suppressor inflammatorischer Aktivität im Neuroblastom

In mehreren humanen sowie auch in mehreren murinen, transgenen Zelllinien ließ sich der Effekt von *MYCN* auf die IFN-Signalwege therapeutisch durch eine Behandlung mit siRNA gegen *MYCN* sowie der Gabe von TNF- α , IFN- α , IFN- γ oder dem murinen STING-Agonisten DMXAA revidieren. Die Zellen nahmen gegenteilig auf vielen untersuchten Ebenen einen proinflammatorischen Status an. Dass sich die Zellen grundsätzlich als durch IFN stimulierbar erwiesen, kann als wichtige Grundlage für eine auch im klinisch-therapeutischen Kontext funktionierende Immuntherapie mit einer notwendigerweise andauernden Unterhaltung der proinflammatorischen Signalwege durch IFN-Sekretion aus T-Zellen gewertet werden. Es kam überdies unter der Behandlung der Zellen in den hier ausgewiesenen Experimenten zu einer gesteigerten Transkription unter anderem der Chemokine CXCL9 und CXCL10 sowie einer deutlichen Zunahme der Sekretion von CXCL10. Da CXCL10-Expression im Tumorgewebe die T-Zell-Rekrutierung begünstigt (Peng *et al.*, 2015), unterdrückt MYCN die Etablierung eines proinflammatorischen Tumormilieus vermutlich zumindest in Teilen durch Repression einer Cxcl10-induzierten positiven Rückkopplung, die in die Rekrutierung IFN- γ -produzierender T-Zellen mündet und somit eine Selbstunterhaltung und Verstärkung der Immunantwort ermöglichen würde.

Bereits zuvor ist für MYCN ein antagonistischer Effekt auf die Expression von Antigen präsentierendem MHC-I (Lenardo *et al.*, 1989) und auch auf die des Chemokins CCL2 (Song *et al.*, 2007) nachgewiesen worden. Es handelt sich jedoch, wie die hier gezeigten Experimente belegen, vielmehr um eine globale Suppression IFN-abhängiger Signalwege, die von *MYCN* ausgeht und ab der Transkrip-

tion jede wichtige Schnittstelle zwischen Tumorzelle und dem Immunsystem, von IFN-Signalwegproteinen, über Chemotaxis bis hin zu Immunrezeptoren und Antigenpräsentation betrifft (siehe Abb. 41).

T-Zell-arme Neuroblastome

MYCN high

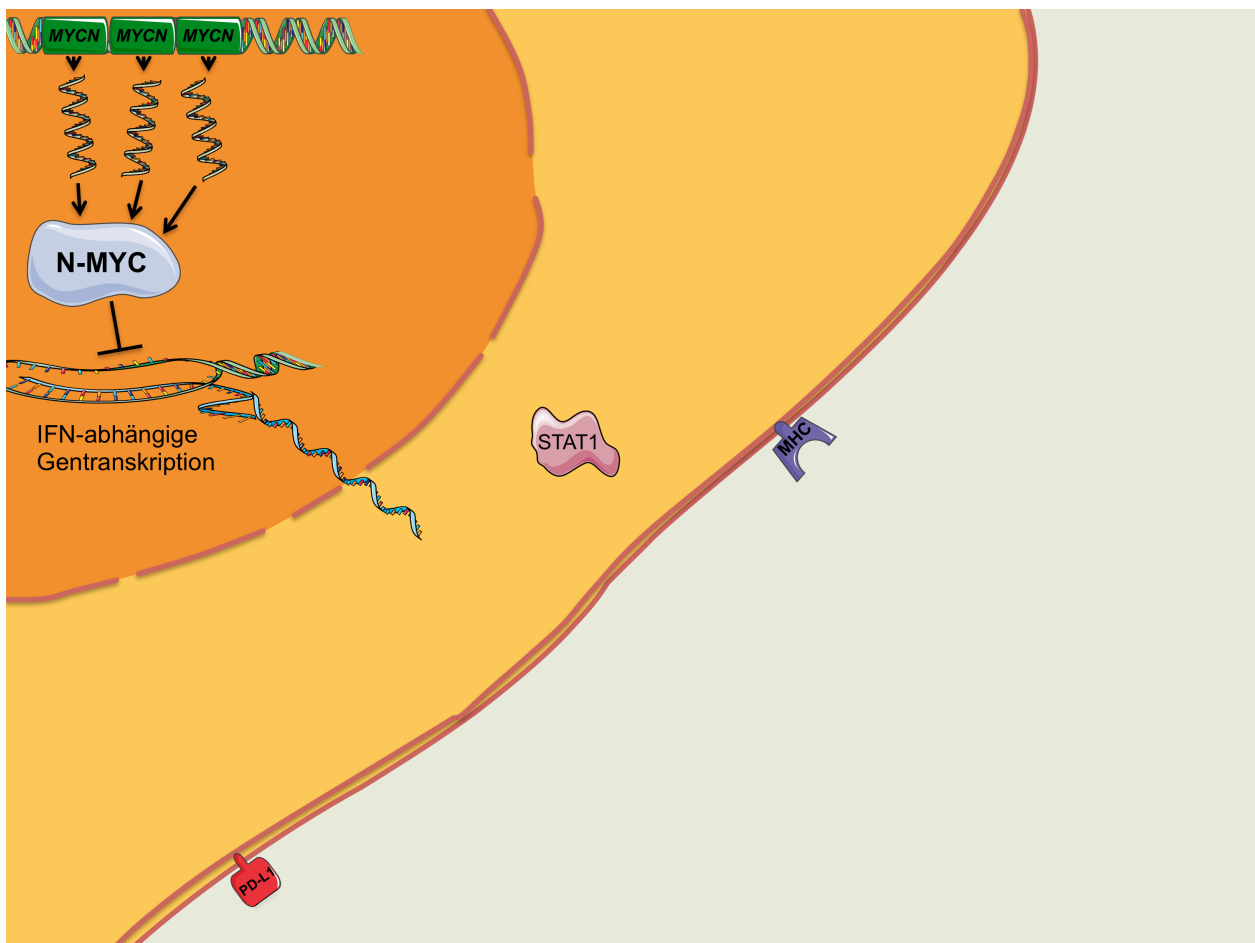


Abb. 41: Schematische Darstellung der intrazellulären Abläufe in *MYCN* high-/T-Zell-armen Tumoren gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit. Resultierend aus der *MYCN*-Amplifikation kommt es zu einer starken Transkription und letztlich Proteinbiosynthese von *MYCN*. Die hohe Expression des Onkogens supprimiert die Transkription IFN-abhängiger Gene und verhindert dadurch einen inflammatorischen Zellstatus. Folglich wird auch die adaptive Immunabwehr nicht auf den Tumor aufmerksam.

