

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für
Kinderheilkunde III,
Universitätsklinikum Essen

Immunmodulation durch Checkpoint-Inhibitoren in präklinischen
Modellen des Retinoblastoms

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Lena Maria Daumann
aus Dinslaken
2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/76926

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20221121-085735-4

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. A. Schramm
2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. L. F. Zimmer

Tag der mündlichen Prüfung: 1. September 2022

PUBLIKATIONEN

L. M. Daumann, M. Schwermer, E. Biewald, S. Ting, S. Schlüter, M. Reschke, T. Kiefer, B. Timmermann, S. Göricke, D. R. Lohmann, N. E. Bechrakis, P. Ketteler
Interdisziplinäre Behandlung des Retinoblastoms; onkologie heute, 2020, Heft 06,
Mediengruppe Oberfranken - Fachverlage GmbH & Co. KG (ISSN 1612-006X);

INHALTSVERZEICHNIS

| | Seite |
|---|-----------|
| 1 EINLEITUNG | 9 |
| 1.1 Retinoblastom | 9 |
| 1.1.1 Stadieneinteilung | 9 |
| 1.1.2 Genetik | 12 |
| 1.1.3 Therapie-Optionen..... | 13 |
| 1.2 MYCN als Onkogen..... | 16 |
| 1.2.1 Rolle von MYCN beim Retinoblastom | 16 |
| 1.3 PD-1/PD-L1 Blockade | 17 |
| 1.3.1 PD-1/PD-L1 beim Retinoblastom | 18 |
| 1.3.2 Stellenwert in der Medizin..... | 19 |
| | |
| 2 ZIELSETZUNG | 20 |
| | |
| 3 MATERIAL | 21 |
| 3.1 Geräte..... | 21 |
| 3.2 Verbrauchsmaterialien | 22 |
| 3.3 Chemikalien | 23 |
| 3.4 Medien und Puffer | 25 |
| 3.5 Kits..... | 28 |
| 3.6 Enzyme..... | 29 |
| 3.7 Zytokine | 29 |
| 3.8 Antikörper..... | 29 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.9 | Primer | 31 |
| 3.10 | Zelllinien | 32 |
| 3.11 | Verwendete PBMCs | 33 |
| 3.12 | Primäre Retinoblastomtumore | 33 |
| 4 | METHODEN | 34 |
| 4.1 | Zellkultur | 34 |
| 4.1.1 | Einfrieren und Auftauen von Zellen | 34 |
| 4.1.2 | Kultivierung und Passagierung von Zellen | 34 |
| 4.1.3 | Ausplattierung von Zellen | 35 |
| 4.2 | Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. PCR) | 35 |
| 4.2.1 | RNA-Isolation | 35 |
| 4.2.2 | cDNA-Synthese | 35 |
| 4.2.3 | Semiquantitative PCR | 35 |
| 4.2.4 | Gelelektrophorese | 37 |
| 4.2.5 | Quantitative Real-Time-PCR | 37 |
| 4.2.6 | Immun-Profilng | 38 |
| 4.3 | FACS basierte Oberflächenfärbung | 39 |
| 4.4 | Immunfärbung | 40 |
| 4.5 | Färbung von Tumormaterial | 41 |
| 4.6 | Immundetektion von Proteinen | 42 |
| 4.6.1 | Herstellung von Zelllysaten | 42 |
| 4.6.2 | BCA-Proteinassay | 43 |
| 4.6.3 | SDS-PAGE | 43 |
| 4.6.4 | Western Blot | 44 |
| 4.7 | Ko-Kultivierungsexperimente | 45 |
| 4.7.1 | MTT-Assay zur Festlegung der Inhibitor-Konzentration von Pembrolizumab für die Ko-Kultivierungsexperimente | 46 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.7.2 | Retinoblastom-Zell-Stimulation | 47 |
| 4.7.3 | T-Zell-Isolation und -Stimulation | 47 |
| 4.7.4 | FACS-basierter Nachweis von PD-L1 / PD-1 | 47 |
| 4.7.5 | Ko-Kultivierung | 48 |
| 4.7.6 | Proliferations-Assay | 48 |
| 4.7.7 | Apoptose-Assay | 48 |
| 4.7.8 | Zytokin Messung | 49 |
| 5 | ERGEBNISSE | 50 |
| 5.1 | Charakterisierung der MYC Expression im Retinoblastom | 50 |
| 5.1.1 | Nachweis der MYCN Expression in Retinoblastomzellen mit und ohne MYCN-Amplifikation | 50 |
| 5.1.2 | Nachweis der c-MYC Expression in Retinoblastomzellen mit und ohne MYCN-Amplifikation | 51 |
| 5.2 | Nachweis der PD-L1 Expression im Retinoblastom..... | 52 |
| 5.2.1 | Nachweis der PD-L1 Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR | 52 |
| 5.2.2 | Nachweis der PD-L1 Expression auf Proteinebene mittels FACS | 53 |
| 5.2.3 | Nachweis der PD-L1 Expression mittels Immunofluoreszenz | 54 |
| 5.2.4 | PD-L1 Färbung primärer Retinoblastomtumore | 56 |
| 5.3 | Zusammenhang zwischen PD-L1 und MYCN..... | 58 |
| 5.4 | Immun-Profiling von <i>MYCN</i> -amplifizierten und nicht <i>MYCN</i> -amplifizierten Retinoblastomzelllinien | 60 |
| 5.5 | T-Zell-Interaktion mit Retinoblastomzellen unter dem Einfluss des PD-1 Inhibitors Pembrolizumab..... | 62 |
| 5.5.1 | Stimulation der PD-1 und PD-L1 Expression in T- und Retinoblastomzellen..... | 62 |
| 5.5.2 | Festlegung der Konzentration des PD-1 Inhibitors Pembrolizumab | 63 |
| 5.5.3 | Einfluss eines PD-1 Inhibitors auf das Proliferationsverhalten von T-Zellen in Ko-Kultur mit Retinoblastomzellen..... | 64 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.5.4 | Einfluss der PD-1 Inhibition durch Pembrolizumab auf das Apoptoseverhalten von T-Zellen und Retinoblastomzellen..... | 65 |
| 5.5.5 | Bestimmung von Zytokinen im Überstand der Ko-Kultur von RB-Zellen und T-Zellen nach Behandlung mit Pembrolizumab..... | 67 |
| 6 | DISKUSSION | 68 |
| 6.1 | Expression von MYCN im Retinoblastom | 68 |
| 6.2 | Expression von PD-L1 im Retinoblastom | 69 |
| 6.3 | Zusammenhang zwischen MYCN und PD-L1 im Retinoblastom | 70 |
| 6.4 | Interaktion von T-Zellen und RB-Zellen unter dem Einfluss eines PD-1 Antikörpers 71 | |
| 6.5 | Immun-Checkpoint-Blockade beim Retinoblastom | 74 |
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG | 76 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 77 |
| 9 | TABELLENVERZEICHNIS | 85 |
| 10 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | 87 |
| 11 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 88 |
| 12 | DANKSAGUNG | 91 |

13 LEBENSLAUF92

1 EINLEITUNG

1.1 Retinoblastom

Das Retinoblastom ist ein maligner Tumor der Retina und der häufigste intraokuläre Tumor in der Kindheit (Jurklies, 2007). Die Inzidenz ist weltweit sehr ähnlich und liegt durchschnittlich bei 1 zu 17.000 Lebendgeburten (Fabian et al., 2020). Es erkranken hauptsächlich Kinder innerhalb der ersten fünf Lebensjahre. Dabei ist die Überlebensrate in Deutschland mit ungefähr 95 % sehr hoch, da die Erkrankung meist früh diagnostiziert werden kann (Temming et al., 2013).

Etwa 60 % der Retinoblastome sind unilateral und betreffen nur ein Auge, die anderen 40 % betreffen beide Augen und werden daher als bilateral bezeichnet (Temming et al., 2013). Es gibt eine erbliche und eine nicht-erbliche Form des Retinoblastoms. Die erbliche Form tritt dabei früher auf als die nicht-erbliche Form (Dimaras et al., 2012).

Ein klassisches Symptom für das Retinoblastom ist die Leukokorie. Dies beschreibt einen weißen Fleck im Auge, den man meist erst auf einem Foto mit Blitzlicht als helle Reflexion sieht. Weitere Symptome können unter anderem Strabismus, Sehverlust oder ein rotes Auge sein (Abramson et al., 1998). Das Retinoblastom kann endophytisch oder exophytisch wachsen. Das endophytische Wachstum zum Glaskörper kann zu einer Glaskörperaussaat oder zu intraokulären Ablagerungen führen. Exophytisch kann es zu Netzhautablösungen oder einer extraokulären Aussaat kommen (Jurklies, 2007). Prognostisch wichtig ist es hier die Erkrankung bereits früh zu erkennen, um eine kurative Therapie mit Erhalt des Sehvermögens einleiten zu können.

1.1.1 Stadieneinteilung

Das Retinoblastom kann klinisch, histopathologisch und prognostisch eingeteilt werden. Die in den 1960er Jahren etablierte Reese-Ellsworth-Klassifikation (siehe Tabelle 1) berücksichtigte Tumorgöße, Lokalisation und Multifokalität zur Entscheidung, ob das Sehvermögen erhalten werden kann oder das betroffene Auge enukleiert werden muss (Shields et al., 2006). Zu dieser Zeit war die externe Strahlentherapie neben der Enukleation eine der führenden Therapiemaßnahmen (Reese & Ellsworth, 1963).

Tabelle 1 Reese-Ellsworth-Klassifikation (Reese & Ellsworth, 1963), aus dem Englischen übersetzt.

| Gruppe | Definition |
|----------|---|
| 1 | Sehr günstig zur Erhaltung des Sehvermögens A. Einzelner Tumor, kleiner als 4 DD (disc diameter), am oder hinter dem Äquator. B. Mehrere Tumore, keiner größer als 4 DD, alle am oder hinter dem Äquator. |
| 2 | Günstig zur Erhaltung des Sehvermögens A. Einzelner Tumor, 4 bis 10 DD am oder hinter dem Äquator. B. Mehrere Tumore, 4 bis 10 DD hinter dem Äquator. |
| 3 | Erhaltung des Sehvermögens möglich A. Jegliche Läsion anterior zum Äquator. B. Einzelner Tumor, größer als 10 DD hinter dem Äquator. |
| 4 | Ungünstig zur Erhaltung des Sehvermögens A. Mehrere Tumore, einige größer als 10 DD. B. Jegliche Läsion mit einer Ausdehnung anterior der Ora serrata. |
| 5 | Sehr ungünstig zur Erhaltung des Sehvermögens A. Massive Tumore, die mehr als die Hälfte der Retina befallen. B. Vitreale Streuung. |

Die Klassifikation der ICRB (International Classification of Retinoblastoma, siehe Tabelle 2) geht dagegen etwas genauer auf die intraokuläre Tumorausbreitung ein. So werden subretinale, vitreale Streuung und die Sehnerv-Invasion mit einbezogen (Shields et al., 2006).

Tabelle 2: International Classification of Retinoblastoma (ICRB) (Shields et al., 2006), aus dem Englischen übersetzt. „“ Bezieht sich auf 3 mm in der Tumorbasis oder Tumorprominenz.*

| Gruppe | Referenz | Definition |
|----------|---|---|
| A | Kleiner Tumor | Retinoblastom ≤ 3 mm* |
| B | Großer Tumor Makula Juxtapapillär Subretinale Flüssigkeit | Retinoblastom > 3 mm* oder - makuläre Lokalisation des Retinoblastoms (≤ 3 mm zur Fovea) - Juxtapapilläre Lokalisation des Retinoblastoms (≤ 1.5 mm zur Papille) - klare subretinale Flüssigkeit ≤ 3 mm vom Tumorrund |

| | | |
|-----------|---------------------------------|--|
| C | Fokale Aussaat | Retinoblastom mit |
| C1 | | - subretinaler Aussaat ≤ 3 mm vom Retinoblastom entfernt |
| C2 | | - Glaskörperaussaat ≤ 3 mm vom Retinoblastom entfernt |
| C3 | | - beides, subretinaler und Glaskörperaussaat ≤ 3 mm vom Retinoblastom entfernt |
| D | Diffuse Aussaat | Retinoblastom mit |
| D1 | | - subretinaler Aussaat > 3 mm vom Retinoblastom entfernt |
| D2 | | - Glaskörperaussaat > 3 mm vom Retinoblastom entfernt |
| D3 | | - beides, subretinaler und Glaskörperaussaat > 3 mm vom Retinoblastom entfernt |
| E | Fortgeschrittenes Retinoblastom | Fortgeschrittenes Retinoblastom, das > 50 % des Bulbus ausfüllt oder |
| | | - neovaskuläres Glaukom |
| | | - getrübbes Medium im Auge aufgrund von Einblutung in die Vorderkammer, in den Glaskörper |
| | | - Invasion des postlaminären N. opticus, der Chorioidea (>2 mm), der Sklera, der Orbita oder der Vorderkammer |

Des Weiteren gibt es das International Retinoblastoma Staging System (IRSS, siehe Tabelle 3). Hier werden die Patienten hinsichtlich der Enukleation als Therapiemaßnahme und anhand weiterer Risikofaktoren eingeteilt (Chantada et al., 2006).

Tabelle 3: International Retinoblastoma Staging System (IRSS) (Chantada et al., 2006), aus dem Englischen übersetzt.

| Stadium | Definition |
|--------------------|---|
| Stadium 0 | Patienten mit konservativer Behandlung, keine Enukleation |
| Stadium I | Auge enukleiert, histologisch vollständig entfernt |
| Stadium II | Auge enukleiert, mikroskopisch residualer Tumor |
| Stadium III | Regionale Ausbreitung |
| - a | Offensichtliche orbitale Erkrankung |
| - b | Ausbreitung in präaurikuläre oder zervikale Lymphknoten |
| Stadium IV | Metastatische Erkrankung |
| - a | Hämatogene Metastase (ohne ZNS-Beteiligung) |
| - 1 | Einzelne Läsion |

| | |
|-----|--|
| - 2 | Mehrere Läsionen |
| - b | ZNS-Ausbreitung (unabhängig von anderen Eigenschaften) |
| - 1 | Prächiasmatische Läsion |
| - 2 | ZNS |
| - 3 | Leptomeningeal und CFS-Erkrankung |

Klinisch und histopathologisch gibt es die TNM-Klassifikation. Die TNM-Klassifikation ist ein gängiges Einteilungssystem in der Onkologie, um die Tumorausbreitung im Körper aufzuzeigen und um dementsprechend therapeutische Entscheidungen treffen zu können. „T“ steht hierbei für den Primärtumor, dessen Lokalisation, Größe und Symptome. „N“ steht für Nodus, die Anzahl der Lymphknotenmetastasen. Fernmetastasen im Körper werden durch „M“ beschrieben. Anhand der TNM-Klassifikation lässt sich auch die Prognose der Erkrankung einschätzen. In der TNM-Klassifikation des Retinoblastoms wird zusätzlich die erbliche Komponente mit „H“ (engl. „heritable“) erfasst (American Joint Committee on Cancer, 2018).

1.1.2 Genetik

Beim Retinoblastom liegt in nahezu allen Fällen eine Mutation des Retinoblastom-Gens (*RB1*) zugrunde (Dimaras et al., 2015). Dadurch wird das vom *RB1*-Gen codierte pRB Protein inaktiviert und eine unkontrollierte Zellteilung induziert (Soliman et al., 2017). Die „Two Hit Hypothesis“ von Alfred Knudson beschreibt, dass zwei Mutationsereignisse notwendig sind, damit sich ein Tumor entwickeln kann. Das *RB1* Gen ist folglich ein Tumorsuppressorgen (Friend et al., 1986), das durch die Mutation inaktiviert wird. Beide Allele müssen für ein Tumorwachstum betroffen sein (Knudson, 1971). In der Abbildung 1 sind die Mutationszeitpunkte beim erblichen und nicht-erblichen Retinoblastom aufgezeigt. Beim erblichen Retinoblastom liegt eine pathogene Variante im *RB1* Gen in der konstitutionellen DNA vor. Zu einem späteren Zeitpunkt kommt eine somatische Mutation des zweiten Allels des *RB1* Gens hinzu, sodass sich ein Retinoblastom entwickeln kann. Bei der nicht-erblichen Form des Retinoblastoms finden beide Mutationsereignisse somatisch statt. Die erste Mutation der Mosaik-Form des Retinoblastoms findet erst in der Embryonalphase statt, somit sind nicht alle Körperzellen betroffen (Temming et al., 2013).

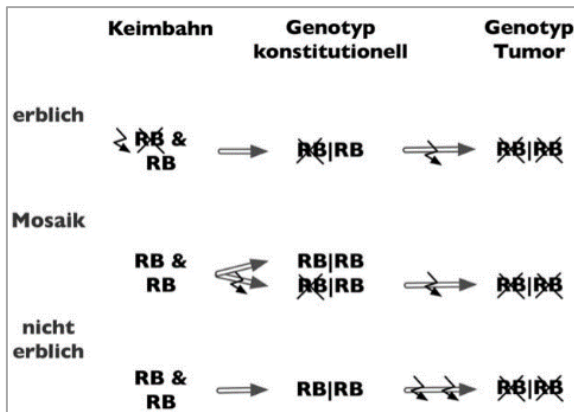


Abbildung 1: Mutationsereignisse beim Retinoblastom (Temming et al., 2013). Beim erblichen Retinoblastom wird die erste Mutation in der Keimbahn durch die Eltern vererbt, die zweite findet erst später statt. So ist der konstitutionelle Genotyp heterozygot. Beim Mosaik findet die Mutation erst in der Embryonalentwicklung statt und ist nicht in allen Körperzellen vertreten. Beim nicht-erblichen Retinoblastom finden beide Mutationen erst später statt und sind nur im Tumor nachzuweisen.

Beim nicht-erblichen Retinoblastom treten folglich die genetischen Veränderungen beider Allele *de novo* auf (sporadisches nicht-erbliches Retinoblastom). Bei den meisten Kindern mit einem erblichen Retinoblastom tritt die pathogene *RB1* Variante in der konstitutionellen DNA *de novo* auf (sporadisches erbliches Retinoblastom), in ungefähr 10 % der Patienten mit einem erblichen Retinoblastom wird die Variante ererbt (familiäres erbliches Retinoblastom) (Soliman et al., 2017). Es gibt verschiedene Mutationstypen, darunter treten Punktmutationen am häufigsten auf. Außerdem sind Promoter-Methylierungen, Deletionen oder Duplikationen des *RB1* Locus beschrieben (Ewens et al., 2017). Unilaterale Tumore treten in der Regel beim nicht-erblichen Retinoblastom auf, bilaterale Tumore sind dagegen immer ein Zeichen einer erblichen Retinoblastom-Erkrankung. Dem erblichen Retinoblastom liegt ein Tumorprädispositionssyndrom zugrunde (Mendoza 2016). Sehr viel seltener treten Retinoblastome ohne *RB1* Mutation auf, bei diesen ist häufig eine Amplifikation des *MYCN*-Onkogens nachzuweisen (Rushlow et al., 2013). Unter 1.2.1 wird dies genauer erläutert.

1.1.3 Therapie-Optionen

Bei der Behandlung des Retinoblastoms ist eines besonders wichtig: Die Lebensrettung steht über der Erhaltung des Augenlichtes (Jurklics, 2007). Dabei gilt es die Behandlung zu wählen, die sowohl eine vollständige Tumorentfernung erzielt, als auch die geringsten Nebenwirkungen und -effekte mit sich bringt (Mendoza & Grossniklaus, 2016). Um die in Deutschland sehr hohen Überlebensraten zu gewährleisten, steht ein multidisziplinäres Team aus Pädiater, Onkologen, Radiologen, Pathologen, Augenärzten, Neurochirurgen und Humangenetikern für eine optimale Versorgung zur Verfügung (Shields & Shields, 2010; Temming et al., 2013).

Grundlegend kann man die Therapie-Optionen in lokale und systemische Behandlungen einteilen, sowie in Behandlungen, die eher das unilaterale oder das bilaterale Retinoblastom betreffen (Jurklies, 2007). Dabei werden im Frühstadium eher Behandlungen wie die Thermo-therapie, Brachytherapie, Laser-Photokoagulation oder Kryotherapie genutzt, für die weiter ausgedehnte Erkrankung die Enukleation, Chemotherapie und Strahlentherapie (Shields & Shields, 2010).

Die sicherste Methode bei dem einseitigen intraokulären Retinoblastom stellt die Enukleation, die operative Entfernung des Auges, dar. Eine vollständige Tumorentfernung gelingt hier nur, wenn sich der Tumor noch nicht auf den Sehnerven ausgebreitet oder extraokulär gestreut hat (AlAli et al., 2018). Der Vorteil der Enukleation ist, dass das Risiko für eine Ausbreitung der Erkrankung mit Metastasierung oder unerwünschten Nebenwirkungen anderer Therapien sehr gering ist (Dimaras et al., 2012). Daneben gibt es Bulbus-erhaltende Therapien. Bei dem unilateralen Retinoblastom können neben der Enukleation lokale Verfahren wie die Chemoreduktion (intravenöse Chemotherapie) oder lokale Strahlentherapie genutzt werden (Mendoza & Grossniklaus, 2016). Bulbus-erhaltende Therapien sind vor allem besonders wichtig für Kinder, die beidseitig erkrankt sind, um somit zumindest eines der Augen für das Sehvermögen erhalten zu können.

Ist die Erkrankung weiter fortgeschritten und eine vollständige Tumorentfernung durch die Enukleation nicht gewährleistet, kommen Therapie-Optionen wie fokale Therapien, Chemotherapie oder Radiotherapie zum Einsatz (Temming et al., 2012). In den 50er Jahren hatte die Strahlentherapie einen großen Stellenwert in der Behandlung des Retinoblastoms (Stallard, 1952), da sie eine komplette Tumorregression mit Erhalt des Sehvermögens erzielen konnte (Jurklies, 2007). Allerdings gingen mit der Strahlentherapie auch häufig Nebenwirkungen wie Netzhautschäden, vermindertes Knochenwachstum, Katarakt, Optikusatrophie (Jurklies, 2007), Endophthalmitis, Glaukom oder hämorrhagische Ereignisse einher (Stallard, 1952). Daneben entwickelten bestrahlte Patienten im Verlauf Zweitumore wie Osteosarkome, Hirntumore oder Tumore im Bestrahlungsbereich der Nebenhöhlen, des Auges und der Orbita (Kleinerman et al., 2005). Daher sollte, wenn möglich, eine Bestrahlung besonders beim hereditären Retinoblastom vermieden werden (Mendoza & Grossniklaus, 2016). Bei peripher gelegenen Retinoblastomen wird oftmals die Kryotherapie genutzt, die eine Vereisung des Tumors zur Abtötung der Tumorzellen bewirkt. Posteriore Retinoblastome sind einer Laser-Photokoagulation zugänglich. Bei Tumoren, die nahe der Fovea oder des Sehnervs gelegen sind, ist eine Thermo-Chemotherapie erfolgsversprechend (Temming et al., 2012). Als Komplikationen der Kryotherapie können eine Retinopathie oder chorioretinale Atrophie auftreten. Komplikationen der transpupillären Thermo-therapie können eine Irisatrophie, Katarakt, Fibrose oder eine Tumorverschleppung in den Glaskörper sein (Mendoza & Grossniklaus,

2016). Bei Nicht-Ansprechen der vorherigen Therapien stellt die Brachytherapie eine Möglichkeit dar, bei der ein mit einem Strahlen-Isotyp beschichteter Applikator im Tumoreal aufgesetzt wird (Jurklics, 2007; Mendoza & Grossniklaus, 2016).

Eine wichtige Überlegung zur Minderung des Risikos für schwere Nebenwirkungen besteht darin, eine gezieltere Behandlung zu entwickeln, die möglichst lokal wirkt und somit wenig unerwünschte systemische Effekte und Langzeitfolgen mit sich bringt (Mendoza & Grossniklaus, 2016). Die systemische Chemotherapie ist eine sehr effektive Behandlung des Retinoblastoms. Nebenwirkungen wie Neurotoxizität, Nephrotoxizität, Ototoxizität und ein leicht erhöhtes Risiko für Auftreten einer sekundären Leukämie sind allerdings belastend und bedrohlich für die Patienten (Mendoza & Grossniklaus, 2016). Das Risiko für Knochentumore, Leukämien und Leiomyosarkome ist vor allem bei Chemotherapien mit Alkylanzien erhöht (Temming et al., 2015; Wong et al., 2014). Dagegen gibt es mittlerweile lokale Methoden eine Chemotherapie anzuwenden. Hier sind als Applikationswege die intraarterielle, intravitreale, periokuläre oder subkonjunktivale Gabe zu nennen.

Eine besondere Herausforderung stellen Kinder dar, die an einem metastasierten Retinoblastom erkrankt sind. Metastasen in der Orbita, in Lymphknoten, im *Nervus opticus*, in Knochen, Knochenmark und dem zentralen Nervensystem oder eine hämatologische Streuung mit Fernmetastasen sind dabei häufig (Temming et al., 2012). Eine systemische Chemotherapie kann nach der Eukleation eines Auges das Risiko für Metastasen reduzieren (Sullivan et al., 2014), andererseits kann sie selbst, wie bereits beschrieben, das Risiko für Zweittumore erhöhen. Die Therapie-Optionen für sich allein bergen bereits Risiken und Nebenwirkungen. Durch kombinierte Behandlungen, wie zum Beispiel die Kombination aus Chemotherapie und Radiotherapie, steigt jedoch das Risiko für Zweittumore, wie das Osteosarkom, stark an (Kleinerman et al., 2005; Temming et al., 2015).

Eine Optimierung der Behandlungsstrategien ist daher bei den aggressiveren und weit fortgeschrittenen Formen des Retinoblastoms erforderlich, was insbesondere für bereits metastasierte Erkrankungen gilt. Die bisherigen Therapien ziehen, wie bereits beschrieben, Komplikationen und Langzeitfolgen mit sich, die es zu reduzieren gilt (Schwermer et al., 2019).

1.2 MYCN als Onkogen

Die Onkogene der MYC-Familie beschreiben Transkriptionsfaktoren, die besonders in der Krebsentwicklung eine Rolle spielen (Hogarty et al., 2008). Unter diesen Onkogenen wurde MYCN (NB-derived myelocytomatosis viral-related oncogene) zunächst im Neuroblastom beschrieben (Schwab et al., 1983). Es beeinflusst bei Überexpression den Zellteilungs- und Proliferationszyklus (Brodeur, 2003). In ungefähr 20 % der Neuroblastome wurde eine *MYCN*-Amplifikation entdeckt (Muth et al., 2010). MYCN stellt hier einen wichtigen prognostischen Faktor dar und ist mit aggressiveren, fortgeschrittenen Tumoren und einer schlechten Prognose assoziiert (Brodeur, 2003). Somit wird es in ungefähr 40 % der Hochrisikopatienten diagnostiziert (Stermann et al., 2015). Tumore mit einer *MYCN*-Amplifikation exprimieren höhere MYCN Level als Tumore ohne *MYCN*-Amplifikation (Nakagawara et al., 1992). Des Weiteren ist eine Suppression des Immunsystems bei *MYCN*-Amplifikation beschrieben, dabei spielt die Hochregulation der T-Zell-Inhibierung mit gleichzeitiger Herunterregulation der T-Zell-Aktivierung eine wichtige Rolle (Stermann et al., 2015). Es gibt außerdem spezifisch gegen MYCN gerichtete zytotoxische T-Zellen, die eine natürliche Immunantwort gegen das Neuroblastom vermuten lässt (Sarkar & Nuchtern, 2000).

1.2.1 Rolle von MYCN beim Retinoblastom

Eine Amplifikation des Onkogens *MYCN* wurde ebenfalls beim Retinoblastom beschrieben (Lee et al., 1984). Lange Zeit galt die *RB1* Mutation beim Retinoblastom als für die Tumorbildung obligatorisch, jedoch spielt die Aktivierung des Onkogens MYCN ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung des Retinoblastoms (Rushlow et al., 2013). Ungefähr 2 % der primären Retinoblastome tragen eine *MYCN*-Amplifikation, davon sind ungefähr 1,4 % *MYCN*-amplifiziert ohne gleichzeitige *RB1* Mutation (Rushlow et al., 2013). Dabei scheint es Tumore zu geben, die sowohl eine *RB1* Mutation und eine *MYCN* Aktivierung besitzen als auch Tumore, die keine *RB1* Mutation, allerdings eine *MYCN*-Amplifikation aufweisen (Ewens et al., 2017). *MYCN*-amplifizierte Retinoblastome treten in einem jüngeren Alter auf (Median ungefähr 4,5 Monate) als Retinoblastome ohne *MYCN*-Amplifikation (Rushlow et al., 2013). Dabei scheint es keinen Unterschied bezüglich der Risikofaktoren zwischen *MYCN*-amplifizierten und nicht *MYCN*-amplifizierten Retinoblastomen zu geben (Ewens et al., 2017). Rushlow et. al. vermuteten, dass eine somatische *MYCN*-Amplifikation in einer retinalen Progenitorzelle hierfür ursächlich sei und diese in der retinalen Entwicklung früh auftritt und somit das frühe Auftreten dieser Tumorentität erklärt. Das Diagnosealter bei *RB1* mutierten und nicht-mutierten Retinoblastomen weist allerdings keinen Unterschied auf (Rushlow et al., 2013). Außerdem wird bei *MYCN*-amplifizierten Tumoren eine nicht-

hereditäre unilaterale Form vermutet (Dimaras et al., 2012), die ein geringes Risiko für Zweitumore und eine weitere Vererbung mit sich bringt (Rushlow et al., 2013).

