

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und
Onkologie)

**TNF- α & IFN- γ vermittelte Seneszenz bei
Neuroblastomzelllinien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Harmuth, Theresa

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. J. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Klein

Tag der Disputation: 07.07.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung.....	11
1.1. Krebserkrankungen im Kindesalter	11
1.2. Neuroblastom	13
1.2.1. Allgemeines.....	13
1.2.2. Diagnostik	15
1.2.3. Klassifikation & Stadien des Neuroblastoms	15
1.2.4. Molekulare Eigenschaften	16
1.2.5. Risikoeinschätzung, Prognose	19
1.2.6. Therapie des Neuroblastoms	19
1.3. Seneszenz & die Rolle von TNF- α & IFN- γ	21
1.3.1. Seneszenz	21
1.3.2. TNF- α	23
1.3.3. IFN- γ	27
1.3.4. Seneszenzinduktion durch TNF- α & IFN- γ	28
1.4. Krebserkrankungen & Seneszenz	31
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	33
2. Material und Methoden.....	34
2.1. Material.....	34
2.1.1. Aktenzeichen des Ethikvotums	34
2.1.2. Geräte	34
2.1.3. Software	35
2.1.4. Verbrauchsmaterialien	36
2.1.5. Zellkulturmedien, -zusätze & -utensilien.....	37
2.1.6. Zellkulturmedien.....	37
2.1.7. Puffer	38
2.1.8. Zelllinien.....	38
2.1.9. Zytokine	39
2.1.10. Kits	39

2.1.11. Chemikalien & Reagenzien	40
2.2. Methoden	42
2.2.1. Zellkultur.....	42
2.2.2. Passagieren von adhärenen Zellen.....	42
2.2.3. Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer	42
2.2.4. Auftauen kryokonservierter Zellen.....	43
2.2.5. Kryokonservierung der Zellen	43
2.2.6. Kultivierung & Zugabe von TNF- α & IFN- γ	44
2.2.7. Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Färbung.....	44
2.2.8. EdU Assay	46
2.2.9. CFSE-Färbung	48
2.2.10. Growth Assay.....	49
2.2.11. Luciferase Assay	49
2.2.12. IncuCyte® Assay.....	50
2.2.13. Immunfluoreszenzfärbung.....	51
3. Ergebnisse	53
3.1. Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Färbung.....	53
3.2. EdU Assay.....	57
3.3. CFSE-Färbung	75
3.4. Growth Assay	87
3.5. Luciferase Assay	94
3.6. IncuCyte® Assay.....	97
3.7. Immunfluoreszenzfärbung.....	106
3.8. Zusammenfassung anhand der einzelnen Zelllinien	106
4. Diskussion	112
4.1. Kein Nachweis von Seneszenz-assoziiertes β -Galactosidase bei Neuroblastomzelllinien	113
4.2. Inhibition des Zellzyklus bei den Zelllinien LS, SH-SY5Y, SK-N-AS & SHEP.....	115
4.3. Abnahme der Teilungszahl im Verlauf der Behandlung bei den Zelllinien LS, SH-SY5Y & SHEP.....	119
4.4. Nachweis einer permanenten Seneszenz bei den Zelllinien LS, Kelly & SHEP.....	123

4.5. Verminderte Proliferation bei der Zelllinie SHEP mithilfe von Biolumineszenz beobachtet.....	127
4.6. Beobachtung einer verminderten Konfluenz bei den Zelllinien LS, SH-SY5Y & SHEP.....	130
4.7. Untersuchung der Proliferationsmarker und Tumorsupressorproteine ..	133
4.8. Abschließender Überblick.....	135
4.9. Fortführende Forschung.....	137
5. Zusammenfassung.....	140
6. Literaturverzeichnis	143
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	151
8. Veröffentlichungen	152
9. Danksagung	153

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Krebserkrankungen im Kindesalter in Deutschland	12
Abbildung 1.2. Klinische Präsentation	14
Abbildung 1.3. Molekulare Eigenschaften des Neuroblastoms	18
Abbildung 1.4. Seneszenzinduktion durch TNF- α & IFN- γ	26
Abbildung 1.5. Zytokin-induzierte Seneszenz	30
Abbildung 3.1.1. β -Galactosidase-Färbung - WM115	54
Abbildung 3.1.2. Anteil gefärbter Zellen - WM115	54
Abbildung 3.1.3. a β -Galactosidase-Färbung - LS, SH-SY5Y, LAN-1, Kelly	55
Abbildung 3.1.3. b β -Galactosidase-Färbung - SK-N-AS, SK-N-BE(2), SHEP	56
Abbildung 3.2.1. Anteil Zellzyklusphasen - WM115	58
Abbildung 3.2.2. EdU Assay - WM115	58
Abbildung 3.2.3. Anteil Zellzyklusphasen - LS	59
Abbildung 3.2.4. EdU Assay - LS	60
Abbildung 3.2.5. Anteil Zellzyklusphasen - SH-SY5Y	61
Abbildung 3.2.6. Anteil Zellzyklusphasen ohne apoptotische Zellen - SH-SY5Y	62
Abbildung 3.2.7. EdU Assay - SH-SY5Y	63
Abbildung 3.2.8. Anteil Zellzyklusphasen - SK-N-AS	64
Abbildung 3.2.9. EdU Assay - SK-N-AS	64
Abbildung 3.2.10. Anteil Zellzyklusphasen - SHEP	65
Abbildung 3.2.11. EdU Assay - SHEP	66
Abbildung 3.2.12. Anteil Zellzyklusphasen - LAN-1	67
Abbildung 3.2.13. EdU Assay - LAN-1	67
Abbildung 3.2.14. Anteil Zellzyklusphasen - Kelly	68
Abbildung 3.2.15. EdU Assay - Kelly	69
Abbildung 3.2.16. Anteil Zellzyklusphasen - SK-N-BE(2)	70

Abbildung 3.2.17. EdU Assay - SK-N-BE(2)	71
Abbildung 3.2.18. S-Phase	71
Abbildung 3.2.19. G1-Phase	72
Abbildung 3.2.20. G2-Phase	72
Abbildung 3.2.21. Fold Change der G1/S Ratio aller Zelllinien	74
Abbildung 3.3.1. CFSE-Färbung - WM115	77
Abbildung 3.3.2. CFSE-Färbung - seneszente Zelllinien	78
Abbildung 3.3.3. CFSE-Färbung - partiell seneszente Zelllinie	79
Abbildung 3.3.4. CFSE-Färbung - nicht seneszente Zelllinien	80
Abbildung 3.3.5. CFSE-Färbung im Verlauf - WM115 (a), SH-SY5Y (b)	82
Abbildung 3.3.6. CFSE-Färbung im Verlauf - LS (a), SHEP (b)	83
Abbildung 3.3.7. CFSE-Färbung im Verlauf - SK-N-AS	84
Abbildung 3.3.8. CFSE-Färbung im Verlauf - LAN-1 (a), Kelly (b)	85
Abbildung 3.3.9. CFSE-Färbung im Verlauf - SK-N-BE(2)	86
Abbildung 3.4.1. Growth Assay - WM115	89
Abbildung 3.4.2. Growth Assay - seneszente Zellen	91
Abbildung 3.4.3. Growth Assay - partiell seneszente Zellen	92
Abbildung 3.4.4. Growth Assay - nicht seneszente Zellen	93
Abbildung 3.5.1. Luciferase Assay	95
Abbildung 3.5.2. Luciferase Assay, Endzeitpunkt	96
Abbildung 3.6.1. IncuCyte® Assay, Konfluenz - WM115	98
Abbildung 3.6.2. IncuCyte® Assay, Konfluenz - LS	99
Abbildung 3.6.3. IncuCyte® Assay, Konfluenz - SH-SY5Y	100
Abbildung 3.6.4. IncuCyte® Assay, Konfluenz - SHEP	101
Abbildung 3.6.5. IncuCyte® Assay, Konfluenz - LAN-1	102
Abbildung 3.6.6. IncuCyte® Assay, Konfluenz - Kelly	103
Abbildung 3.6.7. IncuCyte® Assay, Konfluenz - SK-N-AS	104
Abbildung 3.6.8. IncuCyte® Assay, Konfluenz - SK-N-BE(2)	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1. INSS Kriterien der Stadieneinteilung	16
Tabelle 3.2.1. Fold Change	73
Tabelle 3.3.1. CFSE-Färbung - Mittelwert Verhältnisse	76
Tabelle 3.3.2. CFSE-Färbung im Verlauf - Zusammenfassung	86
Tabelle 3.4.1. Growth Assay - Proliferationsfaktor	88
Tabelle 3.8.1. Zusammenfassung Assays - WM115	106
Tabelle 3.8.2. Zusammenfassung Assays - LS	107
Tabelle 3.8.3. Zusammenfassung Assays - SH-SY5Y	107
Tabelle 3.8.4. Zusammenfassung Assays - LAN-1	108
Tabelle 3.8.5. Zusammenfassung Assays - Kelly	109
Tabelle 3.8.6. Zusammenfassung Assays - SK-N-AS	109
Tabelle 3.8.7. Zusammenfassung Assays - SK-N-BE(2)	110
Tabelle 3.8.8. Zusammenfassung Assays - SHEP	110
Tabelle 3.8.9. Zusammenfassung aller Assays & aller Zelllinien	111

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres
BrdU	5'-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD	Cluster of Differentiation
CDK 4/6	Cyclin-abhängige Kinase 4/6 (<i>Cyclin-Dependent Kinase 4/6</i>)
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2a (<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CT	Computertomographie
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten (<i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>)
CTLA4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4 (<i>Cytotoxic T Lymphocytes Antigene 4</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
GvHD	Graft versus Host Disease
HP1	Heterochromatin-Protein 1
ICB	Immune Checkpoint Blockade
IFN- γ	Interferon- γ
IFNGR	IFN- γ -Rezeptor
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
INRG	International Neuroblastoma Risiko Group
INSS	International Neuroblastoma Staging System
L-Glut	L-Glutamin
mCh	mCherry
MFI	Median Fluorescence Intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIBG	Metaiodbenzylguanidin
MRT	Magnetresonanztomographie
NEA	Nicht-essenzielle Aminosäuren
NF	Neurofibromatose
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz (<i>Oncogene-Induced Senescence</i>)
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen

PD1	Programmed Cell Death Proteine 1
PD-L1	Programmed Cell Death 1 - Ligand 1
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PF	Proliferationsfaktor
PI	Propidiumiodid
Rb	Retinoblastom-Protein
REST	RE1-Silencing Transcription-Factor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SA- β -gal	Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatin Foci
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phenotyp
SD	Standardabweichung
SMS	Senescence-Messaging Secretome
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription
STM	Standardtumormedium
TACE	TNF- α -konvertierendes Enzym
Tc	Technetium
TCR	T-Zell-Rezeptor
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)
T _h 1	T-Helferzellen, Typ 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNFR	TNF-Rezeptor
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
ZIS	Zytokin-induzierte Seneszenz
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Krebserkrankungen im Kindesalter

In Deutschland erkranken jährlich ca. 1.800 Kinder unter 15 Jahren neu an einer Krebserkrankung. In Industrieländern ist nach Unfällen eine Krebserkrankung die zweithäufigste Todesursache im Kindesalter. Den größten Anteil an Krebserkrankungen bei Kindern unter 15 Jahren machen die Leukämien aus (32 %), danach folgen die ZNS-Tumore (25 %), Lymphome (11 %) und die Neuroblastome sowie andere periphere Nervenzelltumore (7 %) (Abb. 1.1.). Die 5-Jahres-Überlebensrate für krebserkrankte Kinder liegt heutzutage in Europa bei über 80 % (Gatta et al., 2009). Mit 7 % macht die Gruppe der Neuroblastome einen relativ großen Anteil der Krebserkrankungen im Kindesalter aus. Die Erkrankung wird häufig sehr spät erkannt und die Therapieoptionen sind begrenzt. So stehen im Rahmen dieser Arbeit das Neuroblastom an sich und die Wirkung von TNF- α und IFN- γ auf eine mögliche Seneszenz im Vordergrund.

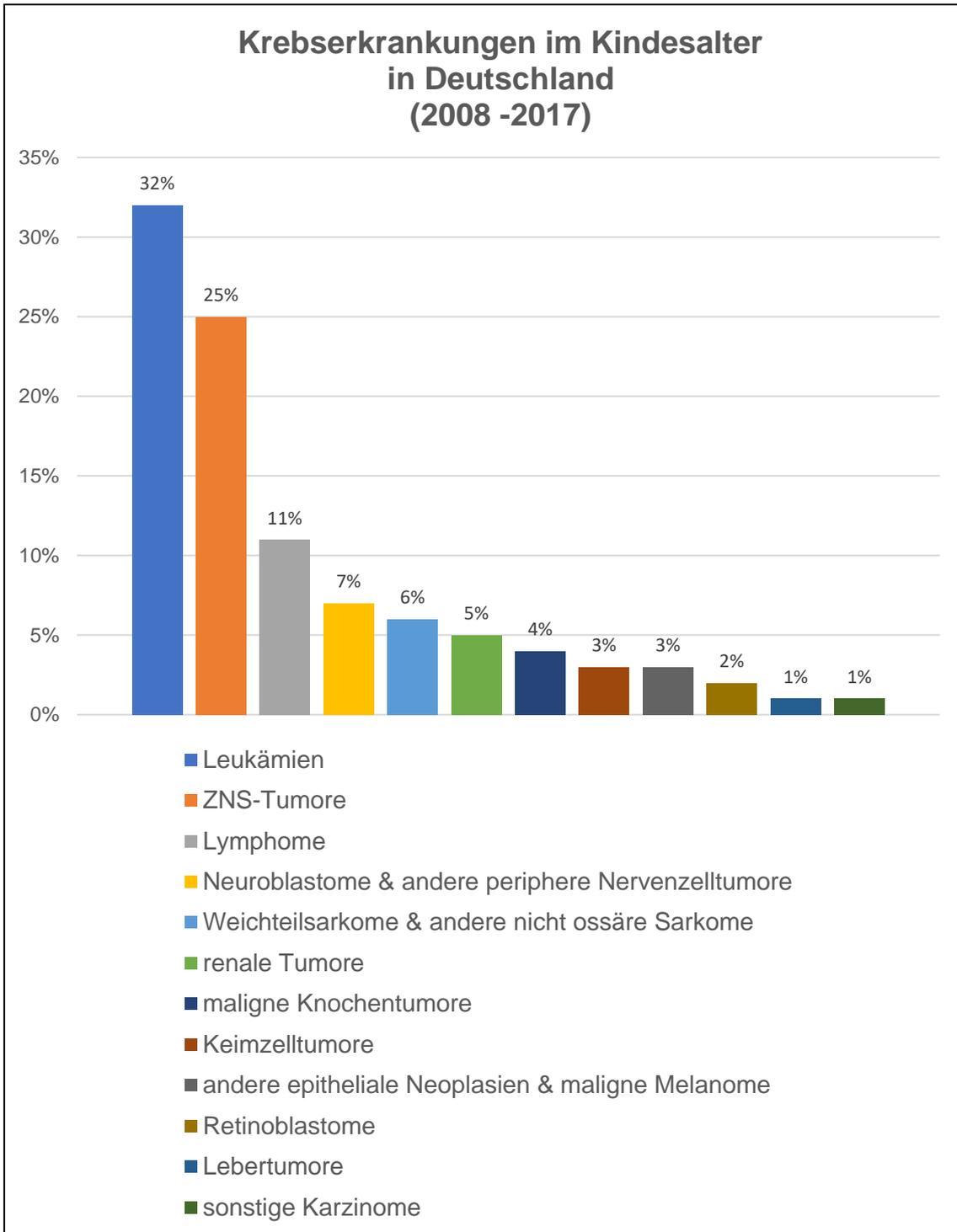


Abbildung 1.1. Krebserkrankungen im Kindesalter in Deutschland: Zeitraum der Erhebung 2008-2017, Darstellung des Prozentsatzes der Krebserkrankungen bei Kindern unter 15 Jahren in den Jahren 2008 bis 2017 (Kaatsch et al., 2019)

1.2. Neuroblastom

1.2.1. Allgemeines

Das Neuroblastom ist eine maligne Erkrankung des sympathischen Nervensystems. Der Tumor zählt zur Gruppe der peripheren neuroblastischen Tumoren. Das Neuroblastom ist ein neuroektodermaler Tumor, der aus den Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems hervorgeht. Der solide Tumor tritt am häufigsten im Nebennierenmark und in den Grenzsträngen auf (Hero et al., 2011). In 70 % der Fälle befindet sich der Tumor im Abdomen. Er metastasiert vor allen Dingen in die Lymphknoten, in das Knochenmark, die Leber und die Haut. Eine Besonderheit des Neuroblastoms ist die Fähigkeit der spontanen Rückbildung (Hero et al., 2011).