T-Zell-reiche Neuroblastome

MYCN low

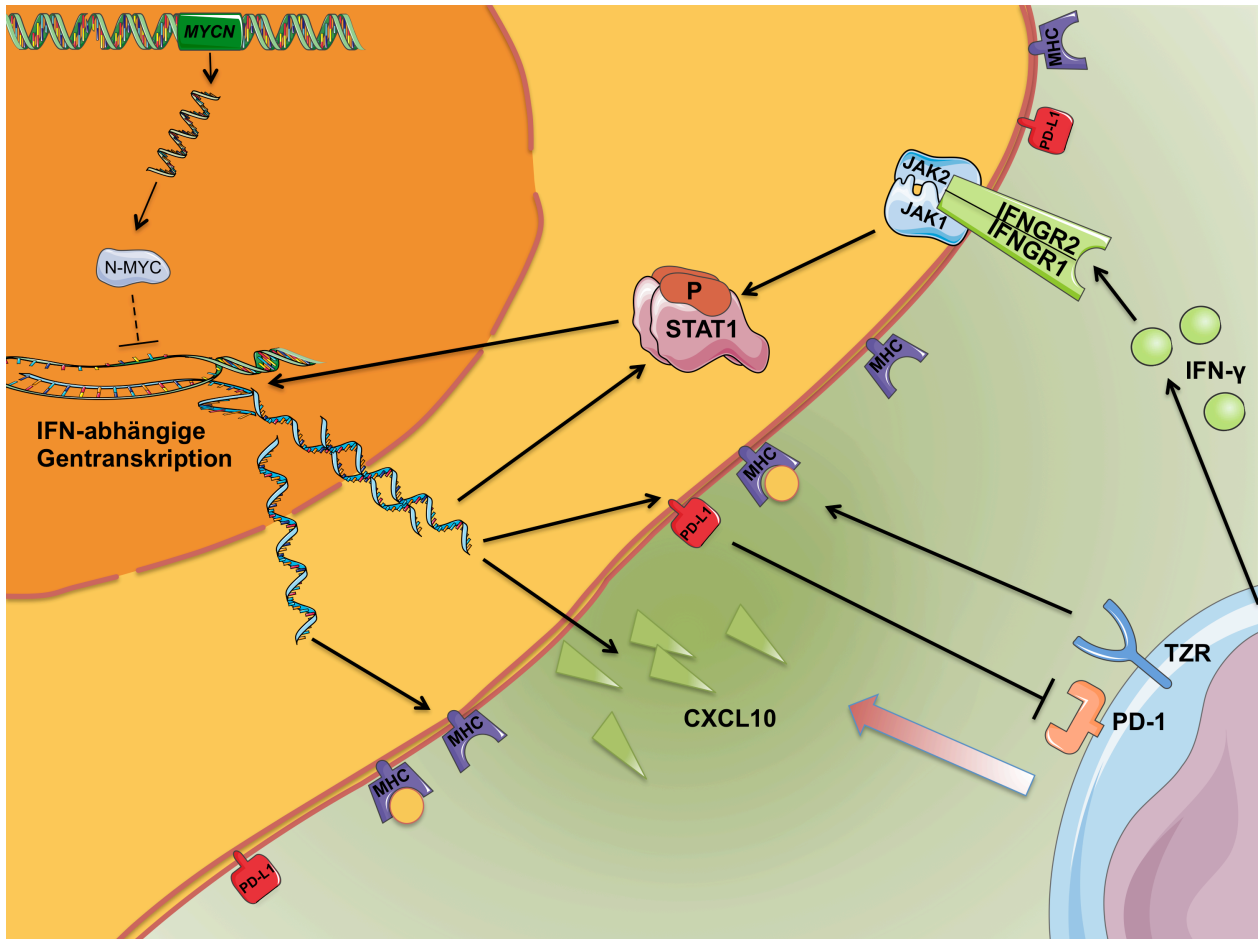


Abb. 42: Schematische Darstellung der intrazellulären Abläufe in *MYCN* low-/T-Zell-reichen Tumoren gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit.

Bei geringer Expression von *MYCN* wird dessen suppressiver Mechanismus entscheidend geschwächt und die IFN-abhängige Gentranskription nimmt deutlich zu. In der Konsequenz erfolgt eine Freisetzung von Chemokinen wie dem T-Zell-rekrutierenden CXCL10. Die durch Chemotaxis angelockten T-Zellen werden auf den Tumor aufmerksam. Über die auf der Zelloberfläche exprimierte MHC-I-Rezeptoren (MHC) kommt es zur Präsentation von Tumorzellmasse, die von CD8-positiven T-Zellen über T-Zell-Rezeptoren (TZR) erkannt wird und zu einer Aktivierung dieser führt. Zugleich hemmt PD-L1 die T-Zellen über Bindung an die T-Zell-eigenen PD-1-Rezeptoren (PD-1-R). Aktivierte T-Zellen schütten Zytokine und Interferone wie IFN- γ aus, was zu einer Aktivierung weiterer T-Zellen führt. Desweiteren bindet das freigesetzte IFN- γ an seinen heterodimeren Rezeptor (IFNGR1/2) auf der Neuroblastomzelle und bewirkt eine Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs. Dies verstärkt wiederum die IFN-abhängige Gentranskription im Nucleolus. Ein sich selbst unterhaltender proinflammatorischer Kreislauf hat sich etabliert.

Schaut man sich hingegen ein *MYCN* low-Neuroblastom an oder reduziert *MYCN* in den aggressiven Tumoren therapeutisch, so sieht man ähnlich wie bei einem umgelegten Schalter nach einer kurzen und gezielten Immunstimulation einen aktiven Status respektive eine Reaktivierung sämtlicher dieser Signalwege (siehe Abb. 42).

6.4 Die Bedeutung des Immunsystems für das extrem variable Neuroblastom

Jegliche, unter Beachtung der Inzidenz und Prognose des Neuroblastoms prinzipiell rationalen Versuche, das Neuroblastom einem frühkindlichen Screening zukommen zu lassen, waren bisher zum Scheitern verurteilt, da die in Studien durchgeführten Reihenuntersuchungen mit erheblichen Zahlen falsch-positiv getesteter beziehungsweise klinisch irrelevanter Diagnosen und einer teilweisen Übertherapie bei Kindern, die im Verlauf vermutlich nie klinisch manifest erkrankt wären, einhergingen (Erttmann *et al.*, 1998; Woods *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 2002). Die erfreulichen, wenn auch für die Etablierung eines Screenings so problematischen, klinisch häufig beobachteten Spontanremissionen (Schilling *et al.*, 2002), bioptische Funde lymphozytärer Infiltrate im Tumorgewebe (Cooper *et al.*, 2001) und ein gehäuftes Auftreten des Prognose begünstigenden autoimmunen Opsoklonus-Myoklonus-Syndroms (OMS) (Rudnick *et al.*, 2001) als paraneoplastisches Phänomen im Rahmen einer Neuroblastom-Erkrankung legen eine Schlüsselrolle des Immunsystems in der Kontrolle des Neuroblastoms nahe.

Gerade die auf Stärkung der antitumoralen Immunaktivität beruhenden Checkpoint-Inhibitoren stellen daher grundsätzlich eine sinnvolle Rationale zur Therapie dar, die momentan bereits in ersten klinischen Studien Anwendung findet. Beim PD-1-Rezeptor handelt es sich um einen auf der Oberfläche von T-Zellen exprimierten Rezeptor, der bei Bindung seines Liganden PD-L1 eine Inaktivierung der T-Zelle verursacht und somit die Elimination von Tumorzellen durch CD8-positive zytotoxische T-Zellen unterdrückt (Kim, 2015). Der als „exhaustion state“ beschriebene zelluläre Zustand, der durch PD-1/PD-L1 ausgelöst wird, kann im Deutschen am ehesten als eine progressive Dysfunktion der T-Zelle, die verschiedenste Bereiche wie die Proliferation, Apoptose oder Rezeptorenexpression betrifft, beschrieben werden (Yi *et al.*, 2010). Die Blockade der PD-1/PD-L1-Bindung mittels monoklonaler Antikörper verhindert diesen Zellzustand und reaktiviert dadurch die antitumorale Immunantwort. Jedoch ist die Effektivität der

Behandlung stark abhängig von der vorliegenden Tumorentität und individuellen Faktoren. Sehr gute Resultate wurden mit PD-1-Inhibitoren insbesondere beim malignen Melanom erzielt (Robert *et al.*, 2015), zunehmend rücken aber auch weitere Entitäten wie nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome in den Fokus (Brahmer *et al.*, 2015). Es konnte gezeigt werden, dass Checkpoint-Inhibitoren am effektivsten bei Tumoren mit einer präexistenten, aber supprimierten antitumorösen Immunantwort wirken. Insbesondere ist das Ansprechen auf die Therapie mit einer T-Zell-Infiltration des Tumors assoziiert (Tumeh *et al.*, 2014). T-Zell-arme Melanome etwa profitierten in experimentellen Modellen von einer PD-1-Inhibition erst nach vorhergehender Typ I-IFN-Aktivierung mittels Poly(I:C) (Bald *et al.*, 2014). Ebenso können Agonisten des cGAS-STING-Signalwegs eine Therapieresistenz durchbrechen und eine Immunreaktion induzieren (Fu *et al.*, 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Thesen auch für das Neuroblastom. Sie legen daher unter anderem die Notwendigkeit einer Checkpoint-Inhibition unter einer Therapie mit einem STING-Agonisten nahe, da die Expression von PD-L1 *in vitro* analog zu den überprüften proinflammatorischen Signalwegen unter Therapie deutlich zunahm.

6.5 *MYCN* als Biomarker für ein Ansprechen auf eine Immuntherapie

Neben der möglichen Therapieresistenz gegenüber Checkpoint-Inhibitoren und hohen Therapiekosten besteht auch die Möglichkeit starker Nebenwirkungen durch die Inhibitoren (Marrone *et al.*, 2016; Michot *et al.*, 2016). Während einzelne Patienten möglicherweise auch aufgrund des bereits in der Einleitung beschriebenen grundsätzlichen Mangels an Neoantigenen im Neuroblastom keine geeignete Grundlage für eine Stimulation des Immunsystems im Sinne einer präexistenten, aber supprimierten, T-Zell-Infiltration bieten, so ist insbesondere bei den Patienten, die im Verlauf spontan remittieren oder etwa ein OMS entwickeln, mit massiven generalisierten Autoimmunreaktionen zu rechnen. Eine Evaluation der zu erwartenden Wirksamkeit unter Abwägung des Risiko-Nutzen-Verhältnisses ist somit nicht nur aus finanziellen, sondern gerade aus medizinischen Gründen geboten. Diese Arbeit hebt daher als Biomarker für eine vorhandene T-Zell-Infiltration, die ein starker Prädiktor für ein Therapieansprechen auf Checkpoint-Inhibitoren ist, und somit zur Identifikation für eine PD-L1-Therapie geeigneter Patienten *MYCN* hervor. Erwähnenswerter Weise ist eine

mangelhafte NKT-Zell-Infiltration *MYCN*-amplifizierter Neuroblastome vorbeschrieben (Metelitsa *et al.*, 2004), die Analyse der Sequenzierungsdaten aus Tumorbiosaten in dieser Arbeit belegt jedoch vielmehr einen generell Immunzell-armen Phänotyp, der insbesondere die Fraktion der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen betrifft.