1.3 PD-1/PD-L1 Blockade

Die Komplexität einer Tumorentstehung wird durch die sogenannten „Hallmarks of Cancer“ beschrieben (Hanahan & Weinberg, 2000). Diese Eigenschaften von Tumorzellen fassen komprimiert das aktuelle Verständnis der Krebsentstehung und -progression zusammen. Ein zusätzliches hinzugefügtes Charakteristikum bezieht die Interaktion von Tumorzellen mit dem Immunsystem ein. Tumorzellen besitzen die Eigenschaft, sich der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen, um ungestört proliferieren zu können und nicht von T-/B-Zellen, Lymphozyten, Makrophagen oder natürlichen Killerzellen angegriffen zu werden (Hanahan & Weinberg, 2011). Das Immunsystem spielt demnach bei der Tumorentstehung und -bekämpfung eine große Rolle.

Ein therapeutischer Ansatzpunkt zur Reaktivierung des Immunsystems ist der Immun-Checkpoint PD-1/PD-L1, der häufig in Tumoren eine T-Zell vermittelte Immunantwort unterdrückt (Dong et al., 2002), die Aktivierung spezifischer T-Zellen inhibiert und somit einen Mechanismus beschreibt, dem Immunsystem zu entfliehen (Iwai et al., 2002). PD-1 (programmed death receptor 1 oder B7-H1; CD274) ist ein von Immunzellen produziertes Oberflächenprotein. Zu diesen Immunzellen gehören T-Zellen, regulatorische T-Zellen (Treg), natürliche Killerzellen, B-Zellen, aktivierte Monozyten und dendritische Zellen (Alsaab et al., 2017; Ceeraz et al., 2013). PD-1 und seine Liganden PD-L1 und PD-L2 (He et al., 2004) gehören zu der B7 Familie von ko-stimulierenden und -inhibierenden Molekülen (Dong et al., 2002). Physiologisch hat PD-1 die Aufgabe, das Immunsystem zu regulieren und Autoimmunreaktionen zu reduzieren, in dem es die T-Zell-Aktivität hemmt und somit die immunologische Eigentoleranz fördert (Sharpe et al., 2007). Außerdem beeinflusst PD-1 die Immunantwort bei Infektionen (Okazaki et al., 2013). In Abbildung 2 ist der Mechanismus der PD-1/PD-L1 Blockade als Übersicht zusammengefasst. PD-1 ist hier von T-Zellen exprimiert, PD-L1 von Makrophagen und Tumorzellen. Trifft nun eine PD-1 positive T-Zelle auf einen immunsuppressiven Liganden, wird die T-Zelle beispielsweise durch Makrophagen inaktiviert, um die Immunantwort zu unterdrücken. Dieser Mechanismus kann auch durch eine PD-L1 positive Tumorzelle initiiert werden. Blockiert man jedoch durch einen Antikörper die Interaktion zwischen PD-L1 und PD-1, kann die T-Zelle die Tumorzelle über den T-Zell-Rezeptor erkennen und eine gegen die Tumorzelle gerichtete Immunreaktion einleiten (Wolchok & Chan, 2014). Die Interaktion von PD-1 Rezeptor und Ligand führt zu einer Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung und induziert die Apoptose der

T-Zellen, sowie die Sekretion von Zytokinen (Dong et al., 2002; Okazaki et al., 2013). Dabei ist die Affinität von PD-1 zu PD-L1 höher als zu PD-L2 (Alsaab et al., 2017).

Die genaue Regulation des PD-1/PD-L1 Immun-Checkpoints ist noch nicht komplett aufgeklärt (Chen et al., 2012; Usui et al., 2006). Das Tumormikromilieu könnte hierbei entscheidend sein (Joyce & Pollard, 2009), um Feedback-Mechanismen zu regulieren, zum Beispiel wenn Lymphozyten Interferon- γ sezernieren, das wiederum die Expression von PD-1 auf der Tumorzelle stimuliert (Usui et al., 2006).

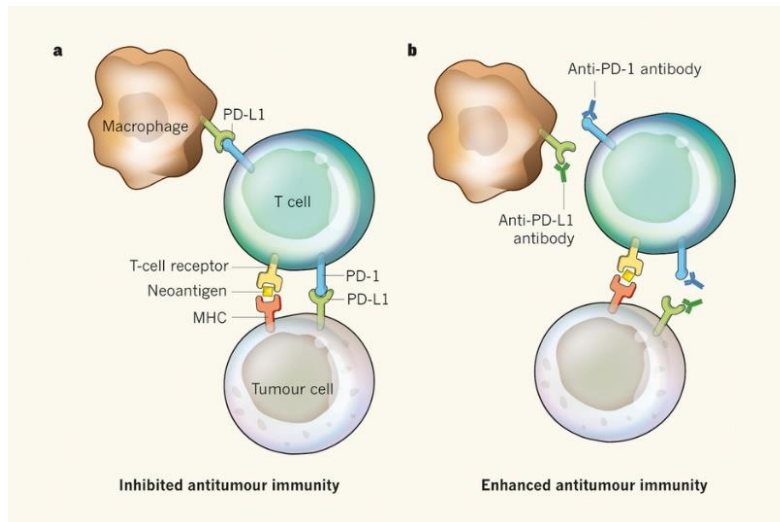


Abbildung 2: Immun-Checkpoint PD-1/PD-L1 Blockade (Wolchok et al., 2014). a: Die Tumorzelle präsentiert über Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) spezifische Neoantigene, die durch den T-Zell-Rezeptor der T-Zelle erkannt werden. So kann eine Immunantwort gegen den Tumor gebildet werden. PD-L1 ist auf verschiedenen Immunzellen exprimiert, wie beispielsweise auf Makrophagen. Die ebenfalls PD-L1 positive Tumorzelle kann so die PD-1 Interaktion nutzen, um die T-Zelle zu inaktivieren. Die Antitumor-Immunantwort wird unterdrückt. b: Anti-PD-1- oder -PD-L1-Antikörper unterbrechen die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1. Die Antitumor-Immunantwort wird nicht mehr unterdrückt, die T-Zelle kann nun die Tumorzelle anhand des T-Zell-Rezeptors erkennen und eine Immunantwort vermitteln.

Blockiert man nun die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1, kann eine auf den Tumor gerichtete Immunreaktion aktiviert werden und somit das Tumorstadium unterdrückt werden (Dong et al., 2002; Iwai et al., 2002). Des Weiteren kann eine verminderte Expression des Liganden PD-L1 ebenfalls die Immunantwort verstärken und somit einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen (Chen et al., 2012).

1.3.1 PD-1/PD-L1 beim Retinoblastom

Das Oberflächenprotein PD-1 kann man auf Retinoblastomzelllinien nachweisen (Usui et al., 2006). Dabei kann die PD-1 Expression durch das Zytokin Interferon- γ stimuliert werden. Auch hier konnte herausgefunden werden, dass die Aktivierung von T-Zellen durch den Immun-Checkpoint PD-1/PD-L1 unterdrückt werden und durch Hinzufügen eines gegen PD-1 gerichteten Antikörper die T-Zell-Proliferation induziert werden kann (Usui et al.,

2006). Dementsprechend scheint die PD-1/PD-L1 Interaktion beim Retinoblastom ebenfalls eine Rolle zu spielen und so könnte die Immuntherapie auch hier eine mögliche Behandlungsalternative darstellen (Usui et al., 2006). PD-L1 ist nicht nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert, sondern unter anderem auch auf immun-privilegierten Organen wie dem Auge, um diese vor Immunreaktionen zu schützen (Sharpe et al., 2007). PD-L1 ist dabei auf der Kornea, Iris, dem Ziliarkörper und der Retina exprimiert (Sharpe et al., 2007; Yang et al., 2009).

1.3.2 Stellenwert in der Medizin

Die Immuntherapie ist ein wichtiger Bestandteil in der Behandlung von Krebserkrankungen geworden (Alsaab et al., 2017; Chen et al., 2012). Immun-Checkpoint-Blockaden durch gezielte Antikörper können dafür genutzt werden, das körpereigene Immunsystem gegen den Tumor zu richten (Wolchok & Chan, 2014).

PD-1 und PD-L1 Antikörper sind von der FDA (United States Food and Drug Administration) bereits für über 17 verschiedene Krebsarten als Erstlinien- oder Anschlusstherapie zugelassen (Topalian et al., 2020). PD-1 Antikörper wie Pembrolizumab und Nivolumab sind unter anderem bei dem malignen Melanom ein vielversprechender therapeutischer Ansatz (Luke et al., 2020; Robert et al., 2014) mit der Aussicht auf Heilung sogar in der metastatischen Situation. Anti-PD-L1 Antikörper werden ebenfalls beim Melanom, NSCLC, Nierenzellkarzinom, Urothelkarzinom und Ovarialkarzinom eingesetzt (Brahmer et al., 2012; Santarpia et al., 2020).

Für eine Aussage über das Ansprechen auf eine PD-1/PD-L1 Therapieblockade wären Biomarker von entscheidender Bedeutung für die Selektion des Patientenkollektivs (Arasanz et al., 2017). Ein möglicher Biomarker, der beim malignen Melanom beschrieben wurde, könnte das Ausmaß der Tumordinfiltration von PD-1 und CTLA4 hoch exprimierenden CD8 positiven T-Zellen sein (Daud et al., 2016). Häufig wird auch der Anteil an PD-L1 exprimierenden Tumorzellen und die Mutationslast (tumour mutational burden) diskutiert, wenn es um die Definition von Patienten geht, die besonders stark von dieser Immuntherapie profitieren (Van Allen et al., 2015).

Es ist beschrieben, dass die PD-1/PD-L1 Interaktion ein möglicher Grund für die Resistenzbildung bei Chemotherapien darstellen kann. So ist beschrieben, dass das Chemotherapeutikum Etoposid mit einer Stimulierung der PD-L1-Expression in Retinoblastomzellen assoziiert ist (L. Wu et al., 2012).

Die Immuntherapie stellt bereits bei einigen Krebserkrankungen nicht nur eine Alternative zu bisherigen nebenwirkungsreichen Behandlungen dar, sondern hat diese häufig sogar abgelöst. Ob die Immuntherapie auch beim Retinoblastom eine neue Therapie-Möglichkeit eröffnen könnte, ist noch nicht beschrieben.

2 ZIELSETZUNG

Grundsätzlich sollte durch diese Arbeit ein verbessertes Verständnis der PD-1/PD-L1 Blockade beim Retinoblastom erreicht werden. Die Therapiemöglichkeiten bei weit fortgeschrittenen oder sehr aggressiven Retinoblastom-Erkrankungen sind begrenzt. Die Immuntherapie könnte eine nebenwirkungsärmere Alternative zu bisherigen Behandlungsmethoden darstellen. Um eine mögliche Immuntherapieform zu untersuchen, befasste sich diese Arbeit mit dem oben genannten Immun-Checkpoint PD-1/PD-L1. Dieser stellt ein Target der Immunmodulation dar. Durch die Anwendung einer Immuntherapie beim Retinoblastom könnten verbesserte Heilungschancen geschaffen werden.

In dieser Arbeit sollten folgende Ziele erarbeitet werden:

1) Nachweis der Expression von PD-1/PD-L1 in Retinoblastomzelllinien

Es sollte ein Profil für die PD-L1 Expression in verschiedenen Retinoblastomzelllinien erstellt werden. Dazu wurde die PD-1/PD-L1 Expression auf RNA-Ebene via Real-Time-PCR, auf Protein-Ebene via Western Blot und Durchflusszytometrie untersucht.

2) Modulation der PD-1-/PD-L1 Expression in Retinoblastomzellen in Abhängigkeit von MYCN

Ein möglicher Einfluss von MYCN auf den Immun-Checkpoint PD-1/PD-L1 sollte untersucht werden. Hierfür wurde die PD-1/PD-L1 Expression in Retinoblastomzellen mit unterschiedlichem *RB1*-Mutations- und *MYCN*-Amplifikationsstatus betrachtet. Via Western Blot wurde der MYCN-Status der verschiedenen Retinoblastomzelllinien untersucht. Zusätzlich wurde in einem MYCN-induzierbarem Neuroblastom Zelllinienpanel der PD-L1 Status der Zelllinien untersucht.

3) Interaktion von Retinoblastomzellen mit T-Zellen unter dem Einfluss eines PD-1-Inhibitors

Die Interaktion von PD-1/PD-L1 auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten der T-Zellen wurde beobachtet. Dazu sollten Proliferations- und Apoptoseassays verwendet werden. Des Weiteren wurde die Wirksamkeit eines PD-1-Inhibitors untersucht.

3 MATERIAL

3.1 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte.

| Geräte | Bezugsquelle |
|-----------------------------------|---|
| Absaugpumpe | Peter Oehmen GmbH, Essen |
| Agarose-Gelelektrophoresekammer | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Applied Biosystem STEP ONE PLUS | Thermo Fisher Scientific, Rockford |
| Athena Multi-Lyte | Luminex Corporation, Austin |
| Autoklave Systec DE-23 | Systec GmbH, Linden |
| autoMACS® Pro Separator | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| Axioscope 2 | Zeiss, Oberkochen |
| Biodoc Analyzer Geldokumentation | Biometra, Göttingen |
| Brutschrank C150 | Binder GmbH, Tuttlingen |
| Cytoseal™ XYL | Thermo Fisher Scientific, Rockford |
| Duomax 1030 | Heidolph Instruments, Schwabach |
| Durchflusszytometer BD LSR II | BD Biosciences, Franklin Lakes |
| Durchflusszytometer FC500 | Beckman Coulter, Krefeld |
| Eismaschine | Scotsman, Mailand |
| EL800 Universal Microplate Reader | Bio-TEK Instruments, Bad Friedrichshall |
| Elektrophoresekammer | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Elektrophorese Power Supply E831 | Consort bvba, Turnhout |
| Heizblock Thermostat TCR 100 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Horizontal-Schüttler 3005 | GFL-Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel |
| LightCycler® 480 | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Mikroskop Axiovert 25 | Zeiss, Oberkochen |
| Mikrowelle | SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Brühl |
| Modulus Microplate Reader | Turner Biosystems/Promega, Mannheim |
| NanoDrop1000 Spektrophotometer | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Neubauer-Zählkammer | Brand, Wertheim |
| PCR-Cycler (C1000 Thermal cycler) | BioRad, München |
| pH-Meter inoLab® pH 7310 | WTW GmbH, Dinslaken |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg |

| | |
|---|--|
| Pipetus | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| Spannungsgerät Major Science MP 3AP | Biometra, Göttingen |
| SterilGARD® Class II Type A/B3 | The Baker Company, Sanford |
| TOMO IHC adhesive glass slide | Matsunami, Bellingham |
| Tube Roller | Starlab, Hamburg |
| VENTANA BenchMark ULTRA | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Vortexer Minishaker MS2 | IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Waage | KERN & SOHN GmbH, Balingen |
| Wasserbad | GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel |
| Western Blot Abbildungssystem Fusion FX | Vilber Lourmat, France |
| Z1 Coulter Partikel Counter | Beckman Coulter, Krefeld |
| Zentrifuge 5424 R | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge Allegra X-22R | Beckman Coulter, Krefeld |
| Zentrifuge Rotixa 50 RS | Hettich GmbH, Tuttlingen |

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verwendetes Verbrauchsmaterial.

| Materialien | Bezugsquelle |
|--|--------------------------------------|
| Accuvetten | Beckmann Coulter, Krefeld |
| CytoOne® Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96) | Starlab, Hamburg |
| Deckgläschen | VWR, Darmstadt |
| Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Eppendorf Tubes® (1,5 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| Kryoröhrchen | A.Hartenstein, Würzburg |
| Nitrozellulose Blotting Membran | GE Healthcare, Freiburg |
| Mikroplatten (96-Well U-Bottom) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Mikroskop-Objekträger | VWR, Darmstadt |
| Parafilm M PM-996 | Bemis Corporate, Neenah |
| Pasteurpipetten | BRAND GMBH + CO KG, Wertheim |
| PCR-Reaktionsgefäße | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| PCR-Stripes | Axygen, USA |
| Pipettenspitzen | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Polypropylen-Röhrchen (1,3ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| PS-Röhrchen (5ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |

| | |
|--|---|
| Suspensionskultur Flaschen (50 ml, 250 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Whatman™ Papier (3mm) | GE Healthcare, Freiburg |
| Zellkultur Flaschen (25cm ²) | Corning, Kaiserslautern |
| Zellkultur Flaschen (75cm ²) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellschaber (13mm) | TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen |
| Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |

3.3 Chemikalien

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien.

| Chemikalien | Bezugsquelle |
|-----------------------------------|---|
| 100 bp Marker | Invitrogen GmbH, Darmstadt |
| 5-Sulfosalicylsäure | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| 7-AAD Viability Staining Solution | eBioscience™, San Diego |
| Agarose | Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld |
| Albumin Fraktion V (BSA) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma, Steinheim |
| Amphotericin B | c-c-pro GmbH, Oberdorla |
| autoMACS® Running Buffer | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| autoMACS™ Pro Washing Solution | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| BD Cytotfix/Cytoperm™ | BD Biosciences, Franklin Lakes |
| BD Perm/Wash™ | BD Biosciences, Franklin Lakes |
| Blasticidin | Invitrogen, Darmstadt |
| Bluing Reagent | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Coomassie® Brilliant Blue R 250 | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| DAPI | Biologend, San Diego |
| Destilliertes Wasser | B.Braun, Melsungen |
| Desoxycholsäure | Sigma, Steinheim |
| DMEM/F12 (1:1) | Life Technologies GmbH (Gibco), Darmstadt |
| DMEM+GlutaMAX™-I | Life Technologies GmbH (Gibco), Darmstadt |
| DMSO | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

| | |
|--|--|
| DTT | Sigma, Steinheim |
| Dye eFluor™ 670 | Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad |
| ECL™ Prime Western Blotting System | GE Healthcare, Freiburg |
| EDTA | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Essigsäure | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Fast Start Universal Sybr Green Master (ROX) | Sigma-Aldrich, Darmstadt |
| Fetal Bovine Serum (FCS) | Biowest, Nuaille |
| Fluoromount-G® | Southern Biotech, Birmingham |
| Geneticin G418 | Cellgro (Corning), USA |
| Glycerin | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt |
| Glycin | Sigma, Steinheim |
| Hämatoxylin II | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| HCL | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Immersol 518 F, Öler 20 ml | Zeiss, Oberkochen |
| Isopropanol | Sigma, Steinheim |
| Isoton-Lösung | Beckman Coulter, Krefeld |
| LightCycler® 480 SYBR Green I Master | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Lithium Dodecylsulfat | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Methanol | VWR International, Darmstadt |
| Milchpulver | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Natriumacetat | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| NP-40 | Sigma, Steinheim |
| PBS pH 7.4 (1x) | Life Technologies GmbH (Gibco), Darmstadt |
| Phenolrot | Sigma, Steinheim |
| Pen Strep | Life Technologies GmbH (Gibco), Darmstadt |
| Ponceau S | AppliChem, Darmstadt |
| Poly-L-Lysin | Biochrom GmbH, Berlin |
| Precision Plus Protein™ Dual Color Standards | Bio-Rad, München |
| Rotiphorese® Gel 30 (37, 5:1) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

| | |
|----------------------------------|--|
| RPMI Medium 1640 | Life Technologies GmbH (Gibco), Darmstadt |
| SDS Pellets | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Terralin® | Schülke, Norderstedt |
| Tetrazyklin | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Thiazolylblau | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Treg Suppression Inspector human | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| Trichloroacetatsäure | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| TRIS | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| TRIS-Base | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| TRIS-hydrochlorid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Trypan Blue solution | Fluka Analytical, Seelze |
| Trypsin-EDTA Solution | Sigma-Aldrich, Darmstadt |
| Tween-20 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

3.4 Medien und Puffer

Tabelle 7: Verwendete Medien und Puffer für die Zellkultur.

| Puffer / Medium | Inhaltsstoffe |
|----------------------------|--|
| Medium A: DMEMcomplete | 500 ml DMEM+GlutaMAX™-I FCS 15 % (v/v) Pen/Strep 1 % (v/v) Amphotericin B 1 % (v/v) |
| Medium B: DMEM/F12complete | 500 ml DMEM/F12 (1:1) FCS 10 % (v/v) Pen/Strep 1 % (v/v) |
| Medium C: RPMIcomplete | 500 ml RPMI Medium 1640 FCS 10 % (v/v) Pen/Strep 1 % (v/v) |
| Medium D: RPMIcomplete | 500 ml RPMI Medium 1640 FCS 10 % (v/v) Pen/Strep 1 % (v/v) G418 1 % (v/v) Blasticidin 75,2 % |

| | |
|----------------|---------------------------------|
| Einfriermedium | DMSO 10 % (v/v) Ad 50 ml FCS |
|----------------|---------------------------------|

Tabelle 8: Verwendete Puffer für die PCR.

| Puffer | Inhaltsstoffe |
|----------------|--|
| 50x TAE-Puffer | Tris-Base 2 M Eisessig 5,71 % (v/v) EDTA 0,5 M pH 8,0 10 % (v/v) Ad 1.000 ml dest. Wasser |

Tabelle 9: Verwendete Puffer für die Durchflusszytometrie.

| Puffer | Inhaltsstoffe |
|-------------|------------------------------|
| FACS-Puffer | BSA 5 % Ad 50 ml PBS (1x) |

Tabelle 10: Verwendete Puffer für die Färbung von Tumorschnitten.

| Puffer | Bezugsquelle |
|--|----------------------------------|
| EZ Prep (10x) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Reaction Buffer (10x) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| SSC (10x) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| ULTRA LCS (Predilute) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |

Tabelle 11: Verwendete Puffer für die Zellyse.

| Puffer | Inhaltsstoffe |
|-------------|---|
| RIPA-Puffer | Tris-Base 50 mM pH 7,4 NaCl 150 mM Desoxycholsäure 0,5 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) NP-40 1 % (v/v) Ad 100 ml dest. Wasser Proteinase Inhibitoren (25x) 40 µl/ml RIPA hinzufügen |

| | |
|---|--|
| | PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitoren (10x) 100µl/ml RIPA hinzufügen |
| PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitoren (10x) | 1 Tablette in 1 ml dest. Wasser |
| Proteinase Inhibitoren (25x) | 1 Tablette in 2 ml dest. Wasser |

Tabelle 12: Verwendete Puffer für den Western Blot.

| Puffer | Inhaltsstoffe |
|---------------------------------|---|
| 0,5 M DTT Lösung | DTT 0,5 M Natriumacetat pH 5,2 10 mM Ad 10 ml dest. Wasser |
| APS 10 % (w/v) | Ammoniumpersulfat 0,44 M Ad 10 ml dest. Wasser |
| Blockierlösung | Milchpulver 5 % (w/v) Ad 100 ml PBS/Tween |
| Elektrophorese Laufpuffer (10x) | Tris-Base 250 mM Glycin 1,92 M SDS 1 % (w/v) Ad 1.000 ml dest. Wasser |
| Ladepuffer (4x) | Tris-HCL 424 mM Tris-Base 564 mM Lithium Dodecylsulfat 8 % (w/v) EDTA 2,04 mM Glycerin 40 % (v/v) 1 % Coomassie Blau 7,5 % (v/v) 1 % Phenolrot 2,5 % (v/v) Ad 10 ml dest. Wasser |
| PBS/Tween (PBST) | PBS (1x) Tween-20 0,05 % (v/v) |
| Ponceau S-Lösung (10x) | Ponceau S 2 % (w/v) Trichloroacetatsäure 30 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure 30 % (w/v) Ad 100 ml dest. Wasser |
| Sammelgel-Puffer (pH 6,8) | Tris-Base 1 M Ad 500 ml dest. Wasser pH mit HCl einstellen |

| | |
|--------------------------|---|
| SDS-Lösung 10 % | SDS 10 % (w/v) Ad 100 ml dest. Wasser |
| Transferpuffer | Elektrophorese Laufpuffer 10 % (10x) (v/v) Methanol 20 % (v/v) Ad 1.000 ml dest. Wasser |
| Trenngel-Puffer (pH 8,8) | Tris-Base 1 M Ad 500 ml dest. Wasser pH mit HCl einstellen |

Tabelle 13: Verwendete Lösungen für den MTT-Assay.

| Lösung | Inhaltsstoffe |
|--|--|
| MTT-Lösung | Thiazolylblau 0,5 % (w/v) Ad 20 ml dest. Wasser Lösung steril filtrieren |
| Solubilisierungslösung für nicht adhären- te Zellen | SDS 10 % (w/v) Essigsäure 5 % (v/v) Ad 20 ml DMSO |

Tabelle 14: Verwendete Färbelösung für das Proliferations-Assay.

| Lösung | Inhaltsstoffe |
|----------------------------------|--|
| Proliferations-Färbelösung 10 µM | Dye eFluor 670 0,2 % Ad 2 ml PBS (1x) |

3.5 Kits

Tabelle 15: Verwendete Kits.

| Name | Bezugsquelle |
|--|---|
| Annexin V Apoptosis Detection Kit – APC | eBioscience™, San Diego |
| CD4+ T Cell Isolation Kit human | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| High Pure RNA Isolation Kit | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Luminex® Assay, Human Premixed Multi- Analyte Kit | Luminex Corporation, Austin |
| OptiView DAB IHC Detection Kit | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| PCR Array Kit PAHS-181Z | Qiagen GmbH, Hilden |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit | Thermo Fisher Scientific, Rockford |

| | |
|--|----------------------------------|
| Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
|--|----------------------------------|

3.6 Enzyme

Tabelle 16: Verwendete Enzyme.

| Name | Bezugsquelle |
|--|----------------------|
| cOmplete™, mini; Protease Inhibitor Cocktail | Roche, Mannheim |
| MyTaq™ HS Red Mix | Bioline, Luckenwalde |
| PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitoren | Roche, Mannheim |

3.7 Zytokine

Tabelle 17: Verwendete Zytokine.

| Name | Bezugsquelle |
|--|----------------------|
| Recombinant Human IFN- γ (carrier free) | Biologend, San Diego |

3.8 Antikörper

Tabelle 18: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.

| Name | Spezies | Verdünnung | Bestellnummer | Bezugsquelle |
|---|---------|---------------------------------|---------------|--------------------------------|
| APC anti-human CD279 (PD-1) Antibody | Maus | 5 μ l/100 μ l (1:20) | 329908 | Biologend, San Diego |
| APC Mouse IgG1, k Isotype Ctrl Antibody | Maus | 2,5 μ l/100 μ l (1:40) | 400120 | Biologend, San Diego |
| CD171 Monoclonal Antibody, PE | Maus | 5 μ l/100 μ l (1:20) | 12-1719-42 | eBioscience™, San Diego |
| IgG2a k Isotype Control PE | Maus | 1,25 μ l/100 μ l (1:80) | 12-4724-82 | eBioscience™, San Diego |
| Pacific Blue™ anti-human CD4 | Maus | 1,25 μ l/100 μ l (1:80) | 558116 | BD Pharmingen™, Franklin Lakes |
| Pacific Blue™ IgG1 k Isotype Control | Maus | 1,25 μ l/100 μ l (1:80) | 558120 | BD Pharmingen™, Franklin Lakes |

| | | | | |
|------------------------------------|------|--------------------|--------|----------------------|
| PE anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) | Maus | 5 µl/100 µl (1:20) | 329706 | Biologend, San Diego |
| PE Mouse IgG2b, κ Isotype Control | Maus | 20 µl/100 µl (1:5) | 556656 | BD Pharmingen™ |

Tabelle 19: Verwendete Antikörper für die Ko-Kultivierungsexperimente.

| Name | Bezugsquelle |
|-------------------------|--|
| Pembrolizumab | Universitätsklinikum Essen Apotheke, Essen |
| Purified anti-human CD3 | Biologend, San Diego |