Das Neuroblastom macht 7 % aller Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter in den Industrieländern aus. In Deutschland erkranken circa 130 Kinder und Jugendliche unter 15 Jahren jährlich neu. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 14 Monaten. In der Patientengruppe, die einer niedrigen Risikogruppe zugeordnet werden, liegt die Überlebensrate bei über 90 % (Cohn et al., 2009). Bei Patienten, die der Hochrisikogruppe zugeordnet werden, liegt die Überlebensrate trotz multimodaler Therapie bei weniger als 50 % (Pinto et al., 2015). Es konnte eine erhöhte Inzidenz bei Jungen festgestellt werden (Kaatsch et al., 2019). Viele Patienten haben keine Beschwerden und der Tumor wird zufällig entdeckt. So ist etwa die Hälfte der Tumoren bei Diagnose bereits metastasiert. Wenn die Patienten dennoch über Symptome klagen, kommen diese aufgrund von Metastasen oder einer Beeinträchtigung der Umgebung zustande (Hero et al., 2011). Hier kann es zu Harnstau, Luftnot, Lähmungserscheinungen oder auch dem Horner-Syndrom kommen, je nach Lokalisation des Tumors oder der Metastasen (Abb. 1.2.). Generelle Symptome eines fortgeschrittenen Neuroblastoms sind ein tastbarer Tumor im betroffenen Bereich, aber auch Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust (B-Symptomatik) (Hero et al., 2011).

In 1-2 % der Fälle liegt eine positive Familienanamnese vor (Maris, 2010, Claviez et al., 2004). Hier handelt es sich um eine autosomal-dominante Vererbung. Im Rahmen dieser Vererbung spielt vor allen Dingen eine aktivierende Mutation in der Domäne der Tyrosinkinase des Onkogens anaplastische Lymphomkinase (ALK) eine Rolle (Maris, 2010). Außerdem wurde eine Verbindung mit genetischen Syndromen festgestellt (z.B. Morbus Hirschsprung (Limpt et al., 2004) oder Neurofibromatose (NF1-Gen) (Origone et al., 2003)).

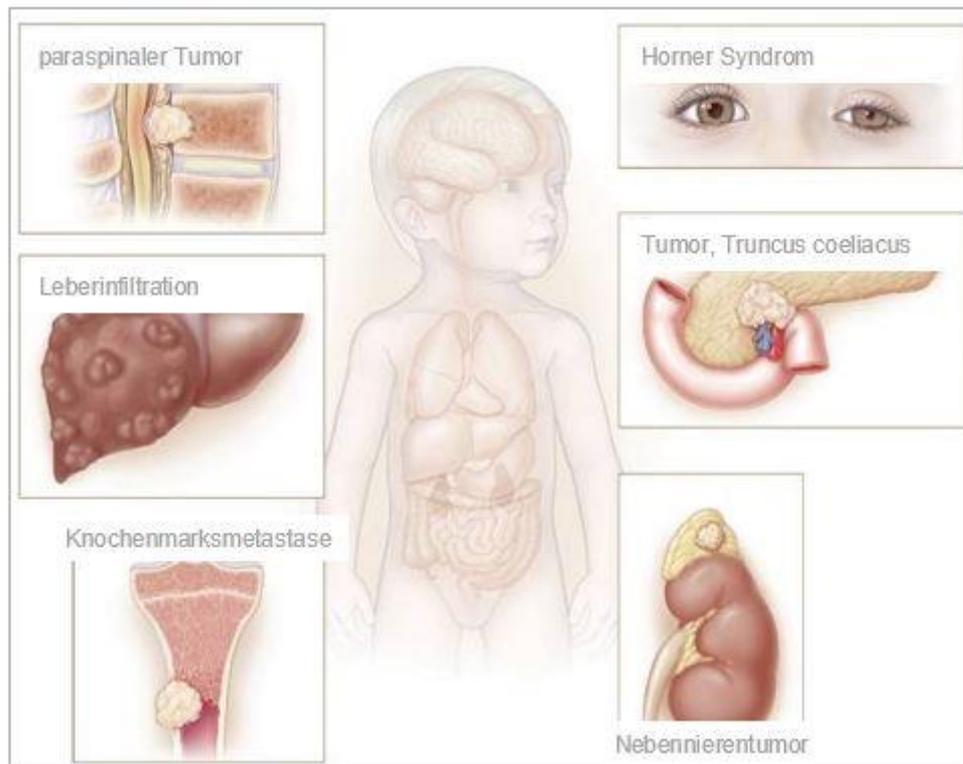


Abbildung 1.2. Klinische Präsentation: Unterschiedliche Lokalisationen, Metastasierungen und Symptome, die häufig auffällig sind, wenn der Patient in die Klinik kommt (modifiziert nach (Maris, 2010)).

1.2.2. Diagnostik

Die Diagnose des Neuroblastoms wird anhand von unterschiedlichen Untersuchungen gesichert (Simon et al., 2017).

Wichtig ist hierbei erst einmal eine komplette körperliche Untersuchung. Bei den bildgebenden Verfahren wird neben der CT und der MRT auch die Szintigraphie mit Metaiodbenzylguanidin (MIBG) zur Metastasensuche eingesetzt. Diese Verbindung reichert sich in Geweben an, die Katecholamine produzieren (Lassmann and Treves, 2014). Somit ist sie bei Neuroblastomen geeignet, da diese meist Katecholamine produzieren. Bei MIBG-negativen Tumoren wird eine ^{99m}Tc -Szintigraphie eingesetzt.

In der Laboruntersuchung sind Katecholamin-Metabolite (Homovanillinmandelsäure, Vanillinmandelsäure) im Serum und im Urin auffällig (Hero et al., 2011). Sie dienen, genau wie die neuronenspezifische Enolase (NSE), als Tumormarker (Massaron et al., 1998). Zusätzlich werden molekulargenetische Faktoren untersucht. Im Rahmen der Diagnostik wird die Kopienzahl des Onkogens MYCN und der chromosomalen Region 1p bestimmt sowie der Mutationsstatus der Anaplastischen Lymphomkinase (ALK) (Simon et al., 2019).

Zur endgültigen Diagnose sollte eine Tumorbiopsie durchgeführt werden. Anhand dieses Tumorgewebes können histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt werden, die es ermöglichen, eine genaue Diagnose zu stellen. Eventuell ist zusätzlich eine Knochenmarkspunktion notwendig (Hero et al., 2011).

1.2.3. Klassifikation & Stadien des Neuroblastoms

Die Stadieneinteilung des Neuroblastoms erfolgt nach dem *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) (Brodeur et al., 1993) (Tab. 1.1.). Für die histologische Einteilung wird die *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC) verwendet (Shimada et al., 1999).

Tabelle 1.1. INSS Kriterien der Stadieneinteilung (Brodeur et al., 1993)

Stadium	Kriterien
Stadium 1	<ul style="list-style-type: none"> • lokalisierter Tumor • makroskopische komplette Entfernung • repräsentative Lymphknoten histologisch tumorfrei
Stadium 2A	<ul style="list-style-type: none"> • lokalisierter Tumor • makroskopisch inkomplette Entfernung • repräsentative Lymphknoten histologisch tumorfrei
Stadium 2B	<ul style="list-style-type: none"> • lokalisierter Tumor • ipsilateraler Lymphknotenbefall
Stadium 3	<ul style="list-style-type: none"> • nicht resektabler Tumor • Überschreitung der Mittellinie
Stadium 4	<ul style="list-style-type: none"> • Fernmetastasen
Stadium 4S	<ul style="list-style-type: none"> • lokalisierter Primärtumor (Stadium 1, 2A oder 2B) • Säuglinge < 18 Monate • minimaler Knochenmarksbefall

1.2.4. Molekulare Eigenschaften

Neuroblastome zeigen eine sehr heterogene genetische Veränderung auf. Es differenziert sich eine Gruppe mit einem günstigen Verlauf und eine Gruppe mit einem ungünstigen Verlauf heraus. Diese Gruppen stellen von Beginn zwei unterschiedliche Tumorarten dar, sie gehen nicht auseinander hervor. Die Tumorart mit dem günstigen Verlauf zeichnet sich durch eine spontane Regression und eine Differenzierung aus. Eine Progression und ein aggressives Tumorwachstum zeigt die Tumorart mit dem ungünstigen Verlauf.

Der Tumorart mit dem günstigen Verlauf liegen auf molekularer Ebene eine geringe segmentale Aberration der Chromosomen und eine geringe Mutationsfrequenz zugrunde. Außerdem ist keine Telomerstabilisierung vorhanden und es liegt meist ein hyperdiploider (3N) Chromosomensatz vor (Hertwig et al., 2016) (Abb. 1.3.). Der ungünstige Verlauf der zweiten Tumorart lässt sich auf einen aktiven Mechanismus zur Telomerstabilisierung aufgrund erhöhter Telomeraseaktivität durch eine MYCN-Amplifikation (Molenaar et al., 2012) oder eine TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*)-Translokation zurückführen (Peifer et al., 2015, Valentijn et al., 2015). MYCN ist ein Onkogen,

das häufig in Verbindung mit einem Neuroblastom auftritt (Schwab, 1990). Auch die Aktivierung des *Alternative Lengthening of Telomeres* (ALT) Signalwegs, der mit einer ATRX-Mutation assoziiert ist (Cheung et al., 2012, Pugh et al., 2013), kann zu einer Telomerstabilisierung führen. Zusätzlich wurden bei den Hochrisiko-Neuroblastomen eine höhere Mutationsfrequenz, ein diploider oder tetraploider Chromosomensatz (2N, 4N) und spezifische segmentale Chromosomenveränderungen beobachtet (Ladenstein et al., 2001). Eine wichtige Rolle in Bezug auf bestimmte Signalwege, wie zum Beispiel den MYCN-Signalweg, der für ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung sorgt, spielt unter anderem die ALT-Mutation beziehungsweise die ALT-Amplifikation (Onitake et al., 2009). Diese Amplifikation führt zu einer Verlängerung der Telomere, die nicht von der Telomerase abhängig ist (Farooqi et al., 2014).

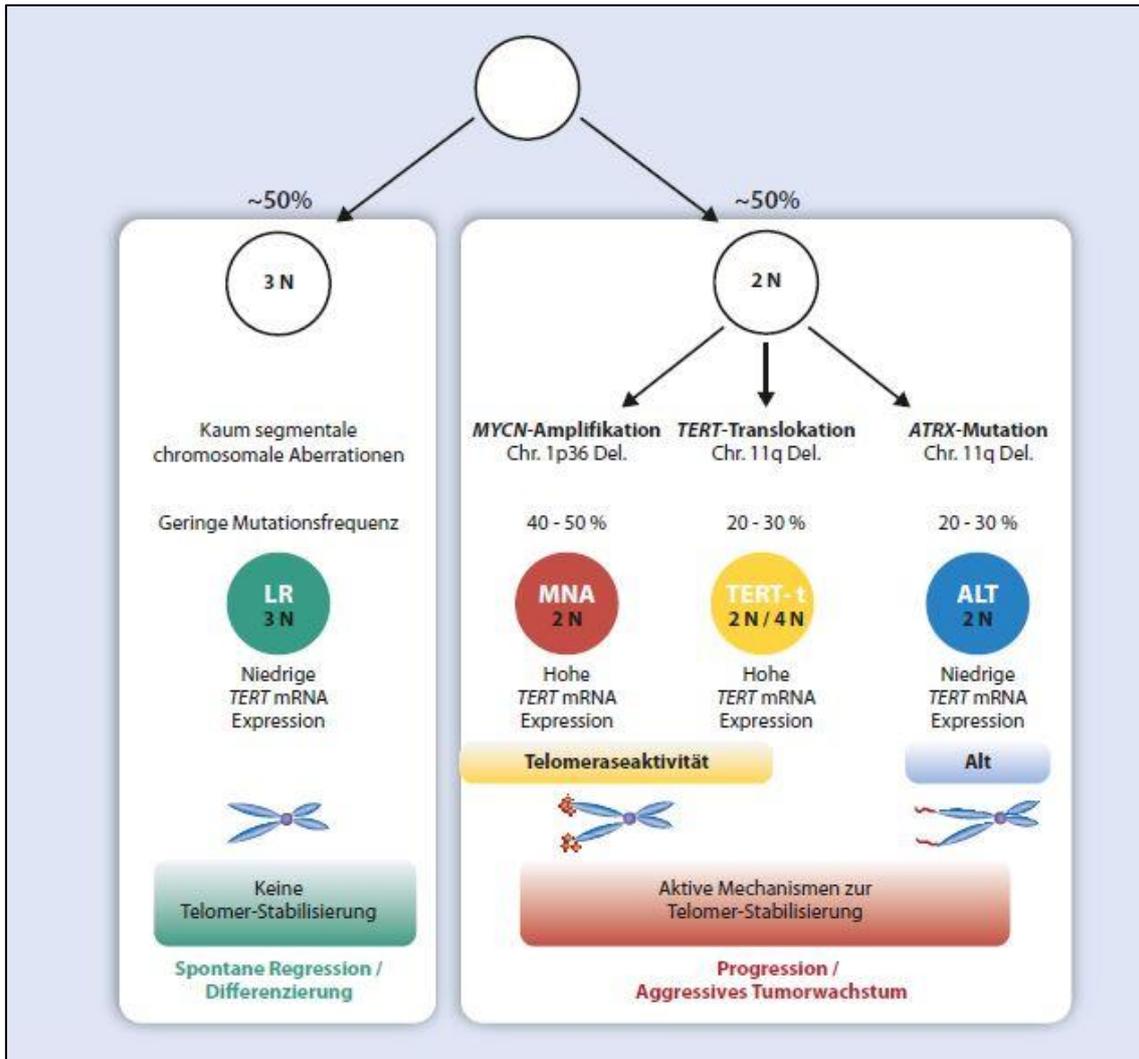


Abbildung 1.3. Molekulare Eigenschaften des Neuroblastoms: Etwa die Hälfte der Neuroblastome weist einen günstigen Verlauf auf und zeichnet sich durch eine spontane Regression und eine Differenzierung aus. In diesem Fall liegt keine Telomerstabilisierung vor. Die andere Hälfte der Neuroblastome zeigt einen ungünstigen Verlauf mit Progression und aggressivem Tumorwachstum. Zusätzlich wurden aktive Mechanismen zur Telomerstabilisierung nachgewiesen. (Niemeyer and Eggert, 2018)

1.2.5. Risikoeinschätzung, Prognose

Für eine adäquate Risikoeinschätzung werden die Patienten in 4 Risikogruppen eingeteilt: sehr niedrig, niedrig, mittel, hoch. Diese Einteilung erfolgt an bestimmten Prognosefaktoren mithilfe der INRG-Klassifikation (*Internationale Neuroblastoma Risiko Group*-Klassifikation) (Cohn et al., 2009). Hier werden die folgenden Faktoren berücksichtigt: das Tumorstadium nach INSS-Klassifikation, das Patientenalter, hier liegt der Cut-off bei 18 Monaten, und klinisch chemische Parameter wie LDH und der initiale Ferritin-Wert. Außerdem werden die Tumorpathologie nach INPC, der Ploidiegrad/DNA-Index, der MYCN-Status, die 1p36-Deletion und die 11q-Deletion berücksichtigt. Das ereignisfreie 5-Jahres Überleben liegt in der sehr niedrigen Risikogruppe bei über 85 %, in der niedrigen Risikogruppe zwischen 75 und 85 %, in der mittleren Risikogruppe zwischen 50 und 75 % und in der hohen Risikogruppe bei weniger als 50 % (Cohn et al., 2009).