6.6 Ein therapeutisches Konzept für *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome

Perspektivisch bietet sich, um die charakterisierte *MYCN*-abhängige antiinflammatorische Tumorphalanx zu durchbrechen, wie auf Grundlage der hier präsentierten Versuchsergebnisse bereits dargelegt, die Kombination aus *MYCN*-Reduktion und Immunstimulation gemeinsam mit Checkpoint-Inhibitoren als adjuvante Therapie zur Behandlung des metastasierten *MYCN*-amplifizierten Neuroblastoms an (siehe Abb. 43).

Bis zu einer tatsächlichen klinischen Erprobung wäre es jedoch noch ein sehr langer Weg. In einem nächsten Schritt könnten die verwendeten GEMMs für das *MYCN*-getriebene Neuroblastom zunächst einmal die Grundlage für eine präklinische Evaluation der hier vorgestellten Kombinationstherapie, sowohl in Bezug auf therapeutische Effizienz als auch auf das zu erwartende Nebenwirkungsspektrum, sein. Eine Rekapitulation der hier *in vitro* gezeigten Ergebnisse im Mausversuch wäre dafür ein erster logischer Schritt. Zur Reduktion von *MYCN* käme RNAi *in vivo* methodisch jedoch eher nicht in Betracht - einerseits aufgrund einer schlechten pharmakokinetischen Steuerbarkeit, andererseits durch die zeitliche Limitation, die sich aus der transienten Wirkung ableitet. Eine grundsätzlich besser geeignete Option stellen eine ganze Reihe der sogenannten „small molecule drugs“ dar. Bei diesen Medikamenten handelt es sich um Wirkstoffe, die aufgrund ihrer geringen molekularen Größe in der Lage sind, auch intrazellulär gezielt ihre Zielstrukturen zu binden und dennoch in klinisch verträglichen Plasmakonzentrationen und oral verabreicht werden können (Imai und Takaoka, 2006). Eine zusätzliche Schwierigkeit ergibt sich für die Gruppe der Transkriptionsfaktoren, zu denen *MYCN* zählt, daraus, dass sie nur schlecht als direktes pharmakologisches Target zu inhibieren sind. Viel mehr muss meist auf indirekte Mechanismen der Inhibition zurückgegriffen werden. Unter anderem Bromodomain-Inhibitoren (Puissant *et al.*, 2013), CDK7-Inhibitoren (Chipumuro *et al.*, 2014) oder Aurorakinase A-Inhibitoren (Brockmann *et al.*, 2013) wurden daher zuletzt

bereits als mögliche Angriffspunkte zur Reduktion von MYCN beschrieben und es bleibt abzuwarten, welche dieser neuen Methoden sich zunächst experimentell und später auch in Studien durchsetzen wird. Zu den Aurorakinase A-Inhibitoren ist zu sagen, dass in den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit über mehrere Zelllinien hinweg keine stabile Suppression von MYCN erreicht werden konnte.

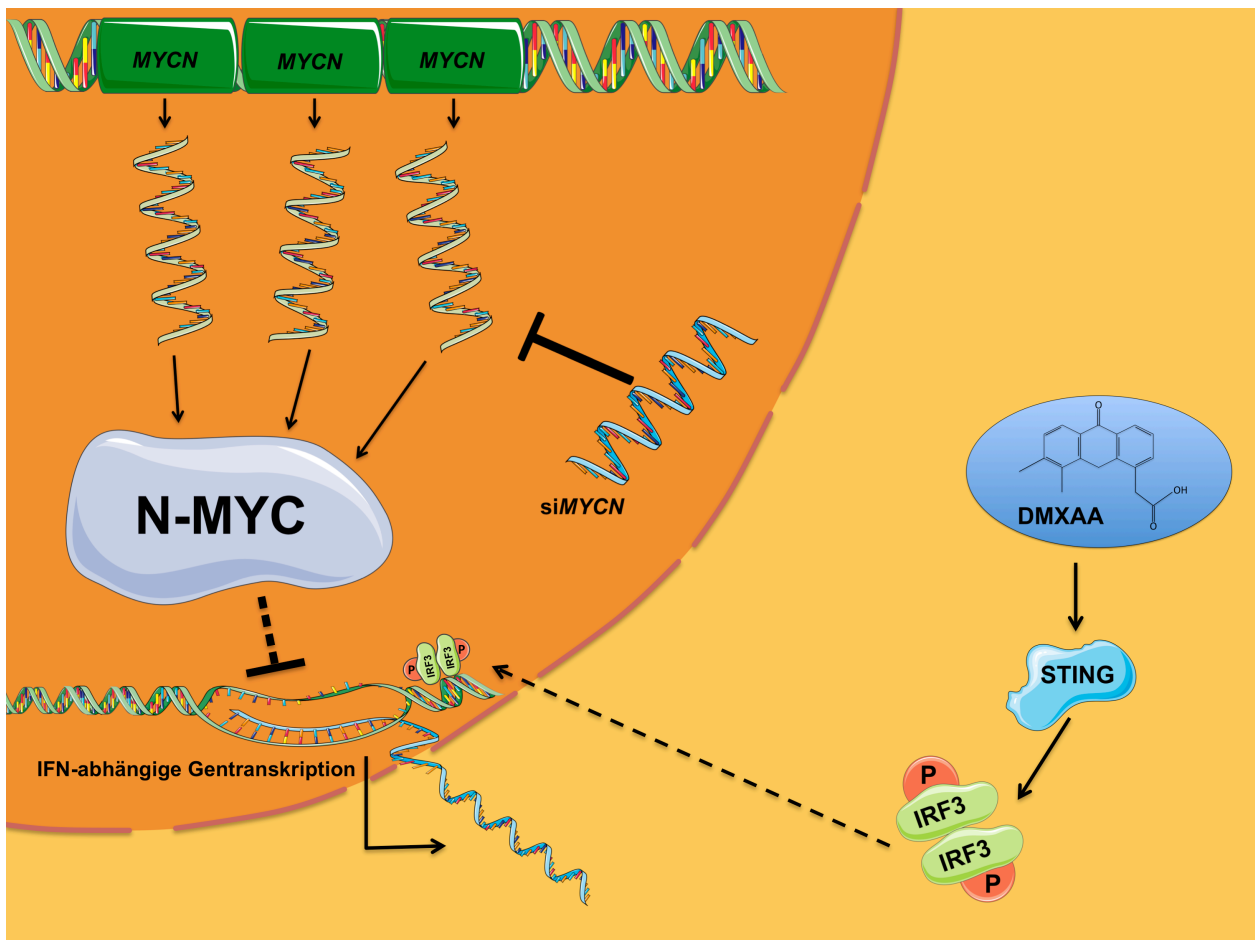


Abb. 43: Synergistisches therapeutisches Konzept für das *MYCN*-amplifizierte Neuroblastom, getestet in der *MYCN*-transgenen Linie mNB-A1. Durch die siRNA gegen *MYCN* kommt es zu einer Reduktion von MYCN, während der STING-Agonist DMXAA über pIRF3-Dimerisierung die Transkription IFN-abhängiger Gene aktiviert und den in Abb. 42 erläuterten Kreislauf weiter verstärkt.

Es ist zu erwarten, dass auf dem Feld der MYCN-angreifenden Agentien in den kommenden Jahren noch wesentliche Fortschritte erzielt werden, möglicherweise auch durch Identifikation weiterer, bislang unbekannter Interaktionen des Onkogens.

6.7 EZH2 als möglicher Angriffspunkt zur Inhibition der Wirkung von MYCN

Eine mögliche solche Interaktion von MYCN mit weiteren, eventuell sogar selbst antiinflammatorische Wirkung erzielenden Einflussfaktoren wurde auch im Rahmen der Experimente für diese Arbeit aufgedeckt. In den 3'-RNA-Sequenzierungsanalysen von Proben zuvor mit siRNA gegen *MYCN*-behandelter Zellen zeigte sich übereinstimmend über die getesteten Zelllinien und biologischen Triplikate eine Reduktion von EZH2. EZH2 soll daher an dieser Stelle als Beispiel gelten für die komplexen Regulationsmechanismen von MYCN, deren Entschlüsselung und pharmakologische Manipulation das Potential einer neuartigen und gezielteren Therapie der aggressiven *MYCN*-amplifizierten Neuroblastome bieten könnte.

Es handelt sich bei EZH2 um einen epigenetischen Repressor, der wichtig für die Regulation der embryonalen Entwicklung und Differenzierung ist, jedoch bei Mutation oder Überexpression an der Entstehung zahlreicher Malignome beteiligt ist. Zu diesen Malignomen zählen die zum Neuroblastom verwandten neuroendokrinen Prostatakarzinome und malignen Melanome (Bachmann *et al.*, 2006; Varambally *et al.*, 2002). Biochemisch fungiert EZH2 in erster Linie als enzymatische Untereinheit eines Komplexes (PRC2), der H3K27 methyliert und somit die Transkription von Genen epigenetisch über Histonmodifikation stumm schaltet (Kim und Roberts, 2016).