Tabelle 20: Verwendete Antikörper für die Immunfärbung.

| Name | Spezies | Verdünnung | Bestellnummer | Bezugsquelle |
|----------------------------|-----------|------------|---------------|----------------------------|
| Alexa Fluor® 488 IgG (H+L) | Esel | 1:200 | 711-545-152 | Dianova, Hamburg |
| PD-L1 Antibody | Kaninchen | 1:500 | 4059 | ProSci Incorporated, Poway |

Tabelle 21: Verwendete Antikörper für die Färbung in der Pathologie.

| Name | Spezies | Verdünnung | Bestellnummer | Bezugsquelle |
|-------|---------|------------|---------------|-------------------|
| PD-L1 | Maus | 1:100 | M3653 | Dako, Carpinteria |

Tabelle 22: Verwendete Erst-Antikörper für den Western Blot.

| Name | Spezies | Verdünnung | Bestellnummer | Bezugsquelle |
|--------------------|-----------|--------------|---------------|-----------------------------------|
| N-Myc | Kaninchen | 1:1000 | 9405 | Cell Signaling, Frankfurt am Main |
| PD-L1 (E1L3N®) XP® | Kaninchen | 1:500 | 13684 | Cell Signaling, Frankfurt am Main |
| Vinculin | Maus | 1:500, 1:250 | ab11194 | abcam, Cambridge |

Tabelle 23: Verwendete Zweit-Antikörper für den Western Blot.

| Name | Spezies | Verdünnung | Bestellnummer | Bezugsquelle |
|-----------------------|---------|------------|---------------|----------------------------|
| Anti-Maus IgG-HRP | Schaf | 1:2.000 | NA931V | GE Healthcare, Freiburg |
| Anti-Kaninchen HRP | Esel | 1:2.000 | NA9340V | GE Healthcare, Freiburg |

3.9 Primer

Tabelle 24: Verwendete Primer für die semiquantitative PCR.

| Primer | Sequenz | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|
| | Forward | Reverse |
| Aktin | cctcgctttgccgatcc | ctcttgctcgaagtccaggg |
| CD274 (PD-L1) | ctgtcacgggtccaaggac | ggcttctctccatgcacaa |
| c-MYC | gatatctggaagaaattcgagctg | atgatgatgttttgatgaaggtct |
| NMYC | ctgtccacgtccacat | ctcgttctcaagcagcatctc |
| PDCD1 (PD-1) | aaaccctgggtggtggtgc | atccagctccccatagtcca |

Tabelle 25: Verwendete Primer für die Real Time PCR.

| Genname | Bestellnummer | Bezugsquelle |
|---------------|---------------------|-----------------------|
| β-Aktin | QT00095431 | Qiagen, Hilden |
| c-Myc | QT00035406 | Qiagen, Hilden |
| | Sequenz | |
| | Forward | Reverse |
| CD274 (PD-L1) | ctgtcacgggtccaaggac | ggcttctctccatgcacaa |
| NMYC | ctgtccacgtccacat | ctcgttctcaagcagcatctc |
| PDCD1 (PD-1) | aaaccctgggtggtggtgc | atccagctccccatagtcca |

3.10 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die Retinoblastomzelllinien RBL15, RBL30, RB355, RB522, WERI-Rb1 und Y79 verwendet (siehe Tabelle 26). Die Auswahl der Zelllinien beruhte auf ihrem *MYCN*-Status: Es wurden drei Zelllinien mit *MYCN*-Amplifikation (RB355, RB522 und Y79) und drei ohne *MYCN*-Amplifikation (RBL15, RBL30, WERI-Rb1) eingesetzt. Alle Zelllinien bis auf RB522 wiesen den für das Retinoblastom charakteristischen Verlust von pRB auf. Um die Rolle von *MYCN* weiter zu untersuchen, wurden *MYCN*-induzierbare Neuroblastomzelllinien verwendet, die SH-SY5Y TR-*MYCN*, SK-N-AS TR-*MYCN*, SK-N-SH TR-*MYCN* und SH-EP TR-*MYCN*, sowie eine stabil hoch exprimierende Neuroblastomzelllinie WAC2 und die dazugehörige parentale Zelllinie SH-EP (siehe Tabelle 27, (Tjaden et al., 2020)). Als Kontrollzellen wurden eine humane Retinapigment Epithelzelllinie (ARPE-19) und eine Lungenkarzinomzelllinie (A549) gewählt (siehe Tabelle 28).

Tabelle 26: Verwendete Retinoblastomzelllinien, Mutationsstatus aus (Schwermer et al., 2019).

| RB-Zelllinie | <i>MYCN</i> -Status | <i>RB1</i> -Gen | Bezugsquelle |
|--------------|---------------------|--|---|
| RBL15 | normal | Deletion <i>RB1</i> | Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen |
| RBL30 | Gain | (exon 8) g.48936983 C>T ENSP00000267163:p.Arg2 51* | Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen |
| RB355 | Amplifikation | (exon 19) g.49030434 C>T (exon 22) g.49039150 T>A | Brenda Gallie, Toronto |
| RB522 | Amplifikation | Wildtyp | Brenda Gallie, Toronto |
| WERI-Rb1 | Gain | Deletion <i>RB1</i> | DSMZ, Braunschweig |
| Y79 | Amplifikation | Deletion exon 2–6 (exon 20) g.49033970 G>A splice site | DSMZ, Braunschweig |

Tabelle 27: Verwendete Neuroblastomzelllinien, (Tjaden et al., 2020).

| NB-Zelllinie | <i>MYCN</i> -Status | Bezugsquelle |
|--------------|---------------------|--|
| SH-EP | keine Aberration | AG Schramm, Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Essen |

| | | |
|-----------------|----------------------|--|
| WAC2 | stabil hochreguliert | AG Schramm, Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Essen |
| SH-EP TR-MYCN | hochregulierbar | AG Schramm, Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Essen |
| SK-N-AS TR-MYCN | hochregulierbar | AG Schramm, Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Essen |
| SK-N-SH TR-MYCN | hochregulierbar | AG Schramm, Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Essen |
| SH-SY5Y TR-MYCN | hochregulierbar | AG Schramm, Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Essen |

Tabelle 28: Kontrollzelllinien.

| Zelllinie | Zellart | Bezugsquelle |
|-----------|---------------------------------|--|
| A549 | Humanes Lungenkarzinom | AG Schuler, Klinik für Innere Medizin (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen |
| ARPE-19 | Humanes Retinapigmentepithel | Dr. rer. nat. Susanne Wasmuth, Ophtha- Lab, Münster |

3.11 Verwendete PBMCs

Die für die Ko-Kultivierungsexperimente verwendeten PBMC-Proben wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Infektionsimmunologie unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Wiebke Hansen zur Verfügung gestellt.

3.12 Primäre Retinoblastomtumore

Für die Pathologie-Färbung primärer Retinoblastomtumore wurden Tumorschnitte vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen von Herrn Dr. Dr. med. univ. Thomas C. Hager, Facharzt für Pathologie, zur Verfügung gestellt.

4 METHODEN

4.1 Zellkultur

4.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zelllinien wurden in 1 ml FCS mit 10 % DMSO bei -80 °C eingefroren und gelagert. Um diese wieder aufzutauen, wurde das Kryoröhrchen mit der Zellsuspension kurz im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 5 ml Kultivierungsmedium überführt, bei 300 g für 5 min abzentrifugiert und in 10 ml frischem Kultivierungsmedium aufgenommen.

4.1.2 Kultivierung und Passagierung von Zellen

Die verwendeten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Das Kultivierungsmedium hing von der jeweiligen Zelllinie ab (siehe Tabelle 29). Die adhärennten Zelllinien wurden sowohl in beschichteten T25- als auch in T75-Kultivierungsflaschen kultiviert, die Suspensionszelllinien in unbeschichteten T25- als auch in T75-Kultivierungsflaschen. Für die Versuche wurde Medium ohne Antibiotika/Antimykotika-Zusätze verwendet.

Tabelle 29: Verwendete Medien für die verschiedenen Zelllinien.

| Zelllinien | Medium |
|---|----------|
| RBL15, RBL30, RB355, RB522, WERI-Rb1, Y79 | Medium A |
| ARPE-19 | Medium B |
| A549, SH-EP, WAC2 | Medium C |
| SH-EP TR-MYCN, SK-N-AS TR-MYCN, SK-N-SH TR-MYCN, SH-SY5Y TR-MYCN | Medium D |

Die Zelllinien wurden je nach Zellteilungsrate alle 2–3 Tage 1:2 bis 1:10 gesplittet. Dafür wurde bei den Suspensionszelllinien 5 ml der 10 ml Zellsuspension abgesaugt und 5 ml frisches Medium hinzugegeben. Die adhärennten Zelllinien wurden zunächst mit 1-fach PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA von der Flaschenbeschichtung abgelöst. Bei einer T25-Flasche wurden 0,5 ml Trypsin-EDTA, bei einer T75-Flasche 1 ml hinzugegeben. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten, konnten sie in dem jeweiligen Verhältnis mit Medium verdünnt werden. Bei einem Verhältnis von 1:10 wurde zu 1 ml Trypsin-EDTA einer T75-Flasche 9 ml Medium hinzugegeben, nach Resuspendierung 9 ml Zellsuspension abgenommen und mit 9 ml Medium ausgetauscht.

4.1.3 Ausplattierung von Zellen

Um einen zuverlässigen Vergleich der verschiedenen Experimente zu gewährleisten, wurde jeweils eine zelllinienspezifische Zellzahl (c) in Multi-Well Platten für eine bestimmte Anzahl an Stunden (h) ausgesät. Die Zellzählung erfolgte mittels Beckmann Z1 Coulter Particle Counter.

4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. PCR)

4.2.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) durchgeführt. Im ersten Schritt der Isolation wurde das geerntete Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen, um jegliche Medium-Überreste zu entfernen. Das Zellpellet wurde dann in 400 µl Lysepuffer und 100 µl PBS aufgenommen. Die nächsten Schritte der Aufreinigung erfolgten nach dem Protokoll des Kits. Die Konzentrationsmessung der RNA-Proben wurde mit dem NanoDrop1000 Spektrophotometer vorgenommen, anschließend wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

4.2.2 cDNA-Synthese

Um die für die PCR nötige cDNA (engl. „complementary DNA“) herzustellen, wurden 1 µg RNA mittels Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) in cDNA umgeschrieben. Die Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentrationsmessung der cDNA-Proben erfolgte ebenfalls mit dem NanoDrop1000 Spektrophotometer.

4.2.3 Semiquantitative PCR

Diese Methode diente zur Qualitätskontrolle der cDNA Proben, die wie später beschrieben zur Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR genutzt wurden.

Bei der PCR wurden definierte DNA-Fragmente amplifiziert. Dazu wurde eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase genutzt, die Taq-Polymerase. Die im Vorschritt synthetisierte cDNA diente als Matrize für die PCR. Je nach zu amplifizierendem Gen wurden spezielle Primer genutzt.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten: der Denaturierung, der Primer Hybridisierung (engl. Annealing) und der Elongation. Im ersten Schritt wird die cDNA bei 90–95 °C denaturiert und somit die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge aufgetrennt. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer an die DNA-Einzelstränge an und definieren so die zu amplifizierende DNA-Sequenz. Die Annealing-Temperatur richtet sich nach den jeweiligen Primern und liegt zwischen 55 und 65 °C. Im dritten Schritt erfolgt die Elongation der cDNA. Die Primer dienen als Startpunkt für die Taq-Polymerase, diese synthetisieren nun den

Gegenstrang zur cDNA-Matrize. Dafür benötigt sie genügend Substrate, die Triphosphatnukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Das Temperaturoptimum für die Taq-Polymerase liegt bei circa 72 °C, sodass die Elongationsschritte bei dieser Temperatur durchgeführt werden. In jedem PCR-Zyklus verdoppelt sich hierbei die DNA, es werden 30 Zyklen durchgeführt. Bei der semiquantitativen PCR werden zwei Gene amplifiziert, ein Referenzgen (z. B. β -Aktin) und das zu untersuchende Gen.

Der Reaktionsansatz für die semiquantitative PCR wurde wie folgt pipettiert:

Tabelle 30: Reaktionsansatz semiquantitative PCR.

| Bestandteil | Menge |
|-----------------------------|--------------|
| MyTaq™ HS Red Mix | 10 μ l |
| 10 μ M Primer 1 forward | 1 μ l |
| 10 μ M Primer 1 reverse | 1 μ l |
| 10 μ M Primer 2 forward | 1 μ l |
| 10 μ M Primer 2 reverse | 1 μ l |
| cDNA (1:10 verdünnt) | 1 μ l |
| dest. Wasser | 20 μ l |

Die PCR-Cycler Einstellungen für die semiquantitative PCRs waren wie folgt:

Tabelle 31: Reaktionsablauf der semiquantitativen PCR.

| Ablauf | Temperatur | Zeitangabe |
|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 95 °C | 5 min |
| 2. Denaturierung | 90 °C | 30 sec |
| 3. Annealing | Primer-abhängig (siehe Tabelle 32) | 30 sec |
| 4. Elongation | 72 °C | 45 sec |
| 5. Finale Elongation | 72 °C | 10 min |

In der folgenden Tabelle sind die genutzten Primer, ihre verschiedenen Annealing-Temperaturen und die Fragmentgröße des Amplifikates aufgelistet:

Tabelle 32: Annealing-Temperatur der für die semiquantitative PCR verwendeten Primer.

| Primer | Annealing-Temperatur | Fragmentgröße [bp] |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------|
| β-Aktin | 61,8 °C | 727 |
| CD274 (PD-L1) | 58,6 °C | 162 |
| c-MYC | 61,8 °C | 248 |
| NMYC | 61,8 °C | 250 |
| PDCD1 (PD-1) | 59,4 °C | 182 |

4.2.4 Gelelektrophorese

Die PCR-Reaktionsproben wurden nun mittels einer Agarose-Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Fragmentgröße aufgetrennt. Dabei lief ein 100 bp-Marker als Größenstandard sowie eine Negativ-Kontrolle mit.

Für die Elektrophorese wurde ein 2 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer 5 min in der Mikrowelle erhitzt und dann mit 3 µl Ethidiumbromid einer 10 mg/ml Stammlösung versetzt. Die Gele härteten in den Gelkammern aus. Die Elektrophorese lief bei 120 V, 150 mA für 45 min. Die PCR-Banden wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht und abfotografiert. Hierzu wurde das Geldokumentationssystem von BioDoc genutzt und die Banden mit der dazugehörigen Analyse Software ausgewertet.

4.2.5 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) oder Echtzeit-PCR beruhte auf demselben Mechanismus wie die semiquantitative PCR. Der Unterschied zeichnete sich durch die Möglichkeit der Quantifizierung der synthetisierten DNA-Stränge in der Real-Time-PCR aus. In dieser Arbeit wurden folgende Gene via Real-Time-PCR untersucht: *MYCN*, *c-MYC* und *PD-L1*.

Der Reaktionsansatz der quantitativen Real-Time-PCR wurde wie folgt pipettiert:

Tabelle 33: Reaktionsansatz für die qRT-PCR.

| Bestandteil | Menge |
|-----------------------------------|-------|
| Fast SYBR.Green PCR Master Mix 2x | 10 µl |
| Primer 1 forward (5 pmol) | 1 µl |
| Primer 1 reverse (5 pmol) | 1 µl |
| cDNA (1:10 verdünnt) | 1 µl |
| RNase freies Wasser | 20 µl |

Tabelle 34: Programm der qRT-PCR (40 Zyklen).

| Ablauf | Temperatur | Zeitangabe |
|-------------------------|------------|------------|
| 1. Denaturierung | 95 °C | 10 min |
| 2. Annealing | 95 °C | 10 sec |
| 3. Elongation | 60 °C | 30 sec |

4.2.6 Immun-Profiling

Für das Immun-Profiling wurde das PCR Array Kit PAHS-181Z von Qiagen genutzt, mit dem simultan die mRNA Expression von 84 immun-relevanten Genen (siehe Tabelle 35) quantifiziert werden konnte. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 35: Im Immun-Profiling untersuchte immun-relevante Gene.

| Gen | Beschreibung | Gen | Beschreibung |
|--------|-----------------------------------|-------|--|
| ACKR3 | Chemokine (C-X-C motif) receptor | HIF1A | Hypoxia inducible factor 1 |
| AICDA | Activation-induced cytidine | HLA-A | Major histocompatibility complex, class I, A |
| BCL2 | B-cell CLL/lymphoma 2 | HLA-B | Major histocompatibility complex, class I, B |
| BCL2L1 | BCL2-like 1 | HLA-C | Major histocompatibility complex, class I, C |
| CCL18 | Chemokine (C-C motif) ligand 18 | IDO1 | Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 |
| CCL2 | Chemokine (C-C motif) ligand 2 | IFNG | Interferon gamma |
| CCL20 | Chemokine (C-C motif) ligand 20 | IGF1 | Insulin-like growth factor 1 |
| CCL21 | Chemokine (C-C motif) ligand 21 | IL10 | Interleukin 10 |
| CCL22 | Chemokine (C-C motif) ligand 22 | IL12A | Interleukin 12A |
| CCL28 | Chemokine (C-C motif) ligand 28 | IL12B | Interleukin 12B |
| CCL4 | Chemokine (C-C motif) ligand 4 | IL13 | Interleukin 13 |
| CCL5 | Chemokine (C-C motif) ligand 5 | IL15 | Interleukin 15 |
| CCR1 | Chemokine (C-C motif) receptor 1 | IL17A | Interleukin 17A |
| CCR10 | Chemokine (C-C motif) receptor 10 | IL1A | Interleukin 1, alpha |
| CCR2 | Chemokine (C-C motif) receptor 2 | IL1B | Interleukin 1, beta |
| CCR4 | Chemokine (C-C motif) receptor 4 | IL2 | Interleukin 2 |

| | | | |
|--------|---|---------|---|
| CCR7 | Chemokine (C-C motif) receptor 7 | IL23A | Interleukin 23, alpha subunit p19 |
| CCR9 | Chemokine (C-C motif) receptor 9 | IL4 | Interleukin 4 |
| CD274 | CD274 molecule | IL6 | Interleukin 6 |
| CSF1 | Colony stimulating factor 1 | CXCL8 | Interleukin 8 |
| CSF2 | Colony stimulating factor 2 | IRF1 | Interferon regulatory factor 1 |
| CSF3 | Colony stimulating factor 3 | KITLG | KIT ligand |
| CTLA4 | Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 | MICA | MHC class I polypeptide-related sequence A |
| CXCL1 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 | MICB | MHC class I polypeptide-related sequence B |
| CXCL10 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 | MIF | Macrophage migration inhibitory factor |
| CXCL11 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 11 | MYC | V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog |
| CXCL12 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 | MYD88 | Myeloid differentiation primary response gene (88) |
| CXCL2 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | NFKB1 | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer |
| CXCL5 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 | NOS2 | Nitric oxide synthase 2 |
| CXCL9 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 | PDCD1 | Programmed cell death 1 |
| CXCR1 | Chemokine (C-X-C motif) receptor 1 | PTGS2 | Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 |
| CXCR2 | Chemokine (C-X-C motif) receptor 2 | SPP1 | Secreted phosphoprotein 1 |
| CXCR3 | Chemokine (C-X-C motif) receptor 3 | STAT1 | Signal transducer and activator of transcription 1 |
| CXCR4 | Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 | STAT3 | Signal transducer and activator of transcription 3 |
| CXCR5 | Chemokine (C-X-C motif) receptor 5 | TGFB1 | Transforming growth factor, beta 1 |
| EGF | Epidermal growth factor | TLR2 | Toll-like receptor 2 |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor | TLR3 | Toll-like receptor 3 |
| FASLG | Fas ligand (TNF superfamily, member 6) | TLR4 | Toll-like receptor 4 |
| FOXP3 | Forkhead box P3 | TNF | Tumour necrosis factor |
| GBP1 | Guanylate binding protein 1 | TNFSF10 | Tumour necrosis factor ligand |
| GZMA | Granzyme A | TP53 | Tumour protein p53 |
| GZMB | Granzyme B | VEGFA | Vascular endothelial growth factor A |

4.3 FACS basierte Oberflächenfärbung

Mittels des FACS (engl. fluorescence activated cell sorting) wurde das Oberflächenprotein PD-L1 auf Retinoblastomzelllinien nachgewiesen. Die Durchflusszytometrie kann mithilfe verschiedener Laser Fluoreszenz-markierte Farbstoffe auf den Zellen sichtbar machen und somit eine Aussage darüber treffen, wie viele Zellen (in Prozent) ein bestimmtes Oberflächenprotein aufweisen.

Die mithilfe des Zellzählers eingestellte (1×10^6 Zellen pro Probe) Zellsuspension wurde bei 300 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 μ l 5 % BSA/PBS resuspendiert und dann mit dem Antikörper inkubiert. Es wurde ein PE-markierter Antikörper gegen CD274 (siehe Tabelle 18) verwendet. Zusätzlich ist jeweils

eine Probe ohne Antikörper (Negativ-Kontrolle) und eine Isotyp-Kontrolle (PE IgG2b; siehe Tabelle 18) mitgelaufen.

Die Isotyp-Kontrolle diente der Absicherung, dass der eigentliche Antikörper spezifisch an das vorgesehene Protein bindet. Die Antikörper-Inkubation fand abgedunkelt für 45 min statt. Die Proben wurden zweimal nach Inkubation mit 5 % BSA/PBS gewaschen, um jegliche ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Messung und Auswertung fand am Durchflusszytometer statt.

4.4 Immunfärbung

Mithilfe der Immunfärbung wurde PD-L1 auf den Retinoblastomzelllinien nachgewiesen, um die PD-L1 Expression auf der Zelloberfläche unter mikroskopischer Vergrößerung darzustellen.

Dafür wurden die verschiedenen Zelllinien mit 250.000 c/Well bei Suspensionszellen (RBL15, RB522, WERI-Rb1 und Y79) und 50.000 c/Well bei adhärenenten Zellen (RB355, SH-EP, WAC2, ARPE-19, A549) auf Deckgläser in einer 24-Well-Bodenplatte ausplattiert. Die Deckgläser wurden am Vortag mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet, damit die Zellen sich beim Ausplattieren darauf absetzen konnten.

Nach 24 h Inkubation wurden die Deckgläser mit den Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 30 min mit Cytofix/Cytoperm (250 µl pro Well) inkubiert. Nach Ablauf der 30 min wurden die Deckgläser wiederum zweimal mit PBS gewaschen.

Die Antikörper-Inkubation fand in einer feuchten Kammer statt. Dafür wurden Zellstofflagen mit destilliertem Wasser angefeuchtet und in eine mit Deckel verschlossene Kammer gelegt. Die Deckgläser wurden auf Parafilmstreifen auf den Zellstofflagen aufliegend gelegt. Der Erst-Antikörper PD-L1 (siehe Tabelle 20) wurde in einem Verhältnis von 1:500 in Perm/Wash eingesetzt, 50 µl der Antikörper-Lösung wurden pro Deckglas pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 60 min in der geschlossenen feuchten Kammer.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen auf den Deckgläsern zweimal mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper (Alexa Fluor® 488 IgG (H+L), 1:200 in Perm/Wash) und gleichzeitig wurde der Zellkern mithilfe des DAPI Farbstoffes (1:360.000 in Perm/Wash) gefärbt. Hierzu wurden jeweils 50 µl der Färbelösung pro Deckglas verwendet. Als Kontrollproben wurden alle Zelllinien zusätzlich nur mit dem Zweit-Antikörper, ohne vorherigen Erst-Antikörper, inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 30 min erfolgte wiederum zweimal der Waschschriff mit PBS. Im letzten Schritt wurde 1 ml destilliertes Wasser auf die Deckgläser pipettiert. Die Deckgläser wurden mit 7 µl Fluoromount G® auf Objektträger fixiert. Die Objektträger wurden in einer Mappe unter

Ausschluss von Licht bei 4 °C gelagert und dann unter Verwendung von Immersol mikroskopiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden Fotos von den Zellen gemacht.

Die Einarbeitung in das Protokoll sowie die Fluoreszenzmikroskopie fand in der AG Brandau der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Essen statt.

4.5 Färbung von Tumormaterial

Die Färbungen primärer humaner Retinoblastome wurde im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen von Herrn Dr. Dr. med. univ. Thomas C. Hager, Facharzt für Pathologie, durchgeführt.

Die Tumorschnitte wurden auf eine Schichtdicke von 1,5 µm geschnitten und für mindestens 2 Stunden bei 50 °C getrocknet. Die Färbung wurde an der VENTANA BenchMark ULTRA durchgeführt. Zur Entparaffinierung der Schnitte wurde ein Xylolersatzstoff genutzt. Eine Vorbehandlung fand mit einem CC1-Puffer für 40 min statt. Die Antikörperinkubation erfolgte mit dem PD-L1 Antikörper (siehe Tabelle 21) für 32 min bei 37 °C in einer Verdünnung von 1:100. Als Nachweissystem wurde das OptiView DAB IHC Detection Kit (Roche) verwendet, die dazugehörigen Puffer sind unter Tabelle 10 aufgelistet. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin II, diese wurde durch Bluing gebläut. Die Objektträger wurden mit Eukitt eingedeckt.

Dabei wurden sieben verschiedene Retinoblastomtumore hinsichtlich ihrer PD-L1 Expression in der Pathologie untersucht und hinsichtlich drei verschiedener Gliederungssysteme definiert. Zu diesen Systemen gehörte der TC-Score (Tumor-Cell-Score, siehe Tabelle 36), der IC-Score (Immune-Cell-Score, siehe Tabelle 36) und der TPS (Tumorproportion-Score, siehe Tabelle 37).

Tabelle 36: Einteilungskriterien für PD-L1 positive Tumore (Fehrenbacher et al., 2016). Der TC-Score teilt die PD-L1 positiven Tumorzellen in 4 verschiedene Kategorien ein, TC0 weist die geringste Prozentzahl an positiven Tumorzellen auf, TC3 die höchste Prozentzahl. Der IC-Score teilt die PD-L1 positiven, den Tumor infiltrierenden Immunzellen in ebenfalls 4 Kategorien ein, IC0 beschreibt die am wenigsten positiven Immunzellen, IC3 die am höchsten.

| TC-Score | PD-L1 positive Tumorzellen | IC-Score | PD-L1 positive tumorinfiltrierende Immunzellen |
|----------|----------------------------|----------|--|
| 0 | < 1 % | 0 | < 1 % |
| 1 | ≥ 1 % < 5 % | 1 | ≥ 1 % < 5 % |
| 2 | ≥ 5 % < 50 % | 2 | ≥ 5 % < 10 % |
| 3 | ≥ 50 % | 3 | ≥ 10 % |

Tabelle 37: TPS (Tumorproportion-Score) zur Einteilung der PD-L1 positiven Tumorzellen (Schildhaus, 2018). Hier wird der prozentuale Anteil PD-L1 positiver Tumorzellen in 3 verschiedene Kategorien eingeteilt.

| TPS (Tumorproportion-Score) | Definition |
|-----------------------------|---------------------|
| < 1 % | Keine Expression |
| 1 – 49 % | Niedrige Expression |
| ≥ 50 % | Hohe Expression |

4.6 Immundetektion von Proteinen

Im Western Blot wurden die Proteine MYCN und PD-L1 untersucht. Bei diesem Verfahren konnte man Proteine aus den Zellen isolieren, diese mittels einer Gelelektrophorese ihres Molekulargewichtes nach auftrennen und mit spezifischen Antikörpern markieren und sichtbar machen.

4.6.1 Herstellung von Zelllysaten

Zunächst wurden die Proteine aus den Zellen isoliert. Dafür wurden die verschiedenen Zelllinien in einer bestimmten Zellzahl in einer 6-Well-Bodenplatte ausplattiert, (RBL15, RB355, RB522, WERI-Rb1, Y79: 1×10^6 c/Well; SH-EP, WAC2, ARPE-19, A549: 150.000 c/Well). Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen geerntet.

Die Zelllinie SH-SY5Y TR-MYCN wurde mit einer Zellzahl von 300.000 c/Well und die Zelllinien SH-EP TR-MYCN, SK-N-AS TR-MYCN und SK-N-SH TR-MYCN mit einer Zellzahl von 150.000 c/Well in einer 6-Well-Bodenplatte ausplattiert. Nach 24 h Inkubation

wurde Tetrazyklin in einer Konzentration von 1 µg/ml den Zellen beigefügt. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen geerntet.

Die Zellsuspension wurde zweimal mit PBS gewaschen, um jegliche Medium-Reste zu entfernen. Danach wurde 100 µl RIPA-Puffer auf das Zellpellet gegeben und bei 4 °C 30 min inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension bei 4 °C, 1000 g, 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und bei -20 °C eingefroren.