1.2.6. Therapie des Neuroblastoms

Anhand der oben beschriebenen Risikoeinschätzung wird sich für die passende Therapieoption entschieden (Oberthuer et al., 2015). Generell stehen folgende Optionen zur Verfügung: eine Operation (Murphy and La Quaglia, 2014), eine Strahlentherapie (Bianchi et al., 2018) und/oder eine Chemotherapie (Evans, 1980), sowie immuntherapeutische Ansätze und eine Stammzelltransplantation (Berthold et al., 2005). Im Bereich der Chirurgie bestehen die primäre und die sekundäre Resektionsmöglichkeit. Die beiden Möglichkeiten unterscheiden sich darin, dass der Tumor bei der primären Resektion ohne vorherige Therapie entfernt werden kann. Bei der sekundären Resektion hingegen muss zuerst eine andere Therapie erfolgen (z.B. Chemotherapie oder Bestrahlung), um den Tumor dann entfernen zu können. Die individuelle Entscheidung wird auf der Grundlage der Tumorlokalisierung, dem Bezug zu großen Gefäßen und Nerven und der Präsenz von Fernmetastasen getroffen. Die Strahlentherapie wird vor allem bei Hochrisikopatienten zur lokalen Kontrolle des Primärtumors und bei Chemotherapie-refraktären Metastasen eingesetzt. Die Chemotherapie stellt die wichtigste Therapiestufe für ein intermediäres und ein hohes Risiko dar. Hier werden Alkylanzien, Anthrazykline, Platinanaloga und viele weitere

Chemotherapeutika eingesetzt (Maris, 2010). In der Rezidivtherapie werden heute schon viele verschiedene Medikamente eingesetzt, die spezifisch auf bestimmte molekulare Veränderungen des Tumors wirken. Zum Beispiel ALK-Inhibitoren (George et al., 2008, Matthay et al., 2012), Tyrosinkinase-Inhibitoren (Brodeur et al., 2009) und EGF (*Epidermal Growth Factor*)-Rezeptor-Inhibitoren (Zheng et al., 2016, Nam et al., 2015). In diesem Zusammenhang ist es wichtig, die Patienten, die für diese Therapien geeignet sind, frühzeitig herauszufiltern und mit Hilfe von geeigneten Biomarkern zu erkennen (Cheung and Dyer, 2013). Hier ist zum Beispiel das Gangliosid GD2 als Biomarker für Patienten mit Neuroblastom und einem hohen Risiko zu nennen (Balis et al., 2020). Für die Zukunft ist es außerdem erstrebenswert, dass man die Patienten identifiziert, die mit der Standardtherapie eine schlechte Prognose haben. Bei ihnen können eventuell die Medikamente, die normalerweise nur in der Rezidivsituation eingesetzt werden, schon als Primärtherapie herangezogen werden (Moreno et al., 2017). Man hat zum Beispiel herausgefunden, dass Patienten, die zur Hochrisikogruppe gehören, teilweise besser von einer Stammzelltransplantation profitieren als von einer Chemotherapie (Berthold et al., 2005). Andere Patientengruppen wiederum profitieren von einer Antikörpertherapie mit dem chimären monoklonalen Antikörper CH14.18, der gegen das Disialogangliosid GD2 gerichtet ist (Handgretinger et al., 1995). Eine weitere Verbesserung der Stammzelltransplantation stellt die Depletion der T-Zell-Rezeptor (TCR) α/β -positiven T-Zellen und der CD19-positiven B-Zellen vor der Transplantation dar. Mit Hilfe dieser spezifischen Technik wird das Auftreten einer *graft versus host disease* (GvHD) deutlich verringert (Sahasrabudhe et al., 2019).

1.3. Seneszenz & die Rolle von TNF- α & IFN- γ

1.3.1. Seneszenz

Der Begriff Seneszenz kann am ehesten durch einen Replikationsstopp der Zelle beschrieben werden, also ein Endpunkt, an dem sich die Zelle nicht mehr teilt und nicht mehr in den Zellzyklus eintritt (Hayflick, 1965, Hayflick and Moorhead, 1961). Dennoch gibt es bis heute keine einheitliche Definition für den Zustand der Seneszenz (Sharpless and Sherr, 2015). Um die Seneszenz zu beschreiben, werden ein permanenter Wachstumsarrest (engl. *growth arrest*) und verschiedene molekulare Marker herangezogen. Dennoch gibt es nicht nur einen einzigen Aspekt, der auf eine Seneszenz hinweist, sondern nur durch die Zusammenschau mehrerer Faktoren kann eine mögliche Seneszenz festgestellt werden (Blagosklonny, 2011, Hernandez-Segura et al., 2018). Ein stabiler Ausstieg aus dem Zellzyklus wird vor allem durch den p53- und den p16/Retinoblastom-Protein (Rb)-Signalweg möglich (Salama et al., 2014). Diese Tumorsuppressoren können zu einem dauerhaften Arrest in der G1- oder G2-Phase führen (Gire and Dulić, 2015). Das Tumorsuppressorprotein p16^{INK4a} spielt im Rahmen der Seneszenz eine große Rolle, da es den Wiedereintritt von der G1-Phase in die S-Phase verlangsamt oder sogar ganz unterdrückt (Vandenberk et al., 2011, Coppe et al., 2011). Dieses Protein wird auch als Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A (CDKN2A, engl. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*) bezeichnet. Auch das Heterochromatin-Protein 1 (HP1)- γ ist hier zu nennen. Im Rahmen einer Seneszenz kommt es zu einer Veränderung des Chromatins in der Zelle (Narita et al., 2006). Durch diese Veränderung können die Seneszenz-assoziierte Heterochromatin Foci (SAHF) bei seneszenten Zellen beschrieben werden (Narita et al., 2003). In diesem Zusammenhang spielt HP1- γ eine große Rolle, da durch den vermehrten Nachweis dieses Proteins ein erhöhter Anteil an Heterochromatin in seneszenten Zellen nachgewiesen werden kann (Bartkova et al., 2011). Typisch für seneszente Zellen ist unter anderem auch die Abwesenheit von Proliferationsmarkern. Als Proliferationsmarker, die auf Abwesenheit untersucht werden können, sollen hier Ki67 und das *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) genannt werden (Lawless et al., 2010). Es ist außerdem wichtig die

Änderung der Morphologie zu untersuchen: Seneszente Zellen stellen sich eher größer dar, bei adhärennten Zellen ist eine Abflachung zu erwarten (Campisi, 2013). Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase (SA- β -gal) ist der erste histochemische Marker, mit dem eine Seneszenz im Gewebe nachgewiesen werden konnte (Dimri et al., 1995). Eine seneszente Zelle wird außerdem über ihren Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) gekennzeichnet, auch *Senescence-Messaging Secretome* (SMS) genannt. Durch diesen Phänotyp werden die Faktoren einer Seneszenz, wie zum Beispiel der Zellzyklusarrest, verstärkt (Chien et al., 2011, Lopes-Paciencia et al., 2019) und so die Inhibition einer Tumorentstehung durch eine Seneszenz unterstützt (Acosta et al., 2013). Mit Hilfe der Sekretion der unterschiedlichsten Botenstoffe kann so eine seneszente Zelle auch über ihre Grenzen hinweg wirken und Einfluss auf das umliegende Gewebe nehmen (Kuilman and Peeper, 2009). Wichtige Botenstoffe sind hier Zytokine, Chemokine und Proteasen. Diese mobilisieren das Immunsystem und helfen somit beschädigtes Gewebe oder erste Tumorzellen zu reparieren beziehungsweise zu beseitigen (Lopes-Paciencia et al., 2019). Allerdings gibt es hier auch Quellen, die eine Tumorentstehung durch den SASP beschreiben (Coppe et al., 2010, Coppe et al., 2008). In diesem Rahmen wird vor allem die chronische Entzündung, die durch den SASP hervorgerufen werden kann, in den Vordergrund gestellt, da eine Entzündung eine Tumorentstehung unterstützen kann (Coppe et al., 2010, Lopes-Paciencia et al., 2019).

Das Stadium einer Seneszenz wurde *in vitro* und *in vivo* an den unterschiedlichsten Modellen überprüft und der Mechanismus dahinter beobachtet. Es wurde festgestellt, dass eine Seneszenz durch Stress, der mit Krebs assoziiert ist, darunter fällt auch DNA-Replikationsstress (Bartkova et al., 2006), hervorgerufen werden kann. Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen Seneszenz und dem Vorhandensein von Onkogenen (Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS)) gezeigt werden (Kuilman et al., 2010). So kann durch den Zustand der Seneszenz einer Zelle die Tumorentstehung unterdrückt werden. Darüber hinaus kann es sogar zu einer Unterstützung bei der Reparatur von Gewebe kommen. Generell können seneszente Zellen vom

Immunsystem erkannt und beseitigt werden (Kang et al., 2011). Auf der anderen Seite kann es aber auch durch die Induktion einer Inflammation, unter anderem durch den SASP, zu einer Progression des Tumorwachstums und zum Altern der Zelle kommen, indem die Immunabwehr geschwächt wird (Rodier and Campisi, 2011).

Generell stehen die Begriffe Seneszenz, Wachstumsarrest (engl. *growth arrest*) und Altern (engl. *aging*) in enger Beziehung zueinander. In dieser Arbeit wird definiert, dass ein permanenter Wachstumsarrest einen Faktor darstellt, der eine Seneszenz ausmacht. Allerdings müssen noch weitere Faktoren untersucht werden, um endgültig eine Seneszenz von Tumorzellen definieren zu können. Eine Seneszenz ist auch die Grundlage für einen normalen Alterungsprozess von gesunden, aber schon länger lebenden Zellen (Vandenberk et al., 2011). Außerdem steht fest, dass die Seneszenz auch in der Embryogenese eine große Rolle spielt (Perez-Mancera et al., 2014). In dieser Arbeit allerdings soll das Augenmerk auf der Induktion einer Seneszenz durch TNF- α und IFN- γ bei Tumorzellen, speziell Neuroblastomzellen, liegen.

1.3.2. TNF- α

Die Gruppe der Tumornekrosefaktoren gehört ebenso zur Gruppe der Zytokine wie die Gruppe der Interleukine und die Gruppe der Interferone.

Die Tumornekrosefaktoren übernehmen wichtige Funktionen in der angeborenen und adaptiven Immunität. Die meisten Zytokine der TNF-Familie fungieren als Transmembranproteine (Horiuchi et al., 2010), im Gegensatz zu vielen anderen immunologisch relevanten Zytokinen. Dadurch ist ihr Aktivitätsspektrum begrenzt, dennoch besitzen sie besondere Eigenschaften. Zwei verschiedene TNF-Rezeptoren übertragen die Wirkung von TNF- α . TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) wird von vielen verschiedenen Zellen exprimiert (z.B. Endothelzellen und Makrophagen). TNFR2 hingegen wird vor allem von Lymphozyten exprimiert (Tartaglia and Goeddel, 1992, Mehta et al., 2018).

Generell wird TNF- α vor allen Dingen von Makrophagen ausgeschüttet (Parameswaran and Patial, 2010), es kann aber auch von Mastzellen (Gordon and Galli, 1990), Lymphozyten (Mehta et al., 2018), Endothelzellen (Neuhaus et al., 2000) oder anderen Zellen sezerniert werden. TNF- α spielt eine große Rolle bei lokalen Entzündungen und Infektionen (Bradley, 2008).

Bei einer lokalen Infektion wirkt TNF- α auf die Endothelzellen (Pober and Cotran, 1990). Dadurch wird die Expression von Adhäsionsmolekülen stimuliert und das Austreten von Zellen wie zum Beispiel Monozyten und neutrophilen Zellen aus den Blutgefäßen unterstützt (Waters et al., 2013). Eine weitere wichtige Funktion von TNF- α ist die Expression von Proteinen zur lokalen Gerinnung. Dies geschieht ebenfalls durch die Stimulation von Endothelzellen. Die Gerinnsel verschließen die kleinen Blutgefäße und unterbinden den Blutfluss. So wird verhindert, dass die Erreger in den Blutkreislauf gelangen und sich im Körper verbreiten (Waters et al., 2013, Engelmann and Massberg, 2013). Gelangen die Erreger allerdings in den Blutkreislauf hat die Wirkung von TNF- α , die bei lokalen Infektionen sehr effektiv ist, verheerende Folgen. Das membrangebundene TNF- α kann von der Protease TACE (TNF- α -konvertierendes Enzym) spezifisch gespalten und als lösliches Zytokin freigesetzt werden (Horiuchi et al., 2010). Diese systemische Freisetzung von TNF- α in das Blut führt zu einer Gefäßerweiterung und somit zu einer Erniedrigung des Blutdrucks. Außerdem kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwände (McKenzie and Ridley, 2007) und somit zu einer Abnahme des Blutplasmavolumens. Dies führt letztendlich zu Schocksymptomen (Tracey et al., 1987). Als weitere Folge tritt eine disseminierte intravaskuläre Gerinnung auf, die zu einer Verbrauchskoagulopathie führt (Aderka, 1991, Tacchini-Cottier et al., 1998).

Eine weitere Wirkung von TNF- α im Rahmen einer Infektion ist die Erhöhung der Körpertemperatur. TNF- α wirkt in diesem Zusammenhang als ein endogenes Pyrogen und induziert die Synthese von Prostaglandin E2 durch das Enzym Cyclooxygenase 2. Das Prostaglandin E2 wirkt dann auf den Hypothalamus, der unter anderem für die Regulation der Körpertemperatur zuständig ist (Waters et al., 2013, Conti et al., 2004, Konsman et al., 2002).

Im Rahmen der Zytokin-induzierten Seneszenz (ZIS) kommt es durch TNF- α über den TNF-Rezeptor 1 (TNFR 1) zu einer Hochregulation von p16^{Ink4a} und dadurch zu einer Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb). Diese Hypophosphorylierung führt zur Hemmung von Zellzyklusgenen und somit zum Zellzyklusarrest (Wieder et al., 2013) (Abb. 1.4.).

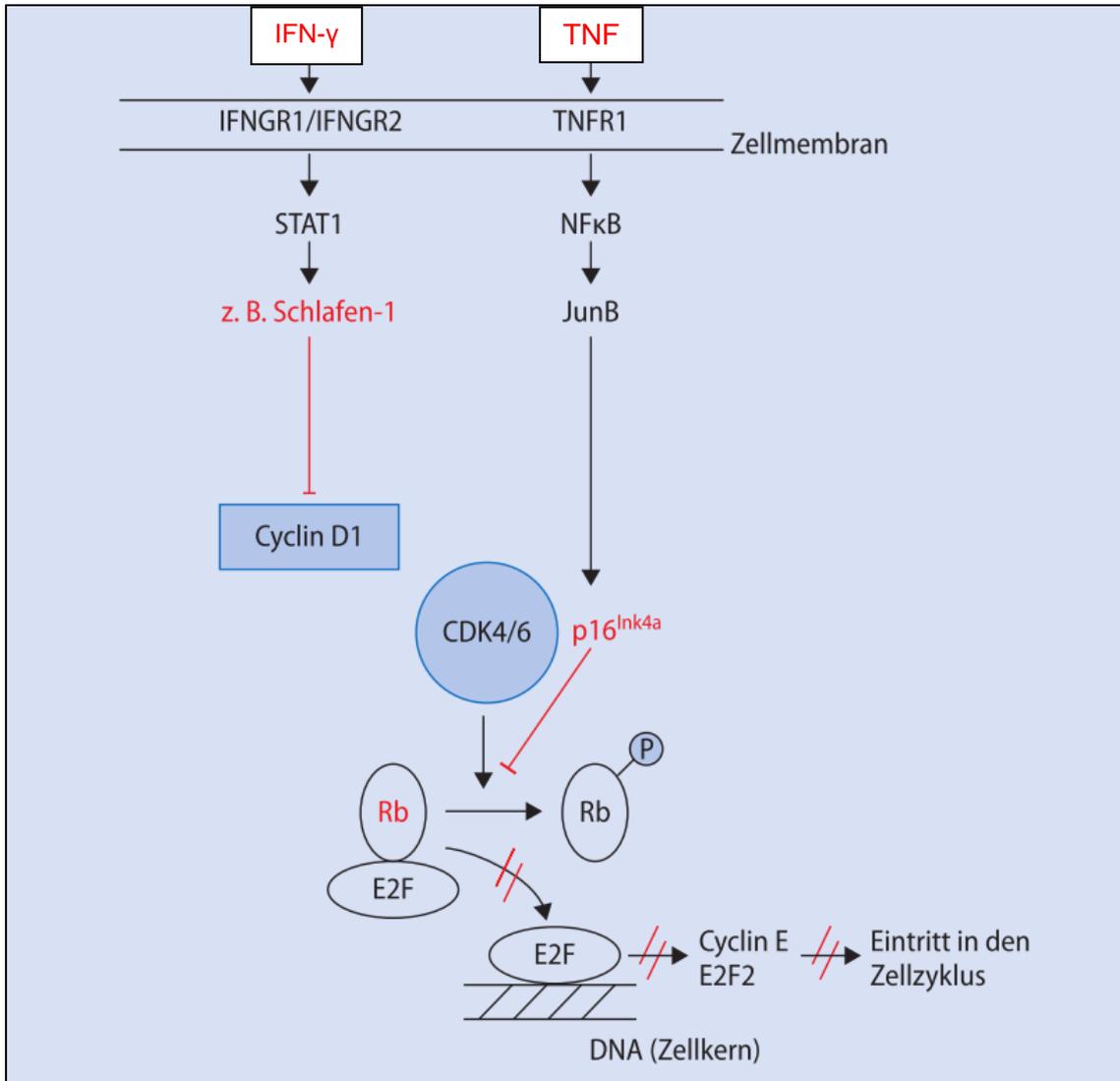


Abbildung 1.4. Seneszenzinduktion durch TNF- α & IFN- γ : links: IFN- γ führt über den entsprechenden Rezeptor und den Transkriptionsfaktor STAT1 zu einer Hochregulierung von Schlafen-1, so wird Cyclin D1 gehemmt; rechts: TNF- α führt über den entsprechenden Rezeptor, NF κ B und den Transkriptionsfaktor JunB, zu einer Hochregulierung von p16^{Ink4a}; gemeinsame Endstrecke: die Hemmung der CDK4/6 führt zu einer Hypophosphorylierung des Rb und somit zu einer Hemmung der Zellzyklusgene E2F (Transkriptionsfaktor), Cyclin E, es findet kein Eintritt in den Zellzyklus statt; IFNGR1/IFNGR2: IFN- γ -Rezeptor 1/2, TNFR1: TNF-Rezeptor 1, STAT1: Signal Transducer and Activator of Transcription 1, NF κ B: Nukleärer Faktor κ B, CDK 4/6: Cyclin-abhängige Kinase 4/6, Rb: Retinoblastom-Protein (Rau et al., 2018b)

1.3.3. IFN- γ

Die Interferone werden der Gruppe der Zytokine zugeteilt. Zu dieser Gruppe zählen ebenfalls die Tumornekrosefaktoren und die Interleukine. Die Gruppe der Interferone wird in 2 Typen unterteilt. Zu den Typ-I-Interferonen zählt IFN- α und IFN- β . IFN- γ wird als Typ-II-Interferon bezeichnet.