Erste ebenfalls bereits im biologischen Triplikat validierte Versuche mit einem der neuesten verfügbaren EZH2-Inhibitoren namens GSK343 zeigten tatsächlich gleichermaßen in SKNBE wie auch in NMB und mNB-A1 eine mit der siRNA gegen *MYCN* vergleichbare Wirkung in der Induktion eines proinflammatorischen Tumorzellphänotyps. Ebenso wie bei der RNAi, erwies sich auch diese Behandlung als synergistisch mit einer Zytokinstimulation beziehungsweise der Gabe des STING-Agonisten DMXAA. Interessanterweise wurde in einer wissenschaftlichen Veröffentlichung jüngst bereits berichtet, dass EZH2-Expression im Ovarialkarzinom mit einer verminderten Produktion von T-Zell-Infiltration-initiierendem CXCL9 und CXCL10 einhergeht. Die Behandlung mit EZH2-Inhibitoren konnte diesen Effekt wieder umkehren und die T-Zell-Migration verstärken, was wiederum die Effizienz einer Therapie mit PD-L1-Inhibitoren verbesserte (Peng *et al.*, 2015). Im *MYC*-amplifizierten Prostatakarzinom wurde eine direkt *MYC*-abhängige Inaktivierung des IFN-JAK-STAT-Signalweges durch EZH2 nachgewiesen (Wee *et al.*, 2014). Bei Gabe eines EZH2-Inhibitors und IFN- γ kam

es zu einer Wiederherstellung dieser Signalwege und robuster antitumoröser Aktivität. Diese Beobachtungen stehen in engem Zusammenhang zu den Ergebnissen dieser Arbeit und untermauern das Potenzial einer kombinierten NMYC-Depletion und Immuntherapie generell zur Reaktivierung intrinsischer inflammatorischer Signalwege. Auf eine detaillierte Präsentation der Ergebnisse mit dem EZH2-Inhibitor wird an dieser Stelle verzichtet, da die Thematik über die Fragestellung und Zielsetzung dieser Dissertationsschrift hinausgeht. Es handelt sich vielmehr um eine Grundlage sowie erste Ansätze für ein weiterführendes Projekt. Die genauere Identifikation von regulatorischen Zusammenhängen und Interaktionen von MYCN und EZH2 kann ebenso wie die präzise therapeutische Ansteuerung von EZH2 und deren Effekt auf den Tumor Teil zukünftiger Experimente sein, deren Endpunkt ein *in vivo* anwendbares therapeutisches Konzept für MYCN-amplifizierte Neuroblastome sein sollte. Ein Vorteil eines solchen auf EZH2-Inhibition beruhenden Konzepts läge sicherlich in der bereits heute verhältnismäßig guten Erprobung der EZH2-Inhibitoren in klinischen Studien (Knutson *et al.*, 2013; Knutson *et al.*, 2014; McCabe *et al.*, 2012), womit eine baldige klinische Verfügbarkeit wahrscheinlich wäre.

6.8 STING und RIG-I-Liganden als Immunstimulantien des Typ I-IFN-Systems

Neben der Reduktion von MYCN und dessen Effektoren ist die zweite Säule der hier experimentell eruierten kombinatorischen Therapie eine gezielte Immunaktivierung der Tumorzellen. Die gezielte IFN-Aktivierung durch Stimulation von Nukleinsäuren erkennenden Signalwegen des angeborenen Immunsystems ist eine aussichtsreiche Strategie zur Provokation von Immunantworten in T-Zell-armen Tumoren.

Bei dem ursprünglich zur Zerstörung tumoröser Angiogenese entwickelten und auch als Vadimezan bekannten DMXAA handelt es sich um einen gut charakterisierten, membrangängigen STING-Agonisten (Conlon *et al.*, 2013). Jedoch ist DMXAA ein rein muriner STING-Agonist und es steht derzeit noch kein human wirksames Präparat zur Verfügung. Allerdings befinden sich erste humane STING-Agonisten derzeit in klinischen Studien und sie sind möglicherweise in wenigen Jahren verfügbar. Alternativ könnten auch andere, konzeptionell ähnlich wirkende Medikamente, die beispielsweise als RIG-I-Liganden fungieren (Daßler-Plenker *et al.*, 2016; Loo und Gale, 2011; Schlee und Hartmann, 2016), eine vergleichbare Wirksamkeit besitzen (siehe Abb. 44).

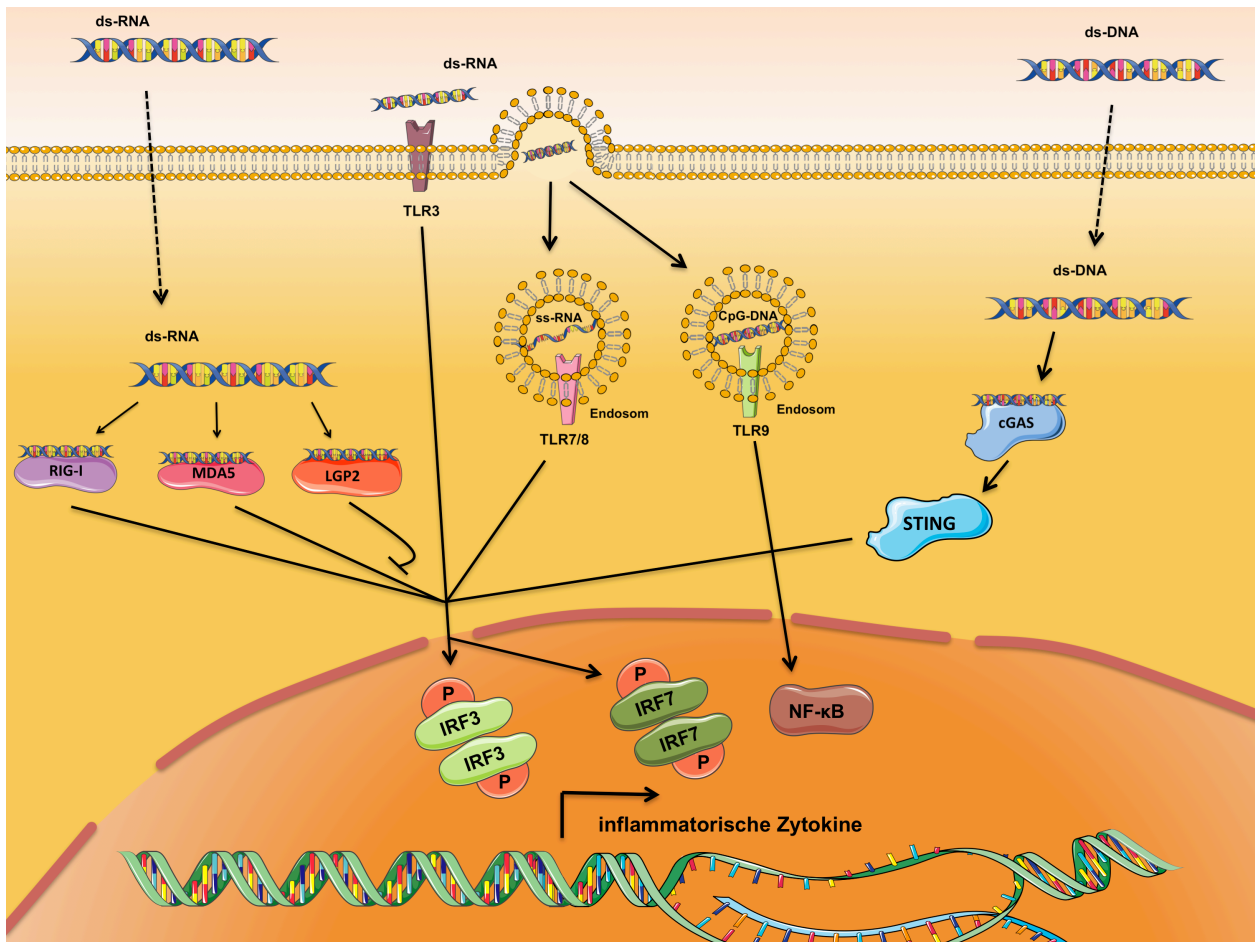


Abb. 44: Mechanismen des intrazellulären RNA/DNA-Sensings als therapeutisches Vehikel inflammatorischer Zellaktivierung. Durch eine Identifizierung doppelsträngiger RNA (ds-RNA) oder DNA (ds-DNA), derer einzelsträngiger Bestandteile (ss-RNA) oder von CpG-Sequenzmustern (CpG-DNA) in Zytoplasma, Zellmembran oder Endosomen kommt es zu einer potenten Aktivierung der dargestellten Signalwege. Deutlich werden die funktionellen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den einzelnen Mitgliedern der RIG-I-like-Rezeptor-Familie (RIG-I, MDA5, LGP2), der Toll-like-Rezeptor-Familie (TLR) sowie dem cGAS-STING-Signalweg. Alle genannten Proteine initiieren eine Dimerisierung, Phosphorylierung und Migration in den Zellkern von IRF3, IRF7 und/oder NFκB, die letztlich die Transkription und Translation proinflammatorischer Zytokine einleitet. Die genaue Rolle von LGP2 ist jedoch bislang nicht komplett verstanden, ihm wird vor allem eine negative Regulation der anderen RIG-I-like-Rezeptoren zugeschrieben. Natürlicherweise dienen die beschriebenen Mechanismen insbesondere der Abwehr viraler oder bakterieller Infektionen. Potenziell wären synthetische Liganden für jedes dieser Proteine als Immunstimulantien denkbar. Vielversprechende Agentien für die hier vorliegende Fragestellung sind neben den in klinischen Studien befindlichen und hier experimentell verwendeten STING-Agonisten etwa RIG-I-Liganden. Darstellung nach Saito und Gale, 2008 sowie Daßler-Plenker *et al.*, 2016.