4.6.2 BCA-Proteinassay

Um die Protein-Konzentration der Zelllysate zu bestimmen, wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet und nach dessen Protokoll gearbeitet. Die Konzentration wurde mithilfe des Modulus Microplate Reader gemessen.

4.6.3 SDS-PAGE

Die Proteine aus den Zelllysaten wurden nun nach ihrem Molekulargewicht in der Gelelektrophorese nach aufgetrennt. Dafür wurden zunächst die 15-Kamm-Polyacrylamidgele, jeweils bestehend aus einem 5 %igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel, nach folgendem Schema gegossen:

Tabelle 38: Pipettierschema für SDS-PAGE Gele, Mengenangabe für zwei Gele.

| Inhaltsstoffe | Sammelgel | Trenngel |
|---------------------------|-----------|----------|
| dest. Wasser | 6,8 ml | 7,9 ml |
| Rotiphorese® Gel 30 | 1,7 ml | 6,67 ml |
| Sammelgel-Puffer (pH 6,8) | 1,25 ml | - |
| Trenngel-Puffer (pH 8,8) | - | 7,5 ml |
| SDS-Lösung 10 % | 100 µl | 200 µl |
| APS 10 % | 100 µl | 200 µl |
| TEMED | 30 µl | 50 µl |

Für den Probenansatz wurden 20 µg Protein, $\frac{1}{10}$ des Gesamtvolumens 0,5 M DTT und Ladebuffer (4x) pipettiert. Die Probenansätze wurden bei 97 °C für 5 min aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren. Die Elektrophoresekammer wurde mit den gegossenen Polyacrylamidgelen und Laufpuffer (1x) vorbereitet. Bevor die Ansätze in die einzelnen Geltaschen pipettiert wurden, wurden diese noch mit Puffer ausgespült, um nicht auspolymerisiertes Acrylamid zu entfernen. Als Größenreferenz wurde ein Proteinstandard

(Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) am Anfang und am Ende des Gels mit aufgetragen.

Die SDS-PAGE lief nach folgendem Programm ab: 10 min 90 V, 70 min 120 V.

4.6.4 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine in dem Polyacrylamidgel der SDS-PAGE wurden nun auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde ein Nass-Blot durchgeführt. Die Blot-Kassette wurde nach folgendem Schema unter Transferpuffer zusammengesetzt:

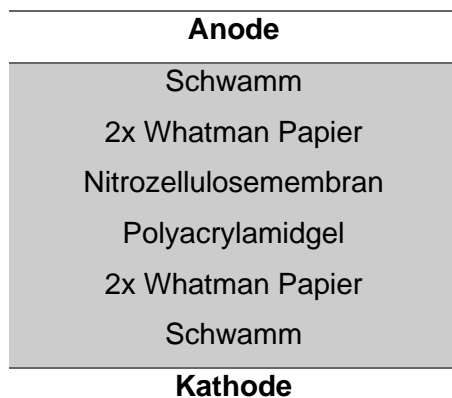


Abbildung 3: Aufbau der Blot-Kassette für den Nass-Blot.

Der Western Blot lief bei 40 V 100 min. Nach dem Blot wurde die Proteinübertragung mit einer Ponceau S-Färbung kontrolliert. Mit diesem Farbstoff wurden die Proteine reversibel auf der Membran angefärbt, somit konnten Übertrag und gleichmäßige Proteinbeladung sichergestellt werden. Die Membran wurde nun so zugeschnitten, dass die einzelnen Proteine auf dem jeweiligen Membranteilschnitt gut zu lokalisieren sind. In der folgenden Tabelle wurden die entsprechenden Molekulargewichte der detektierten Proteine aufgelistet:

Tabelle 39: Molekulargewichte der zu detektierende Proteine.

| Protein | Molekulargewicht (kDa) |
|----------------|-------------------------------|
| N-MYC | 62 |
| PD-L1 | 40-50 |
| Vinculin | 116 |

Bevor die gegen die Proteine gerichteten Antikörper auf die Nitrozellulosemembran gegeben werden konnten, wurde diese zuerst mit der Blockierlösung für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Kipp-Schüttler blockiert. Die Inkubation der Erst-Antikörper

erfolgte dann bei 4 °C auf einem Horizontalschüttler über Nacht. Die eingesetzten Konzentrationen der Erst-Antikörper können der Tabelle 22 entnommen werden.

Nach der Inkubation mit dem Erst-Antikörper wurden die Membranteilschnitte jeweils 3x 10 min mit PBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur über 60 min auf dem Kipp-Schüttler. Die eingesetzten Konzentrationen der Zweit-Antikörper können der Tabelle 23 entnommen werden. Anschließend erfolgten wiederum 3x Waschschrte mit PBST.

Die Membranen wurden im Fusion FX entwickelt, dazu nutzte man das ECL™ Prime Western Blotting Detektionsreagenz.

4.7 Ko-Kultivierungsexperimente

Bei diesem Experiment wurden die Retinoblastomzelllinie Y79 und humane T-Zellen ko-kultiviert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das Experiment wurde in der AG Molekulare Infektionsimmunologie unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Wiebke Hansen durchgeführt. Die PBMC-Proben (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells) wurden ebenfalls von ihrer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Der Versuchsablauf wird in Abbildung 4 dargestellt:

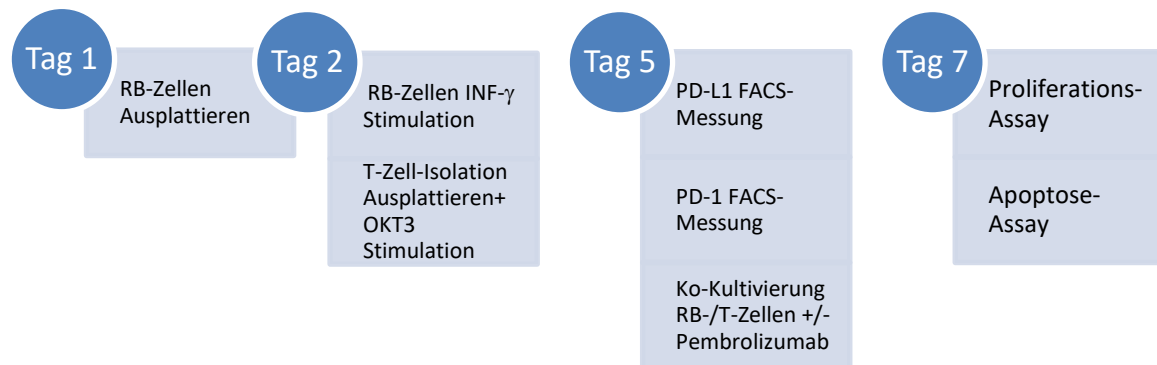


Abbildung 4: Versuchsablauf Ko-Kultivierung. An Tag 1 wurden die RB-Zellen ausplattiert, an Tag 2 mit INF- γ stimuliert und für 72 h kultiviert. Die T-Zellen wurden an Tag 2 aus den PBMC-Proben isoliert, ausplattiert, mit OKT3-Microbeads stimuliert und ebenfalls für 72 h kultiviert. An Tag 5 erfolgte die Ko-Kultivierung von RB- und T-Zellen für weitere 48 h, sowie die Zugabe des PD-1 Antikörper Pembrolizumab. Zur Kontrolle wurden die RB-Zellen auf PD-L1, die T-Zellen auf PD-1 in der Durchflusszytometrie untersucht. An Tag 7 konnte das Proliferations- sowie Apoptose-Assay am Durchflusszytometer durchgeführt werden.

Die Ko-Kultivierung wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, wie folgende Tabelle zeigt:

Tabelle 40: Versuchsbedingungen in der Ko-Kultivierung. „Stimuliert“ bzw. „Unstimuliert“ bezieht sich auf Zugabe von $INF-\gamma$ bei den RB-Zellen und OKT-3 bei den T-Zellen. „Keine“ bezieht sich auf die alleinige Kultivierung von RB-Zellen oder T-Zellen.

| Proben | Retinoblastomzellen | T-Zellen |
|------------------------|---------------------|--------------|
| <i>+ Pembrolizumab</i> | | |
| 1 | stimuliert | stimuliert |
| 2 | stimuliert | unstimuliert |
| 3 | unstimuliert | stimuliert |
| 4 | unstimuliert | unstimuliert |
| 5 | stimuliert | keine |
| 6 | keine | stimuliert |
| <i>- Pembrolizumab</i> | | |
| 1 | stimuliert | stimuliert |
| 2 | stimuliert | unstimuliert |
| 3 | unstimuliert | stimuliert |
| 4 | unstimuliert | unstimuliert |
| 5 | stimuliert | keine |
| 6 | keine | stimuliert |

4.7.1 MTT-Assay zur Festlegung der Inhibitor-Konzentration von Pembrolizumab für die Ko-Kultivierungsexperimente

Im MTT-Assay wurde die Zellviabilität nach Zugabe des Inhibitors Pembrolizumab untersucht. Dabei reduziert die bei lebenden Zellen aktive mitochondriale Dehydrogenase das Tetrazoliumsalz 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT). Es entsteht ein Formazan, dessen Absorption photometrisch bestimmt werden kann. Zunächst wurden die T-Zellen und Retinoblastomzelllinie Y79 unter folgenden Bedingungen in 96-Well-Bodenplatten in einer bestimmten Zellzahl (c) pro Well ausplattiert:

- 1) RB-Zellen mit 25.000 c/Well
- 2) T-Zellen mit 100.000 c/Well
- 3) T-Zellen mit 200.000 c/Well
- 4) RB-Zellen und T-Zellen in einem Verhältnis 1:4
- 5) RB-Zellen und T-Zellen in einem Verhältnis 1:8

Die T-Zellen wurden wie in 4.7.3 beschrieben isoliert und mit Anti-CD3/CD2/CD28 Beads stimuliert. Die Retinoblastomzellen wurden wie in 4.7.2 beschrieben mit Interferon- γ stimuliert. Nach 24 h Inkubation wurde der Inhibitor Pembrolizumab in verschiedenen Konzentrationen (5 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$) hinzugefügt. Nach 72 h und nach 96 h wurden die Zellen zur MTT-Messung entnommen. Dazu wurden zunächst 20 μl MTT-Lösung (5 mg/ml) pro Well hinzugegeben. Nach 2 h Inkubationszeit wurden 100 μl Solubilisierungslösung pro Well zugefügt. Nach 30 min Inkubationszeit bei 40 °C und 80 rpm geschüttelt fand die Messung am ELISA statt.

4.7.2 Retinoblastom-Zell-Stimulation

Am ersten Tag wurde die Retinoblastomzelllinie Y79 mit 1×10^6 c/Well in einer 6-Well-Bodenplatte ausplattiert und 24 h im Inkubator kultiviert. Die Zellzählung für diese Versuchsreihe erfolgte anhand der Neubauer-Zählkammer. Um PD-L1 auf den Retinoblastomzellen induzieren, wurde am zweiten Tag Interferon- γ in einer Konzentration von 10 ng/ml den Zellen beigefügt. Die Zellen wurden für weitere 72 h inkubiert.

4.7.3 T-Zell-Isolation und -Stimulation

An Tag zwei wurden die T-Zellen aus humanen mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) gesunder Probanden isoliert. Dazu wurde das humane CD4+ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) verwendet. Die magnetische Separation erfolgte am autoMACS® Pro Separator (Miltenyi Biotec).

Die isolierten T-Zellen wurden mit 2×10^6 c/Well in einer 12-Well-Bodenplatte ausplattiert. Die Zellen wurden durch die Zugabe von Anti-CD3/CD2/CD28 Beads im Verhältnis 1:1 zu den T-Zellen für 72 h stimuliert. Zur Stimulation wurde der humane Treg Suppression Inspector Kit (Miltenyi Biotec) genutzt.

4.7.4 FACS-basierter Nachweis von PD-L1 / PD-1

Am fünften Versuchstag wurde die Retinoblastomzell-Stimulation und T-Zell-Stimulation mithilfe der Durchflusszytometrie kontrolliert (vgl. 4.3). Für den PD-L1 Nachweis der Retinoblastom-Zellen wurde der PE-markierte CD274 Antikörper (siehe Tabelle 18) genutzt. Für den PD-1 Nachweis der T-Zellen wurde der APC-markierte CD279 Antikörper (siehe Tabelle 18) genutzt. Pro Messprobe wurden jeweils 100.000 Zellen verwendet. Es wurde jeweils die entsprechende Isotyp-Kontrolle eingesetzt.

4.7.5 Ko-Kultivierung

Die Retinoblastom- und T-Zellen wurden unter den Bedingungen der Tabelle 40 ko-kultiviert. Das Verhältnis der Zellen betrug 1:1, jeweils 25.000c pro Well in einer 96-Well-Bodenplatte. Der PD-1 Inhibitor Pembrolizumab wurde in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt. Die Zellen wurden für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ ko-kultiviert.

4.7.6 Proliferations-Assay

Für den Proliferations-Assay wurde der Farbstoff Dye eFluor™ 670 genutzt. Dabei wurden alle Zellen mit diesem Farbstoff markiert. Eine sich teilende Zelle gab gleichmäßig den Farbstoff an ihre Tochterzellen weiter und die Farbintensität nahm ab. Die Zellteilungen konnten so im Durchflusszytometer anhand der Farbintensität der Zellen beobachtet werden. Die T-Zellen wurden vor der Ko-Kultivierung gefärbt. Dabei wurden ebenfalls ungefärbte T-Zellen als Kontrolle einbezogen.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, um jegliche Mediumreste zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 2 ml PBS aufgenommen, 1:1 mit 2 ml der 10 µM Färbelösung resuspendiert und für 10 min im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Die Färbung wurde mit 4 ml kaltem FCS für 5 min bei 4 °C gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit Medium A (ohne Antibiotika/Mykotika-Zusatz) gewaschen und wie in 4.7.5 beschrieben ausplattiert. Am Tag Sieben wurden die Zellen geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und in eine 96-Well-Rundbodenplatte vorgelegt. Zunächst wurden die Oberflächenfärbungen durchgeführt. Es wurde CD4 als T-Zell-Marker genutzt. Der Pacific Blue™-markierte CD4 Antikörper und die dazugehörige IgG1 Isotyp-Kontrolle (siehe Tabelle 18) wurden in 5 % BSA/PBS für 10 min angesetzt. Die Proben wurden einmal mit 5 % BSA/PBS gewaschen, in 1,3 ml Polypropylen-Röhrchen übernommen und im Durchflusszytometer BD LSR II analysiert.

4.7.7 Apoptose-Assay

Für das Apoptose-Assay wurde das Annexin V Apoptosis Detection Kit – APC (eBioscience™) verwendet. Am Tag sieben wurden die Zellen wie auch unter Punkt 4.7.6 beschrieben geerntet und mit dem Retinoblastomzellen-Marker CD171 und dem T-Zellen-Marker CD4 gefärbt, um die beiden Zellarten später im Durchflusszytometer voneinander unterscheiden zu können. Der PE-markierte CD171 Antikörper und die dazugehörige IgG2a Isotyp-Kontrolle (siehe Tabelle 18) wurden in 5 % BSA/PBS angesetzt und für 45 min inkubiert. Der CD4 Antikörper wurde wie unter Punkt 4.7.6 beschrieben eingesetzt.

Nach der Oberflächenfärbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µl Annexin V binding buffer (1x; Annexin V Apoptosis Detection Kit) aufgenommen. Pro Well

wurden 3 μ l Annexin-APC und 7 μ l 7-AAD hinzugegeben und die Zellen für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit Annexin V binding buffer (1x) gewaschen und wieder in 100 μ l dessen aufgenommen. Die Proben wurden in 1,3 ml Polypropylen-Röhrchen übernommen und im Durchflusszytometer BD LSR II analysiert.

4.7.8 Zytokin Messung

Die Überstände aus der Ko-Kultivierung wurden bei -20 °C eingefroren, um sie für eine weitere Messung aufzubewahren. Es wurden mittels des Luminex® Assay (siehe Tabelle 15) die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor α (TNF α), sowie die Interleukine 6, 8 und 10 (IL6, 8, 10) gemessen. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Kits.

Diese Messungen wurden von Sina Luppus in der AG Molekulare Infektionsimmunologie unter der Aufsicht von Prof. Dr. rer. nat. Wiebke Hansen durchgeführt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Charakterisierung der MYC Expression im Retinoblastom

Im folgendem wurde die Expression von MYCN und c-MYC in verschiedenen Retinoblastomzelllinien nachgewiesen.

5.1.1 Nachweis der MYCN Expression in Retinoblastomzellen mit und ohne MYCN-Amplifikation

In Abbildung 5 ist die relative MYCN Expression der Retinoblastomzelllinien dargestellt. Dabei wurden drei Retinoblastomzelllinien mit (RB355, RB522, Y79) und drei Retinoblastomzelllinien ohne MYCN-Amplifikation (RBL15, RBL30, WERI-Rb1) getestet. Die Ergebnisse wurden relativ zur MYCN überexprimierenden Neuroblastomzelllinie WAC2 als Positiv-Kontrolle für die MYCN Expression dargestellt. Als Negativ-Kontrolle diente die Neuroblastomzelllinie SH-EP.

Die nicht MYCN-amplifizierten Retinoblastomzelllinien (RBL15, RBL30, WERI-Rb1) exprimierten grundsätzlich weniger MYCN als die MYCN-amplifizierten Retinoblastomzelllinien (RB522, Y79). Eine Ausnahme bildete die Zelllinie RB355. Allerdings wiesen alle Retinoblastomzelllinien eine stark höhere Expression auf als die Neuroblastomzelllinien WAC2 und SH-EP. Die Streuung der MYCN Expression war bei den MYCN-amplifizierten Retinoblastomzelllinien im Vergleich zu den nicht MYCN-amplifizierten Zelllinien deutlich höher (siehe Abbildung 5B).

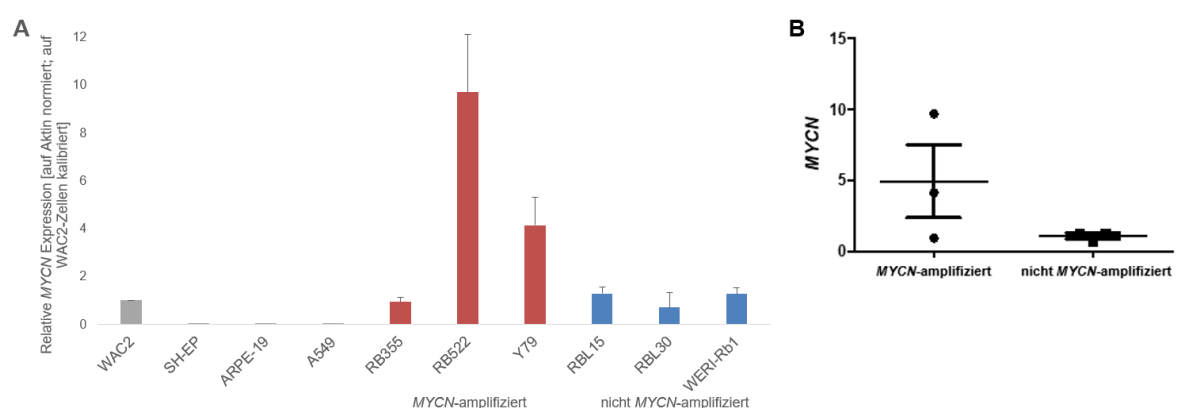


Abbildung 5: Nachweis der MYCN Expression via qRT-PCR. Die Ergebnisse beziehen sich auf den Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 3 Experimenten. **A:** Grau: Kontrollzellen. Rot: MYCN-amplifizierte Zellen. Blau: nicht MYCN-amplifizierte Zellen. Die MYCN-amplifizierten RB-Zelllinien wiesen bis auf RB355 eine höhere MYCN Expression auf als die nicht MYCN-amplifizierten RB-Zelllinien. **B:** Whisker Plot der qRT-PCR Daten aus Abbildung 5A. Die Zelllinien ARPE-19 und A549 sind Kontrollzelllinien für die unter 5.2 untersuchte PD-L1 Expression, sie sind hier der Vollständigkeit halber mit aufgeführt. p -Wert=0,21.

5.1.2 Nachweis der c-MYC Expression in Retinoblastomzellen mit und ohne MYCN-Amplifikation

Um einen möglichen Zusammenhang von c-MYC mit MYCN oder PD-L1 zu untersuchen, wurde ebenfalls eine qRT-PCR von c-MYC in dem Standard Zelllinienpanel durchgeführt. Wie in Abbildung 6 dargestellt konnte man erkennen, dass die MYCN-amplifizierten Retinoblastomzelllinien wenig c-MYC und die nicht MYCN-amplifizierten Zellen viel c-MYC exprimieren. Hier bestand also eine Antikorrelation zwischen MYCN und c-MYC. Die PD-L1 Negativ-Kontrolle A549 exprimierte hier ebenfalls c-MYC hoch, wobei die PD-L1 positive Zelllinie SH-EP wenig c-MYC exprimierte. Bei den nicht MYCN-amplifizierten Retinoblastomzelllinien wurde eine höhere Streuung festgestellt (siehe Abbildung 6B).

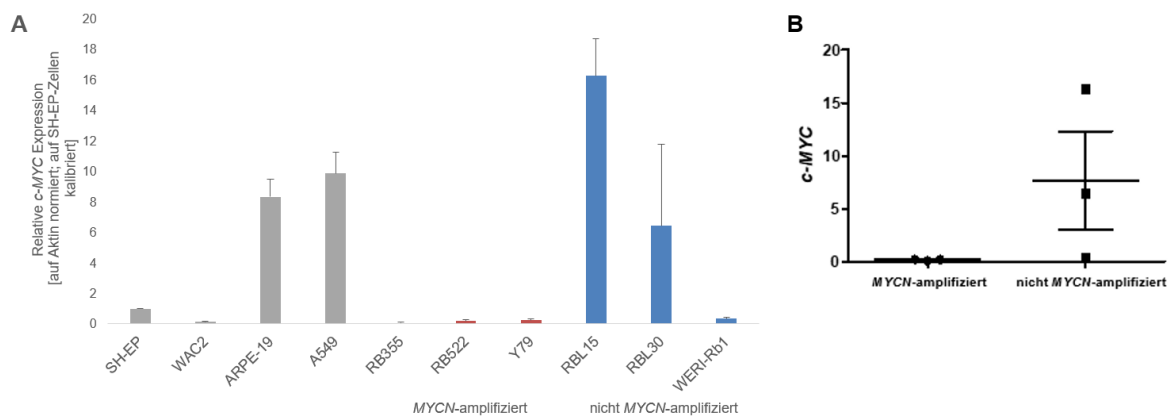


Abbildung 6: Nachweis der c-MYC Expression via qRT-PCR. Die Ergebnisse beziehen sich auf den Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 3 Experimenten. **A:** Grau: Kontrollzellen. Rot: MYCN-amplifizierte Zellen. Blau: nicht MYCN-amplifizierte Zellen. Die MYCN-amplifizierten RB-Zelllinien exprimieren kaum c-MYC, die nicht MYCN-amplifizierten RB-Zelllinien wiesen bis auf WERI-Rb1 eine hohe c-MYC Expression auf. **B:** Whisker Plot der qRT-PCR Daten aus Abbildung 6A. Nicht MYCN-amplifizierte RB-Zellen verfügten über eine höhere Varianz als MYCN-amplifizierte RB-Zelllinien (p -Wert=0,18).

Des Weiteren wurde in einer Korrelationsanalyse die Korrelation zwischen MYCN und c-MYC dargestellt. Hier wurde eine Antikorrelation bestätigt, der Korrelationskoeffizient lag bei -0,37, d. h. je weniger MYCN exprimiert wurde, desto mehr c-MYC wurde exprimiert.

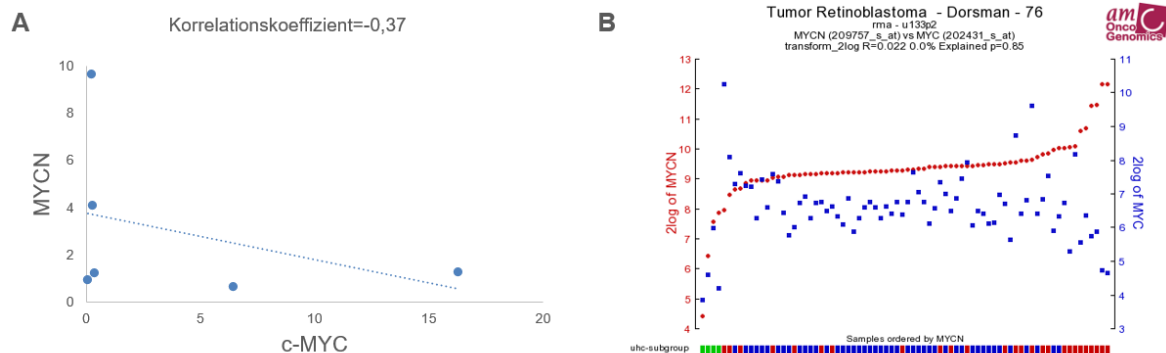


Abbildung 7: Korrelation zwischen MYCN und c-MYC. A: Die Korrelation wurde auf Basis der qRT-PCR Daten der MYCN und c-MYC Expression (Abbildung 5 und 6) der sechs verschiedenen RB-Zelllinien dargestellt. Der Korrelationskoeffizient ist mit -0,37 negativ, daher schien eine Antikorrelation zwischen MYCN und c-MYC vorzuliegen. B: Korrelation zwischen MYCN und c-MYC in primären Retinoblastomtumoren. Es lag keine Korrelation zwischen der MYCN und c-MYC Expression vor (R2 Daten: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>)) (Kooi et al., 2015).

Die in der Zellkultur beobachtete Antikorrelation zwischen c-MYC und MYCN ließ sich in primärem Tumormaterial nicht bestätigen (siehe Abbildung 7B).

5.2 Nachweis der PD-L1 Expression im Retinoblastom

Im Folgenden wurde die Expression von PD-L1 auf verschiedenen Ebenen in Retinoblastomzelllinien nachgewiesen.

5.2.1 Nachweis der PD-L1 Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR

In der Abbildung 8 ist die relative PD-L1 Expression der verschiedenen Retinoblastomzelllinien dargestellt. Es wurde dabei das Retinoblastom Standard Zelllinienpanel genutzt. Die Zelllinie ARPE-19 wurde hinzugezogen, um diese Daten mit einer retinalen, nicht malignen Zelllinie zu vergleichen. Die Ergebnisse wurden auf die PD-L1 Expression in WAC2-Zellen normalisiert.

Man erkennt, dass alle Retinoblastomzelllinien PD-L1 in unterschiedlichem Ausmaß exprimierten. Die Expression bei allen getesteten Retinoblastomzelllinien war niedriger als in den retinalen nicht-malignen ARPE-19 Zellen. Die MYCN-negative Zelllinie SH-EP hatte hier die höchste PD-L1 Expression. Einen Zusammenhang zwischen MYCN und PD-L1 ließ sich im Rahmen der qRT-PCR nicht beschreiben.

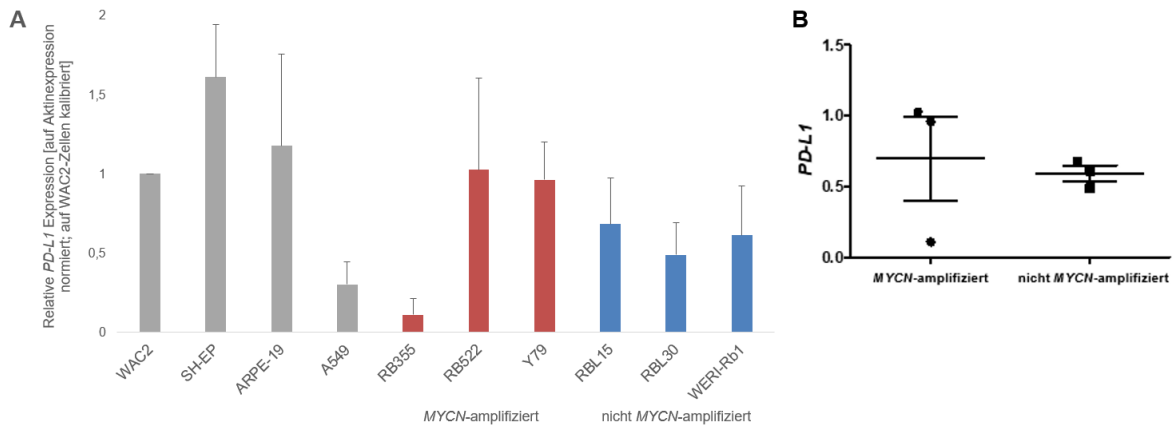


Abbildung 8: Nachweis der PD-L1 Expression via qRT-PCR. Die Ergebnisse beziehen sich auf den Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 3 Experimenten. **A:** Grau: Kontrollzelllinien. Rot: MYCN-amplifizierte RB-Zelllinien. Blau: nicht MYCN-amplifizierte RB-Zelllinien. Alle Zelllinien zeigten eine PD-L1 Expression. Am stärksten exprimierte die Kontrollzelllinie SH-EP PD-L1, am wenigsten die RB-Zelllinie RB355. **B:** PD-L1 Expression im Whisker Plot. Die PD-L1 Expression in der qRT-PCR der verschiedenen RB-Zelllinien aus Abbildung 8A wurden in einem Whisker Plot dargestellt. Die Varianz der PD-L1 Expression war bei MYCN-amplifizierten RB-Zellen höher als bei nicht MYCN-amplifizierten RB-Zellen, aber es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen MYCN-amplifizierten und nicht MYCN-amplifizierten RB-Zelllinien (p -Wert=0,74).