IFN- γ spielt eine wichtige Rolle bei der direkten und adaptiven Immunantwort. Die Produktion von IFN- γ erfolgt durch CD4⁺ T_h1-Effektorzellen, CD8⁺ T-Zellen und von NK-Zellen (Whitmire et al., 2005). Die Hauptfunktion ist die Aktivierung von Makrophagen (Nathan et al., 1983). IFN- γ lockt die Makrophagen zu den Infektionsherden. Dort können sie als Effektorzellen oder als Antigen-präsentierende Zellen fungieren (Unanue, 1984).

Eine wichtige Funktion ist die Bekämpfung von intrazellulären Krankheitserregern (Murray, 1988). IFN- γ aktiviert Phagozyten. So können intrazelluläre Pathogene wirksamer getötet werden. Außerdem bewirkt es in bestimmten Geweben, dass intrazelluläre Krankheitserreger besser abgewehrt werden können (Murray et al., 1983). CD4⁺ T-Zellen der T_h1-Untergruppe wirken bei der Bekämpfung bestimmter Bakterien, die sich in membranumschlossenen Vesikeln innerhalb von Makrophagen aufhalten, indem sie IFN- γ produzieren. Dadurch werden die Makrophagen aktiviert und ihr intrazelluläres Abtötungspotenzial verstärkt. So können die Bakterien vernichtet werden (Cowley et al., 2005, Schaible et al., 1999). Die Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen, die durch verschiedene Interleukine stimuliert wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Eindämmung von Infektionen, bevor zytotoxische CD8⁺ T-Zellen IFN- γ freisetzen (Mah and Cooper, 2016).

IFN- γ hemmt direkt die virale Replikation, indem es dazu führt, dass MHC-Klasse-I-Moleküle und andere Moleküle verstärkt exprimiert werden. Diese Moleküle können mit Peptiden von infizierten Zellen beladen und von zytotoxischen Zellen erkannt werden (Whitmire et al., 2005).

Außerdem wirkt IFN- γ im Rahmen der adaptiven Immunität auf dendritische Zellen und beeinflusst die Regulation der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu proinflammatorischen T_h1-Zellen (Whitmire et al., 2005). T_h1-Zellen selbst können dann IFN- γ produzieren (Schulz et al., 2009) und das Signal für die Differenzierung durch positive Rückkopplung verstärken.

Eine weitere Bedeutung kommt IFN- γ in der Beseitigung von Tumorzellen zu (Mantovani et al., 2004). Es aktiviert direkt oder indirekt andere Zellen zur Beseitigung dieser Tumorzellen.

Bei der Zytokin-induzierten Seneszenz (ZIS) kommt es durch IFN- γ über den IFN- γ -Rezeptor 1 und den IFN- γ -Rezeptor 2 (IFNGR1/IFNGR2) zu einer Hochregulation von Schlafen-1, dies führt zu einer Hemmung von Cyclin D1. Dadurch kommt es wie bei TNF- α auch zu einer Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb). Diese Hypophosphorylierung führt ebenfalls zur Hemmung von Zellzyklusgenen und somit zum Zellzyklusarrest (Wieder et al., 2013) (Abb. 1.4.).

1.3.4. Seneszenzinduktion durch TNF- α & IFN- γ

Bereits Ende des 20. Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Doxorubicin, in Tumorzellen ein Zustand der Seneszenz hervorgerufen wird (Chang et al., 1999, Lee and Lee, 2014). Hier spielt vor allen Dingen der Einfluss dieser zytotoxischen Medikamente auf die DNA eine große Rolle und führt hierdurch zu einer Seneszenzinduktion.

In der Behandlung von Tumoren spielen in der heutigen Therapie außerdem Checkpoint-Inhibitoren eine große Rolle. Sie werden unter anderem eingesetzt, um das Immunsystem zu aktivieren. So kann zum Beispiel die Blockade von Immuninhibitoren, wie das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 (CTLA 4) oder das programmierte Zelltod-Protein 1 (PD 1), vor allem bei soliden Tumoren ein Zustand des Wachstumsarrests hervorrufen (Wieder et al., 2018). Generell hängt die Effizienz der Immuncheckpoint-Blockade (ICB) in der Tumorthherapie von vier Faktoren ab. Eine wichtige Rolle spielen die generelle Tumor- und

Mutationslast (Rizvi et al., 2015). Neben der Expressionsrate von PD-L1 (Reck et al., 2016) ist außerdem die Intensität der Wirkung von IFN- γ auf den Tumor von großer Bedeutung (Gao et al., 2016, Sucker et al., 2017). In der Phase der Immuncheckpoint-Therapie, in der es zur Konsolidierung kommt, hat das Immunsystem einen großen Einfluss auf die Ausmaße des Resttumors. Ein wichtiger Bestandteil einer effizienten ICB Therapie ist eine Zytokin-induzierte Seneszenz durch T_H1-Zellen (Braumuller et al., 2013, Schilbach et al., 2015, Wieder et al., 2017). Unter anderem kann ein Zustand des Wachstumsarrest bei soliden Tumoren durch die Produktion von IFN- γ durch CD4⁺ T_H1-Zellen herbeigeführt werden (Muller-Hermelink et al., 2008). Die Zytokin-induzierte Seneszenz verhindert eine Hyperproliferation und führt zur Stabilität der Erkrankung, ohne den Tumor zu entfernen. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Mechanismus existiert, der von TNF- α und IFN- γ abhängt und zu einem Stopp der Tumorprogression (Inselzellkarzinom des Pankreas) führt (Muller-Hermelink et al., 2008). Diese Beeinflussung des Tumors durch TNF- α und IFN- γ geht sogar über den einfachen Wachstumsarrest hinaus. Es konnte ein permanenter Wachstumsarrest beobachtet werden, der auch als zelluläre Seneszenz bezeichnet wird (Braumuller et al., 2013, Wieder et al., 2017, Hubackova et al., 2016) (Abb. 1.5., B). Hier ist der Unterschied entscheidend, dass der Wachstumsarrest auch noch vorhanden ist, wenn den Zellen die Zytokine entzogen wurden und der Zustand irreversibel ist. Speziell bei Melanomen wurde eine Seneszenzinduktion durch TNF- α und IFN- γ nachgewiesen (Braumuller et al., 2013). Trotz all der Ergebnisse im Hinblick auf eine zelluläre Seneszenz mit positiver Beeinflussung des Tumors, sollte eine mögliche Tumorprogression durch genau eben diese Seneszenz nicht aus den Augen verloren werden (Campisi, 2013, Landsberg et al., 2012) (Abb. 1.5. A).

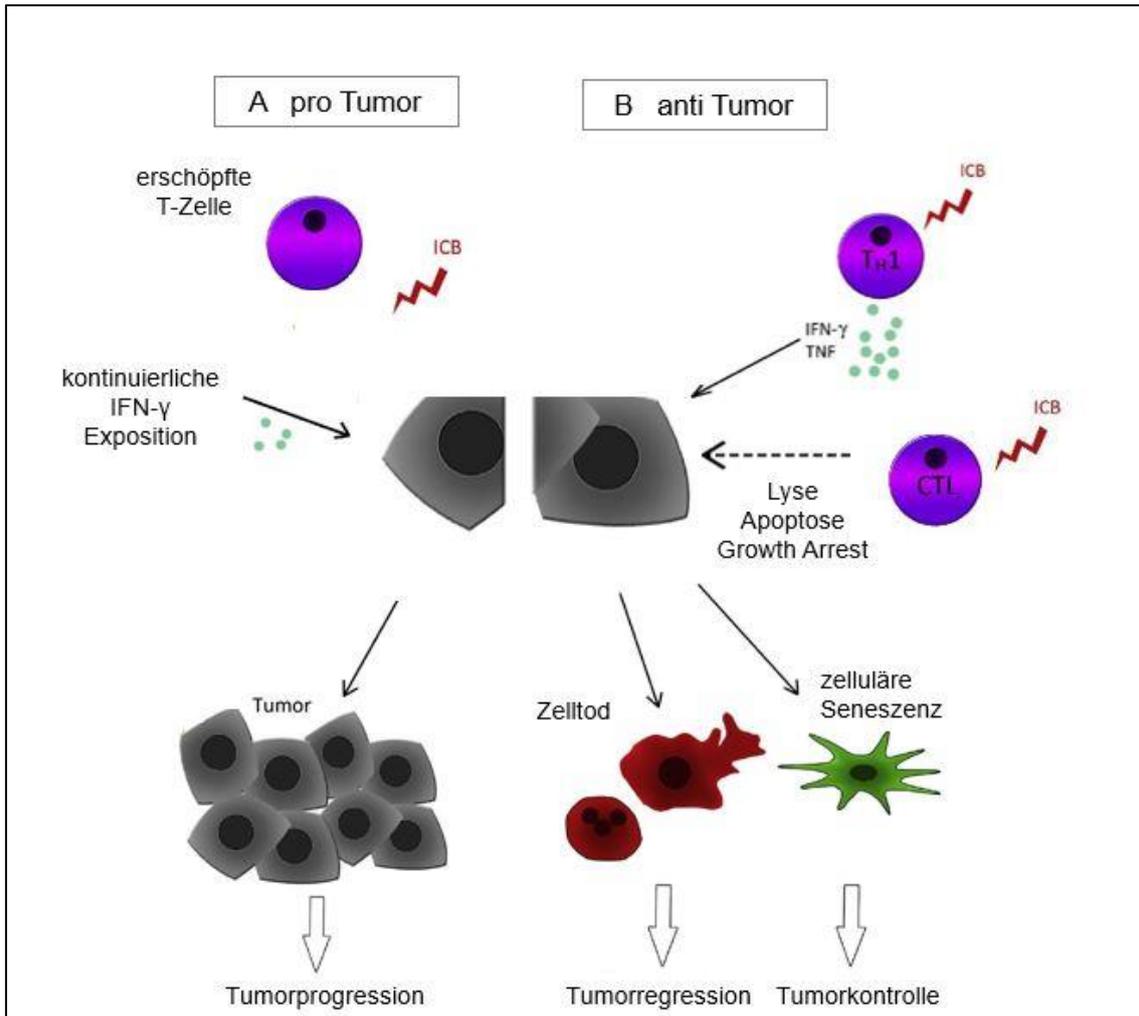


Abbildung 1.5. Zytokin-induzierte Seneszenz: A pro Tumor: Die T-Zellen ermüden aufgrund einer dauerhaften IFN- γ Freisetzung. Die ICB kann die T-Zellen nicht mehr aktivieren und es kommt zu einer Tumorprogression. B anti Tumor: Die ICB aktiviert die T_H1-Zellen. Diese setzen TNF- α , IFN- γ frei. So kommt es zu einer Tumorregression und einer Tumorkontrolle. ICB: Immune Checkpoint Blockade CTL: Zytotoxische T-Lymphozyten (modifiziert nach (Wieder et al., 2018))

1.4. Krebserkrankungen & Seneszenz

Krebserkrankungen im Allgemeinen werden häufig durch drei unterschiedliche Therapiekategorien, die häufig auch kombiniert eingesetzt werden, behandelt. Darunter fällt die Möglichkeit einer Operation, einer Chemotherapie oder auch einer Bestrahlung. In den letzten Jahren und Jahrzehnten spielt auch die Beeinflussung des Immunsystems durch Immuntherapie eine immer größere Rolle. Der Gedanke dahinter ist der, dass das Immunsystem des Körpers von sich aus versucht die andersartigen Zellen, also die malignen Krebszellen, zu erkennen und zu bekämpfen. Wenn man nun das Immunsystem durch eine spezifische Therapie unterstützen kann, ist dies ein sinnvoller und gut etablierter Ansatz, um die Behandlung von Tumorerkrankungen durch eine weitere Kategorie und Behandlungsoption zu erweitern. Bei allen bis jetzt genannten Therapieoptionen steht vor allen Dingen die Zerstörung oder die Entfernung der Krebszellen im Vordergrund (Wieder et al., 2017). Eine weitere denkbare Möglichkeit, um einen Tumorprozess unter Kontrolle zu halten, ist ein Ruhezustand, ein Wachstumsstopp oder auch ein Wachstumsarrest, auch als Seneszenz beschrieben. Hier sollte immer bedacht werden, dass eventuell ein erneuter Beginn der Zellproliferation aus diesem Stadium heraus möglich wäre. Dennoch ist eine Seneszenz meist durch einen irreversiblen Wachstumsarrest definiert und eine Rückkehr zu einer erneuten Proliferation der Zellen ist nicht mehr möglich. Die Arbeit von Thomas Wieder und seinen Mitautoren beschreibt für das Erreichen dieses Ruhezustandes den Einsatz von Zytokinen als ein denkbare Mittel, da durch diese Zytokine eine Seneszenz, also ein Wachstumsarrest, induziert werden kann. Die Zytokine, hier ist vor allen Dingen von TNF- α und IFN- γ sowie dem transformierendem Wachstumsfaktor β (TGF- β) die Rede. Diese können theoretisch entweder direkt oder durch die Übertragung von T_h1-Zellen eingesetzt werden. Mit Hilfe dieser Zytokine kann ein stabiler Zellzyklusarrest hervorgerufen werden. Durch die Zytokin-induzierte Seneszenz könnten die Tumorzellen in einen Ruhezustand versetzt werden und der Tumor so unter Kontrolle gebracht werden (Wieder et al., 2017). Bei Melanomen konnte bereits eine dauerhafte klinische Remission durch die Übertragung von Tumor-spezifischen T-Helferzellen beobachtet werden