6.9 Ergänzung bestehender Therapiekonzepte für das Neuroblastom

Denkbar sind aber auch Kombinationen der in dieser Arbeit verwendeten Therapeutika mit anderen experimentellen oder aber auch etablierten Methoden in der Therapie des Neuroblastoms. So wären etwa STING-Agonisten eine möglicherweise sinnvolle, wie auch effektive Ergänzung zur bestehenden Therapie mit GD2-Antikörpern. GD2-Antikörper richten sich gegen ein neuron- und melanomzellspezifisches, in Neuroblastomen verstärkt exprimiertes Gangliosid (Schulz *et al.*, 1984) und werden in aggressiven Verlaufsformen des Neuroblastoms nach multimodaler Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation mit lokaler Bestrahlung mittlerweile standardmäßig therapeutisch genutzt. Ziel der Antikörpertherapie ist es, durch die gezielte Bindung der Antikörper an Neuroblastomstrukturen eine Immunzellmigration ins Tumorgewebe sowie die dortige Aktivierung der Immunzellen zu erzielen. Letztlich kommt es zu einer Tumorregression durch Komplement-abhängige und Antikörper-vermittelte Zytotoxizität (Seeger, 2011). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Verbesserungen an den Antikörpern vorgenommen und zuletzt auch eine CAR (chimeric antigen receptor)-Therapie mit spezifischen T-Zell-Rezeptoren auf Basis des GD2-Antikörpers erprobt (Pule *et al.*, 2008). Eine groß angelegte Studie konnte zeigen, dass die Effektivität der Anti-GD2-Therapie massiv gesteigert werden kann, wenn man sie mit der Gabe von immunstimulierendem G-CSF und IL-2 sowie Isotretinoin kombiniert (Yu *et al.*, 2010). Diese Kombination wurde zum Standard für die Antikörperbehandlung erhoben. Jedoch geht die Kombinationstherapie mit erheblichen Nebenwirkungen wie unter anderem Neuropathien, Fieber, Elektrolytentgleisungen und einem Capillary-Leak-Syndrom einher, sodass alternative Kombinationspartner für die Antikörpertherapie dringend gesucht werden (Seeger, 2011). Zudem unterstreichen die Gefahren der Therapie erneut die Notwendigkeit einer sorgfältigen Therapieauswahl auf Grundlage der Ergebnisse validierter Biomarker-Analysen. Möglicherweise bietet die Kombination der Antikörpertherapie oder auch einer zukünftigen CAR-Therapie mit MYCN-Inhibition, Checkpoint-Inhibition und gezielter Immunstimulation gerade in T-Zell-armen MYCN high-Neuroblastomen ein nutzbares therapeutisches Potential bei geringeren Nebenwirkungen.

7. Zusammenfassung

Beim Neuroblastom handelt es sich um einen embryonalen Tumor der Neuralleiste mit sehr variablem klinischen Verlauf. Aufgrund der großen Heterogenität der Erkrankung besteht ein enormer Bedarf an spezifischeren Methoden zur Risikostratifizierung und einer effizienten, personalisiert-zielgerichteten Therapie der Tumoren. Das High-Risk-Neuroblastom geht mit einer überaus schlechten Prognose einher, wobei eine Amplifikation des Onkogens *MYCN* den wichtigsten Risikofaktor darstellt.

Ausgehend von der Fragestellung nach neuen und alternativen Prädiktoren für ein Ansprechen des Neuroblastoms auf eine Checkpoint-Inhibitor-Immuntherapie und die hierfür wesentliche präexistente T-Zellinfiltration des Tumors erfolgte eine bioinformatische Auswertung von aus Tumorbiopsaten gewonnenen RNA-Sequenzierungsdatensätzen. Hierbei ergab sich eine negative Korrelation zwischen der Expression von *MYCN* und einer überlebensverlängernden Infiltration des Tumors mit CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen. In weitergehenden Analysen sowie *in vitro* Experimenten mit jeweils mehreren humanen und transgenen murinen Neuroblastomzellen offenbarte sich *MYCN* als zentraler Antagonist globaler Interferon-abhängiger Signalwege. Bei erhöhter *MYCN*-Expression zeigten sich ferner ebenfalls die Antigenpräsentation, die Expression von therapeutisch relevanten Oberflächenmarkern und insbesondere die Sekretion von T-Zell-rekrutierenden Chemokinen deutlich herabgesetzt. Das Onkogen bietet sich gemäß dieser *MYCN*-abhängigen Unterscheidbarkeit von T-Zell-armen und T-Zell-reichen Neuroblastomen als molekularbiologischer Prädiktor für das Ansprechen des Tumors auf eine Checkpoint-Inhibitor-Therapie an. Es erwiesen sich humane, wie auch murine Neuroblastomzellen experimentell als durch Interferone stimulierbar, wobei die Wirksamkeit der Stimulation durch einen zusätzlichen *MYCN*-Knockdown deutlich gesteigert werden konnte. In Kombination mit der Gabe eines STING-Agonisten bewirkte die *MYCN*-Reduktion eine potente Aktivierung zuvor unterdrückter, Interferon-abhängiger Transkription und eine Konversion des antiinflammatorischen Phänotyps. Dies führte letztendlich zu deutlich gesteigerter T-Zell-Migration in Richtung der Tumorzellen.

Damit stellt die Kombination aus MYCN-Reduktion und STING-Agonisten gemeinsam mit Checkpoint-Inhibitoren perspektivisch eine Option zur adjuvanten Therapie des *MYCN*-amplifizierten Neuroblastoms dar.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1:** Funktionsweise von MYCN
- Abb. 2:** Schematische Darstellung der Generierung des LSL-MYCN; Dbh-iCre-Modells und der Zelllinien mNB-A1 und mNB-A2 nach Althoff *et. al.*
- Abb. 3:** Schematische Darstellung des Vorgehens zur bioinformatischen Analyse der Sequenzierungsdaten von 498 Neuroblastompatienten
- Abb. 4:** MYCN-amplifizierte Neuroblastome zeigen eine niedrigere Expression einer T-Zell-Signatur
- Abb. 5:** MYCN-amplifizierte Neuroblastome des Stadiums 4 nach INSS zeigen eine niedrigere Expression einer zytotoxischen Immunzell-Signatur
- Abb. 6:** Reduktion der für die Analysen verwendeten Proben auf die Lokalisation der Nebennieren
- Abb. 7:** Reduktion der für die Analysen verwendeten Proben auf die Lokalisation Abdomen und Becken
- Abb. 8:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Anwendung der CIBERSORT-Methode
- Abb. 9:** Nach Expression einer kombinierten T-Zell- und zytotoxischen Immunzellsignatur sortierte Proben von Neuroblastombiopsien
- Abb. 10:** Aufschlüsselung des Anteils einzelner Immunzellsubtypen an der Gesamt-Leukozyten-RNA mittels einer CIBERSORT-Analyse
- Abb. 11:** Ebenso wie der MYCN-Status bedeutet auch die Expression einer T-Zell- oder zytotoxischen Immunzellsignatur einen signifikanten Unterschied für das Gesamtüberleben von Neuroblastom-Patienten
- Abb. 12:** Nur in High-Risk-Neuroblastomen und vermutlich sekundär abhängig vom MYCN-Status korreliert die Mutationslast mit der Expression einer T-Zell-Signatur
- Abb. 13:** MYCN-amplifizierte Neuroblastome weisen eine reduzierte, mit T-Zell-Infiltration korrelierende Interferon-Signalweg-Signatur auf
- Abb. 14:** Die Expression von Chemokin-Genen ist in MYCN-amplifizierten Neuroblastomen deutlich vermindert