5.2.2 Nachweis der PD-L1 Expression auf Proteinebene mittels FACS

Des Weiteren wurde die PD-L1 Expression in der Durchflusszytometrie detektiert (siehe Abbildung 9). Die Ergebnisse wurden auf die PD-L1 Expression in WAC2-Zellen normalisiert. Die Retinoblastomzelllinien RB355, RB522, Y79, RBL15 und WERI-Rb1 wurden aufgrund ihrer guten Kultivierungsbedingungen in den folgenden Experimenten weiterverfolgt.

Die in der qRT-PCR ermittelten Werte bestätigten sich in der Durchflusszytometrie. Auch die in Abbildung 9B dargestellte höhere Streuung der MYCN-amplifizierten Retinoblastomzellen ging mit den Ergebnissen der qRT-PCR einher (siehe Abbildung 8B).

Exemplarisch stellt Abbildung 9C die Verteilung der PD-L1 Expression der Retinoblastomzellen von einem der 3 Experimenten grafisch dar. Der graue Peak entsprach der jeweiligen Isotyp-Kontrolle und der rote Peak markierte den Anteil PD-L1 gefärbter Zellen. Man erkennt, dass die Peaks der Retinoblastomzelllinien inhomogener und ungleichmäßiger als die der Kontrollzelllinien waren. Retinoblastomzellen wachsen in der Zellkultur in Clustern, im Gegensatz zu den Kontrollzelllinien, die einzeln wachsen. Es bestand somit die Hypothese, dass die Zellen innerhalb der Cluster kein PD-L1 aufweisen und nur die den Clustern außen anliegenden Zellen das Oberflächenprotein exprimieren. Um dies weiterzuverfolgen, wurde im Folgenden eine PD-L1 Immunfärbung der Zelllinien durchgeführt.

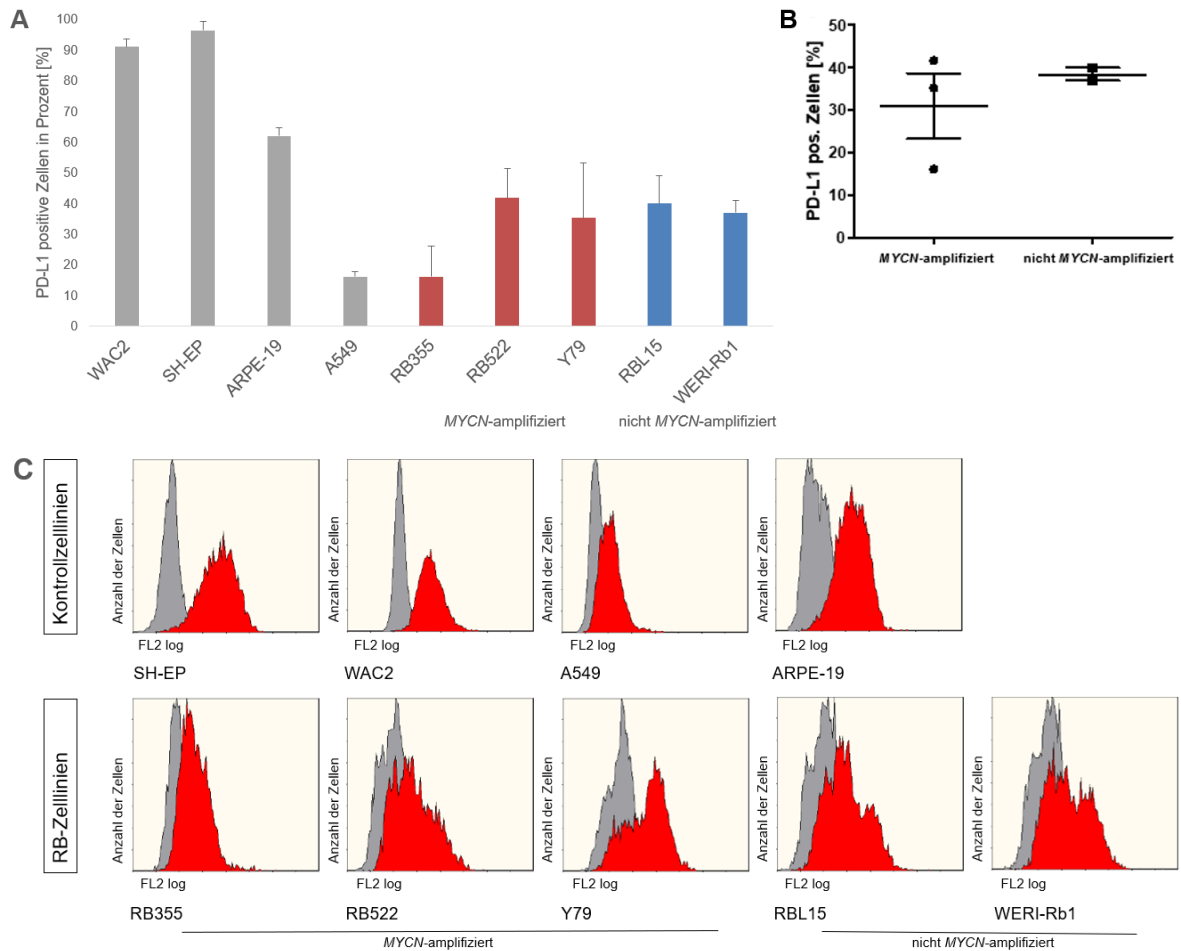


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Bestimmung der PD-L1 Expression in RB-Zellen mit und ohne MYCN-Amplifikation. **A:** Grau: Kontrollzelllinien. Rot: MYCN-amplifizierte RB-Zelllinien. **Blau:** nicht MYCN-amplifizierte RB-Zelllinien. Die Ergebnisse beziehen sich auf den Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 3 Experimenten. **B:** Whisker Plot der PD-L1 Expression aus Daten der Durchflusszytometrie in Abbildung 9A. Die Varianz der PD-L1 Expression war bei MYCN-amplifizierten RB-Zellen höher als bei nicht MYCN-amplifizierten RB-Zellen (p -Wert=0,51). **C:** Repräsentative Overlayplots zu den in Abbildung 9A gezeigten Daten für PD-L1 und Isotyp-Kontrollen. Grau: Isotyp-Kontrolle. Rot: PD-L1 gefärbte Zellen. In allen untersuchten Zelllinien war eine PD-L1 Expression nachweisbar.

5.2.3 Nachweis der PD-L1 Expression mittels Immunfluoreszenz

Um die PD-L1 Oberflächenexpression genauer zu charakterisieren, wurde eine Immunfärbung durchgeführt. Ziel dieses Experimentes war es herauszufinden, wo genau das Protein in der Zelle lokalisiert ist. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Färbung dargestellt. Es wurde das Standardpanel an Zelllinien verwendet (SH-EP, WAC2, ARPE-19, A549, RBL15, WERI-Rb1, RB355, RB522, Y79). Man erkennt bei den Positiv-Kontrollen SH-EP, WAC2 eine positive PD-L1 Expression, bei den Negativ-Kontrollen ARPE-19, A549 eine schwache PD-L1 Expression.

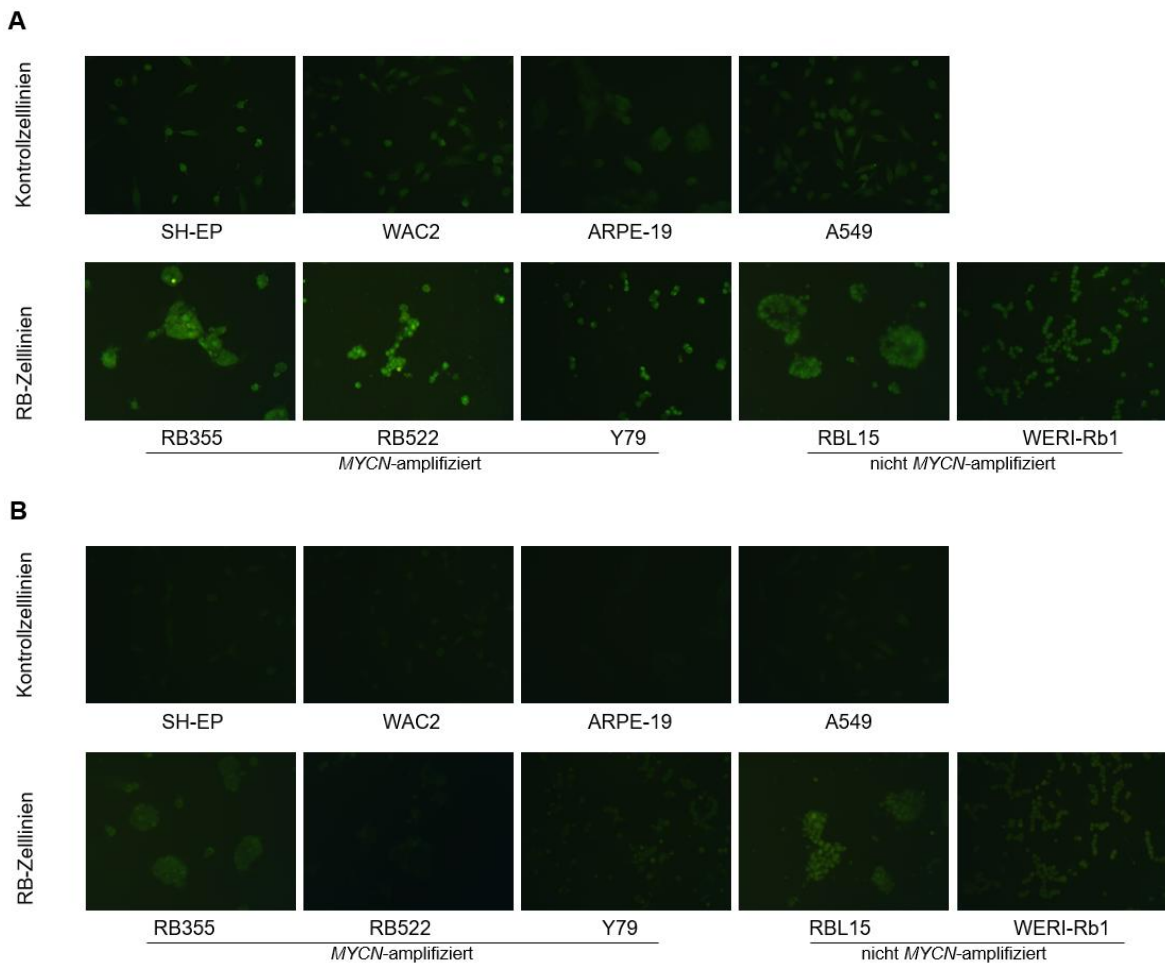


Abbildung 10: PD-L1 Immunfärbung, 40er Vergrößerung. A: Die Expression von PD-L1 konnte in den RB-Zelllinien in unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden (grün). Eine ausschließlich randständige Färbung konnte nicht festgestellt werden, am ehesten zeigte sich eine solche Tendenz bei der Zelllinie RBL 15. **B:** Kontrollfärbung, nur Zweit-Antikörper ohne PD-L1 Erst-Antikörper.

Bei den Retinoblastomzelllinien sah man in allen untersuchten Fällen eine PD-L1 Expression, allerdings in unterschiedlichen Ausprägungen. So war die Expression bei RB522 am stärksten, bei Y79 am geringsten. Eine unterschiedliche Expression der Zellen innerhalb und außerhalb gelegener Zellen der Zellcluster ließ sich am ehesten bei RBL15 erahnen. Dies schien jedoch nicht repräsentativ für Retinoblastomzelllinien zu sein, sodass das Wachsen in Clustern nicht alleinig für die Variabilität der PD-L1 Expression verantwortlich sein konnte.

5.2.4 PD-L1 Färbung primärer Retinoblastomtumore

Zusätzlich zur Charakterisierung der PD-L1 Expression bei Retinoblastomzelllinien wurde die PD-L1 Expression auf primären Retinoblastomtumoren untersucht. Die Auswertung der Färbungen nach den verschiedenen Scores ist in Tabelle 41 aufgeführt. Zwei der sieben Tumore waren nach dem TPS (siehe Tabelle 37) niedrig PD-L1 positiv und mit einem TC-Score (siehe Tabelle 36) von 1 definiert. Die restlichen fünf Tumore waren nach dem TPS PD-L1 negativ und mit einem TC-Score von 0 definiert. Exemplarisch sind die histologischen Bilder der zwei PD-L1 positiven Retinoblastomtumore in Abbildung 11 dargestellt. Da nur zwei von sieben Tumoren PD-L1 exprimierten, sollte dies weiterführend in einer größeren Kohorte getestet werden.

Tabelle 41: Auswertung der PD-L1 Tumorfärbung primärer Retinoblastome. Die gefärbten Retinoblastome wurden mittels TC-Score, IC-Score (siehe Tabelle 36) und TPS (siehe Tabelle 37) eingeteilt. Zwei der primären Tumore wiesen einen TPS einer niedrigen PD-L1 Expression entsprechend auf, zusätzlich ein TC-Score von jeweils 1. Die restlichen Färbungen der Retinoblastome ergaben einen TC-Score von 0, mit einem TPS entsprechend keiner PD-L1 Expression. Mehrere Tumore hatten einen höheren IC-Score, unabhängig vom TC-Score oder TPS.

| Proben | PD-L1 positive Tumorzellen | TC-Score | IC-Score | TPS |
|--------|----------------------------|----------|----------|----------|
| 1 | < 1 % | 0 | 0 | < 1 % |
| 2 | 2 % | 1 | 2 | 1 – 49 % |
| 3 | < 1 % | 0 | 1 | < 1 % |
| 4 | 2 % | 1 | 1 | 1 – 49 % |
| 5 | < 1 % | 0 | 0 | < 1 % |
| 6 | < 1 % | 0 | 2 | < 1 % |
| 7 | < 1 % | 0 | 1 | < 1 % |

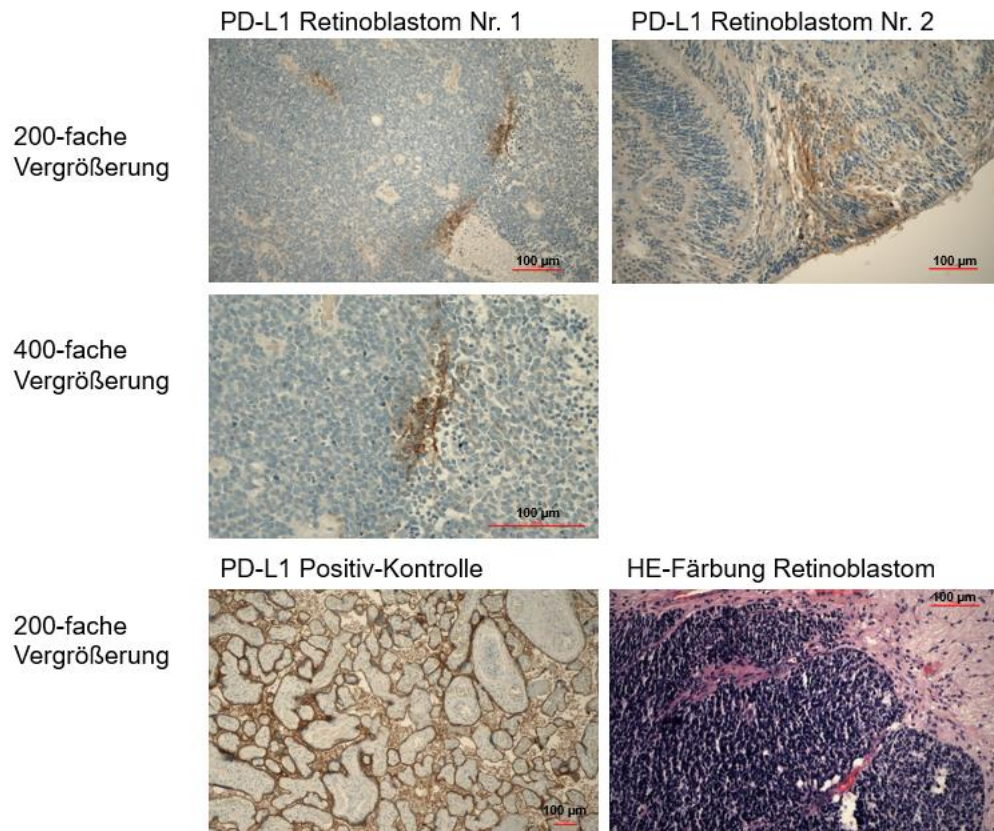


Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von PD-L1 bei primären Retinoblastomen. Exemplarisch sind hier zwei PD-L1 positive Retinoblastom-Tumore dargestellt. Als Positivkontrolle diente Plazentagewebe, hier färbt sich der Synzytiotrophoblast membranständig PD-L1 positiv an. Die PD-L1 Färbungen der primären Retinoblastome zeigten positive Tumorzellcluster (Membranfärbung). Zum Vergleich wurde eine HE-Färbung eines Retinoblastoms durchgeführt.

5.3 Zusammenhang zwischen PD-L1 und MYCN

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression und MYCN Expression zu untersuchen, wurden zunächst Korrelationsanalysen durchgeführt (siehe Abbildung 12). In Abbildung 12A ließ der Korrelationskoeffizient von 0,74 einen linearen Zusammenhang zwischen MYCN und PD-L1 auf RNA-Ebene vermuten. Diese Korrelation konnte in Primärtumoren nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 12B). Auch zwischen c-MYC und PD-L1 konnte weder in Zelllinien noch bei der Reanalyse von Primärtumordaten eine Korrelation zwischen c-MYC und PD-L1 Expression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12C und D).

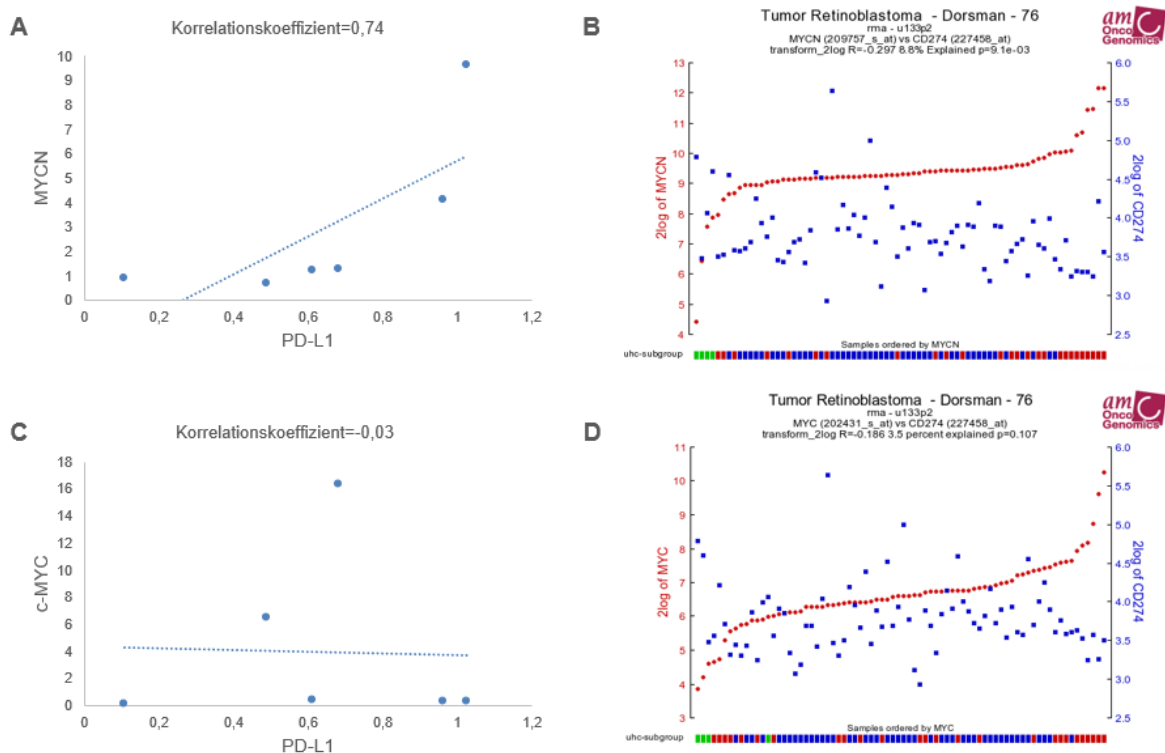


Abbildung 12: Korrelation zwischen PD-L1 und MYCN bzw. c-MYC. Die Korrelation wurde auf Basis der qRT-PCR Daten der MYCN und c-MYC Expression (Abbildungen 5 und 6) der 6 verschiedenen RB-Zelllinien dargestellt. **A:** Korrelation zwischen MYCN und PD-L1, Korrelationskoeffizient 0,74. Je höher die PD-L1 Expression ist, desto höher die MYCN Expression. **B:** Primäre Retinoblastomtumore, Korrelation MYCN und PD-L1 (R2 Daten: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>); (Kooi et al., 2015)). **C:** Korrelation zwischen c-MYC und PD-L1, Korrelationskoeffizient nahe 0, es schien hier keinen linearen Zusammenhang zu geben. **D:** Primäre Retinoblastomtumore, Korrelation c-MYC und PD-L1 (<http://r2.amc.nl>); (Kooi et al., 2015).

Des Weiteren wurden MYCN und PD-L1 auf Protein-Ebene in einem Western Blot untersucht. Es wurde das Standardpanel an Zelllinien verwendet. Als Kontrollmarker wurde Vinculin genutzt, als Negativ-Kontrolle für MYCN wiederum SH-EP und als Positiv-Kontrolle WAC2. Die MYCN Expression der Retinoblastomzelllinien auf der Protein-Ebene korrelierte mit der Expression auf cDNA-Ebene, die bereits durch die qRT-PCR beschrieben wurde.

Die Zelllinien RB 522 und Y79 wiesen hier die höchste MYCN Expression auf. Als Negativ-Kontrolle für PD-L1 wurde hier A459 verwendet, als Positiv-Kontrolle SH-EP. Man erkennt ebenfalls hier eine leicht positive PD-L1 Expression bei allen Retinoblastomzelllinien. Ein Zusammenhang zwischen PD-L1 und MYCN ließ sich aus diesem Experiment nicht ableiten. So zeigte sowohl die Neuroblastomzelllinie SH-EP als auch deren MYCN exprimierende Sublinie WAC2 eine sehr hohe PD-L1 Expression.

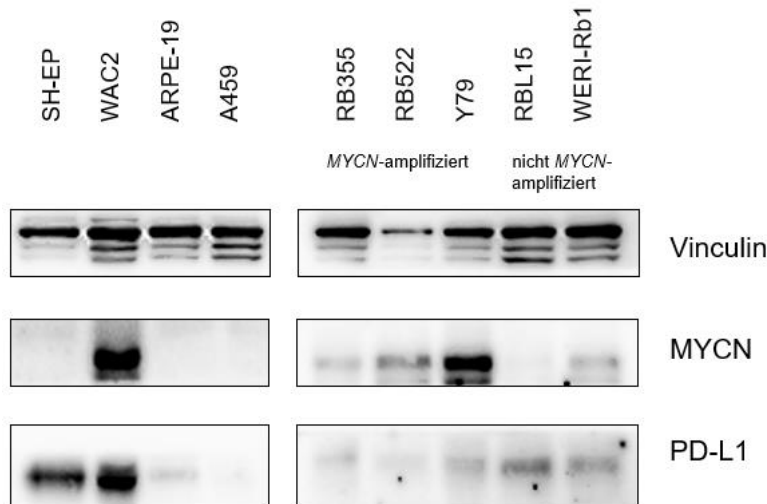


Abbildung 13: Nachweis der MYCN und PD-L1 Expression auf Protein-Ebene via Western Blot. Die RB-Zelllinien zeigten eine unterschiedliche, nicht einheitliche Expression von MYCN und PD-L1. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen MYCN und PD-L1 Expression darstellen.

Um nun sicherzustellen, dass es keinen möglichen Einfluss von MYCN auf die PD-L1 Expression gab, wurde das Experiment in einem MYCN-induzierbarem Neuroblastom Zelllinienpanel wiederholt (SH-SY5Y TR-MYCN, SK-N-AS TR-MYCN, SK-N-SH TR-MYCN, SH-EP TR-MYCN). In diesen Zelllinien war die MYCN Expression durch einen Tet-Repressor kontrolliert, sodass durch Tetracyclin-Gabe die MYCN Expression induziert werden konnte (Tjaden et al., 2020). Alle Zellen zeigten aber unabhängig vom MYCN Status eine hohe oder niedrige PD-L1 Expression. So fand sich in den Zelllinien SH-SY5Y TR-MYCN und SK-N-AS TR-MYCN eine PD-L1 Expression, die unabhängig von der MYCN Induktion war. Die PD-L1 Expression von SK-N-SH TR-MYCN blieb nach MYCN Induktion unverändert, während die PD-L1 Expression bei SH-EP TR-MYCN in Anwesenheit von MYCN sogar abnahm. Ein Zusammenhang zwischen PD-L1 und MYCN konnte somit nicht nachgewiesen werden.

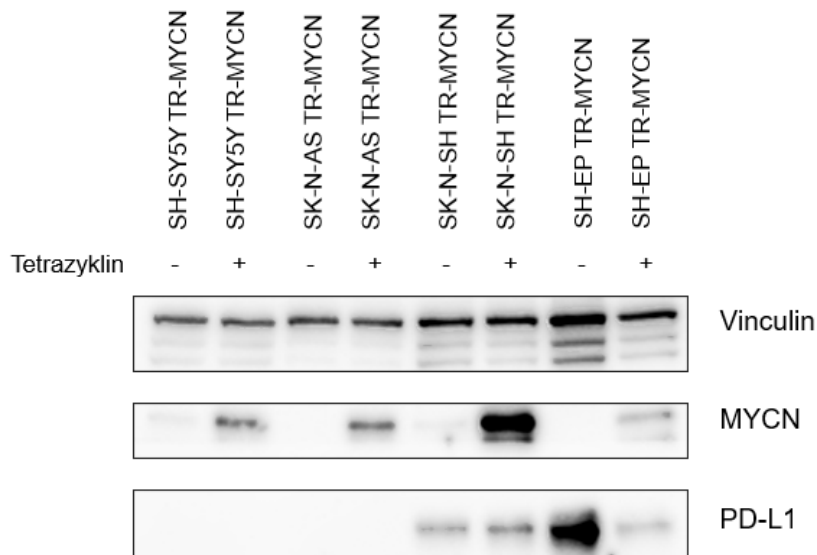


Abbildung 14: Nachweis der MYCN und PD-L1 Expression auf Protein-Ebene via Western Blot in einem ausgewählten Neuroblastom Zelllinienpanel. In diesen Zelllinien ließ sich durch Tetrazyklin-Gabe die MYCN Expression induzieren. Ein Zusammenhang von MYCN und PD-L1 konnte hier nicht gezeigt werden und die MYCN Induktion korrelierte nicht mit einer erhöhten PD-L1 Expression.

5.4 Immun-Profilung von MYCN-amplifizierten und nicht MYCN-amplifizierten Retinoblastomzelllinien

Da keine Korrelation von MYCN und PD-L1 bisher nachweisbar war, wurde ein qRT-PCR basiertes mRNA Immun-Profilung von 84 Immun-assoziierten Genen in sechs verschiedenen Retinoblastomzelllinien durchgeführt. Dabei sollten wiederum die MYCN-amplifizierten RB355, RB522 und Y79 den nicht MYCN-amplifizierten Zelllinien RBL15, RB30 und Weri-Rb1 gegenübergestellt werden. Der Tabelle 42 ist zu entnehmen, dass die meisten Immun-assoziierten Gene in MYCN-amplifizierten Zellen niedriger exprimiert wurden. Die Signifikanzschwelle wurde jedoch nur für vier Gene (CCL21, CSF3, IL1B, IRF1) erreicht. Diese Ergebnisse stellten zumindest einen Hinweis auf einen möglichen MYCN-assoziierten Immun-schwächenden Effekt der Tumorzellen dar. Die restlichen Gene des Profiling-Panels waren nicht exprimiert und sind dementsprechend hier nicht aufgeführt, darunter PD-L1.