(Hunder et al., 2008). Dennoch ist zu bedenken, dass die Zytokin-induzierte Seneszenz zur Sekretion von Wachstumsfaktoren und anderen Botenstoffen führen kann, sodass allgemein empfohlen wird, die seneszenten Zellen aus dem Körper zu entfernen. Hier wurde in einer Arbeit beschrieben, dass seneszente prä-maligne Hepatozyten durch Makrophagen beseitigt werden können (Kang et al., 2011). Ein genereller Vorteil einer möglichen Kontrolle der Krebserkrankung durch das Hervorrufen einer Seneszenz ist, dass dieser Eingriff in den Körper lange nicht so einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen und das Gewebe hat, wie zum Beispiel eine zytotoxische Chemotherapie (Hortobagyi et al., 2016). Zusammenfassend erachten Thomas Wieder und seine Mitautoren auf jeden Fall eine Kombination von zytotoxischen und nicht-zytotoxischen Ansätzen, die zum Beispiel eine Seneszenz auslösen, als sehr sinnvoll, da so mehrere unterschiedliche Angriffspunkte genutzt und angesprochen werden können und die Wahrscheinlichkeit einer Therapieresistenz der Krebszellen verringert werden könnte. Generell ist die Kombination von Chemotherapeutika mit einer Zytokin-induzierten Seneszenz, z.B. durch TNF- α und IFN- γ , zur Therapie von unterschiedlichen Tumoren ein vielversprechender Ansatz (Wieder et al., 2017).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit liegt darin die Grundlagenforschung im Bereich des Neuroblastoms voranzubringen. In den letzten Jahren wurde viel im Bereich der Seneszenz an den verschiedensten Tumorarten geforscht. Auch in der Hautklinik der Universitätsklinik Tübingen wurde die Seneszenzinduktion durch TNF- α und IFN- γ bei Melanomzelllinien untersucht. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Seneszenzinduktion durch TNF- α und IFN- γ auch bei Neuroblastomzelllinien möglich ist. Dazu wurden sieben unterschiedliche Neuroblastomzelllinien (LS, SH-SY5Y, LAN-1, Kelly, SK-N-AS, SK-N-BE(2) und SHEP) in verschiedenen Assays untersucht. Es wurde mit den unterschiedlichen Neuroblastomzelllinien eine Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Färbung, ein EdU Assay, eine CFSE-Färbung, ein Growth Assay, ein Luciferase Assay, ein IncuCyte® Assay und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Im klinischen Kontext betrachtet, ist das Neuroblastom eine häufige Krebserkrankung, die spät entdeckt wird und für die es in diesem Stadium immer noch wenige Behandlungsmöglichkeiten gibt. Vielleicht kann mithilfe dieser Arbeit und weiterführender Forschung in der Zukunft die Grundlage für einen neuen Therapieansatz, auch im Hinblick auf weitere Immuncheckpointblockaden, geschaffen und so auch die Prognose der Patienten verbessert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Aktenzeichen des Ethikvotums

- Nr.: 716/2015B02

2.1.2. Geräte

Beschreibung	Hersteller
Brutschrank Heraeus BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Brutschrank Heraeus Hera Cell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer, LSR II Flow Cytometer	BD, Heidelberg
Durchlicht-Mikroskop, Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
Einfrierbehälter (CoolCell)	Biocision
Handzähler	Baumer GmbH, Friedberg
Kamera, Axio Cam MRc	Zeiss, Jena
Kamera, EOS 550D	Canon, Krefeld
Kamera, Spot RT3	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Kühlschrank	Gram, Sarstedt
Live Cell Analysis System IncuCyte S3	Essen BioScience, Ann Arbor, USA
Mehrkanalpipette Discovery 20-200 µl	HTL Lab Solutions, Warschau Polen
Mikroskop, Axiovert 135	Zeiss, Jena
Mikroskop, Axiovert 200	Zeiss, Jena
Pipetten Discovery	HTL Lab Solutions, Warschau, Polen
Pipetten Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, Biebertal
Pipettierhilfe Pipetboy 2	Integra Biosciences GmbH, Biebertal
Sterilbank Biowizard	Kojair, Mänttä-Vilppula, Finnland
Tiefkühlschrank (-20 °C)	Gram, Sarstedt
Tiefkühlschrank (-80 °C)	Herafreeze HFU T Series, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Victor 2 Microplate Reader	Perkin Elmer (Wallac Oy), Joensuu, Finnland
Vortex Mixer	neoLab, Heidelberg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotanta 460 R	Hettich, Tuttlingen

2.1.3. Software

Beschreibung	Hersteller
Advanced Renamer	Kim Jensen
Axio Vision Rel. 4.8	Zeiss, Jena
BD FACS Diva Version 6.0	BD, Heidelberg
EndNoteX9.1	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
EOS Utility	Canon, Krefeld
FlowJo Version 10	FlowJo LLC, Ashland, USA
GraphPad Version 7.03	GraphPad Software, La Jolla, USA
IncuCyte S3 Software	Essen BioScience, Ann Arbor, USA
JMP	SAS Institute GmbH, Böblingen
Paint	Microsoft, Redmond, USA
SPSS	IBM Analytics, New York, USA
VisiView	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Wallac 1420 Version 3.0	Perkin Elmer (Wallac Oy), Joensuu, Finland
Word und Excel 2010	Microsoft, Redmond, USA

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Hersteller
Deckgläser rund, Ø 16mm	Omnilab, Bremen
Deckgläser 20x26x0,4 mm	VWR, Darmstadt
Einmalhandschuhe Peha-soft Nitrile	Abena, Zörbig
FACS Rundboden Röhrchen	BD, Heidelberg
Filter, MCE-Membran, 0,22 µm, Ø 33 mm	Merck, Millipore, Darmstadt
Filter, PES-Membran, 0,22 µm, Ø 33 mm	Merck, Millipore, Darmstadt
Kryoröhrchen 2ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Neubauer-Zellzählkammer	Hecht-Assistent, Paris, Frankreich
Neubauer-Zellzählkammer	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Perfusionsspritze 50 ml	Becton Dickinson, Louth, Irland
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reservoirs 25 ml	VWR, Westchester, USA
Stripetten 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturflaschen 250 ml, Filterschraubverschluss	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 50 ml, Filterschraubverschluss	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten Flachboden 12-Well	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturplatten Flachboden 48-Well	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturplatten Flachboden 6-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten Flachboden 96-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten Flachboden 96-Well, weiß	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugen-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen

2.1.5. Zellkulturmedien, -zusätze & -utensilien

Beschreibung	Hersteller
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Bovine Serum Albumins (BSA)	Sigma, Steinheim
Destilliertes Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEM	Lonza, Basel, Schweiz
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA (0,5 M)	AppliChem, Darmstadt
FCS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Formaldehyd 37 %	AppliChem, Darmstadt
Glycerol	Sigma, Steinheim
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEA)	Sigma, Steinheim
PBS	Sigma, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Triton X-100 10 %	Sigma, Steinheim
Trypanblau 0,4 %	Sigma, Steinheim
Trypsin/EDTA Solution 0,05 %	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA Soluton 0,25 %	Sigma, Steinheim
Tween 20	AppliChem, Darmstadt

2.1.6. Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
Einfriermedium	FCS 90 % DMSO 10 %
SH-SY5Y-Medium	DMEM 78 % FCS 20 % L-Glut 1 % Pen/Strep 1 %
SKN-Medium	DMEM 87 % FCS 10 % L-Glut 1 % Pen/Strep 1 % NEA 1 %
Standardmedium (STM)	RPMI 1640 88 % FCS 10 % L-Glut 1 % Pen/Strep 1 %

2.1.7. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	500 ml PBS 2 mM EDTA 2 % FCS 0,01 % Na-Azid
PBSE	500 ml PBS 2 mM EDTA

2.1.8. Zelllinien

Zelllinie	Herkunftsort	Zellkulturmedium
Kelly	humane Neuroblastomzelllinie	STM
Kelly mCherry	siehe Kelly, zusätzlich transduziert mit Fluoreszenzprotein mCherry	STM
LAN-1	Knochenmarksmetastase eines 2 Jahre alten Jungen (humane Neuroblastomzelllinie)	STM
LAN mCherry	siehe LAN-1, zusätzlich transduziert mit Fluoreszenzprotein mCherry	STM
LS	abdomineller Primärtumor eines 16 Monate alten Mädchens (humane Neuroblastomzelllinie)	STM
SHEP-TET 21N Luc-mCherry	Subklon einer Knochenmarksmetastase eines 4 Jahre alten Mädchens (humane Neuroblastomzelllinie)	STM
SH-SY5Y	Subklon einer Knochenmarksmetastase eines 4 Jahre alten Mädchens (humane Neuroblastomzelllinie)	SH-SY5Y-Medium
SH-SY5Y mCherry	siehe SH-SY5Y, zusätzlich transduziert mit Fluoreszenzprotein mCherry	SH-SY5Y-Medium
SK-N-AS	Knochenmarksmetastase eines 6 Jahre alten Mädchens (humane Neuroblastomzelllinie)	SKN-Medium
SK-N-BE(2)	Knochenmarksmetastase eines 2 Jahre alten Jungen (humane Neuroblastomzelllinie)	SKN-Medium
WM 115	Primärtumor einer 55 Jahre alten Frau (humane Melanomzelllinie)	STM

2.1.9. Zytokine

Zytokin	LOT-Nummer	Hersteller
rh TNF- α	1406JC21	CellGenix, Freiburg
rh IFN- γ	1425OK13	CellGenix, Freiburg
IFN- γ	426P078	PromoKine, Heidelberg

2.1.10. Kits

Kit	Hersteller
<p>Senescence Cells Histochemical Staining Kit (LOT-Nummer: 085M4054V)</p> <ul style="list-style-type: none">• Fixation Buffer 10x 15 ml (Catalog Number F1797) → solution containing 20 % formaldehyde, 2 % glutaraldehyde, 70,4 mM Na₂HPO₄, 14,7 mM KH₂PO₄, 1,37 M NaCl, 26,8 mM KCl• Reagent B 1,5 ml (Catalog Number R5272) → 400 mM Potassium Ferricyanide• Reagent C 1,5 ml (Catalog Number R5147) → 400 mM Potassium Ferrocyanide• X-gal Solution 4 ml (Catalog Number X3753) → 40 mg/ml• Staining Solution 10x 15 ml (Catalog Number S5818)• Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x 60 ml (Catalog Number P3621)	Sigma, Saint Louis, USA

2.1.11. Chemikalien & Reagenzien

Beschreibung	LOT-Nummer	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	096M4014V	Sigma, Steinheim
5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU)	20518	Biomol GmbH, Hamburg
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	91-0675	BD, Heidelberg
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	B235872	BioLegend, San Diego, USA
5-(und 6-) Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	B181902/B247614	BioLegend, San Diego, USA
CuSO ₄ Pentahydrat	BCBV6964	Sigma, Steinheim
D-Luciferin, synthetisch	L9504	Sigma, Steinheim
Glass Antifade Mountant	951985	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IncuCyte Cytotox Green Reagent	1925922-110717	Essen BioScience, Ann Arbor, USA
Na-L-Ascorbat	SLBT6741	Sigma, Steinheim
Poly-L-Lysin	RNB60769	Sigma, Steinheim
Propidiumiodid (PI)	5170303212	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Sulfo-Cyanin-5-Azid	LD8GD	Lumiprobe GmbH, Hannover

2.1.12. Antikörper & Seren

Beschreibung	Konjugat	Isotyp	Klon	LOT-Nummer	Hersteller
Anti-Ki67	-	polyklonal	Rabbit IgG	GR32000471	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-PCNA	-	Mouse IgG2a	PC10	SG254285	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-CDKN2a (p16)	-	Maus IgG2b	15C10C30	B206683	BioLegend, San Diego, USA
Anti-HP1-γ	-	polyklonal	Rabbit IgG	GR300027-1	abcam, Cambridge, England
Anti-Rabbit IgG	AlexaFluor 488	polyklonal	Donkey IgG	134352	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
Anti-Mouse IgG	Cy5	polyklonal	Donkey IgG	132236	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
Anti-Mouse IgG	Cy3	polyklonal	Donkey IgG	133644	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
Normal Donkey Serum	-	-	-	135346	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Pflege der Zellkultur wurde unter einer Sterilbank durchgeführt. Es wurden entweder steril verpackte oder bei 120 °C mit Wasserdampf autoklavierte Einmalmaterialien verwendet. Die Desinfektion erfolgte mit 70 %igem Alkohol. Die Zellen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen mit einem Filterschraubverschluss in 12 ml Medium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.2. Passagieren von adhärenenten Zellen

Die Zellen wurden alle 2-5 Tage, bei ca. 80 % Konfluenz gesplittet. Dazu wurde das Medium aus den Kulturflaschen entnommen und der Flaschenboden mit 10 ml PBS gewaschen. Um den Zellrasen vom Flaschenboden zu lösen, wurden die Zellen für 3-5 Minuten mit einer 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Für die Zelllinien SK-N-BE(2) und Kelly mCh wurde eine 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung verwendet. Die Zellen wurden daraufhin durch Beklopfen der Kulturflasche vollständig gelöst. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde durch die Zugabe von 5 ml warmem Medium abgestoppt. Der Anteil, der weiterhin kultiviert werden sollte, bei einem Splitten von zum Beispiel 1:10 entspricht dieser Anteil 0,8 ml, verblieb in der Kulturflasche, der Rest wurde verworfen. In die Kulturflasche wurde danach frisches Medium hinzugeben, bis ein Volumen von 12 ml erreicht war. Im Falle des Beispiels also 11,2 ml.

2.2.3. Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop. Die Neubauer-Zählkammer wurde mit einem Deckglas abgedeckt, dabei wurde darauf geachtet, dass Newton'sche Ringe zu erkennen sind. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension mit Trypanblau angefärbt. Dieser Farbstoff ist in der Lage die Zellmembran toter Zellen zu passieren, dadurch stellen sich lebende Zellen unter dem Mikroskop hell, tote Zellen in einem sehr dunklen Blau dar. Für die Färbung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau verdünnt. Ein Teil der Verdünnung wurde anschließend zwischen das Deckglas und die Neubauer-Zählkammer pipettiert,

indem die Spitze der Pipette am Rand zwischen diesen beiden Einheiten angesetzt wurde. Dabei wird das Gemisch durch Kapillarkräfte in den Zwischenraum gesogen. Nun wurden die Zellen unter dem Mikroskop mithilfe eines Handzählers gezählt. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus 3 x 3 Großquadraten. Die Kantenlänge beträgt 1 mm, die Tiefe der Zählkammer beträgt 0,1 mm. Somit ergeben sich eine Fläche von 1 mm² und ein Volumen von 0,1 mm³ für ein Großquadrat. Je nach Zellzahl konnten unterschiedliche Teile der Zählkammer ausgezählt und die Formel für die Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter (siehe unten) entsprechend angepasst werden. Die Auszählung aller 4 Diagonalen entspricht hierbei einem Großquadrat.

$$\text{Zellzahl pro Milliliter} = (\text{gezählte Zellen/Anzahl der Großquadrate}) * 2 * 10.000 * 1/\text{ml}^{-1} \quad [1]$$

[1] *2 (Verdünnung), *10.000 (Faktor der Zählkammer)

2.2.4. Auftauen kryokonservierter Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad erwärmt bis nur noch in der Mitte ein Eiskern vorhanden war. In das Kryoröhrchen wurde 1 ml Kultiviermedium, das vorher im Wasserbad bei 37 °C erwärmt wurde, tropfenweise hinzugegeben. In einer 250 ml Zellkulturflasche wurden 10 ml ebenfalls erwärmtes Kultiviermedium vorgelegt und die Zellsuspension aus dem Kryoröhrchen dazugegeben. Beim Auftauen von kryokonservierten Zellen sollte zügig gearbeitet werden, da das DMSO, das im Einfriermedium enthalten ist, bei höheren Temperaturen toxisch auf die Zellen wirkt.

2.2.5. Kryokonservierung der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zuerst geerntet und nach Zentrifugation in kaltem Einfriermedium mit einer Konzentration von 4*10⁶ Zellen/ml aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zu je 1 ml in Kryoröhrchen überführt, die anschließend bei -80 °C mithilfe eines Einfrierbehälters eingefroren wurden. Hierbei sorgt der Einfrierbehälter für ein gleichmäßiges Einfrieren der Zellen. Dies geschieht dadurch, dass die Zellen 1 °C pro Minute runtergekühlt werden. So bilden sich keine Eiskristalle, die die Zellen beschädigen würden. Eine längerfristige Lagerung findet in Tanks statt, an deren Boden sich flüssiger Stickstoff befindet.

2.2.6. Kultivierung & Zugabe von TNF- α & IFN- γ

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Wirkung von TNF- α und IFN- γ auf unterschiedliche Neuroblastomzelllinien untersucht. Der Vergleich erfolgte immer zwischen unbehandelten Zellen, die als Kontrolle dienten und in reinem Medium kultiviert wurden, und Zellen, die mit Zytokinen behandelt wurden. Die Zellen wurden in Medium kultiviert, das mit TNF- α und IFN- γ versetzt wurde. Für alle folgend beschriebenen Assays ist die Kultivierung und Zugabe von TNF- α und IFN- γ grundlegend.

Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturplatten mit unterschiedlicher Anzahl an Wells. Sofern nicht anders erwähnt, wurden sowohl die Kontrollen als auch die später behandelten Zellen für 24 h in reinem Medium ausplattiert. Nach 24 h erfolgte entweder die Zugabe von frischem Medium für die Kontrolle oder die Zugabe von Medium mit TNF- α und IFN- γ für die behandelten Zellen. Soweit nicht anders beschrieben, wurde mit Konzentrationen von 10 ng/ml für TNF- α und 100 ng/ml für IFN- γ gearbeitet. Nach Zugabe wurden die Zellen für 72 bis 96 Stunden kultiviert.