- Abb. 15:** Auch in Sequenzierungsanalysen humaner Neuroblastomzelllinien ergibt sich eine vermindert exprimierte IFN-Signalweg-Signatur bei Vorliegen einer MYCN-Amplifikation
- Abb. 16:** Eine Reduktion von MYCN durch siRNA bewirkt einen Anstieg der Transkription des IFN-abhängigen *OAS1* in den humanen Neuroblastomzelllinien SKNBE und NMB
- Abb. 17:** Ausschluss von off target-Effekten als Ursache der Induktion von IFN-Signalweggenen durch siMYCN
- Abb. 18:** Ein MYCN-Knockdown führt in den humanen Neuroblastomzelllinien SKNBE und NMB zu einer gesteigerten Proteinexpression sowie Aktivierung der IFN-Signalwegproteine STAT1 und STAT3 nach Stimulation mit Zytokinen
- Abb. 19:** Gegen *MYCN* gerichtete siRNAs und eine Stimulation mit den Zytokinen TNF- α , IFN- α oder IFN- γ bewirken in den humanen *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinien SKNBE und NMB eine proinflammatorische Aktivierung auf mRNA-Ebene
- Abb. 20:** Die Behandlung der *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinien SKNBE und NMB mit gegen *MYCN* gerichteter siRNA sowie einer Zytokinstimulation resultiert in einer deutlichen Zunahme der PD-L1-Expression
- Abb. 21:** In der humanen *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinie SKNBE zeigt sich nach *MYCN*-Knockdown und IFN- γ -Gabe eine gesteigerte Transkription von IFN-Signalweg-Genen
- Abb. 22:** Exemplarische Darstellung der gesteigerten Transkription von Chemokin-Genen in der humanen *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinie SKNBE nach Behandlung mit siMYCN und IFN- γ -Gabe
- Abb. 23:** Die murine transgene Neuroblastomzelllinie mNB-A1 spricht auf eine Behandlung mit siRNA gegen *MYCN* an
- Abb. 24:** Eine N-Myc-Reduktion durch RNA-Interferenz in murin-transgenen Neuroblastomzellen hemmt die Transkription proliferativer Signalwege, während sie die Transkription proinflammatorischer Signalwege steigert

- Abb. 25:** Die Behandlung der murinen transgenen Neuroblastomzelllinie mNB-A1 mit siRNA gegen *MYCN* sowie einer Stimulation mit Zytokinen geht mit einer verstärkten Proteinexpression und -phosphorylierung der IFN-Signalweg-Proteine STAT1 und STAT3 einher
- Abb. 26:** Die Behandlung der transgenen Zelllinie mNB-A1 mit si*MYCN* und Zytokinen führt zu einer verstärkten Transkription von Interferon-Signalweggenen
- Abb. 27:** Gegen *MYCN* gerichtete siRNA verstärkt den positiven Effekt einer Zytokinstimulation auf Transkription und Proteinexpression des Oberflächenmarkers PD-L1 auf mNB-A1-Zellen
- Abb. 28:** Gegen *MYCN* gerichtete siRNA verstärkt den positiven Effekt einer Zytokinstimulation auf Transkription und Proteinexpression des Oberflächenmarkers MHC-I auf mNB-A1-Zellen
- Abb. 29:** Die Transkription von Chemokin-Genen lässt sich in der transgenen Mauszelllinie mNB-A1 signifikant durch Behandlung mit einer siRNA gegen *MYCN* sowie einer Zytokinstimulation steigern
- Abb. 30:** Die Behandlung von mNB-A1-Zellen mit siRNA gegen *MYCN* unterstützt signifikant die Zytokin-induzierte Transkription und Sekretion des T-Zell rekrutierenden Chemokins CXCL10
- Abb. 31:** Der STING-Agonist DMXAA verstärkt den Effekt einer Reduktion von *MYCN* in der *MYCN*-transgenen Linie mNB-A1 mittels RNA-Interferenz auf die gesteigerte Proteinexpression und -aktivierung der IFN-Signalwegproteine STAT1 und STAT3
- Abb. 32:** Der Überstand mit si*MYCN* und DMXAA behandelter mNB-A1-Zellen wirkt stimulierend auf Expression und Aktivierung von STAT1 und STAT3 in unbehandelten Zellen
- Abb. 33:** Die Behandlung der transgenen murinen Neuroblastomzelllinie mNB-A1 mit siRNA gegen *MYCN* und dem STING-Agonisten bewirkt synergistisch eine globale Hochregulation IFN-abhängiger Transkription
- Abb. 34:** Bestätigung der in der RNAseq nachgewiesenen globalen Wirkung der Kombinationstherapie aus siRNA und DMXAA mittels qRT-PCR
- Abb. 35:** Die Behandlung von mNB-A1-Zellen mit siRNA gegen *MYCN* resultiert in leicht erhöhter Transkription von *Tmem173* (*STING*)

- Abb. 36:** Mit siMYCN und DMXAA behandelte mNB-A1-Zellen zeigen eine verstärkte Expression der therapeutisch relevanten Oberflächenmarker PD-L1 und MHC-I
- Abb. 37:** Durch die Behandlung von mNB-A1-Zellen mit siMYCN und DMXAA kommt es zu verstärkter Antigenpräsentation und damit einhergehender T-Zellaktivierung
- Abb. 38:** Die in mNB-A1 observierten immunstimulierenden Effekte einer Behandlung mit siMYCN und DMXAA bestätigen sich auch in den weiteren transgen-murinen Zelllinien mNB-A2 und Nho2a
- Abb. 39:** Die Behandlung der transgen-murinen Zelllinie mNB-A1 mit siRNA gegen MYCN sowie DMXAA führt zu einer gesteigerten Transkription sowie auch Sekretion des T-Zell-rekrutierenden CXCL10
- Abb. 40:** Schematische Darstellung der beiden in dieser Arbeit herausgestellten gegensätzlichen tumorinflammatorischen Phänotypen in Abhängigkeit von der MYCN-Expression
- Abb. 41:** Schematische Darstellung der intrazellulären Abläufe in MYCN high/T-Zell-armen Tumoren
- Abb. 42:** Schematische Darstellung der intrazellulären Abläufe in MYCN low/T-Zell-reichen Tumoren
- Abb. 43:** Synergistisches therapeutisches Konzept für das MYCN-amplifizierte Neuroblastom
- Abb. 44:** Mechanismen des intrazellulären RNA/DNA-Sensings als therapeutisches Vehikel inflammatorischer Zellaktivierung
-
- Tab. 1:** Sequenzen der verwendeten siRNAs gegen MYCN
- Tab. 2:** In der Immunoblot-Analyse verwendete Primärantikörper
- Tab. 3:** In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper
- Tab. 4:** Sequenzen der verwendeten qRT-PCR-Primer
- Tab. 5:** Schema der cDNA-Amplifikation in der qRT-PCR
- Tab. 6:** Verteilung der Lokalisationen der für die RNAseq (GSE62564) biopsierten Tumoren, die den bioinformatischen Analysen zugrunde liegen

9. Literaturverzeichnis

Althoff K, Beckers A, Bell E, Nortmeyer M, Thor T, Sprüssel A, Lindner S, De Preter K, Florin A, Heukamp LC, Klein-Hitpass L, Astrahantseff K, Kumps C, Speleman F, Eggert A, Westermann F, Schramm A, Schulte JH. A Cre-conditional MYCN-driven neuroblastoma mouse model as an improved tool for preclinical studies. *Oncogene* 2014; 34: 3357–3368

Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol* 2006; 24: 268–273

Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, Angell H, Fredriksen T, Lafontaine L, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Becker C, Pagè F, Speicher MR, Trajanoski Z, Rô Me Galon J. Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* 2013; 39: 782–795

Blackwell TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H. Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 1990; 250(4984):1149–1151

Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Arén Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 123-135

Brisse HJ, McCarville MB, Granata C, Krug KB, Wootton-Gorges SL, Kanegawa K, Giammarile F, Schmidt M, Shulkin BL, Matthay KK, Lewington VJ, Sarnacki S, Hero B, Kaneko M, London WB, Pearson ADJ, Cohn SL, Monclair T. Guidelines for Imaging and Staging of Neuroblastic Tumors: Consensus Report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Radiology* 2011; 261: 243–257

Brockmann M, Poon E, Berry T, Carstensen A, Deubzer HE, Rycak L, Jasmin Y, Thway K, Robinson SP, Roels F, Witt O, Fischer M, Chesler L, Eilers M. Small Molecule Inhibitors of Aurora-A Induce Proteasomal Degradation of N-Myc in Childhood Neuroblastoma. *Cancer Cell* 2013; 24: 75–89

Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 203–216

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1466–1477

Casey SC, Tong L, Li Y, Do R, Walz S, Fitzgerald KN, Gouw AM, Baylot V, Gütgemann I, Eilers M, Felsher DW. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science* 2016; 352: 227–231

Cavlar T, Deimling T, Ablasser A, Hopfner K-P, Hornung V. Species-specific detection of the antiviral small-molecule compound CMA by STING. *EMBO J* 2013; 32: 1440–1450

Chipumuro E, Marco E, Christensen CL, Kwiatkowski N, Zhang T, Hatheway CM, Abraham BJ, Sharma B, Yeung C, Altabef A, Perez-Atayde A, Wong KK, Yuan GC, Gray NS, Young RA, George RE. CDK7 Inhibition Suppresses Super-Enhancer-Linked Oncogenic Transcription in MYCN-Driven Cancer. *Cell* 2014; 159: 1126–1139

Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Ichara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK, INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009; 27: 289–297

Conlon J, Burdette DL, Sharma S, Bhat N, Thompson M, Jiang Z, Rathinam VAK, Monks B, Jin T, Xiao TS, Vogel SN, Vance RE, Fitzgerald, KA. Mouse, but not Human STING, Binds and Signals in Response to the Vascular Disrupting Agent 5,6-Dimethylxanthenone-4-Acetic Acid. *J Immunol* 2013; 190: 5216–5225