Tabelle 42: MYCN-assoziierte Gene, die durch mRNA Immun-Profilung identifiziert wurden. Es wurden zwei RB-Zellliniengruppen untersucht, drei MYCN-amplifizierte (RB355, RB522, Y79) und drei nicht MYCN-amplifizierte (RBL15, RB30, Weri-Rb1) Zelllinien. Die Expression der Immun-Checkpoint-Gene der MYCN-amplifizierten Zellen wurde auf die nicht MYCN-amplifizierten bezogen und die Expressionsunterschiede zwischen beiden Gruppen sind als Faktor angegeben. Man erkennt, dass einige Gene in MYCN-amplifizierten RB-Zellen herunterreguliert wurden, darunter PDCD1 (PD-1) und c-MYC. „*“ Signifikant reguliert, p-Wert < 0,05. „**“ Signifikant reguliert, p-Wert < 0,01.

| hochreguliert | | | | herunterreguliert | | | |
|---------------|--------------------------------|--------|--------|-------------------|---|--------|--------|
| Gen | Beschreibung | Faktor | p-Wert | Gen | Beschreibung | Faktor | p-Wert |
| IL12A | Interleukin 12A | 2,05 | 0,38 | MYC | myelocytomatosis viral related oncogene | 0,05 | 0,15 |
| CXCL10 | C-X-C Motif Chemokin Ligand 10 | 2,52 | 0,44 | BCL2 | C-Cell-Lymphoma 2 | 0,06 | 0,54 |
| CCL28 | CC-Chemokin-Ligand-28 | 2,56 | 0,39 | EGFR | Epidermal-growth-factor-rezeptor | 0,07 | 0,37 |
| IL6 | Interleukin 6 | 3,25 | 0,70 | IL1B** | Interleukin 1B | 0,11 | 0,00 |
| CXCL8 | C-X-C Motif Chemokin Ligand 8 | 4,15 | 0,38 | TLR2 | Toll-like-rezeptor 2 | 0,11 | 0,15 |
| CCL2 | CC-Chemokin-Ligand-2 | 4,24 | 0,10 | GZMA | Granzyme A | 0,15 | 0,14 |
| GBP1 | Guanylate Binding Protein 1 | 5,04 | 0,42 | CSF1 | Colony-stimulating-factor 1 | 0,17 | 0,06 |
| KITLG | KIT Ligand | 5,37 | 0,39 | CCL21* | CC-Chemokin-Ligand-21 | 0,19 | 0,02 |
| CCR4 | CC-Chemokin-Rezeptor Typ 4 | 6,46 | 0,29 | IDO1 | Indolamin-2,3-Dioxygenase | 0,20 | 0,36 |
| CXCL11 | C-X-C Motif Chemokin Ligand 11 | 13,48 | 0,22 | CCR10 | CC-Chemokin-Rezeptor Typ 10 | 0,21 | 0,18 |
| IGF1 | Insulin-like-growth-factor 1 | 29,26 | 0,27 | CSF3* | Colony-stimulating-factor 3 | 0,21 | 0,03 |
| | | | | EGF | Epidermal-growth-factor | 0,22 | 0,41 |
| | | | | IL10 | Interleukin 10 | 0,22 | 0,37 |
| | | | | ACKR3 | Atypical chemokine receptor 3 | 0,24 | 0,45 |
| | | | | CSF2 | Colony-stimulating-factor 2 | 0,26 | 0,38 |
| | | | | CXCL1 | C-X-C Motif Chemokin Ligand 1 | 0,26 | 0,70 |
| | | | | CCR7 | CC-Chemokin-Rezeptor Typ 7 | 0,29 | 0,14 |
| | | | | CTLA4 | cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 | 0,29 | 0,33 |
| | | | | CXCR4 | C-X-C Motif Chemokin Rezeptor 4 | 0,29 | 0,94 |
| | | | | HLA-A | human leukocyte antigen-A | 0,29 | 0,24 |
| | | | | FASLG | FAS Ligand | 0,31 | 0,37 |
| | | | | IL4 | Interleukin 4 | 0,35 | 0,48 |
| | | | | PDCD1 | programmed cell death protein 1 | 0,35 | 0,31 |
| | | | | IRF1* | Interferon-regulatory-factor 1 | 0,36 | 0,03 |
| | | | | CXCL2 | C-X-C Motif Chemokin Ligand 2 | 0,37 | 0,49 |
| | | | | TP53 | tumour protein p53 | 0,37 | 0,46 |
| | | | | CXCR3 | C-X-C Motif Chemokin Rezeptor 3 | 0,39 | 0,40 |
| | | | | MICA | MHC class I polypeptide-related sequence A | 0,44 | 0,45 |
| | | | | GZMB | Granzyme B | 0,50 | 0,42 |

5.5 T-Zell-Interaktion mit Retinoblastomzellen unter dem Einfluss des PD-1 Inhibitors Pembrolizumab

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung des Immun-Checkpoints PD-1/PD-L1 beim Retinoblastom eruiert werden, insbesondere inwiefern dieser für einen möglichen Angriffspunkt in der Krebstherapie genutzt werden kann. Dazu wurde die Interaktion zwischen Retinoblastomzellen und CD4 positiven T-Helferzellen in einem Proliferations- und Apoptoseassay untersucht, wobei auch der Einfluss des PD-1 Inhibitors Pembrolizumab analysiert wurde.

5.5.1 Stimulation der PD-1 und PD-L1 Expression in T- und Retinoblastomzellen

Um einen möglichen Effekt in diesen Experimenten auf die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 beziehen zu können, wurden beide Oberflächenproteine auf den jeweiligen Zellen stimuliert, um eine hohe Expression zu gewährleisten. In der Abbildung 15 konnte man erkennen, dass die Retinoblastomzellen unter dem Einfluss von Interferon- γ PD-L1 deutlich höher exprimierten: ohne Interferon- γ Stimulation waren 25 % der Zellen PD-L1 positiv, während nach Stimulation 67,23 % der Zellen positiv waren. Ebenfalls ließ sich bei den T-Zellen erkennen, dass die Expression von PD-1 vor Stimulation mit OKT3 beschichteten Microbeads deutlich geringer war (9 % der Zellen) als nach OKT3-Stimulation (32,7 % der Zellen).

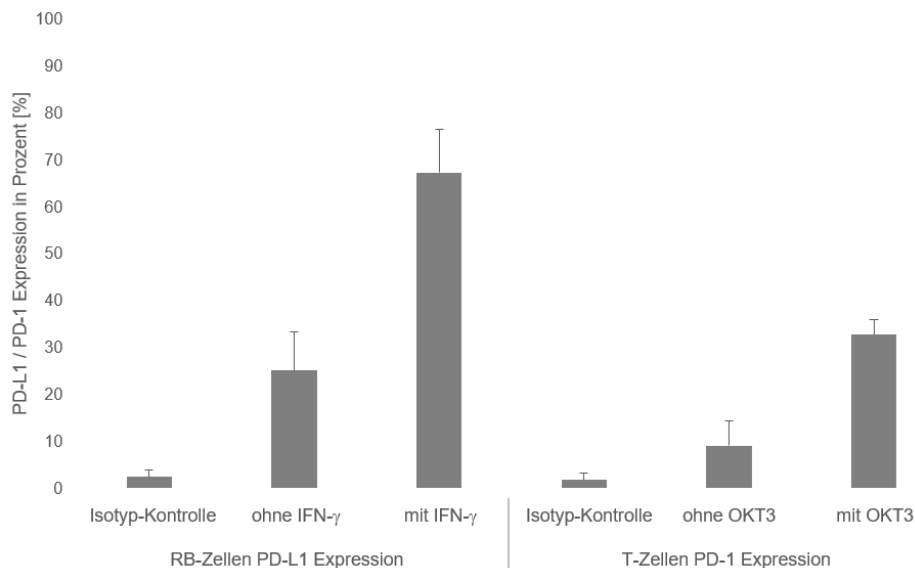


Abbildung 15: Stimulation der PD-L1 Expression in RB-Zellen (Y79) und der PD-1 Expression auf T-Zellen durch Interferon- γ bzw. OKT3. Die Oberflächenexpression von PD-L1 auf RB-Zellen konnte durch Interferon- γ nach 72 h induziert werden. Ebenfalls konnte die PD-1 Expression in den T-Zellen durch OKT3 beschichtete Microbeads nach 48 h stimuliert werden. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- Standardabweichung) von 3 Experimenten. Die Bestimmungen erfolgten mittels Durchflusszytometrie.

5.5.2 Festlegung der Konzentration des PD-1 Inhibitors Pembrolizumab

Um auszuschließen, dass eine zu hohe Konzentration des PD-1 Inhibitors Pembrolizumab einen toxischen Einfluss auf die Zellen hat, wurden in einem MTT-Assay verschiedene Konzentrationen (1-5 µg/ml) untersucht. Zur Kontrolle wurden auch jeweils Retinoblastomzellen und T-Zellen allein, ohne oder mit OKT3 bzw. Interferon- γ Stimulation ausplattiert. Man konnte erkennen, dass sowohl nach 76 h (siehe Abbildung 16A) als auch nach 96 h (siehe Abbildung 16B) kein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität hinsichtlich der verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors vorlag. Dementsprechend wurde eine Konzentration von 2 µg/ml des PD-1 Antikörpers Pembrolizumab für die Ko-Kultivierungsversuche festgelegt.

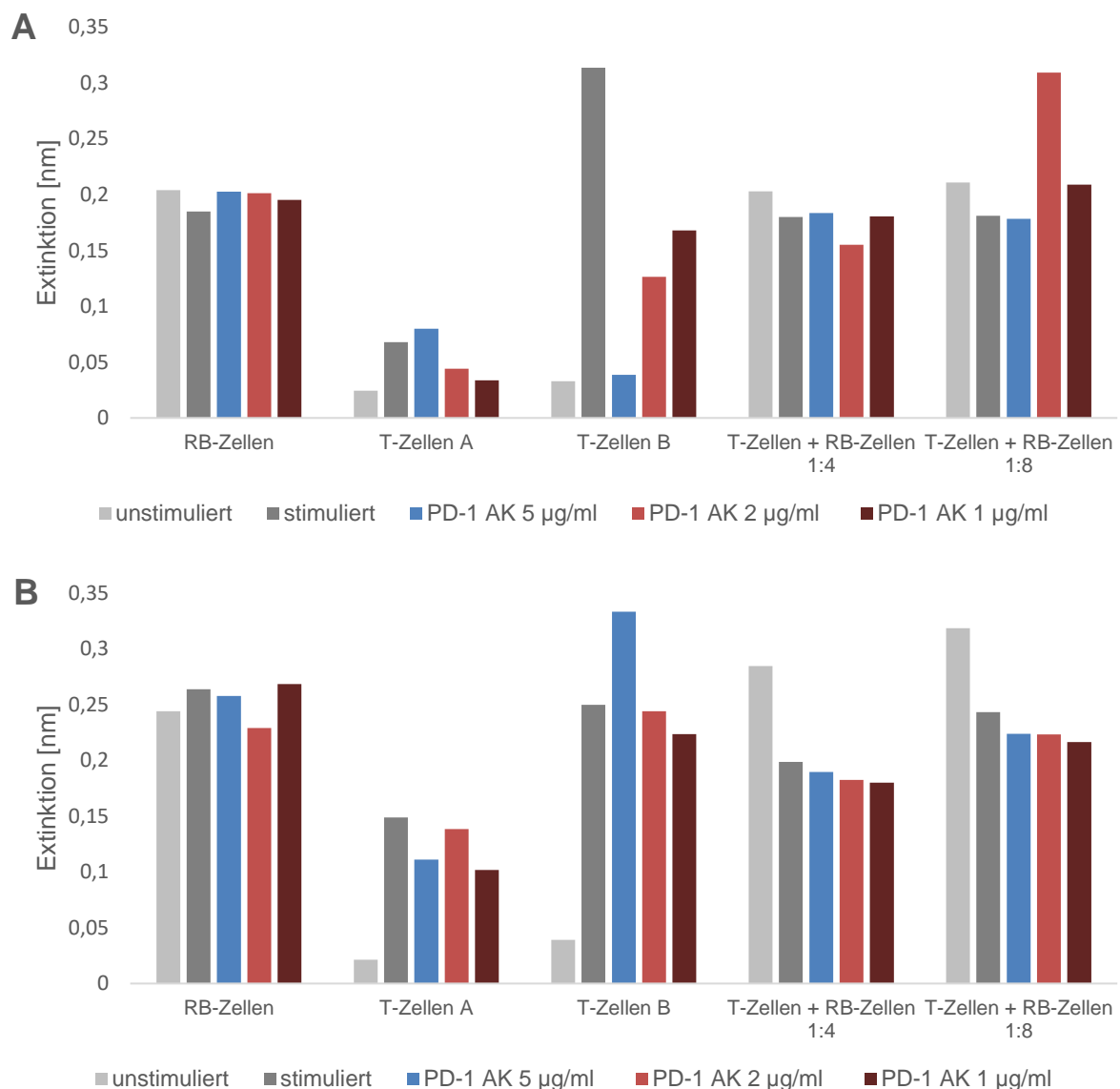


Abbildung 16: MTT-Assay zur Festlegung der optimalen Konzentration von Pembrolizumab (PD-1 AK) für nachfolgende Ko-Kultivierungsversuche mit T-Zellen und RB-Zellen. T-Zellen A: 100.000 c/Well, T-Zellen B: 200.000 c/Well. **A:** MTT nach 72 h. **B:** MTT nach 96 h. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen des PD-1 Antikörpers.

5.5.3 Einfluss eines PD-1 Inhibitors auf das Proliferationsverhalten von T-Zellen in Ko-Kultur mit Retinoblastomzellen

Nachdem die Ko-Kultivierung von stimulierten T-Zellen und Retinoblastomzellen etabliert war, sollten Proliferation und Apoptose untersucht werden. Im Proliferationsassay sollte speziell das Teilungsverhalten der T-Zellen im Hinblick auf eine mögliche Inhibierung durch die Retinoblastomzellen beurteilt werden. Dabei wurde das Proliferationsverhalten der T-Zellen sowohl mit als auch ohne Einfluss von Pembrolizumab, einem PD-1-Antikörper, betrachtet. Pembrolizumab ist ein etabliertes Medikament zur Inhibition der PD-1 / PD-L1 Interaktion, um bei Krebspatienten eine durch den Immun-Checkpoint unterdrückte Immunantwort zu verhindern.

In Abbildung 17 ist die Proliferation der T-Zellen unter den unterschiedlichen Ko-Kultivierungsbedingungen dargestellt. Die Proliferation der T-Zellen war generell unter OKT3-bead-Stimulation höher als ohne Stimulation. Dabei war es unerheblich, ob Retinoblastomzellen mit kultiviert waren und ob diese mit Interferon- γ stimuliert worden waren. Auch schien die Anwesenheit von Pembrolizumab keinen Einfluss auf die Teilungsfähigkeit der T-Zellen zu haben.

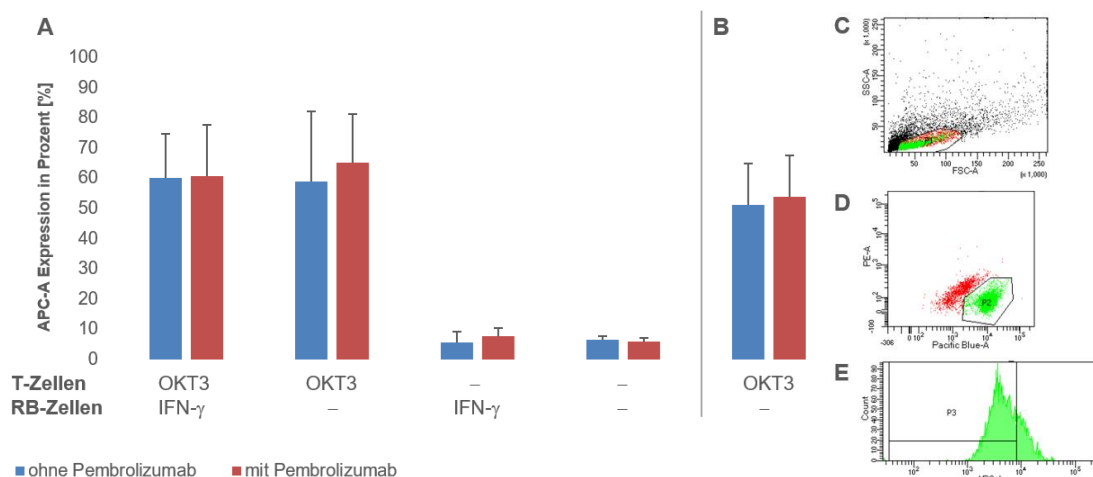


Abbildung 17: T-Zell-Proliferation unter verschiedenen Ko-Kultivierungsbedingungen, mit und ohne Anwesenheit von Pembrolizumab. A/B: Y-Achse: Analysierte T-Zellen. X-Achse: Ko-Kultivierungsbedingungen (siehe Tabelle 40). A: T-Zellen und RB-Zellen ko-kultiviert. B: T-Zellen isoliert kultiviert. Es ließ sich kein Effekt der PD-1 Inhibition und damit vermittelter T-Zell-Inhibition durch Pembrolizumab erkennen. Die Anwesenheit der RB-Zellen wies ebenfalls keinen Effekt auf das Proliferationsverhalten der T-Zellen auf. C-E: Gating-Strategie der T-Zellen am Beispiel einer einzelnen Probe. C: Gating der lebenden Zellen. D: Gating auf CD4 positive T-Zellen (via Pacific Blue). E: Gating der T-Zellen, die durch Proliferation eine verminderte Intensität an APC Farbstoff aufweisen.

5.5.4 Einfluss der PD-1 Inhibition durch Pembrolizumab auf das Apoptoseverhalten von T-Zellen und Retinoblastomzellen

Des Weiteren wurde ein Apoptoseassay durchgeführt, um die Sterberate von sowohl T-Zellen als auch Retinoblastomzellen unter den Ko-Kultivierungsbedingungen und dem Einfluss von Pembrolizumab zu charakterisieren. Es wurden die CD171 positiven Retinoblastomzellen und die CD4 positiven T-Zellen in die Auswertung genommen. Dabei wurden einmal die spät-apoptotischen Zellen, die sowohl Annexin als auch 7AAD positiv waren, betrachtet, als auch die früh-apoptotischen Zellen, die Annexin positiv und 7AAD negativ waren. Wie bereits im Proliferationsassay wurde auch hier der Einfluss von Pembrolizumab auf die Apoptose verglichen. Die Gating-Strategie des Experimentes ist in Abbildung 19 an einem Beispiel verdeutlicht. Betrachtet man Abbildung 18A bis D erkennt man, dass sehr wenige Zellen am Ende der Ko-Kultivierung spät-apoptotisch waren. Dabei schien es unerheblich zu sein, in welcher Konstellation die T-Zellen und Retinoblastomzellen ko-kultiviert wurden (ob stimuliert oder nicht stimuliert). Im Gegensatz dazu wiesen die allein kultivierten Retinoblastomzellen einen hohen Anteil an spät-apoptotischen Zellen auf (84,38 %).

In Abbildung 18E bis H sind nun die früh-apoptotischen Zellen aufgetragen. Man erkennt, dass der größte Anteil der Zellen in der Ko-Kultivierung sich in der Apoptose befand. Dabei schien wiederum die Bedingung der Ko-Kultivierung kaum eine Rolle zu spielen. Ebenfalls ließ sich kein Einfluss von Pembrolizumab auf die Apoptoserate der Zellen erkennen.

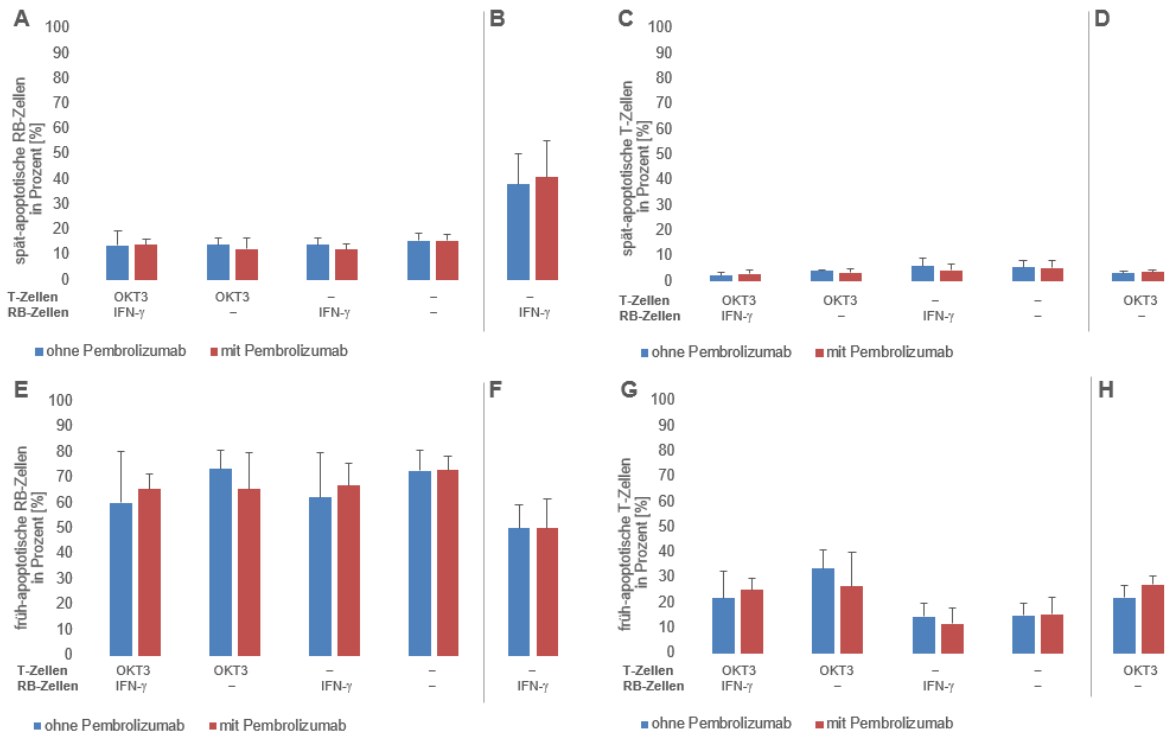


Abbildung 18: Apoptoseassay ko-kultivierter T- und RB-Zellen. Y-Achse: Analytierte Zellen (RB- oder T-Zellen). X-Achse: Ko-Kultivierungsbedingungen (siehe Tabelle 40). **A/C/E/G:** T-Zellen und RB-Zellen ko-kultiviert. **B/D/F/H:** T-Zellen oder RB-Zellen isoliert kultiviert. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen des jeweiligen Zelltyps. **A/B:** Anteil der spät-apoptischen RB-Zellen; die RB-Zellen allein kultiviert wiesen den höchsten prozentualen Anteil an toten Zellen auf. **C/D:** Anteil der spät-apoptischen T-Zellen; es fanden sich hier unabhängig von den Kultivierungsbedingungen kaum spät-apoptische Zellen. **E/F:** Anteil der früh-apoptischen RB-Zellen; hier fanden sich unter allen Kultivierungsbedingungen sehr viele früh-apoptische RB-Zellen. **G/H:** Anteil der früh-apoptischen T-Zellen; unter allen Kultivierungsbedingungen waren die T-Zellen stark früh-apoptisch.

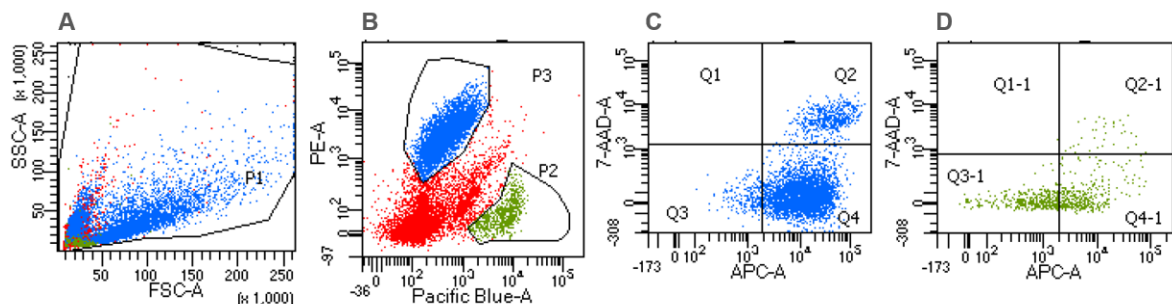


Abbildung 19: Gating-Strategie beim Apoptoseassay. **A:** Übersicht der gesamten Zellen. **B:** Gating der CD171 positiven RB-Zellen (via PE, in grün) und der CD4 positiven T-Zellen (via Pacific Blue, in blau). **C:** Gating der früh- und spät-apoptotischen RB-Zellen via 7AAD und Annexin (APC). **D:** Gating der früh- und spät-apoptotischen T-Zellen via 7AAD und Annexin (APC).

5.5.5 Bestimmung von Zytokinen im Überstand der Ko-Kultur von RB-Zellen und T-Zellen nach Behandlung mit Pembrolizumab

Der Regulation von Apoptose-Mechanismen in Tumorzellen liegt ein hoch-komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Botenstoffen und Signalinduktoren zugrunde. Um eventuelle Kompensationsmechanismen der Tumorzellen in Anwesenheit von T-Zellen charakterisieren zu können, die durch eine alleinige Inhibierung mit Pembrolizumab nicht unterdrückt werden konnten, führten wir eine Messung ausgewählter Zytokine durch. Es wurden die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), Interleukin 6 (IL6), Interleukin 8 (IL8) und Interleukin 10 (IL10) aus dem Überstand der Zellen im Apoptoseassay gemessen. Dabei erkennt man, dass im Überstand der allein kultivierten Retinoblastomzellen ein sehr geringer Level der Zytokine zu finden war. Nachweisbare Mengen an den oben genannten Zytokinen fanden sich nur in Anwesenheit von T-Zellen, die Level der Zytokine bei den ko-kultivierten Zellen unterschieden sich allerdings kaum zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen.

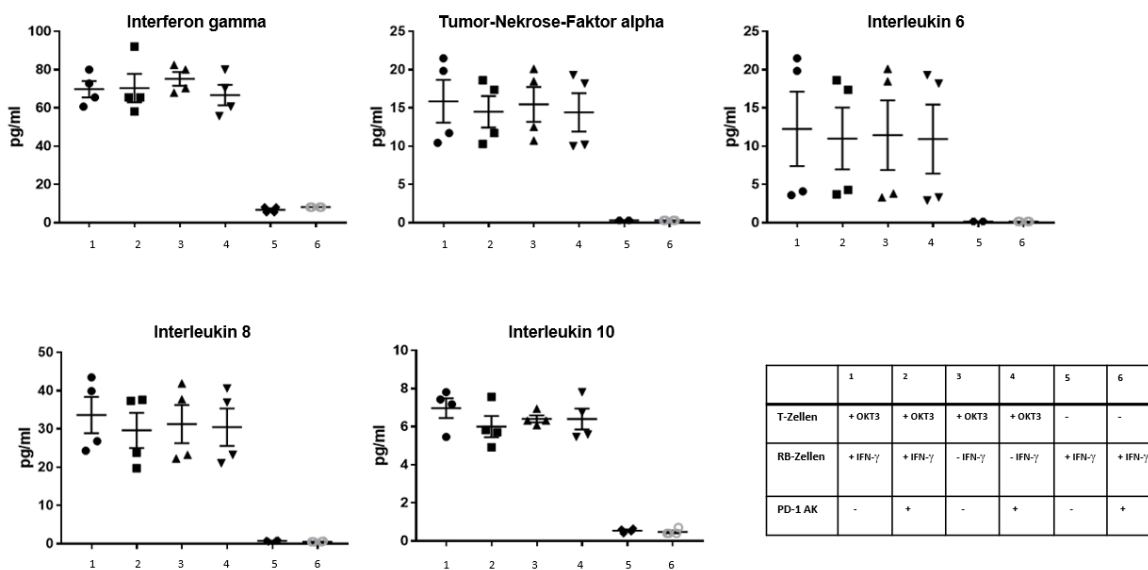


Abbildung 20: Zytokinmessung im Überstand ko-kultivierter T-Zellen und RB-Zellen. Die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), Interleukin 6 (IL6), Interleukin 8 (IL8) und Interleukin 10 (IL10) wurden im Zellüberstand der Ko-Kultivierung gemessen. Tabellarisch sind die aufgeführten Proben 1-6 erläutert: +/- OKT3, +/- IFN- γ , +/- PD-1 AK (Pembrolizumab). Die Level der Zytokine bei den unterschiedlichen Ko-Kultivierungsbedingungen unterschieden sich nicht signifikant.