2.2.7. Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Färbung

β -Galactosidase ist eine Hydrolase, die die Spaltung von β -Galactosidasen in Monosaccharide enzymatisch katalysiert. Diese ist normalerweise in allen Zellen aktiv und bei einem pH von 4.0 nachweisbar. Als Biomarker für seneszente Zellen wird die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase (SA- β -gal) analysiert, die bei einem pH von 6.0 nachgewiesen werden kann. Der Nachweis der SA- β -gal in seneszenten Zellen erfolgt durch die Zugabe des Substrats (X-Gal). Dadurch entsteht - neben Galaktose - ein Farbstoff, der sich in einem kräftigen Blau darstellt.

Vor der Färbung wurden die Zellen in 12-Well-Platten kultiviert. TNF- α und IFN- γ wurden nach 24 Stunden hinzugegeben. Die Färbung erfolgte 72 Stunden nach der Zugabe mithilfe des „Senescence Cells Histochemical Staining Kits“. Die Durchführung erfolgte weitestgehend nach Protokoll des Herstellers. Die Angaben in der folgenden Versuchsbeschreibung beziehen sich immer auf ein Well.

Zu Beginn wurde das Medium aus den Wells entfernt und die Zellen zweimal mit 400 µl 1x PBS gewaschen und anschließend in 600 µl 1x Fixierlösung für 6 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 400 µl 1x PBS gewaschen und in 400 µl der zuvor angesetzten Färbelösung (Staining Solution, Reagent B, Reagent C & X-Gal-Solution) inkubiert. Die Inkubation erfolgte über 16 Stunden bei 37 °C und 0 % CO₂. Die komplette Abwesenheit von CO₂ ist für die Aufrechterhaltung eines stabilen pH-Werts notwendig, da die Färbung, und somit der spezifische Nachweis der SA-β-gal Aktivität, von Diesem abhängig ist. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach der Inkubationszeit wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen mit DAPI gefärbt. Hierbei wird DAPI als Fluoreszenzfarbstoff zur Anfärbung der DNA im Zellkern verwendet, um bei der Auswertung die Zellen unter dem Mikroskop besser zählen zu können. Für die Färbung wurde eine Lösung mit 1 µg/ml DAPI in PBS hergestellt. In jedes Well wurden 400 µl dieser Lösung pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Färbelösung abgenommen und 400 µl 1x PBS hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einer Mikroskopkamera an drei unterschiedlichen Stellen in einem Well aufgenommen und anschließend das Verhältnis von gefärbten zu ungefärbten Zellen am Computer anhand der Bilder ausgezählt. Die SA-β-gal positiven Zellen zeigten unter dem Mikroskop eine kräftige Blaufärbung.

2.2.8. EdU Assay

Das EdU Assay dient zur Beobachtung der Zellproliferation. 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) ist ein Thymidinanalogon und wird bei Teilung der Zellen in die DNA eingebaut. Mit Hilfe eines Farbstoffes kann es dann im FACS gemessen werden. Bei den Zellen, die sich in der Teilungsphase befinden, lässt sich ein stärkeres Signal messen, da sie während dieser Phase ihre DNA verdoppeln.

Vor der Zugabe von EdU wurden die Zellen in 6-Well-Platten in 2 ml Medium kultiviert. Um genügend Zellen für die spätere FACS-Messung zur Verfügung zu haben, wurde in der Gruppe der behandelten Zellen die doppelte Anzahl an Zellen ausplattiert. TNF- α und IFN- γ wurden nach 24 Stunden in 2 ml Medium hinzugegeben. Zu den Wells der unbehandelten Zellen wurden 2 ml Medium hinzugegeben. Die Zugabe von EdU erfolgte dann nach 96 Stunden Inkubationszeit. In der folgenden Versuchsbeschreibung werden die Angaben immer auf ein Well bezogen.

a) Einfügen von EdU

Das Medium wurde für die Zugabe von EdU aus den Wells abgenommen und anschließend 1080 μ l Medium und 120 μ l EdU 100 μ M hinzugegeben. Die finale Konzentration betrug somit 10 μ M. Nach der Zugabe wurden die Zellen 3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium mit EdU abgenommen und die Zellen einmal mit 1000 μ l PBS gewaschen. Es wurden 1000 μ l Trypsin hinzugegeben und die Platten für 6 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 1000 μ l Medium dazugegeben, um die Reaktion abzustoppen. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (2 min, 660 g). Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet.

b) Fixierung & Permeabilisierung der Zellen

Es wurden 100 µl 3,7 % Formaldehyd in PBS pro FACS-Röhrchen hinzugegeben und es erfolgte eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden 500 µl PBS hinzugegeben und die Zellen zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet. Es wurde noch ein weiteres Mal mit 500 µl PBS gewaschen. Dann wurde 200 µl 0,5 % Triton X-100 in PBS in jedes FACS-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach der Inkubationszeit wieder zweimal mit 500 µl PBS gewaschen.

c) Fluoreszenz – EdU-Detektion

100 µl des Reaktionsmixes wurden in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert: 88,8 µl CuSO₄ (200 mM in H₂O), 0,2 µl Sulfo-Cy5-Azid (2,5 mM in H₂O), 10 µl Na-L-Ascorbat (1000 mM in H₂O, immer frisch hergestellt). In jedes FACS-Röhrchen wurden 100 µl des Reaktionsmixes pipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten, lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Danach wurde zweimal ein Waschschrift mit 500 µl PBS durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 150 µl FACS-Puffer aufgenommen. Eine halbe Stunde vor der FACS-Messung wurden 1 µl PI beziehungsweise 20 µl 7-AAD hinzugegeben. Die Messung von Cy5 (em. 670 nm) erfolgte im APC Kanal (roter Laser, ex. 640 nm, em. 660 nm) und die Messung von PI (em. 617 nm) erfolgte im CF594 Kanal (blauer Laser, ex. 488 nm, em. 614 nm).

2.2.9. CFSE-Färbung

Die CFSE-Färbung wird zur Messung der Proliferation von Zellen eingesetzt. Dabei lässt sich bestimmen, wie oft sich eine Zellpopulation geteilt hat. Grundlage der Methode ist es, dass Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) in die Zellen gelangt und dort die Azetatgruppe durch die Esterase enzymatisch abgespalten wird. Dadurch entsteht ein Fluoreszenzfarbstoff. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt mit jeder Zellteilung um die Hälfte ab, da mit der Teilung das vorhandene CFSE gleichmäßig auf beide Zellen aufgeteilt wird.

a) Färbung der Zellen mit CFSE

Die Kultivierung erfolgte in 6-Well-Platten. Die Zellen wurden geerntet, die benötigte Anzahl in ein 15 ml Falcon überführt und mit 2 ml PBS bei 300 g für 10 Minuten gewaschen. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand vorsichtig abgeschüttet, das Zellpellet in 500 µl CFSE (5 µM) resuspendiert und dann inkubiert (20 min, 37 °C, 5 % CO₂). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5 ml Medium abgestoppt. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 300 g) wurde das Pellet in der entsprechenden Menge Medium aufgenommen, in 6-Well-Platten ausplattiert und im Brutschrank inkubiert (5 Tage, 37 °C, 5 % CO₂). Nach 24 Stunden wurde Medium zu den unbehandelten Zellen und Medium mit TNF-α und IFN-γ zur Behandlung der Zellen hinzugegeben. 96 Stunden nach der Zugabe erfolgte die FACS-Messung.

b) FACS-Färbung

Die Zellen wurden mit Trypsin gelöst, in FACS-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (2 min, 660 g). eFluor 780 wurde 1:1000 verdünnt, das Zellpellet in 500 µl dieser Lösung gelöst und für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei diente eFluor zur Anfärbung toter Zellen. Dadurch konnten die toten Zellen von der Analyse ausgeschlossen werden. Die Zellen wurden mit 2 ml PBS gewaschen und für die Messung in 150 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Messung von CFSE (em. 521 nm) erfolgte im FITC-Kanal (blauer Laser, ex. 488 nm, em. 525 nm).

2.2.10. Growth Assay

Das Growth Assay dient dazu zu beobachten, ob die mit TNF- α und IFN- γ behandelten Zellen auch nach der Wegnahme dieser Zytokine eine Wachstumshemmung beziehungsweise einen Wachstumsstopp aufweisen.

Für dieses Assay wurden die unterschiedlichen Zelllinien in 12-Well-Platten in 1 ml Medium kultiviert. Die Kultivierung der Kontrollen und der mit TNF- α und IFN- γ behandelten Zellen erfolgte jeweils in Triplikaten. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von TNF- α und IFN- γ in 1 ml Medium. Die Zellen wurden danach für weitere 96 Stunden kultiviert. Es erfolgte eine Ablösung und die aus allen drei Wells gepoolten Zellen wurden mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden in neuen 12-Well-Platten mit der gleichen Zellzahl wie zu Beginn ausplattiert und nach 24 Stunden wurde wieder TNF- α und IFN- γ dazugegeben. Die Zellen wurden danach erneut für 96 Stunden kultiviert, dann abgelöst und gezählt. Es erfolgte eine dritte Kultivierung in einer neuen 12-Well-Platte mit der entsprechenden Zellzahl. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen allerdings in 2 ml Medium kultiviert und es erfolgte keine Zugabe von TNF- α und IFN- γ . Nach 96 Stunden Kultivierung wurden die Zellen erneut gezählt.

2.2.11. Luciferase Assay

Im Luciferase Assay werden Zelllinien verwendet, die vorher mit einem Luciferase-Konstrukt und einem mCherry-Reporter transduziert wurden. Mit Hilfe dieses Enzyms können die Zellen das Substrat D-Luciferin spalten. Die Biolumineszenz, die durch die Spaltung von D-Luciferin erfolgt, kann mithilfe des „Victor 2 Microplate Reader“ im Lumineszenz-Programm gemessen werden. Ziel dieses Assays war es, die Zellteilung bei unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α und gleichbleibender IFN- γ Konzentration zu beurteilen.

Die Zellen wurden in weißen 96-Well-Platten in zunächst 100 µl Medium ausplattiert. Nach dem Ausplattieren der Zellen wurde D-Luciferin in 50 µl Medium hinzugegeben. Die finale Konzentration von D-Luciferin betrug 1 µg/ml. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Zugabe von weiteren 50 µl Medium zu der Mediumkontrolle und den unbehandelten Zellen. Die Zugabe von IFN-γ erfolgte in 25 µl mit einer finalen Konzentration von 100 µg/ml. Für die Zugabe von TNF-α wurde eine Titration durchgeführt. Die finalen Konzentrationen betragen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml. Die Zugabe erfolgte ebenfalls in 25 µl Medium. Somit betrug das Endvolumen pro Well 200 µl. Die erste Messung der Platten wurde direkt nach der Zugabe von TNF-α und IFN-γ durchgeführt. Die Platten wurden dann wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und erneut nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden gemessen. Als Positivkontrollen dienten unbehandelte Zellen, die mit Medium inkubiert wurden, Zellen der Negativkontrolle wurden mit 1 % Triton X-100 behandelt.

2.2.12. IncuCyte® Assay

Bei diesem Assay wurde die Konfluenz der Zellen im Verlauf von 96 Stunden mithilfe des Gerätes IncuCyte® S3 beobachtet. In diesem Gerät ist ein Mikroskop eingebaut, das alle 2 Stunden vier Bilder pro Well einer 48-Well-Platte aufgenommen hat. Anschließend wurde die Konfluenz mithilfe einer Maske, die über die Zellen gelegt wurde, mit dem Programm IncuCyte® S3 errechnet. Mithilfe eines Reagenzes wurde außerdem die mögliche Zytotoxizität der Zytokine evaluiert.

Für diese Analyse wurden die Zellen in einer 48-Well-Platte in 250 µl Medium ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zytokine und das Reagenz zur Analyse der Zytotoxizität (250 nM in Medium) dazugegeben. Anschließend wurde die Platte in das Gerät eingesetzt und die Analyse gestartet. Nach 96 Stunden erfolgte die Auswertung.

2.2.13. Immunfluoreszenzfärbung

Bei diesem Assay werden die Proliferationsmarker Ki67 und PCNA (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) und die Seneszenzmarker HP1- γ (Heterochromatin-Protein 1- γ) und p16^{INK4A} untersucht. Hierfür wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurden die Deckgläser einen Tag vor der Kultivierung jeweils mit 100 μ l 0,01 % Poly-L-Lysin-Lösung bedeckt und 5 Minuten inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt, die Deckgläser trockneten bei Raumtemperatur und wurden in die 12-Well-Platten eingesetzt. Am folgenden Tag wurden die Zellen ausplattiert. Nachdem die Zellen 24 auf den Deckgläsern angewachsen waren, wurden TNF- α und IFN- γ mit einer Konzentration von 10 ng/ml und 100 ng/ml hinzugegeben und für 96 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Färbung an den zwei darauffolgenden Tagen durchgeführt. Am ersten Tag der Färbung wurde das Zellkulturmedium abgenommen und jedes Well dreimal gewaschen (400 μ l PBS mit 0,05 % Tween20). Zum Waschen wurde die 12-Well-Platte 5 Minuten auf den Schüttler bei geringer Stufe gestellt. Die Fixierung und Permeabilisierung wurde mit Aceton/Methanol 1:1 (400 μ l pro Well) durchgeführt. Darauf folgte eine Inkubationszeit von 10 Minuten bei -20 °C. Die Lösung wurde vorsichtig abgenommen und es folgten erneut 3 Waschschrte. Das Blocking erfolgte mit 5 % Eseserum in PBS (200 μ l pro Well). Die Zellen wurden 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und der Blocking Puffer danach vorsichtig abgenommen. Als nächster Schritt erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers. Für die Färbung wurden die Zellen in zwei Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe wurde mit anti-Ki67 und anti-p16^{INK4A} und die andere mit anti-HP1- γ und anti-PCNA Antikörper gefärbt. Die Antikörper anti-Ki67 und anti-p16^{INK4A} wurden mit einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Anti-HP1- γ und anti-PCNA wurden mit einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Zur Verdünnung der Antikörper wurde eine Lösung aus 1 % BSA in PBS verwendet. In jedes Well wurden 100 μ l der Färbelösung hinzugegeben und die Zellen zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln, anschließend über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Am zweiten Tag der Färbung wurden die Zellen zuerst dreimal (400 µl PBS mit 0,05 % Tween20) gewaschen. Danach wurden die sekundären Antikörper dazugegeben. Beide Antikörper (anti-Mouse IgG, anti-Rabbit IgG) wurden mit einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Danach folgten drei Waschschriffe. Anschließend wurden die Zellen noch mit DAPI gefärbt. Hierfür wurde pro Well eine Lösung von 400 µl (DAPI 1 µg/ml) verwendet. Es folgten wieder 3 Waschschriffe und die Deckgläser wurden mit Glass Antifade Mountant auf Objektträgern aufgesetzt. Wenn die Zellen 18-24 h geruht haben, kann der Rand zwischen Objektträger und Deckglas mit Nagellack abgedichtet werden. Danach wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die einzelnen Marker beurteilt.

Die oben beschriebene Durchführung des Assays brachte keine Ergebnisse. Die Methode muss durch weiteres Ausprobieren und Ausschließen von Fehlerquellen für die Neuroblastomzelllinien etabliert werden. Folgende Variationen wurden schon getestet: Blocking Puffer 3 % BSA in PBS, alle primären Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000, Waschen ohne Tween20, Fixierung mit 3,7 % Paraformaldehyd (PFA), Permeabilisierung mit 0,05 % Triton X-100, Konjugat des sekundären Antikörpers Cy5 und Cy3. Die oben beschriebene Methode zeigte das beste Ergebnis von allen Versuchen, dennoch konnten keine Ergebnisse erzielt werden.

3. Ergebnisse

Bei folgenden Neuroblastomzelllinien wurde untersucht, ob durch Inkubation mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ eine Seneszenz ausgelöst werden kann: LS, SH-SY5Y, LAN-1, Kelly, SK-N-AS, SK-N-BE(2) und SHEP. Als Positivkontrolle diente die T_h1 Zytokin-sensitive Melanomzelllinie WM115. Der Begriff der Kontrollgruppe wird im Folgenden immer für die unbehandelte Gruppe verwendet und der Begriff der behandelten Gruppe für die Zellen, die mit Zytokinen im Medium über einen bestimmten Zeitraum gewachsen sind.

3.1. Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Färbung

Anhand der β -Galactosidase-Färbung wird bei einer Blaufärbung der Seneszenz-assoziierte Biomarker β -Galactosidase nachgewiesen.