Cooper R, Khakoo Y, Matthay KK, Lukens JN, Seeger RC, Stram DO, Gerbing RB, Nakagawa A, Shimada H. Opsoclonus-myooclonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: Histopathologic features-A report from the children's cancer group. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 623–629

Daßler-Plenker J, Reiners KS, van den Boorn JG, Hansen HP, Putschli B, Barnert S, Schuberth-Wagner C, Schubert R, Tüting T, Hallek M, Schlee M, Hartmann G, Pogge von Strandmann E, Coch C. RIG-I activation induces the release of extracellular vesicles with antitumor activity. *Oncoimmunology* 2016; 5: e1219827

De Bernardi B, Nicolas B, Boni L, Indolfi P, Carli M, Cordero Di Montezemolo L, Donfrancesco A, Pession A, Provenzi M, di Cataldo A, Rizzo A, Tonini GP, Dallorso S, Conte M, Gambini C, Garaventa A, Bonetti F, Zanazzo A, D'Angelo P, Bruzzi P. Disseminated neuroblastoma in children older than one year at diagnosis: comparable results with three consecutive high-dose protocols adopted by the Italian Co-Operative Group for Neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1592–1601

Erttmann R, Tafese T, Berthold F, Kerbl R, Mann J, Parker L, Schilling F, Ambros P, Christiansen H, Fayrot M, Kabisch H, Hero B, Philip T. 10 years' neuroblastoma screening in Europe: preliminary results of a clinical and biological review from the Study Group for Evaluation of Neuroblastoma Screening in Europe (SENSE). *Eur J Cancer* 1998; 34: 1391–1397

Escobar MA, Grosfeld JL, Powell RL, West KW, Scherer LR, Fallon RJ, Rescorla FJ. Long-term outcomes in patients with stage IV neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 377–381

Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan H-M, Livingston DM, Amati B. MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* 2003; 4: 575–580

Fu J, Kanne DB, Leong M, Glickman LH, McWhirter SM, Lemmens E, Mechette K, Leong JJ, Lauer P, Liu W, Sivick KE, Zeng Q, Soares KC, Zheng L, Portnoy DA, Woodward JJ, Pardoll DM, Dubensky TW, Kim Y. STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. *Sci Transl Med* 2015; 7: 283ra52

Gettinger S, Rizvi NA, Chow LQ, Borghaei H, Brahmer J, Ready N, Gerber DE, Shepherd FA, Antonia S, Goldman JW, Juergens RA, Laurie SA, Nathan FE, Shen Y, Harbison CT, Hellmann MD. Nivolumab Monotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2016; 34: 2980–2987

Gherardi S, Valli E, Erriquez D, Perini G. MYCN-mediated transcriptional repression in neuroblastoma: the other side of the coin. *Front Oncol* 2013; 3: 42

Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 714–727

Karttunen J, Sanderson S, Shastri N. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 6020–6024

Kim KH, Roberts CWM. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med* 2016; 22: 128–134

Kim YJ. Subverting the adaptive immune resistance mechanism to improve clinical responses to immune checkpoint blockade therapy. *Oncoimmunology* 2014; 3: e954868

Knutson SK, Warholic NM, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, Porter-Scott M, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Pollock RM, Kuntz KW, Keilhack H. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110: 7922–7927

Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholic NM, Huang K-C, Xiao Y, Kadowaki T, Uesugi M, Kuznetsov G, Kumar N, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, Waters NJ, Smith JJ, Porter-Scott M, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Uenaka T, Pollock RM, Kuntz KW, Yokoi A, Keilhack H. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2014; 13: 842–854

Korshunov A, Remke M, Kool M, Hielscher T, Northcott PA, Williamson D, Pfaff E, Witt H, Jones DTW, Ryzhova M, Cho Y-J, Wittmann A, Benner A, Weiss WA, von Deimling A, Scheurlen W, Kulozik AE, Clifford SC, Peter Collins V, Westermann F, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM. Biological and clinical heterogeneity of MYCN-amplified medulloblastoma. *Acta Neuropathol* 2012; 123: 515–527

Kortlever RM, Sodir NM, Wilson CH, Burkhart DL, Pellegrinet L, Brown Swigart L, Littlewood TD, Evan GI. Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell* 2017; 171: 1301–1315

Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol* 2014; 15: R29

Lenardo M, Rustgi AK, Schievella AR, Bernards R. Suppression of MHC class I gene expression by N-myc through enhancer inactivation. *EMBO J* 1989; 8: 3351–3355

Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: e108

Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011; 34: 680–692

Lüscher B, Vervoorts J. Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC. *Gene* 2012; 494: 145–160

Ma A, Moroy T, Collum R, Weintraub H, Alt FW, Blackwell TK. DNA binding by N- and L-Myc proteins. *Oncogene* 1993; 8: 1093–1098

Majello B, Napolitano G, Giordano A, Lania L. Transcriptional regulation by targeted recruitment of cyclin-dependent CDK9 kinase in vivo. *Oncogene* 1999; 18: 4598-4605

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007; 369: 2106–2120

Marrone K, Ying W, Naidoo J. Immune-Related Adverse Events From Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Pharmacol Ther* 2016; 100: 242–251

Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP. Treatment of High-Risk Neuroblastoma with Intensive Chemotherapy, Radiotherapy, Autologous Bone Marrow Transplantation, and 13- *cis* -Retinoic Acid. *N Engl J Med* 1999; 341: 1165–1173

McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, III ADP, Diaz E, LaFrance LV, Mellinger M, Duquenne C, Tian X, Kruger RG, McHugh CF, Brandt M, Miller WH, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ, Creasy CL. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 2012; 492: 108–112

Metelitsa LS, Wu H-W, Wang H, Yang Y, Warsi Z, Asgharzadeh S, Groshen S, Wilson SB, Seeger RC. Natural Killer T Cells Infiltrate Neuroblastomas Expressing the Chemokine CCL2. *J Exp Med* 2004; 199: 1213–1221

Michot JM, Bigenwald C, Champiat S, Collins M, Carbonnel F, Postel-Vinay S, Berdelou A, Varga A, Bahleda R, Hollebecque A, Massard C, Fuerea A, Ribrag V, Gazzah A, Armand JP, Amellal N, Angevin E, Noel N, Boutros C, Mateus C, Robert C, Soria JC, Marabelle A, Lambotte O. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur J Cancer* 2016; 54: 139–148

Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson ADJ, INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009; 27: 298–303

Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, Hoang CD, Diehn M, Alizadeh AA. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* 2015; 12: 453–457

Oberthuer A, Juraeva D, Hero B, Volland R, Sterz C, Schmidt R, Faldum A, Kahlert Y, Engesser A, Asgharzadeh S, Seeger R, Ohira M, Nakagawara A, Scaruffi P, Tomini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Bénard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Grundy RG, Ortmann M, Shao C, Schwab M, Eils R, Simon T, Theissen J, Berthold F, Westermann F, Brors B, Fischer M. Revised risk estimation and treatment stratification of low- and intermediate-risk neuroblastoma patients by integrating clinical and molecular prognostic markers. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 1904–1915

Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, Zhao L, Wei S, Wang W, Sun Y, Zhao E, Vatan L, Szeliga W, Kotarski J, Tarkowski R, Dou Y, Cho K, Hensley-Alford S, Munkarah A, Liu R, Zou W. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature* 2015; 527: 249–253

Perwein T, Lackner H, Sovinz P, Benesch M, Schmidt S, Schwinger W, Urban C. Survival and late effects in children with stage 4 neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57: 629–635

Pinto NR, Applebaum MA, Volchenboun SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, Nakagawara A, Berthold F, Schleiermacher G, Park JR, Valteau-Couanet D, Pearson ADJ, Cohn SL. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2015; 33: 3008–3017

Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, Carter SL, Cjbulskis K, Hanna M, Kiezun A, Kim J, Lawrence MS, Lichenstein L, McKenna A, Pedamallu CS, Ramos AH, Shefler E, Sivachenko A, Sougnez C, Stewart C, Ally A, Birol I, Chiu R, Corbett RD, Hirst M, Jackman SD, Kamoh B, Khodabakshi AH, Krzywinski M, Lo A, Moore RA, Mungall KL, Qian J, Tam A, Thiessen N, Zhao Y, Cole KA, Diamond M, Diskin SJ, Mosse YP, Wood AC, Ji L, Sposto R, Badgett T, London WB, Moyer Y, Gastier-Foster JM, Smith MA, Guidry Auvil JM, Gerhard DS, Hogarty MD, Jones SJM, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Seeger RC, Khan J, Marra MA, Meyerson M, Maris JM. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* 2013; 45: 279–284

Puissant A, Frumm SM, Alexe G, Bassil CF, Qi J, Chanthery YH, Nekritz EA, Zeid R, Gustafson WC, Greninger P, Garnett MJ, McDermott U, Benes CH, Kung AL, Weiss WA, Bradner JE, Stegmaier K. Targeting MYCN in Neuroblastoma by BET Bromodomain Inhibition. *Cancer Discov* 2013; 3: 308–323

Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell H V, Dotti G, Huls MH, Liu E, Gee AP, Mei Z, Yvon E, Weiss HL, Liu H, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 2008; 14: 1264–1270

Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmis B, Zappasodi R, Maeda Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN, Chan TA. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348: 124–128

Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, Savage KJ, Hernberg MN, Lebbé C, Charles J, Mihalciou C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, Lundgren-Eriksson L, Horak C, Sharkey B, Waxman IM, Atkinson V, Ascierto PA. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. *N Engl J Med* 2015; 372: 320–330

Rudnick E, Khakoo Y, Antunes NL, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Gerbing RB, Stram DO, Matthay KK. Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: Clinical outcome and antineuronal antibodies? A report from the children's cancer group study. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 612–622

Saito T, Gale M, Jr. Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity. *J Exp Med* 2008; 205: 1523–1527

Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, Klein G, Sander J, Schwarz K, Treuner J, Zorn U, Michaelis J. Neuroblastoma Screening at One Year of Age. *N Engl J* 2002; 346: 1047–1053

Schlee M, Hölzel M, Bernard S, Mailhammer R, Schuhmacher M, Reschke J, Eick D, Marinkovic D, Wirth T, Rosenwald A, Staudt LM, Eilers M, Baran-Marszak F, Fagard R, Feuillard J, Laux G, Bornkamm GW. c-MYC activation impairs the NF- κ B and the interferon response: Implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* 2007; 120:1387–1395

Schlee M, Hartmann G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat Rev Immunol* 2016; 16: 566–580

Schulz G, Cheresch DA, Varki NM, Yu A, Staffileno LK, Reisfeld RA. Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer Res* 1984; 44: 5914–5920

Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of Multiple Copies of the *N-myc* Oncogene with Rapid Progression of Neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985; 313: 1111–1116

Seeger RC. Immunology and immunotherapy of neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 2011; 21: 229–237

Song L, Ara T, Wu H-W, Woo C-W, Reynolds CP, Seeger RC, DeClerck YA, Thiele CJ, Sposto R, Metelitsa LS. Oncogene MYCN regulates localization of NKT cells to the site of disease in neuroblastoma. *J Clin Invest* 2007; 117: 2702–2712

Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, Brahmer JR, Lawrence DP, Atkins MB, Powderly JD, Leming PD, Lipson EJ, Puzanov I, Smith DC, Taube JM, Wigginton JM, Kollia GD, Gupta A, Pardoll DM, Sosman JA, Hodi FS. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 2014; 32: 1020–1030

Topper MJ, Vaz M, Chiappinelli KB, DeStefano Shields CE, Niknafs N, Yen R-WC, Wenzel A, Hicks J, Ballew M, Stone M, Tran PT, Zahnow CA, Hellmann MD, Anagnostou V, Strissel PL, Strick R, Velculescu VE, Baylin SB. Epigenetic Therapy Ties MYC Depletion to Reversing Immune Evasion and Treating Lung Cancer. *Cell* 2017; 171: 1284–1300

Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014; 515: 568–571

Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RGAB, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; 419: 624–629

Wee ZN, Li Z, Lee PL, Lee ST, Lim YP, Yu Q. EZH2-mediated inactivation of IFN- γ -JAK-STAT1 signaling is an effective therapeutic target in MYC-driven prostate cancer. *Cell Rep* 2014; 8: 204–216

Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J* 1997; 16: 2985–2995

Woods WG, Tuchman M, Robison LL, Bernstein M, Leclerc J-M, Brisson LC, Brossard J, Hill G, Shuster J, Luepker R, Byrne T, Weitzmann S, Bunin G, Lemieux B. A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. *Lancet* 1996; 348: 1682–1687

Yamamoto K, Ohta S, Ito E, Hayashi Y, Asami T, Mabuchi O, Higashigawa M, Tanimura M. Marginal Decrease in Mortality and Marked Increase in Incidence as a Result of Neuroblastoma Screening at 6 Months of Age: Cohort Study in Seven Prefectures in Japan. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1209–1214

Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology* 2010; 129: 474–481

Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 1324–1334

Zeller KI, Zhao X, Lee CWH, Chiu KP, Yao F, Yustein JT, Ooi HS, Orlov YL, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Kuznetsov VA, Sung WK, Ruan Y, Dang CV, Wei CL. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103: 17834–17839

Zeltzer LK, Recklitis C, Buchbinder D, Zebrack B, Casillas J, Tsao JCI, Lu Q, Krull K. Psychological Status in Childhood Cancer Survivors: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2396–2404

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Hölzel, der mir nicht nur diese Arbeit überlassen hat, sondern mich auch zu jedem Zeitpunkt der vergangenen Jahre, sei es früh morgens oder spät in der Nacht gewesen, engagiert, motiviert und mit Rat und Tat unterstützt hat. Seine Begeisterung und Hingabe für die Forschung werden mir ein vorbildliches Beispiel bleiben. Ohne seine wissenschaftliche Weitsicht und seine freundschaftliche Art wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ebenso großer Dank gebührt meiner Arbeitsgruppe, Frau Maike Effern, Frau Stefanie Riesenberg, Frau Debby van den Boorn-Konijnenberg, Herrn Daniel Hinze, Frau Julia Reinhardt und Herrn Stefan Holtin, die alle bereitwillig, wie auch uneigennützig, Stunde um Stunde in mich investiert und mich angeleitet haben, um dieses Projekt zu einem Erfolg zu führen. Über die Jahre ist mir die ganze AG Hölzel sehr ans Herz gewachsen und ich werde sie vermissen.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Johannes Schulte in der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und SZT der Charité Berlin mit seinen Mitarbeiterinnen Frau Kerstin Schönbeck und Frau Annabell Szymansky und seiner vorherigen Arbeitsgruppe in der Pädiatrischen Onkologie und Hämatologie des Uniklinikums Essen mit den Mitarbeitern Frau Dr. Kristina Althoff, Herrn Dr. Alexander Schramm und Frau Andrea Odersky für die Bereitstellung der GEMM-Zelllinien und den freundlichen Empfang in Berlin sowie die rasche Antwort auf Fragen aller Art. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Fischer und Herrn Dr. Martin Peifer vom Zentrum für Molekulare Medizin des Uniklinikums Köln sowie Herrn Dr. Frank Westermann vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg für ihre Überlassung der Sequenzierungsdatensätze für die bioinformatischen Analysen und Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus mit seinen Mitarbeitern Herrn Dr. Thomas Quast und Frau Marie Kronmüller in der Abteilung für Molekulare Immunologie und Zellbiologie des LIMES-Instituts der Universität Bonn für ihre rasche, unkomplizierte und hervorragende Mitarbeit an unserer Publikation.

Ich danke der Flow Cytometry Core Facility des Uniklinikums Bonn und ihren Mitarbeitern für ihre fachliche Hilfe und die Bereithaltung und Wartung der dortigen

Geräte. Ebenso danke ich der Next Generation Sequencing Core Facility des Uniklinikums Bonn für die technische Durchführung der 3'-RNA-Sequenzierung.

Ein Dank sei darüber hinaus Herrn Dr. Jasper van den Boorn und seiner Mitarbeiterin Frau Silke Lambing, Frau Dr. Eva Bartok, Herrn Dr. Martin Schlee und seiner Mitarbeiterin Anna-Maria Herzner aus dem Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie, der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Tüting aus der Klinik für Dermatologie und den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Kurts aus dem Institut für Experimentelle Immunologie für ihre fachliche Unterstützung und so manche „Gratisprobe“ ausgesprochen. Danken möchte ich auch dem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. Hartmann, der sich damals die Zeit für ein sehr informatives Gespräch mit mir genommen und meinen späteren Doktorvater in seinen Überlegungen bedacht hat, womit der Stein des Anstoßes überhaupt erst ins Rollen kam.

Ein besonderer Dank geht an die Korrekturleser dieser Arbeit – Maïke Effern, Felix Malter sowie meinen Vater und meine Brüder Yannik und Yonah.

Ich danke dem Bonner Promotionskolleg „Neuroimmunology“ (BonnNI) und der Else Kröner-Fresenius-Stiftung für ihre ideelle und materielle Förderung dieser Dissertation. Ebenso gilt der Studienstiftung des deutschen Volkes gleicher Dank, insbesondere auch für die Unterstützung meiner Studienverlängerung für dieses Vorhaben.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden und meiner Familie an dieser Stelle für die Unterstützung und für ihr Verständnis für mich und mein Zeitmanagement in den letzten drei Jahren.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie, der ich diese Dissertation auch widmen möchte. Meinen Eltern, die mich von Kindesbeinen an gefördert und mir all das ermöglicht haben. Meinen Großeltern, die stets an ihre Enkel glauben und wirklich alles für sie tun. Meinen Brüdern, ohne die ich nicht der wäre, der ich bin. Und natürlich meiner Freundin Katharina, die mich ohne zu zögern auf allen meinen Schritten begleitet und mich nicht nur bei dieser Arbeit in jeder erdenklichen Form unterstützt hat.