6 DISKUSSION

Die Behandlungsmöglichkeiten beim fortgeschrittenen Retinoblastom sind trotz stetiger Forschung und bereits verbesserten Optionen mit verringerter Morbidität (Chawla & Singh, 2017) weiterhin begrenzt (Sachdeva & O'Brien, 2012). Daher ist es notwendig, neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln (Schwermer et al., 2019; Usui et al., 2006). Die Immuntherapie als Option bei der Krebsbehandlung ist bereits in vielen verschiedenen Tumorentitäten etabliert (Singh et al., 2020) und sollte daher auch beim Retinoblastom untersucht werden. Die bisher klinisch zugelassenen Antikörper richten sich in erster Linie gegen PD-1 bzw. PD-L1, aber die genauen regulatorischen Prozesse und Hintergründe des PD-1/PD-L1 Immun-Checkpoints sind bisher noch nicht vollständig geklärt (Juneja et al., 2017; Usui et al., 2006). In dieser Arbeit sollten erste Hinweise zu PD-1/PD-L1 als mögliches Target beim Retinoblastom erhoben werden.

6.1 Expression von MYCN im Retinoblastom

Wie bereits in 1.2.1 erwähnt, liegt bei einer Untergruppe der Retinoblastome eine *MYCN*-Amplifikation vor (Lee et al., 1984). Um den Einfluss einer *MYCN*-Amplifikation auf die Immuntherapie einzuschätzen, wurden in dieser Arbeit Zellen mit und ohne *MYCN*-Amplifikation untersucht. Generell konnten wir zeigen, dass *MYCN* in allen Retinoblastomzellen hoch exprimiert vorlag, wobei die *MYCN*-amplifizierten Zellen (Y79, RB522) im Vergleich zu nicht amplifizierten Zellen noch höhere Expressionslevel aufwiesen.

Die Eigenschaften von Zellkulturlinien unterscheiden sich in gewisser Weise von den Eigenschaften Zellen primärer Tumore. Da es bisher kaum verwendbare *in vivo* Tiermodelle in der Retinoblastomforschung gibt (Schwermer et al., 2019), sind die Möglichkeiten weiterer Experimente außerhalb der *in vitro* Zellkulturversuche begrenzt. Daher wurden in dieser Arbeit hauptsächlich *in vitro* Modelle genutzt. Nittner et. al. beschrieben ein genetisches Mausmodell, in dem sowohl RB1 als auch p107 und p53 deletiert wurden (Nittner et al., 2012). Des Weiteren gibt es ein Mausmodell, in dem *MYCN* überexprimiert und *RB1* inaktiviert wird (N. Wu et al., 2017).

Ein nächster Schritt wäre hier, einen Vergleich zu primären Retinoblastomtumoren zu ziehen, jedoch sind explantierte Tumore selten kultivierbar (Schwermer et al., 2019). In der Zellkultur gibt es generell mehr Zelllinien mit einer *MYCN*-Amplifikation, da diese vermutlich einen Überlebensvorteil darstellt und sich einfacher kultivieren lassen.

Es gibt Hinweise, dass eine *MYCN*-Amplifikation mit aggressiveren Verläufen und einer Metastasierung einhergehen könnten. Rushlow et al. beschrieben, dass Retinoblastome

mit einer *MYCN*-Amplifikation bereits bei jüngeren Kindern auftreten (Rushlow et al., 2013), die generell herausfordernd bezüglich der Therapie sind.

Sowohl *MYCN* als auch *c-MYC* sind in Retinoblastomzelllinien exprimiert (siehe Abbildungen 5 und 6). Die Antikorrelation zwischen *c-MYC* und *MYCN* Expression konnte dabei in dieser Arbeit für das Retinoblastom bestätigt werden (siehe Abbildung 7), da *c-MYC* die Funktion von *MYCN* übernehmen kann. Auch in verschiedenen Neuroblastomzelllinien zeigte sich eine *c-MYC* Expression in nicht *MYCN*-amplifizierten Zelllinien und eine fehlende Expression in *MYCN*-amplifizierten Zelllinien (Blanc et al., 2003), sowie bei Ausschalten von *MYCN* erhöhte *c-MYC* Level (Le Grand et al., 2020). Einen Zusammenhang zwischen *c-MYC* und PD-L1 konnte nicht erhärtet werden, insbesondere zeigte sich keine lineare Korrelation der RNA- und Proteinexpression (siehe Abbildung 12).

6.2 Expression von PD-L1 im Retinoblastom

Die Expression von PD-L1 konnte in allen hier verwendeten Retinoblastomzelllinien nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8). Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen *MYCN*-amplifizierten und nicht amplifizierten Zellen. Bei den *MYCN*-amplifizierten Zelllinien war eine größere Streuung der PD-L1 Expression zu vermerken. Die Zelllinie RB355 stellte hier einen Ausreißer mit deutlich niedrigeren PD-L1 Leveln dar, sowohl auf mRNA-Ebene (siehe Abbildung 8) als auch auf Protein-Level (siehe Abbildung 9). Die Zelllinie RB355 war die einzige adhärente Zelllinie in dem verwendeten Retinoblastom Zelllinienpanel. Allerdings zeigten die ebenfalls adhärenen Neuroblastomzelllinien SH-EP und WAC2 und die Zelllinie ARPE-19 hohe PD-L1 Level, weswegen eine Korrelation zwischen Zell-Adhärenz und PD-L1 Status wenig wahrscheinlich ist. Die PD-L1 Expression bei nicht *MYCN*-amplifizierten Zelllinien waren geringer als die Level der *MYCN*-amplifizierten Zelllinien RB552 und Y79. Einen Zusammenhang zwischen PD-L1 und *MYCN* auszumachen, bliebe in weiteren Zelllinien zu bestätigen (siehe Abbildung 8). In der Durchflusszytometrie lag die PD-L1 Expression der Retinoblastomzelllinien mit Ausnahme von RB355 auf einem ähnlichen Level (siehe Abbildung 9).

Interessanterweise konnte man bei einigen Zelllinien, beispielsweise WERI-Rb1, in der Durchflusszytometrie zwei Populationen mit unterschiedlich starker PD-L1 Expression erkennen (siehe Abbildung 9C). Methodenkritisch ist hier anzumerken, dass die Retinoblastomzellen in Zellclustern und nicht einzeln wachsen. Daher müssen diese extern vereinzelt werden, um die Zellen mit einem Antikörper markieren zu können. Um zu prüfen, ob die beiden Populationen mit unterschiedlicher PD-L1 Expression darauf zurückzuführen

sind, dass die in den Zellclustern außen liegenden Zellen PD-L1 positiv sind, die innen liegenden jedoch negativ, wurde eine Immunfärbung (siehe Abbildung 10) durchgeführt. Hier gab es bei der Zelllinie RBL15 Hinweise, dass die innenliegenden Zellen schwächer angefärbt waren als die außen liegenden Zellen. Bei den restlichen Zelllinien ließ sich die Vermutung nicht bestätigen. Alsaab et al. beschrieben, dass die PD-L1 Expression in Tumoren nicht gleichmäßig sein muss und von verschiedenen Faktoren abhängig sein kann (Alsaab et al., 2017). Daher wäre hier eine genauere Untersuchung mit weiteren Experimenten unter Verwendung von Zellen vor und nach Separation/Aggregation eine sinnvolle Möglichkeit, diese Hypothese zu bestätigen oder auszuschließen.

Um die Ergebnisse, die anhand von Zelllinien generiert wurden, in Primärtumoren zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit auch Primärtumore auf PD-L1 Expression untersucht. Von den insgesamt sieben untersuchten Tumoren waren nur zwei schwach positiv. Ob dies nun einen signifikanten Unterschied zu den Zelllinien in Kultur darstellt, lässt sich anhand des sehr kleinen untersuchten Tumor pools nicht repräsentieren. Daher wären hier größere Versuchsreihen mit Primärtumoren, Zweittumoren oder Metastasen durchaus sinnvoll. Da jedoch in der Regel sehr wenig Tumormaterial von resezierten Retinoblastomen zur Verfügung steht (Schwermer et al., 2019), müssen die Erfolgsaussichten dieser Versuche sehr kritisch bewertet werden. Interessant wäre jedoch, ob es einen Unterschied bezüglich der PD-L1 Expression zwischen Primärtumoren und Zweittumoren/Metastasen gibt. Da das Auge ein immun-privilegiertes Organ ist (Keino et al., 2018), wäre PD-L1/PD-1 als therapeutisches Target eher für die weit fortgeschrittenen, metastasierten Retinoblastom-Patienten zu verwenden. Kürzlich publizierte Daten weisen darauf hin, dass PD-1/PD-L1 Expression beim Retinoblastom mit fortgeschrittenen Stadien sowie einer verstärkten Tumordinvasion assoziiert ist (Singh et al., 2020).

6.3 Zusammenhang zwischen MYCN und PD-L1 im Retinoblastom

In einer hochrangig publizierten Arbeit (Casey et al., 2016) wurde PD-L1 als transkriptionelles Target von MYC beschrieben. Einen eindeutigen Zusammenhang zwischen MYCN, MYC und PD-L1 ließ sich in dieser Arbeit für das Retinoblastom nicht feststellen. Eine Korrelationsanalyse von mRNA Daten zeigte eine leicht positive Korrelation zwischen MYCN und PD-L1 (siehe Abbildung 12). Jedoch konnte diese Tendenz im Western Blot nicht bestätigt werden, hier waren in den verschiedenen Zelllinien MYCN und PD-L1 unabhängig voneinander exprimiert (siehe Abbildung 13). Ein Retinoblastom Zellliniensystem mit induzierbarem MYCN konnte angesichts der bereits intrinsisch hohen MYCN Expression in Retinoblastomzellen nicht sinnvoll etabliert werden,

daher wurde in dieser Arbeit auf ein bereits bestehendes Neuroblastom Zellliniensystem zurückgegriffen (Tjaden et al 2020). Auch in diesen MYCN-induzierbaren Neuroblastomzelllinien konnte kein Zusammenhang zwischen MYCN und PD-L1 dargestellt werden. Interessanterweise nahm bei der Zelllinie SH-EP TR-MYC die PD-L1 Expression nach Einschalten der MYCN Expression sogar ab (siehe Abbildung 14). Eine Korrelation zwischen c-MYC und PD-L1 wurde ebenfalls nicht beobachtet (siehe Abbildung 12). In dem vergleichenden Immun-Profilung zwischen *MYCN*-amplifizierten und nicht *MYCN*-amplifizierten Zellen war PD-L1 nicht reguliert, PD-1 und MYC hingegen in den *MYCN*-amplifizierten Zellen herunterreguliert (siehe Tabelle 42).

6.4 Interaktion von T-Zellen und RB-Zellen unter dem Einfluss eines PD-1 Antikörpers

In dieser Arbeit sollte des Weiteren die therapeutische Relevanz der Immuntherapie beim Retinoblastom beurteilt werden. Dazu wurde der PD-1 Inhibitor Pembrolizumab verwendet, der bereits für die Behandlung des metastasierten malignen Melanoms und weiterer Entitäten zugelassen ist. Die FDA vergab unter anderem eine Zulassung beim Melanom, NSCLC, Urothelkarzinom und Ösophaguskarzinom (Santarpia et al., 2020). Ebenfalls ist beschrieben, dass Pembrolizumab beispielsweise in Kombination mit einer neoadjuvanten Chemotherapie bei Brustkrebs das Therapieansprechen verbesserte (Schmid et al., 2020). Pembrolizumab wird außerdem für Chemotherapie-refraktäre PD-L1 positive gastroösophageale Karzinome genutzt (Hsu et al., 2020).

Zunächst wurde die Interaktion zwischen T-Zellen und Retinoblastomzellen untersucht. Wie bereits unter 1.3 beschrieben, nutzen einige Tumore die Interaktion von PD-1 und PD-L1, um Immunreaktionen zu unterdrücken (Dong et al., 2002). Unter anderem scheint insbesondere die Interaktion zwischen Tumorzelle und T-Zelle eine essenzielle Rolle zu spielen. Durch einen PD-1 Antikörper kann das Immunsystem reaktiviert werden und sich dieses somit gegen den Tumor richten (Wolchok & Chan, 2014). PD-L1 auf Retinoblastomzellen kann durch Interferon- γ hochreguliert werden (Usui et al., 2006), dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Abbildung 15).

In den durchgeführten Ko-Kultivierungsexperimenten konnte kein Einfluss des PD-1 Antikörpers Pembrolizumab auf die Proliferation und das Apoptoseverhalten der T-Zellen und Retinoblastomzellen gezeigt werden. Das Apoptoseassay zeigte dabei eine hohe Apoptoserate der Retinoblastomzellen unabhängig von der Anwesenheit des PD-1 Antikörpers (Abbildung 18).

In den Ko-Kultivierungsexperimenten wurden ausschließlich CD4 positive T-Zellen (T-Helferzellen) verwendet. Ein Versuch mit CD8 positiven T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) wäre ein sinnvoller nächster Schritt, um zu differenzieren, ob CD4 oder CD8 positive T-Zellen unterschiedliche Effekte auf Retinoblastomzellen haben.

Aufgrund des PD-1/PD-L1 Checkpoints wurden durch Tumorzellen CD8 positive T-Zellen gehemmt (Chen et al., 2012), dabei wurde das Verhältnis von CD8 positiven und regulatorischen T-Zellen verschoben (Juneja et al., 2017). Eine Blockade von PD-1/PD-L1 wiederum reduzierte die Apoptoserate der CD8 positiven T-Zellen (Chen et al., 2012). Usui et. al. beschrieben außerdem, dass die Proliferation von (CD3 positiven) T-Zellen durch die Blockade von PD-1/PD-L1 erhöht wurde (Usui et al., 2006).

Dementsprechend sollte eine Inhibition von PD-1/PD-L1 sowohl die Zytotoxizität CD8 positiver Zellen als auch die Zytokinproduktion erhöhen (Juneja et al., 2017). Ein weiterer möglicher Versuchsansatz wäre also, verschiedene T-Zelltypen in die Analyse einzubeziehen. Die regulatorischen T-Zellen (Treg), ein Subtyp der CD4 positiven T-Zellen, scheinen ebenfalls über PD-1 einen immunsuppressiven Effekt zu haben. So können sie PD-1 vermittelt Effektor T-Zellen inhibieren. Des Weiteren ist beschrieben, dass eine durch PD-1/PD-L1 beeinflusste Konversion von CD4 positiven T-Zellen in regulatorische T-Zellen möglich ist (Alsaab et al., 2017; Francisco et al., 2010).

In dem hier beschriebenen Versuchssetting kann man nicht ausschließen, ob weitere Zelltypen für die Interaktion zwischen T-Zellen und Retinoblastomzellen notwendig sind. Klinisch ist das insofern relevant, als dass beispielsweise das Tumormikromilieu (engl. TME, tumour microenvironment) mit seinen Komponenten eine Rolle bezüglich Interaktionen, Prognose und das Ansprechen auf bestimmte Behandlungen beim Retinoblastom spielt (Miracco et al., 2021; Raguraman et al., 2019). Das Tumormikromilieu wurde in dieser Arbeit nicht mit untersucht, es wurde hier ausschließlich auf die Interaktion zwischen CD4 positiven T-Zellen und Retinoblastomzellen fokussiert. PD-L1 und PD-1 scheinen nicht nur auf den Tumor- und T-Zellen exprimiert zu sein, sondern darüber hinaus auf verschiedenen Elementen des Tumormikromilieus (Zou et al., 2016), die ebenfalls einen Effekt auf die Antitumor-Immunität haben können (Juneja et al., 2017; Zou et al., 2016). Ein möglicher Therapieansatz könnte hier eine Veränderung des Tumormikromilieus darstellen, um somit das Immunsystem zu stärken (Alsaab et al., 2017). Insgesamt ist es von großer Bedeutung, die Einflüsse des umgebenden Mikromilieus mitzuberücksichtigen und weiter zu untersuchen (Wang et al., 2017).

Möglicherweise muss man jedoch den Versuchsrahmen weiter ausweiten, um mögliche Effekte und Interaktionen mit aufzufassen, die in dem bisherigen Versuchssetting

weggefallen sind. So scheinen insbesondere Stromazellen einen Einfluss auf die Tumorgenese zu haben (Raguraman et al., 2019).

Retinoblastomzellen sind schwierig zu kultivieren, insbesondere in lang andauernden Versuchen. Dementsprechend kann man nicht ausschließen, ob diese hohe Apoptoserate des Versuches mit einer zu langen Versuchsdauer zusammenhing. Andererseits könnte auch eine längere Kultivierungszeit mehr Zeit für die Interaktion von T-Zellen und Retinoblastomzellen schaffen und somit förderlich sein. Ebenfalls könnte eine Reduktion der Tumorzellichte einen stärkeren Effekt bringen, wie Juneja et al. zeigte (Juneja et al., 2017).

In einem Vorversuch wurden verschiedene Konzentrationen von Pembrolizumab getestet, um einen toxischen Effekt auf die Zellen auszuschließen. Hier zeigten sich keine Unterschiede auf die Zellviabilität. Die optimale Dosis von PD-1/PD-L1 Inhibitoren ist auch in der Klinik schwierig festzulegen (Alsaab et al., 2017), somit wären hier weitere Untersuchungen sinnvoll.

Yang et al. beschrieben, dass in ihren Ko-Kultivierungsexperimenten von humanen Augenzellen und T-Zellen die Anti-PD-L1/2 Antikörper keinen Effekt auf die Apoptoserate der T-Zellen hatten. Sie vermuteten daher andere Targets, die für die erhöhte Apoptose der T-Zellen in der Ko-Kultivierung verantwortlich waren (Yang et al., 2009). Dies könnte ebenfalls auf das Retinoblastom zutreffen, jedoch lässt sich PD-1/PD-L1 als einer der verantwortlichen Moleküle für die beeinflusste Anti-Tumorimmunität nicht ausschließen.

Zytokine sind als Botenstoffe Teil der Zellkommunikation, insbesondere von Immunzellen, und können sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Effekte haben (Borish & Steinke, 2003; Steinke & Borish, 2006). Darunter können sie einen proinflammatorischen Einfluss auf das Tumorstadium haben (Todoric et al., 2016). Dementsprechend wurden in dieser Arbeit verschiedene Zytokine untersucht, um die Mechanismen des PD-1/PD-L1 Immun-Checkpoints genauer zu charakterisieren.

In der Zytokinmessung (siehe Abbildung 20) ist Interferon- γ nur eingeschränkt beurteilbar, da es im Versuchsablauf extern zur Stimulation hinzugefügt wurde. Es ist beschrieben, dass die Interaktion von PD-1 und PD-L1 mit einer Expression von Interleukin 10 einhergehen könnte (Zou et al., 2016). In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Expression von Interleukin 10 gemessen werden, jedoch unterschied sich diese nicht bei An- und Abwesenheit des PD-1 Inhibitors Pembrolizumab. Im Immun-Profiling waren Interleukin 6 und 8 in *MYCN*-amplifizierten Retinoblastomzelllinien hochreguliert, Interleukin 10 herunterreguliert und Interferon- γ sowie TNF α nicht beeinflusst (siehe Tabelle 42). Yang et al. beschrieben erhöhte Level von TNF α , Interferon- γ und Interleukin 5 bei Ko-Kultivierung von T-Zellen und

Augenzellen in Anwesenheit eines Anti-PD-L1 Antikörper (Yang et al., 2009). Aber auch generell sezernieren Tumorzellen verschiedene inflammatorische Zytokine wie TNF α , Interleukin 2 oder Interferon- γ (Alsaab et al., 2017). Dies kann häufig zu chronischen Inflammationsreaktionen oder zu einem erhöhten Anteil an Toleranz- vermittelnden Immunzellen im Tumor führen.

6.5 Immun-Checkpoint-Blockade beim Retinoblastom

Die Rolle der Immuntherapie beim Retinoblastom ist noch nicht geklärt (Singh et al., 2020). Der Immun-Checkpoint PD-1/PD-L1 als mögliches Therapie-Target ist nach den vorliegenden Ergebnissen beim Retinoblastom kritisch zu werten. Diese Arbeit erlaubt allerdings keine definitive Aussage darüber, ob die Blockade von PD-1/PD-L1 als mögliche Immuntherapie beim Retinoblastom genutzt werden kann. Es ließ sich kein Effekt des Anti-PD-1 Antikörpers Pembrolizumab auf die Interaktion von CD4 positiven T-Zellen und Retinoblastomzellen aufzeigen. Um jedoch eine endgültige Aussage treffen zu können, müssten weitere Experimente zum Beispiel mit zytotoxischen CD8 positiven T-Zellen durchgeführt werden. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, wie genau die Funktion des PD-1/PD-L1 Immun-Checkpoints ist (Juneja et al., 2017) oder welcher Mechanismus genau für ein Therapieansprechen bei der Blockade von PD-1/PD-L1 verantwortlich ist (Zou et al., 2016). Eine erhöhte PD-L1 Expression in Tumoren kann auf ein erhöhtes Ansprechen einer Immuntherapie hinweisen (Juneja et al., 2017), PD-L1 niedrige oder negative Tumore scheinen weniger auf die spezifische Immuntherapie anzusprechen (Mahoney et al., 2015). Jedoch gibt es auch PD-L1 positive Tumore, die kaum auf die Immun-Checkpoint-Blockade ansprechen (Alsaab et al., 2017; Mahoney et al., 2015) und vice versa PD-L1 negative Tumore, die dennoch auf eine PD-1 Immuntherapie ansprechen (Postow et al., 2015). Dementsprechend ist es schwierig, PD-L1 als alleinigen Biomarker für den Einsatz einer PD-1 gerichteten Blockade nutzen zu wollen (Zou et al., 2016) und es ist wichtig, weitere potenzielle Biomarker zu identifizieren (Mahoney et al., 2015).

Ein weiterer Immun-Checkpoint, der sich ähnlich wie PD-1/PD-L1 gegen regulatorische T-Zellen richtet, ist CTLA-4. Der Anti-CTLA-4 Antikörper Ipilimumab ist durch die FDA bereits für die Therapie des Lungenkarzinoms, Ovarialkarzinoms, Nierenzellkarzinoms und des malignen Melanoms zugelassen (Alsaab et al., 2017; Vaddepally et al., 2020). CTLA-4 ist wie PD-L1 beim Retinoblastom exprimiert und mit einem höheren Tumorstadium assoziiert (Singh et al., 2020). Dementsprechend könnte eine gegen CTLA-4 gerichtete Therapie als eine Möglichkeit beim Retinoblastom diskutiert werden.

Immun-Checkpoint-Blockaden sind ein wichtiger Bestandteil der Erst-Linientherapie bei Tumoren geworden, in Studien verschiedener Tumore konnten bereits vielversprechende Ergebnisse mit geringeren Nebenwirkungen bei den PD-1/PD-L1 Checkpoint-Inhibitoren erreicht werden (Alsaab et al., 2017; Seidel et al., 2018). Dabei scheinen die Nebenwirkungen von PD-1/PD-L1 Medikamenten nochmals geringere Nebenwirkungen mit sich zu bringen als andere Immuntherapien, nichtsdestotrotz müssen potenzielle Nebenwirkungen weiterhin beobachtet werden (Mahoney et al., 2015). Patienten, die nicht auf eine Monotherapie ansprechen, können von Kombinationen verschiedenen Immuntherapien profitieren, wie beispielsweise eine Kombination der PD-1 und CTLA-4 Blockade (Mahoney et al., 2015; Postow et al., 2015). Hier sei jedoch eine mögliche Erhöhung von Nebenwirkungen zu bedenken (Seidel et al., 2018). Biomarker für das potenzielle Ansprechen der Immuntherapie müssen noch identifiziert werden (Mahoney et al., 2015). Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf das Retinoblastom bedarf weiterer Untersuchungen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Das Retinoblastom ist der häufigste intraokuläre Tumor in der Kindheit. In fast allen Fällen liegt ursächlich eine Mutation des Retinoblastom-Gens (*RB1*) vor, seltener ist eine Amplifikation vom NB-derived myelocytomatosis viral-related oncogene (*MYCN*) ohne *RB1* Mutation beim Retinoblastom beschrieben. Letztere sind jedoch häufig in den aggressiven Tumorstadien zu beobachten. Die Heilungschancen beim Retinoblastom sind mit über 95 % sehr hoch. Dennoch bringen viele Therapie-Optionen erhebliche Risiken und Nebenwirkungen mit sich, die mit gezielteren Behandlungsmöglichkeiten gesenkt werden sollen. Eine mögliche Option stellt die Immuntherapie dar, insbesondere die Blockade des Immun-Checkpoints programmed death receptor/ligand 1 (PD-1/PD-L1) mit entsprechenden Antikörpern. Bei der Behandlung von verschiedenen Krebserkrankungen gewinnt diese Art der Immuntherapie an Bedeutung immer noch dazu.

In dieser Arbeit wurde eine mögliche Rolle von PD-1/PD-L1 beim Retinoblastom evaluiert, insbesondere auch ein möglicher Zusammenhang zwischen PD-L1 und dem Onkogen *MYCN*. Es konnte nachgewiesen werden, dass alle getesteten Retinoblastomzelllinien PD-L1 in unterschiedlichen Mengen exprimierten. Dabei wurde die Expression sowohl auf Gen-Ebene durch eine quantitative Real-Time-Polymerasenkettenreaktion als auch auf Protein-Ebene via Western Blot, Durchflusszytometrie und Immunfärbung nachgewiesen. In primären Retinoblastomen waren nur zwei von sieben Tumoren schwach PD-L1 positiv. Beim Vergleich von *MYCN*-amplifizierten und nicht *MYCN*-amplifizierten Retinoblastomzelllinien konnte kein Zusammenhang zwischen PD-L1 und *MYCN* nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte in Neuroblastomzelllinien mit induzierbarer *MYCN* Expression ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen PD-L1 und *MYCN* gefunden werden. Um PD-1/PD-L1 genauer zu untersuchen, wurden Ko-Kultivierungsversuche von Retinoblastomzellen und cluster of differentiation 4 (CD4) positiven T-Zellen in An- oder Abwesenheit des PD-1 Antikörpers Pembrolizumab durchgeführt. Die Interaktion von Retinoblastomzellen und T-Zellen wurde anhand von Proliferations- und Apoptoseassays untersucht. Es ließ sich dabei kein Unterschied in der Proliferations- und Apoptoserate der T-Zellen in Abhängigkeit von PD-1 Blockade feststellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Bedeutung des Immun-Checkpoint PD-1/PD-L1 im Retinoblastom weiter aufgeklärt werden. Anhaltspunkte, dass es sich hierbei um ein potenzielles Therapietarget handelt, konnten allerdings nicht gefunden werden.

Es sind weitere Versuche notwendig, um die Rolle von PD-1/PD-L1 im Retinoblastom, vor allem von metastasierten Fällen zu klären und mögliche alternative Targets für eine Immuntherapie vorzuschlagen.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abramson, D. H., Frank, C. M., Susman, M., Whalen, M. P., Dunkel, I. J., Boyd, N. W., 3rd. (1998): Presenting signs of retinoblastoma. *J Pediatr* 132, 505-508.
2. AlAli, A., Kletke, S., Gallie, B., Lam, W. C. (2018): Retinoblastoma for Pediatric Ophthalmologists. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 7, 160-168.
3. Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K., Iyer, A. K. (2017): PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol* 8, 561.
4. American Joint Committee on Cancer. (2018): TNM8: The updated TNM classification for retinoblastoma. *Community Eye Health* 31, 34.
5. Arasanz, H., Gato-Canas, M., Zuazo, M., Ibanez-Vea, M., Breckpot, K., Kochan, G., Escors, D. (2017): PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget* 8, 51936-51945.
6. Blanc, E., Goldschneider, D., Ferrandis, E., Barrois, M., Le Roux, G., Leonce, S., Douc-Rasy, S., Bénard, J., Raguénez, G. (2003): MYCN enhances P-gp/MDR1 gene expression in the human metastatic neuroblastoma IGR-N-91 model. *Am J Pathol* 163, 321-331.
7. Borish, L. C., Steinke, J. W. (2003): 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111, S460-475.
8. Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., Drake, C. G., Camacho, L. H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H. C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T. M., Alaparthi, S., Grosso, J. F., Korman, A. J., Parker, S. M., Agrawal, S., Goldberg, S. M., Pardoll, D. M., Gupta, A., Wigginton, J. M. (2012): Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366, 2455-2465.
9. Brodeur, G. M. (2003): Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3, 203-216.
10. Casey, S. C., Tong, L., Li, Y., Do, R., Walz, S., Fitzgerald, K. N., Gouw, A. M., Baylot, V., Gütgemann, I., Eilers, M., Felsner, D. W. (2016): MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science* 352, 227-231.
11. Ceeraz, S., Nowak, E. C., Noelle, R. J. (2013): B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol* 34, 556-563.