Die behandelten Zellen der Melanomzelllinie WM115 zeigten bei der Färbung in größerer Anzahl eine kräftige Blaufärbung. Hier konnte der Seneszenz-assoziierte Biomarker β -Galactosidase nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe konnte nur bei einigen Zellen eine Blaufärbung beobachtet werden. In der behandelten Gruppe färbte sich ein relativ großer Anteil der Zellen blau (Abb. 3.3.1.). Der Anteil der gefärbten Zellen wurde mithilfe der DAPI-Färbung und mikroskopischen Bildern am Computer ausgezählt. Für die Kontrollgruppe zeigte sich ein Mittelwert an gefärbten Zellen von 3 % (n=3). In der behandelten Gruppe betrug der Mittelwert der gefärbten Zellen 16 % (n=3) (Abb. 3.3.2.).

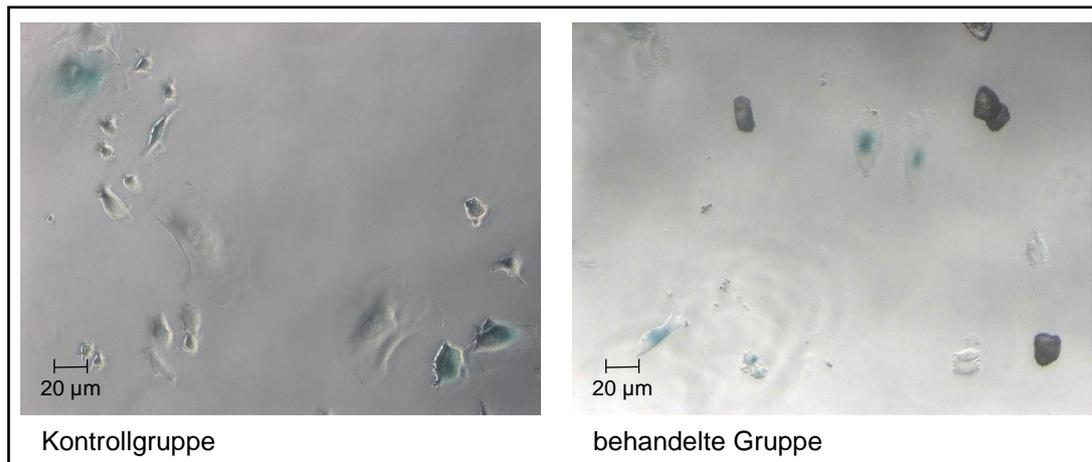


Abbildung 3.1.1. β -Galactosidase-Färbung - WM115

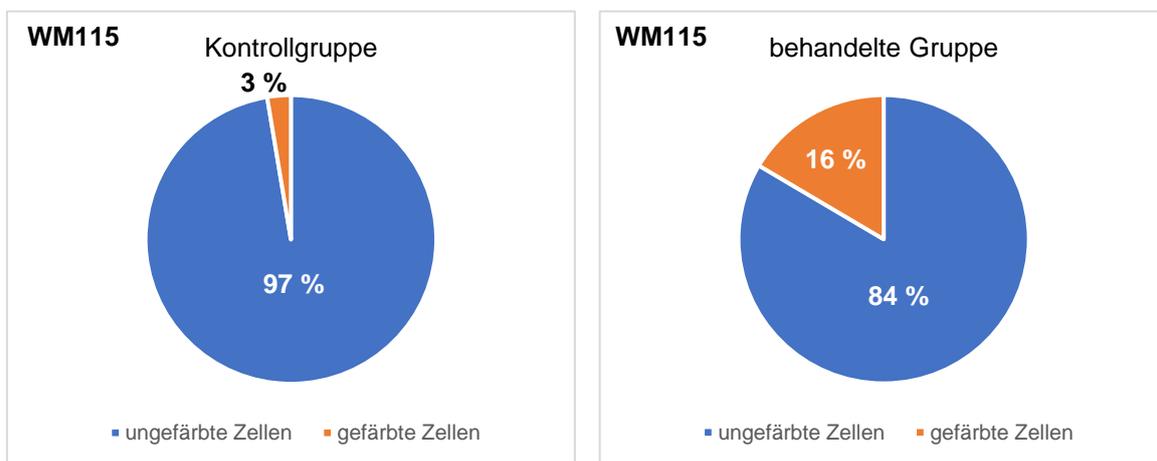


Abbildung 3.1.2. Anteil gefärbter Zellen - WM115: Mittelwert, n=3

Bei den untersuchten Neuroblastomzelllinien konnte keine Färbung nachgewiesen werden, die über die Hintergrundfärbung hinausgeht. Somit konnte der Seneszenz-assoziierte Biomarker β -Galactosidase bei diesen Neuroblastomzelllinien nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.1.3. a, b).



Abbildung 3.1.3. a β -Galactosidase-Färbung - LS, SH-SY5Y, LAN-1, Kelly

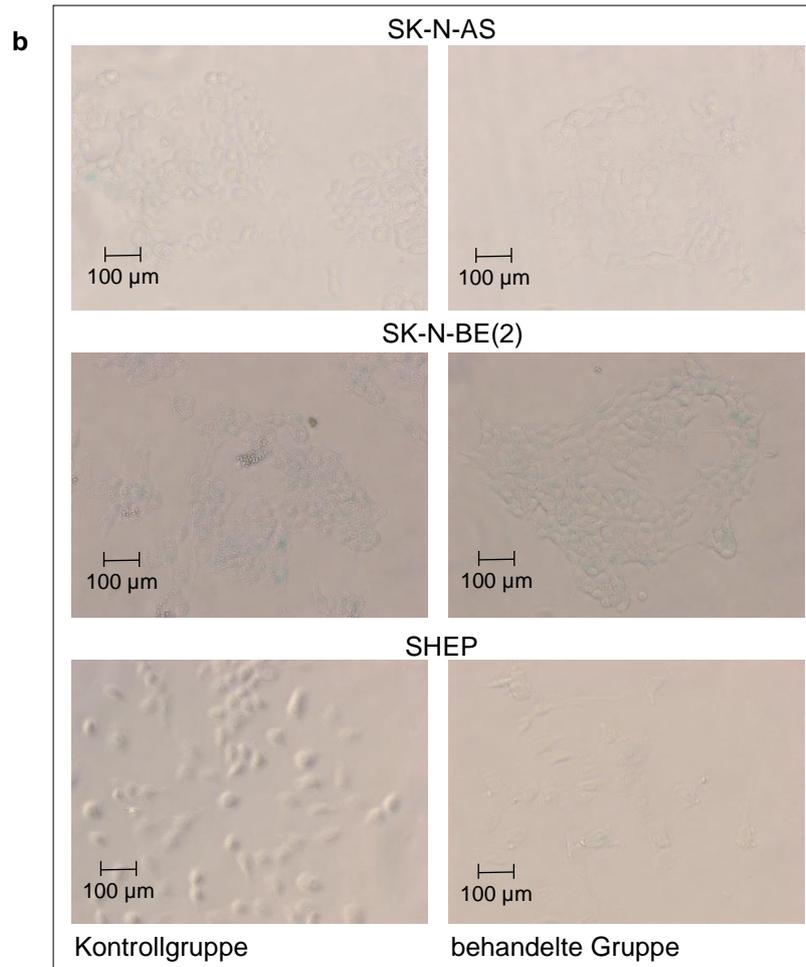


Abbildung 3.1.3. b β -Galactosidase-Färbung - SK-N-AS, SK-N-BE(2), SHEP

3.2. EdU Assay

Das EdU Assay dient zur Beobachtung der Zellproliferation und des Zellzyklus. Es kann der Anteil der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt werden. Für eine seneszente Zelllinie würde man eine Inhibition des Zellzyklus erwarten. Das bedeutet, dass der Anteil der S-Phase bei der behandelten Gruppe zurückgeht und der Anteil der G1-Phase zunimmt. Außerdem weist die G1/S-Ratio bei den seneszenten Zellen einen größeren Wert auf. Des Weiteren ist auch eine Zunahme der Anzahl der Zellen der behandelten Gruppe in der G2-Phase zu erwarten, da für seneszente Zellen im Allgemeinen ein möglicher Zellzyklusarrest in der G1- und G2-Phase beschrieben wurde.

Die Zelllinie WM115 dient als Positivkontrolle.

In der S-Phase konnte in der Kontrollgruppe der Zelllinie WM115 ein Anteil von 29 % (SD \pm 0,5, n=3) und in der behandelten Gruppe von 6 % (SD \pm 2, n=3) beobachtet werden. Die G1-Phase in der Kontrollgruppe zeigte einen Anteil von 60 % (SD \pm 0,3, n=3) und in der behandelten Gruppe ebenfalls von 60 % (SD \pm 9, n=3). Der Anteil der G2-Phase liegt bei 11 % (SD \pm 0,3, n=3) und bei 34 % (SD \pm 7, n=3) in der Kontrollgruppe bzw. in der behandelten Gruppe (Abb. 3.2.1.). In der S-Phase und der G2-Phase liegt hier ein signifikanter Unterschied vor (Abb. 3.2.18, Abb. 3.2.20.). Ein Beispiel einer FACS-Analyse des EdU Assays ist in Abbildung 3.2.2. dargestellt.

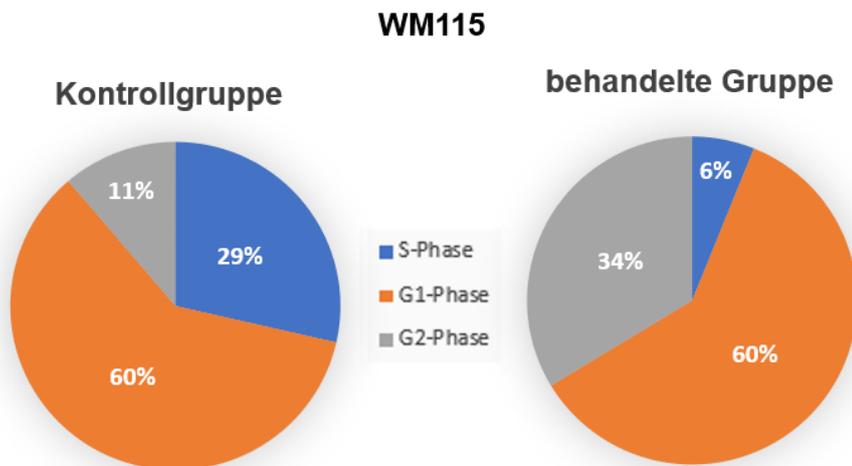


Abbildung 3.2.1. Anteil Zellzyklusphasen - WM115: Mittelwerte der einzelnen Phasen gemessen im FACS-Gerät, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=3

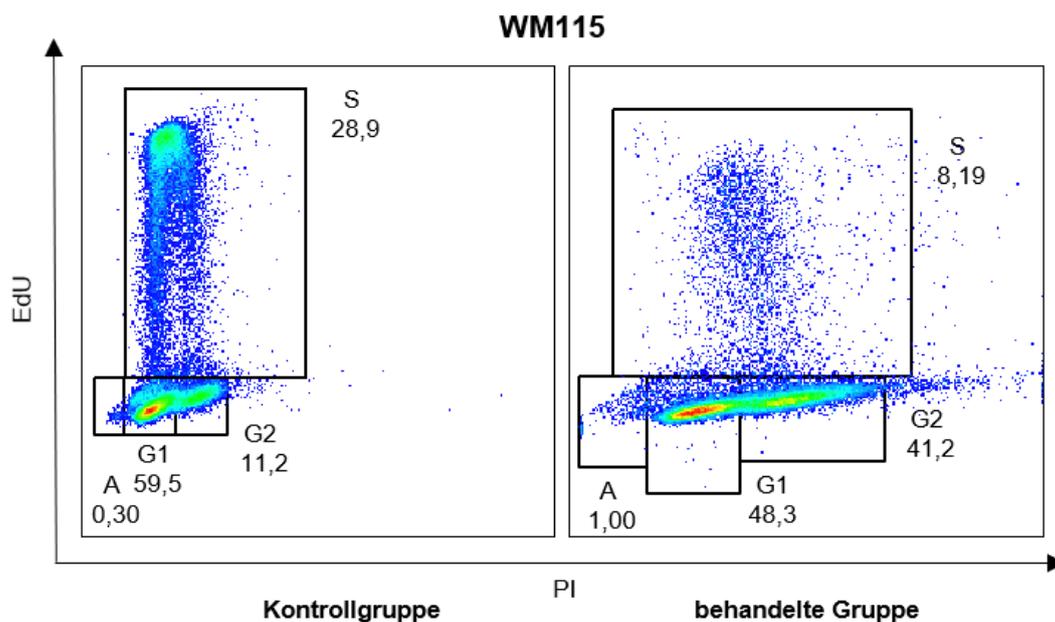


Abbildung 3.2.2. EdU Assay - WM115: Repräsentative FACS-Analyse der Zelllinie WM115, S-Phase, G1-Phase, G2-Phase, Angaben in Prozent, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, EdU: 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin, PI: Propidiumiodid, A: apoptotische Zellen

Die Zelllinien LS, SH-SY5Y, SK-N-AS und SHEP zeigten nach der Behandlung eine deutliche Veränderung im Zellzyklus.

Die Kontrollgruppe der Zelllinie LS zeigte in der S-Phase im Mittel 52 % (SD \pm 3, n=3), die behandelte Gruppe 25 % (SD \pm 3, n=3). In der G1-Phase wurde in der Kontrollgruppe eine Prozentzahl von 40 % (SD \pm 1, n=3), in der behandelten Gruppe von 63 % (SD \pm 4, n=3) beobachtet. Die G2-Phase umfasst in der Kontrollgruppe einen Anteil von 8 % (SD \pm 2, n=3) und in der behandelten Gruppe von 12 % (SD \pm 2, n=3) (Abb. 3.2.3.). Somit lässt sich feststellen, dass der Anteil der Zellen in der S-Phase in der behandelten Gruppe deutlich abgenommen hat, wohingegen der Anteil in der G1-Phase zugenommen hat. Beide Unterschiede der Zellzyklusphasen können als signifikant beschrieben werden (Abb. 3.2.18., Abb. 3.2.19.). Auch der Anteil der Zellen in der G2-Phase hat zugenommen. In der Abbildung 3.2.4. ist ein Beispiel für eine FACS-Messung dieser Zelllinie dargestellt.