12. Chantada, G., Doz, F., Antoneli, C. B., Grundy, R., Clare Stannard, F. F., Dunkel, I. J., Grabowski, E., Leal-Leal, C., Rodriguez-Galindo, C., Schwartzman, E., Popovic, M. B., Kremens, B., Meadows, A. T., Zucker, J. M. (2006): A proposal for an international retinoblastoma staging system. *Pediatr Blood Cancer* 47, 801-805.
13. Chawla, B., Singh, R. (2017): Recent advances and challenges in the management of retinoblastoma. *Indian J Ophthalmol* 65, 133-139.
14. Chen, J., Feng, Y., Lu, L., Wang, H., Dai, L., Li, Y., Zhang, P. (2012): Interferon-gamma-induced PD-L1 surface expression on human oral squamous carcinoma via PKD2 signal pathway. *Immunobiology* 217, 385-393.
15. Daud, A. I., Loo, K., Pauli, M. L., Sanchez-Rodriguez, R., Sandoval, P. M., Taravati, K., Tsai, K., Nosrati, A., Nardo, L., Alvarado, M. D., Algazi, A. P., Pampaloni, M. H., Lobach, I. V., Hwang, J., Pierce, R. H., Gratz, I. K., Krummel, M. F., Rosenblum, M. D. (2016): Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. *J Clin Invest* 126, 3447-3452.
16. Dimaras, H., Corson, T. W., Cobrinik, D., White, A., Zhao, J., Munier, F. L., Abramson, D. H., Shields, C. L., Chantada, G. L., Njuguna, F., Gallie, B. L. (2015): Retinoblastoma. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15021.
17. Dimaras, H., Kimani, K., Dimba, E. A., Grons Dahl, P., White, A., Chan, H. S., Gallie, B. L. (2012): Retinoblastoma. *Lancet* 379, 1436-1446.
18. Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Celis, E., Chen, L. (2002): Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793-800.
19. Ewens, K. G., Bhatti, T. R., Moran, K. A., Richards-Yutz, J., Shields, C. L., Eagle, R. C., Ganguly, A. (2017): Phosphorylation of pRb: mechanism for RB pathway inactivation in MYCN-amplified retinoblastoma. *Cancer Med* 6, 619-630.
20. Fabian, I. D., Abdallah, E., Abdullahi, S. U., Abdulqader, R. A., Boubacar, S. A., Ademola-Popoola, D. S., Adio, A., Afshar, A. R., Aggarwal, P., Aghaji, A. E. (2020): Global retinoblastoma presentation and analysis by national income level. *JAMA oncology* 6, 685-695.
21. Fehrenbacher, L., Spira, A., Ballinger, M., Kowanetz, M., Vansteenkiste, J., Mazieres, J., Park, K., Smith, D., Artal-Cortes, A., Lewanski, C., Braiteh, F., Waterkamp, D., He, P., Zou, W., Chen, D. S., Yi, J., Sandler, A., Rittmeyer, A. (2016): Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 387, 1837-1846.

22. Francisco, L. M., Sage, P. T., Sharpe, A. H. (2010): The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 236, 219-242.
23. Friend, S. H., Bernards, R., Rogelji, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M., Dryja, T. P. (1986): A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643-646.
24. Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
25. Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
26. He, Y. F., Zhang, G. M., Wang, X. H., Zhang, H., Yuan, Y., Li, D., Feng, Z. H. (2004): Blocking programmed death-1 ligand-PD-1 interactions by local gene therapy results in enhancement of antitumor effect of secondary lymphoid tissue chemokine. *J Immunol* 173, 4919-4928.
27. Hogarty, M. D., Norris, M. D., Davis, K., Liu, X., Evageliou, N. F., Hayes, C. S., Pawel, B., Guo, R., Zhao, H., Sekyere, E., Keating, J., Thomas, W., Cheng, N. C., Murray, J., Smith, J., Sutton, R., Venn, N., London, W. B., Buxton, A., Gilmour, S. K., Marshall, G. M., Haber, M. (2008): ODC1 is a critical determinant of MYCN oncogenesis and a therapeutic target in neuroblastoma. *Cancer Res* 68, 9735-9745.
28. Hsu, A., Mendelson, L., Almhanna, K. (2020): Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Gastrointestinal Malignancies: A Review of Current and Future Therapies. *R I Med J* (2013) 103, 33-37.
29. Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N. (2002): Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12293-12297.
30. Joyce, J. A., Pollard, J. W. (2009): Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9, 239-252.
31. Juneja, V. R., McGuire, K. A., Manguso, R. T., LaFleur, M. W., Collins, N., Haining, W. N., Freeman, G. J., Sharpe, A. H. (2017): PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J Exp Med* 214, 895-904.
32. Jurklies, C. (2007): Das Retinoblastom – Diagnose und Therapie. *Kinderkrebsstiftung WIR* 01/2007, 26-31.
33. Keino, H., Horie, S., Sugita, S. (2018): Immune Privilege and Eye-Derived T-Regulatory Cells. *J Immunol Res* 2018, 1679197.
34. Kleinerman, R. A., Tucker, M. A., Tarone, R. E., Abramson, D. H., Seddon, J. M., Stovall, M., Li, F. P., Fraumeni, J. F., Jr. (2005): Risk of new cancers after

- radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. *J Clin Oncol* 23, 2272-2279.
35. Knudson, A. G., Jr. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.
36. Kooi, I. E., Mol, B. M., Moll, A. C., van der Valk, P., de Jong, M. C., de Graaf, P., van Mil, S. E., Schouten-van Meeteren, A. Y., Meijers-Heijboer, H., Kaspers, G. L., Te Riele, H., Cloos, J., Dorsman, J. C. (2015): Loss of photoreceptor and gain of genomic alterations in retinoblastoma reveal tumor progression. *EBioMedicine* 2, 660-670.
37. Le Grand, M., Mukha, A., Püschel, J., Valli, E., Kamili, A., Vittorio, O., Dubrovskaja, A., Kavallaris, M. (2020): Interplay between MycN and c-Myc regulates radioresistance and cancer stem cell phenotype in neuroblastoma upon glutamine deprivation. *Theranostics* 10, 6411-6429.
38. Lee, W. H., Murphree, A. L., Benedict, W. F. (1984): Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* 309, 458-460.
39. Luke, J. J., Ascierto, P. A., Carlino, M. S., Gershenwald, J. E., Grob, J. J., Hauschild, A., Kirkwood, J. M., Long, G. V., Mohr, P., Robert, C., Ross, M., Scolyer, R. A., Yoon, C. H., Poklepovic, A., Rutkowski, P., Anderson, J. R., Ahsan, S., Ibrahim, N., AM, M. E. (2020): KEYNOTE-716: Phase III study of adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected high-risk stage II melanoma. *Future Oncol* 16, 4429-4438.
40. Mahoney, K. M., Freeman, G. J., McDermott, D. F. (2015): The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clin Ther* 37, 764-782.
41. Mendoza, P. R., Grossniklaus, H. E. (2016): Therapeutic Options for Retinoblastoma. *Cancer Control* 23, 99-109.
42. Miracco, C., Toti, P., Gelmi, M. C., Aversa, S., Baldino, G., Galluzzi, P., De Francesco, S., Petrelli, F., Sorrentino, E., Belmonte, G., Galimberti, D., Bracco, S., Hadjistilianou, T. (2021): Retinoblastoma Is Characterized by a Cold, CD8+ Cell Poor, PD-L1- Microenvironment, Which Turns Into Hot, CD8+ Cell Rich, PD-L1+ After Chemotherapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 62, 6.
43. Muth, D., Ghazaryan, S., Eckerle, I., Beckett, E., Pohler, C., Batzler, J., Beisel, C., Gogolin, S., Fischer, M., Henrich, K. O., Ehemann, V., Gillespie, P., Schwab, M., Westermann, F. (2010): Transcriptional repression of SKP2 is impaired in MYCN-amplified neuroblastoma. *Cancer Res* 70, 3791-3802.
44. Nakagawara, A., Arima, M., Azar, C. G., Scavarda, N. J., Brodeur, G. M. (1992): Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res* 52, 1364-1368.

45. Nittner, D., Lambertz, I., Clermont, F., Mestdagh, P., Köhler, C., Nielsen, S. J., Jochemsen, A., Speleman, F., Vandesompele, J., Dyer, M. A., Schramm, A., Schulte, J. H., Marine, J. C. (2012): Synthetic lethality between Rb, p53 and Dicer or miR-17-92 in retinal progenitors suppresses retinoblastoma formation. *Nat Cell Biol* 14, 958-965.
46. Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S., Honjo, T. (2013): A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol* 14, 1212-1218.
47. Postow, M. A., Callahan, M. K., Wolchok, J. D. (2015): Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* 33, 1974-1982.
48. Raguraman, R., Parameswaran, S., Kanwar, J. R., Khetan, V., Rishi, P., Kanwar, R. K., Krishnakumar, S. (2019): Evidence of Tumour Microenvironment and Stromal Cellular Components in Retinoblastoma. *Ocul Oncol Pathol* 5, 85-93.
49. Reese, A. B., Ellsworth, R. M. (1963): The evaluation and current concept of retinoblastoma therapy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 67, 164-172.
50. Robert, C., Ribas, A., Wolchok, J. D., Hodi, F. S., Hamid, O., Kefford, R., Weber, J. S., Joshua, A. M., Hwu, W. J., Gangadhar, T. C., Patnaik, A., Dronca, R., Zarour, H., Joseph, R. W., Boasberg, P., Chmielowski, B., Mateus, C., Postow, M. A., Gergich, K., Ellassais-Schaap, J., Li, X. N., Iannone, R., Ebbinghaus, S. W., Kang, S. P., Daud, A. (2014): Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 384, 1109-1117.
51. Rushlow, D. E., Mol, B. M., Kennett, J. Y., Yee, S., Pajovic, S., Theriault, B. L., Prigoda-Lee, N. L., Spencer, C., Dimaras, H., Corson, T. W., Pang, R., Massey, C., Godbout, R., Jiang, Z., Zacksenhaus, E., Paton, K., Moll, A. C., Houdayer, C., Raizis, A., Halliday, W., Lam, W. L., Boutros, P. C., Lohmann, D., Dorsman, J. C., Gallie, B. L. (2013): Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: genomic, gene expression, and clinical studies. *Lancet Oncol* 14, 327-334.
52. Sachdeva, U. M., O'Brien, J. M. (2012): Understanding pRb: toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma. *J Clin Invest* 122, 425-434.
53. Santarpia, M., Aguilar, A., Chaib, I., Cardona, A. F., Fancelli, S., Laguia, F., Bracht, J. W. P., Cao, P., Molina-Vila, M. A., Karachaliou, N., Rosell, R. (2020): Non-Small-Cell Lung Cancer Signaling Pathways, Metabolism, and PD-1/PD-L1 Antibodies. *Cancers (Basel)* 12

54. Sarkar, A. K., Nuchtern, J. G. (2000): Lysis of MYCN-amplified neuroblastoma cells by MYCN peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 60, 1908-1913.
55. Schildhaus, H. U. (2018): [Predictive value of PD-L1 diagnostics]. *Pathologe* 39, 498-519.
56. Schmid, P., Cortes, J., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y. H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Foukakis, T., Fasching, P. A., Cardoso, F., Untch, M., Jia, L., Karantza, V., Zhao, J., Aktan, G., Dent, R., O'Shaughnessy, J. (2020): Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 382, 810-821.
57. Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K. H., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., Trent, J. (1983): Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305, 245-248.
58. Schwermer, M., Hiber, M., Dreesmann, S., Rieb, A., Theißen, J., Herold, T., Schramm, A., Temming, P., Steenpass, L. (2019): Comprehensive characterization of RB1 mutant and MYCN amplified retinoblastoma cell lines. *Experimental cell research* 375, 92-99.
59. Seidel, J. A., Otsuka, A., Kabashima, K. (2018): Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol* 8, 86.
60. Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R., Freeman, G. J. (2007): The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 8, 239-245.
61. Shields, C. L., Mashayekhi, A., Au, A. K., Czyz, C., Leahey, A., Meadows, A. T., Shields, J. A. (2006): The International Classification of Retinoblastoma predicts chemoreduction success. *Ophthalmology* 113, 2276-2280.
62. Shields, C. L., Shields, J. A. (2010): Retinoblastoma management: advances in enucleation, intravenous chemoreduction, and intra-arterial chemotherapy. *Curr Opin Ophthalmol* 21, 203-212.
63. Singh, L., Singh, M. K., Rizvi, M. A., Bakhshi, S., Meel, R., Lomi, N., Sen, S., Kashyap, S. (2020): Clinical relevance of the comparative expression of immune checkpoint markers with the clinicopathological findings in patients with primary and chemoreduced retinoblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 69, 1087-1099.
64. Soliman, S. E., Racher, H., Zhang, C., MacDonald, H., Gallie, B. L. (2017): Genetics and Molecular Diagnostics in Retinoblastoma--An Update. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 6, 197-207.

65. Stallard, H. B. (1952): Irradiation of retinoblastoma (glioma retinae). *Lancet* 1, 1046-1049.
66. Steinke, J. W., Borish, L. (2006): 3. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 117, S441-445.
67. Stermann, A., Huebener, N., Seidel, D., Fest, S., Eschenburg, G., Stauder, M., Schramm, A., Eggert, A., Lode, H. N. (2015): Targeting of MYCN by means of DNA vaccination is effective against neuroblastoma in mice. *Cancer Immunol Immunother* 64, 1215-1227.
68. Sullivan, E. M., Wilson, M. W., Billups, C. A., Wu, J., Merchant, T. E., Brennan, R. C., Haik, B. G., Shulkin, B., Free, T. M., Given, V., Rodriguez-Galindo, C., Qaddoumi, I. (2014): Pathologic risk-based adjuvant chemotherapy for unilateral retinoblastoma following enucleation. *J Pediatr Hematol Oncol* 36, e335-340.
69. Temming, P., Eggert, A., Bornfeld, N., Sauerwein, W., Goricke, S., Lohmann, D. R. (2013): [Diagnosis and treatment of retinoblastoma: current strategies for effective tumour control and preservation of vision]. *Klin Monbl Augenheilkd* 230, 232-242.
70. Temming, P., Lohmann, D., Bornfeld, N., Sauerwein, W., Goericke, S. L., Eggert, A. (2012): Current concepts for diagnosis and treatment of retinoblastoma in Germany: aiming for safe tumor control and vision preservation. *Klin Padiatr* 224, 339-347.
71. Temming, P., Viehmann, A., Arendt, M., Eisele, L., Spix, C., Bornfeld, N., Sauerwein, W., Jockel, K. H., Lohmann, D. R. (2015): Pediatric second primary malignancies after retinoblastoma treatment. *Pediatr Blood Cancer* 62, 1799-1804.
72. Tjaden, B., Baum, K., Marquardt, V., Simon, M., Trajkovic-Arsic, M., Kouril, T., Siebers, B., Lisec, J., Siveke, J. T., Schulte, J. H., Benary, U., Remke, M., Wolf, J., Schramm, A. (2020): N-Myc-induced metabolic rewiring creates novel therapeutic vulnerabilities in neuroblastoma. *Sci Rep* 10, 7157.
73. Todoric, J., Antonucci, L., Karin, M. (2016): Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. *Cancer Prev Res (Phila)* 9, 895-905.
74. Topalian, S. L., Taube, J. M., Pardoll, D. M. (2020): Neoadjuvant checkpoint blockade for cancer immunotherapy. *Science* 367
75. Usui, Y., Okunuki, Y., Hattori, T., Takeuchi, M., Kezuka, T., Goto, H., Usui, M. (2006): Expression of costimulatory molecules on human retinoblastoma cells Y-79: functional expression of CD40 and B7H1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 4607-4613.

76. Vaddepally, R. K., Kharel, P., Pandey, R., Garje, R., Chandra, A. B. (2020): Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers (Basel)* 12
77. Van Allen, E. M., Miao, D., Schilling, B., Shukla, S. A., Blank, C., Zimmer, L., Sucker, A., Hillen, U., Foppen, M. H. G., Goldinger, S. M., Utikal, J., Hassel, J. C., Weide, B., Kaehler, K. C., Loquai, C., Mohr, P., Gutzmer, R., Dummer, R., Gabriel, S., Wu, C. J., Schadendorf, D., Garraway, L. A. (2015): Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 350, 207-211.
78. Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z., Guo, C. (2017): Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* 8, 761-773.
79. Wolchok, J. D., Chan, T. A. (2014): Cancer: Antitumour immunity gets a boost. *Nature* 515, 496-498.
80. Wong, J. R., Morton, L. M., Tucker, M. A., Abramson, D. H., Seddon, J. M., Sampson, J. N., Kleinerman, R. A. (2014): Risk of subsequent malignant neoplasms in long-term hereditary retinoblastoma survivors after chemotherapy and radiotherapy. *J Clin Oncol* 32, 3284-3290.
81. Wu, L., Chen, Z., Zhang, J., Xing, Y. (2012): Effect of miR-513a-5p on etoposide-stimulating B7-H1 expression in retinoblastoma cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 32, 601-606.
82. Wu, N., Jia, D., Bates, B., Basom, R., Eberhart, C. G., MacPherson, D. (2017): A mouse model of MYCN-driven retinoblastoma reveals MYCN-independent tumor reemergence. *J Clin Invest* 127, 888-898.
83. Yang, W., Li, H., Chen, P. W., Alizadeh, H., He, Y., Hogan, R. N., Niederkorn, J. Y. (2009): PD-L1 expression on human ocular cells and its possible role in regulating immune-mediated ocular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 273-280.
84. Zou, W., Wolchok, J. D., Chen, L. (2016): PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med* 8, 328rv324.

9 TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle 1 Reese-Ellsworth-Klassifikation. | 10 |
| Tabelle 2: International Classification of Retinoblastoma (ICRB). | 10 |
| Tabelle 3: International Retinoblastoma Staging System (IRSS)..... | 11 |
| Tabelle 4: Verwendete Geräte. | 21 |
| Tabelle 5: Verwendetes Verbrauchsmaterial..... | 22 |
| Tabelle 6: Verwendete Chemikalien..... | 23 |
| Tabelle 7: Verwendete Medien und Puffer für die Zellkultur. | 25 |
| Tabelle 8: Verwendete Puffer für die PCR. | 26 |
| Tabelle 9: Verwendete Puffer für die Durchflusszytometrie..... | 26 |
| Tabelle 10: Verwendete Puffer für die Färbung von Tumorschnitten..... | 26 |
| Tabelle 11: Verwendete Puffer für die Zellyse. | 26 |
| Tabelle 12: Verwendete Puffer für den Western Blot..... | 27 |
| Tabelle 13: Verwendete Lösungen für den MTT-Assay..... | 28 |
| Tabelle 14: Verwendete Färbelösung für das Proliferations-Assay. | 28 |
| Tabelle 15: Verwendete Kits. | 28 |
| Tabelle 16: Verwendete Enzyme. | 29 |
| Tabelle 17: Verwendete Zytokine..... | 29 |
| Tabelle 18: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie. | 29 |
| Tabelle 19: Verwendete Antikörper für die Ko-Kultivierungsexperimente. | 30 |
| Tabelle 20: Verwendete Antikörper für die Immunfärbung. | 30 |
| Tabelle 21: Verwendete Antikörper für die Färbung in der Pathologie..... | 30 |
| Tabelle 22: Verwendete Erst-Antikörper für den Western Blot. | 30 |
| Tabelle 23: Verwendete Zweit-Antikörper für den Western Blot. | 31 |
| Tabelle 24: Verwendete Primer für die semiquantitative PCR. | 31 |
| Tabelle 25: Verwendete Primer für die Real Time PCR. | 31 |
| Tabelle 26: Verwendete Retinoblastomzelllinien. | 32 |
| Tabelle 27: Verwendete Neuroblastomzelllinien..... | 32 |
| Tabelle 28: Kontrollzelllinien. | 33 |
| Tabelle 29: Verwendete Medien für die verschiedenen Zelllinien. | 34 |
| Tabelle 30: Reaktionsansatz semiquantitative PCR. | 36 |
| Tabelle 31: Reaktionsablauf der semiquantitativen PCR..... | 36 |
| Tabelle 32: Annealing-Temperatur der für die semiquantitative PCR verwendeten Primer. | 37 |
| Tabelle 33: Reaktionsansatz für die qRT-PCR..... | 38 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 34: Programm der qRT-PCR (40 Zyklen). | 38 |
| Tabelle 35: Im Immun-Profilung untersuchte immun-relevante Gene. | 38 |
| Tabelle 36: Einteilungskriterien für PD-L1 positive Tumore. | 42 |
| Tabelle 37: TPS (Tumorproportion-Score) zur Einteilung der PD-L1 positiven Tumorzellen | 42 |
| Tabelle 38: Pipettierschema für SDS-PAGE Gele. | 43 |
| Tabelle 39: Molekulargewichte der zu detektierende Proteine. | 44 |
| Tabelle 40: Versuchsbedingungen in der Ko-Kultivierung | 46 |
| Tabelle 41: Auswertung der PD-L1 Tumorfärbung primärer Retinoblastome. | 56 |
| Tabelle 42: MYCN-assoziierte Gene, die durch mRNA Immun-Profilung identifiziert wurden.. | 61 |

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Mutationsereignisse beim Retinoblastom. | 13 |
| Abbildung 2: Immun-Checkpoint PD-1/PD-L1 Blockade..... | 18 |
| Abbildung 3: Aufbau der Blot-Kassette für den Nass-Blot. | 44 |
| Abbildung 4: Versuchsablauf Ko-Kultivierung..... | 45 |
| Abbildung 5: Nachweis der MYCN Expression via qRT-PCR. | 50 |
| Abbildung 6: Nachweis der c-MYC Expression via qRT-PCR.. | 51 |
| Abbildung 7: Korrelation zwischen MYCN und c-MYC. | 52 |
| Abbildung 8: Nachweis der PD-L1 Expression via qRT-PCR..... | 53 |
| Abbildung 9: Durchflusszytometrische Bestimmung der PD-L1 Expression in RB-Zellen mit und ohne MYCN-Amplifikation.. | 54 |
| Abbildung 10: PD-L1 Immunfärbung. | 55 |
| Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von PD-L1 bei primären Retinoblastomen.. | 57 |
| Abbildung 12: Korrelation zwischen PD-L1 und MYCN bzw. c-MYC..... | 58 |
| Abbildung 13: Nachweis der MYCN und PD-L1 Expression auf Protein-Ebene via Western Blot. | 59 |
| Abbildung 14: Nachweis der MYCN und PD-L1 Expression auf Protein-Ebene via Western Blot in einem ausgewählten Neuroblastom Zelllinienpanel..... | 60 |
| Abbildung 15: Stimulation der PD-L1 Expression in RB-Zellen (Y79) und der PD-1 Expression auf T-Zellen durch Interferon- γ bzw. OKT3.. | 62 |
| Abbildung 16: MTT-Assay zur Festlegung der optimalen Konzentration von Pembrolizumab (PD-1 AK) für nachfolgende Ko-Kultivierungsversuche mit T-Zellen und RB-Zellen. | 63 |
| Abbildung 17: T-Zell-Proliferation unter verschiedenen Ko-Kultivierungsbedingungen, mit und ohne Anwesenheit von Pembrolizumab.. | 64 |
| Abbildung 18: Apoptoseassay ko-kultivierter T- und RB-Zellen..... | 66 |
| Abbildung 19: Gating-Strategie beim Apoptoseassay.. | 66 |
| Abbildung 20: Zytokinmessung im Überstand ko-kultivierter T-Zellen und RB-Zellen..... | 67 |

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------|---|
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| °C | Grad Celsius |
| 7-AAD | 7-Aminoaktinomycin |
| AG | Arbeitsgemeinschaft |
| AK | Antikörper |
| APC | Allophycocyanin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| bp | Basenpaare |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| c | Zellen |
| CC1-Puffer | Cell Conditioning 1 Puffer |
| CD2-171 | cluster of differentiation 2-171 |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CFS | chronisches Fatigue Syndrom |
| c-MYC | cellular MYC |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CTLA4 | cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| DD | disc diameter |
| dest. Wasser | destilliertes Wasser |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| d.h. | das heißt |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |

| | |
|--------------------|--|
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| Engl. | Englisch |
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| FCS | fetales Kälberserum |
| FDA | Food and Drug Administration |
| g | Gramm |
| G418 | Geneticin 418 |
| h | Stunde |
| HCL | Salzsäure |
| ICRB | International Classification of Retinoblastoma |
| IC-Score | Immune-Cell-Score |
| IgG1; IgG2a; IgG2b | Immunglobulin G1; G2a; G2b |
| IL | Interleukin |
| INF- γ | Interferon- γ |
| IRSS | International Retinoblastoma Staging System |
| kDa | Kilodalton |
| M | Molar |
| mA | Milliampere |
| mg | Milligramm |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. major histocompatibility complex |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| MTT | 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid |
| MYCN | NB-derived myelocytomatosis viral-related oncogene |
| NaCl | Natriumchlorid |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| Nr. | Nummer |
| NP-40 | Nonylphenoethoxylat-40 |
| NSCLC | non-small cell lung cancer |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cells |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline) |

| | |
|--------------------|--|
| PBST | PBS-Tween |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PD-1 | programmed death receptor 1 (PDCD1; CD279) |
| PD-L1 | programmed death ligand 1 (B7-H1; CD274) |
| PD-L2 | programmed death ligand 2 |
| PE | Phycoerythrin |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| pmol | Pikomol |
| pRB | Retinoblastom-Protein |
| qRT-PCR | quantitative real time PCR |
| RB1 | Retinoblastom-Gen |
| RB-Zellen | Retinoblastomzellen |
| RIPA | Radioimmunopräzipitations-Puffer |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehung pro Minute (rounds per minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| Taq-Polymerase | DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i> |
| TAE-Puffer | TRIS-Acetat-EDTA-Puffer |
| TC-Score | Tumor-Cell-Score |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| tet | Tetrazyklin |
| TME | tumour microenvironment |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| TNM-Klassifikation | Tumor – Node – Metastasis |
| TPS | Tumorproportion-Score |
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UV | Ultraviolette |
| V | Volt |
| vgl. | vergleiche |
| v/v | Volumen/Volumen |
| w/v | Gewicht/Volumen |
| ZNS | Zentralnervensystem |

12 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Alexander Schramm für seine hervorragende Betreuung und enorme Unterstützung bedanken. Er hat mein Interesse an der Tumorforschung geweckt und mir die Möglichkeit gegeben, an diesem hochspannenden Thema in der pädiatrischen Onkologie zu arbeiten.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Melanie Schwermer bedanken. Sie stand mir als meine Betreuerin zu jeder Zeit für Diskussionen, Anregungen und Tipps zur Seite.

Ich durfte meine Dissertationsarbeit am Oncolab Essen verwirklichen und umsetzen. Insbesondere sind hier Priv.-Doz. Dr. Petra Ketteler, sowie Anja Rieb, Sabine Dreesmann und Sebastian Vogt zu nennen, die mich in besonderem Maße unterstützt haben und mir jederzeit mit einem Rat zur Seite standen.

Einen großen Beitrag zur Planung und Umsetzung der Ko-Kultivierungsexperimente leistete Prof. Dr. Wiebke Hansen. Ebenfalls möchte ich mich bei Sina Luppus für die Einarbeitung sowie die Durchführung der Zytokin Messungen bedanken.

Die AG Brandau der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Essen unterstütze mich bei der Umsetzung der Immunfärbungen. Insbesondere sind hier Prof. Sven Brandau und Kirsten Bruderek zu nennen. Als Teil meines Promotionskomitees im Rahmen der ELAN-Förderung stand mir Prof. Sven Brandau beratend zur Seite.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Dr. Thomas Hager für die Durchführung der Färbungen primärer Retinoblastomtumore bedanken.

Diese Arbeit wurde durch das ELAN-Promotionskolleg, sowie die Else-Kröner-Fresenius-Stiftung gefördert. Auch hier möchte ich meinen Dank an alle Beteiligten widmen, die durch das Programm meine Arbeit unterstützt haben. Ich konnte hier viele Kontakte aus verschiedenen Forschungsbereichen sammeln, sowie meine Arbeit präsentieren.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich durch diese Zeit begleitet hat.

13 LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.