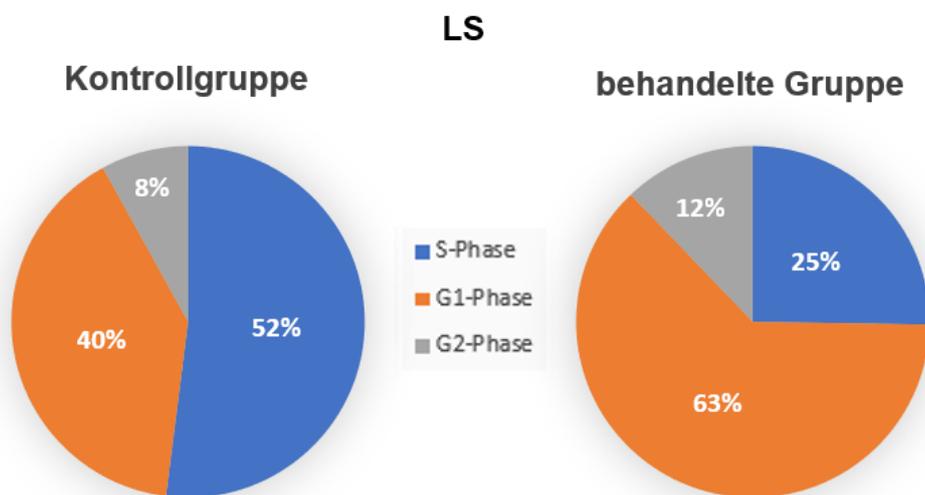


Abbildung 3.2.3. Anteil Zellzyklusphasen - LS: Mittelwerte der einzelnen Phasen gemessen im FACS-Gerät, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=3

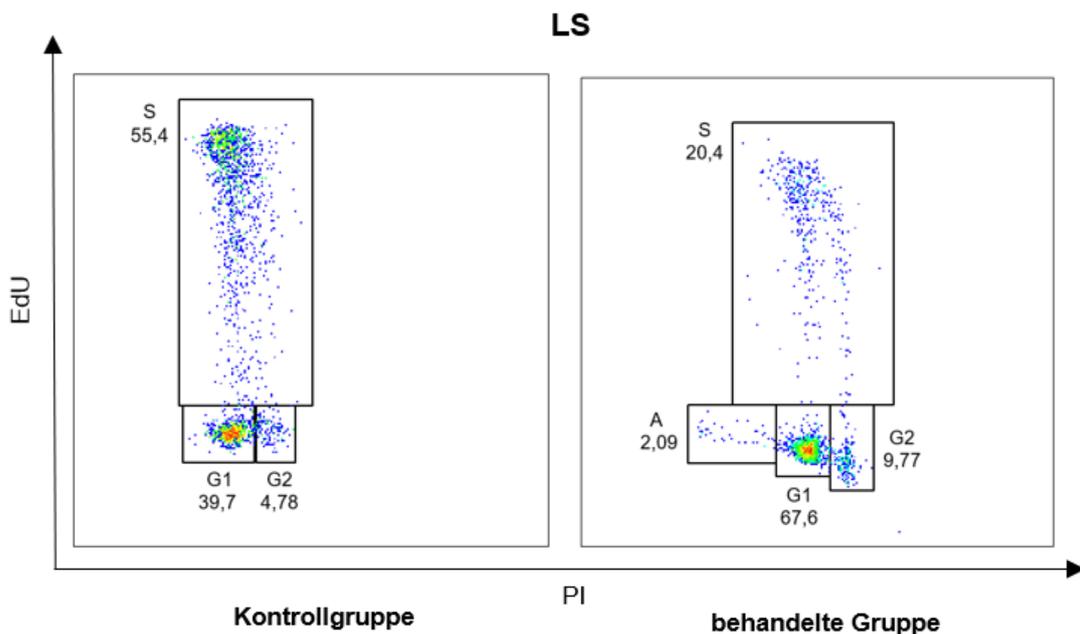


Abbildung 3.2.4. EdU Assay - LS: Repräsentative FACS-Analyse der Zelllinie LS, S-Phase, G1-Phase, G2-Phase, Angaben in Prozent, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, EdU: 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin, PI: Propidiumiodid, A: apoptotische Zellen

Für die Zelllinie SH-SY5Y ergab sich in der Kontrollgruppe in der S-Phase ein Anteil von 31 % (SD \pm 2, n=3) und in der behandelten Gruppe von 4 % (SD \pm 2, n=3). In der Kontrollgruppe wurde für die G1-Phase ein Anteil von 54 % (SD \pm 6, n=3) beobachtet und in der behandelten Gruppe von 36 % (SD \pm 19, n=3). Die G2-Phase hat in der Kontrollgruppe einen Anteil von 10 % (SD \pm 1, n=3) und in der behandelten Gruppe 10 % (SD \pm 6, n=3). Der Anteil der apoptotischen Zellen liegt in der Kontrollgruppe bei 5 % (SD \pm 5, n=3), in der behandelten Gruppe liegt er bei 50 % (SD \pm 27, n=3) (Abb. 3.2.5.).

SH-SY5Y

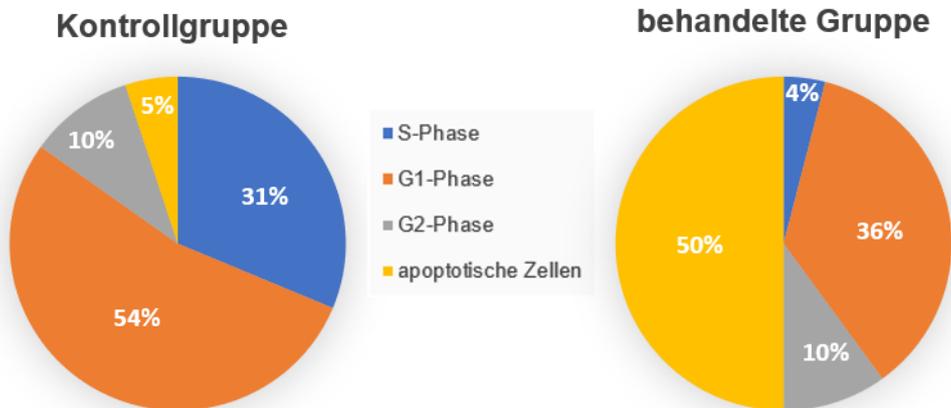


Abbildung 3.2.5. Anteil Zellzyklusphasen - SH-SY5Y: Mittelwerte der einzelnen Phasen gemessen im FACS-Gerät, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=3

Die Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen sind in der Abbildung 3.2.6. nochmals ohne den Anteil der apoptotischen Zellen dargestellt. Bei einem Ausschließen der apoptotischen Zellen und einer Anpassung der prozentualen Werte ergab sich für die S-Phase der Kontrollgruppe ein Anteil von 33 % (SD \pm 3, n=3). Für die G1-Phase wurde ein Anteil von 56 % (SD \pm 3, n=3) und für die G2-Phase ein Anteil von 11 % (SD \pm 1,5, n=3) ermittelt. In der behandelten Gruppe ergaben sich für die S-Phase 7 % (SD \pm 1, n=3), für die G1-Phase 75 % (SD \pm 6, n=3) und für die G2-Phase 18 % (SD \pm 5, n=3). Im Vergleich der prozentualen Anteil der unterschiedlichen Zellzyklusphasen, einmal mit Einschluss der apoptotischen Zellen und einmal mit Ausschluss der apoptotischen Zellen, fällt auf, dass beim Ausschluss der apoptotischen Zellen der Anteil der G1-Phase in der behandelten Gruppe deutlich ansteigt, wohingegen Dieser beim Einschluss der apoptotischen Zellen deutlich abnimmt. Der Unterschied der anderen beiden Zellzyklus stellt sich bei Ein- und bei Ausschluss mit relativ ähnlichen Werten da. Dennoch kommt es in der S-Phase zu einer deutlichen Abnahme der Anteils in der behandelten Gruppe. Nach Ausschluss der apoptotischen Zellen können die Unterschiede der S-Phase und der G1-Phase als signifikant beschrieben werden (Abb. 3.2.18., Abb. 3.2.19.).

Die Abbildung 3.2.7. zeigt ein Beispiel der FACS-Messung der Zelllinie SH-SY5Y. Hier lässt sich ein Rückgang der Zellen der behandelten Gruppe in der S-Phase beobachten. Die Anzahl der Zellen in der G1-Phase nimmt in der behandelten Gruppe ab. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase bleibt nahezu gleich. In der behandelten Gruppe wurde ein hoher Anteil an apoptotischen Zellen detektiert.

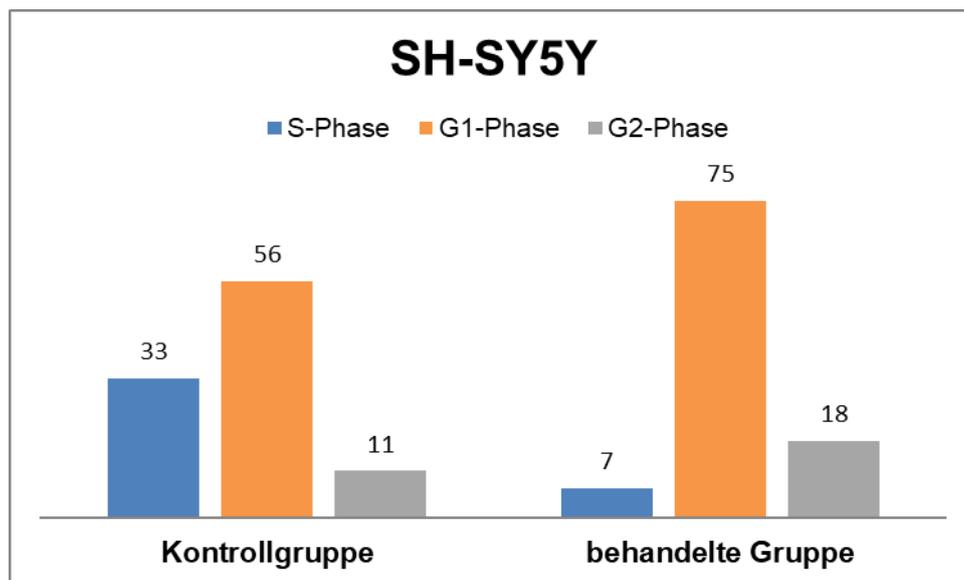


Abbildung 3.2.6. Anteil Zellzyklusphasen ohne apoptotische Zellen - SH-SY5Y: Mittelwerte der einzelnen Phasen gemessen im FACS-Gerät, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=3

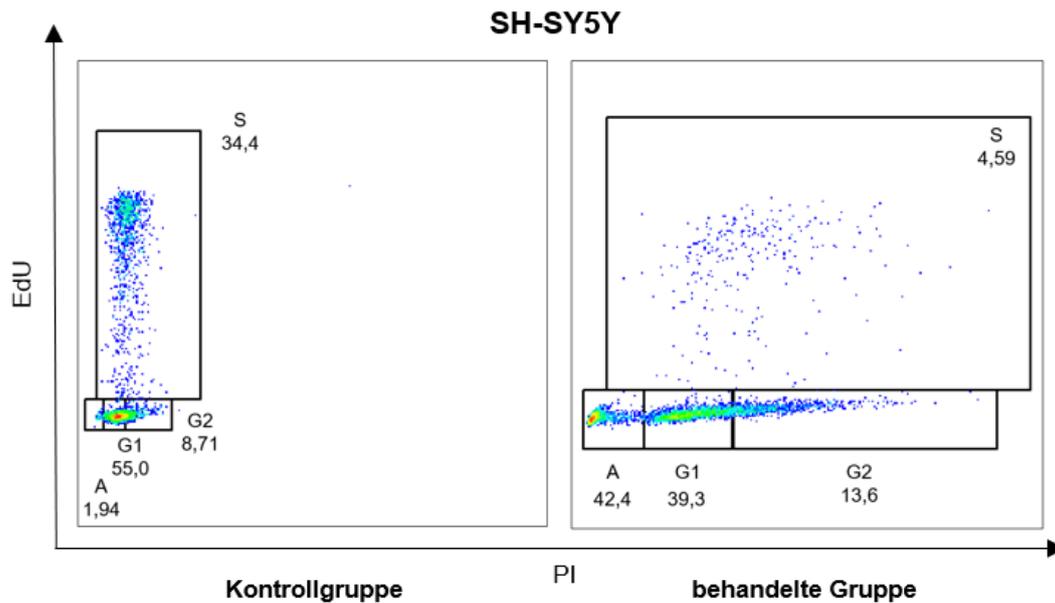


Abbildung 3.2.7. EdU Assay - SH-SY5Y: Repräsentative FACS-Analyse der Zelllinie SH-SY5Y, S-Phase, G1-Phase, G2-Phase, Angaben in Prozent, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, EdU: 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin, PI: Propidiumiodid, A: apoptotische Zellen

In der S-Phase der Kontrollgruppe der Zelllinie SK-N-AS wurde eine Prozentzahl von 31 % (SD \pm 1, n=3), in der behandelten Gruppe von 17 % (SD \pm 0,1, n=3) beobachtet. Die G1-Phase zeigte einen Anteil von 57 % (SD \pm 4, n=3) in der Kontrollgruppe und in der behandelten Gruppe von 70 % (SD \pm 1, n=3). 12 % (SD \pm 3, n=3) umfasst die G2-Phase in der Kontrollgruppe und 13 % (SD \pm 1, n=3) in der behandelten Gruppe (Abb. 3.2.8.). Für die Zelllinie SK-N-AS fällt hier auf, dass der Unterschied in der S-Phase zwischen den beiden Gruppen relativ groß ist. Auch in der G1-Phase zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Die Differenz zwischen den unterschiedlichen Gruppen der G2-Phase fällt relativ gering aus. Für die S-Phase und die G1-Phase kann ein signifikanter Unterschied beschrieben werden (Abb. 3.2.18., Abb. 3.2.19.). Die Abbildung 3.2.9. zeigt beispielhaft eine FACS-Messung.

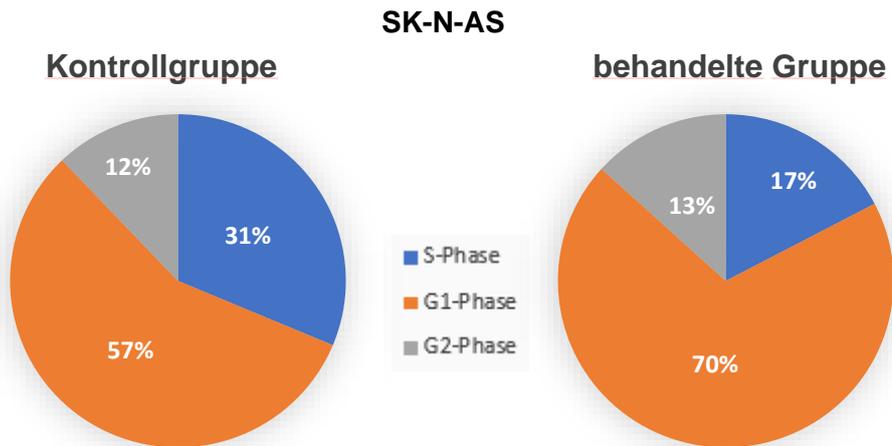


Abbildung 3.2.8. Anteil Zellzyklusphasen - SK-N-AS: Mittelwerte der einzelnen Phasen gemessen im FACS-Gerät, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=3

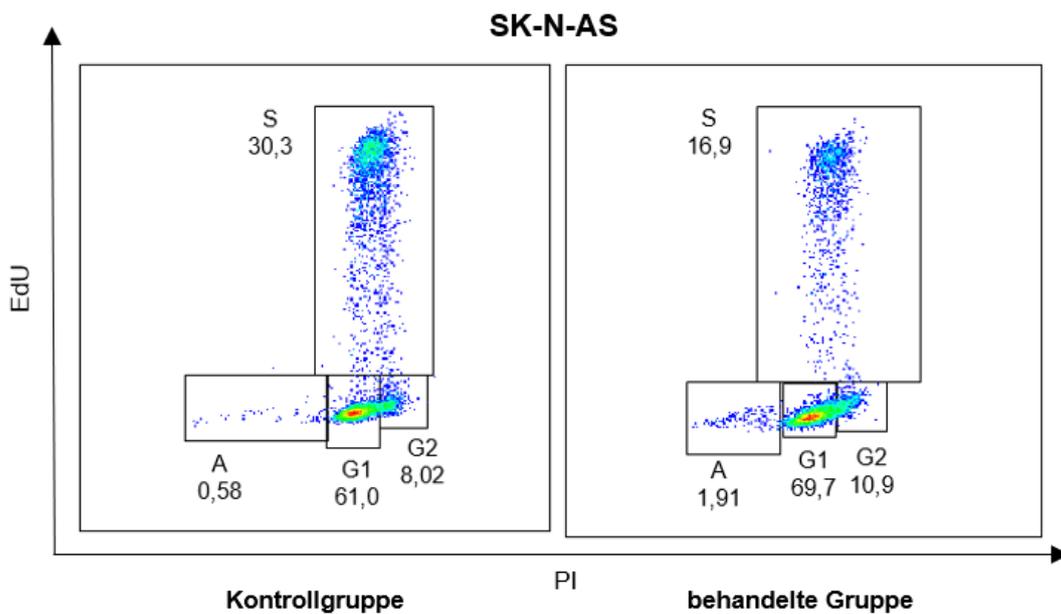


Abbildung 3.2.9. EdU Assay - SK-N-AS: Repräsentative FACS-Analyse der Zelllinie SK-N-AS, S-Phase, G1-Phase, G2-Phase, Angaben in Prozent, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, EdU: 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin, PI: Propidiumiodid, A: apoptotische Zellen

Die Zelllinie SHEP zeigte in der Kontrollgruppe in der S-Phase eine Prozentzahl von 52 % (SD \pm 3, n=3) und in der behandelten Gruppe von 30 % (SD \pm 1, n=3). In der G1-Phase wurde in der Kontrollgruppe ein Anteil von 39 % (SD \pm 2, n=3) und in der behandelten Gruppe ein Anteil von 54 % (SD \pm 6, n=3) beobachtet. In der Kontrollgruppe macht die G2-Phase einen Anteil von 9 % (SD \pm 9, n=3) aus, in der behandelten Gruppe hat sie einen Anteil von 16 % (SD \pm 7, n=3) (Abb. 3.2.10.). Hier ist, wie bei der Zelllinie LS, eine Zunahme der Zellen der behandelten Gruppe in der G1- und G2-Phase zu erkennen, wohingegen die Anzahl in der S-Phase deutlich abnimmt. Für die S-Phase und die G1-Phase kann ein signifikanter Unterschied beschrieben werden (Abb. 3.2.18., Abb. 3.2.19.). Die Abbildung 3.211. zeigt die Graphik einer der FACS-Messungen.

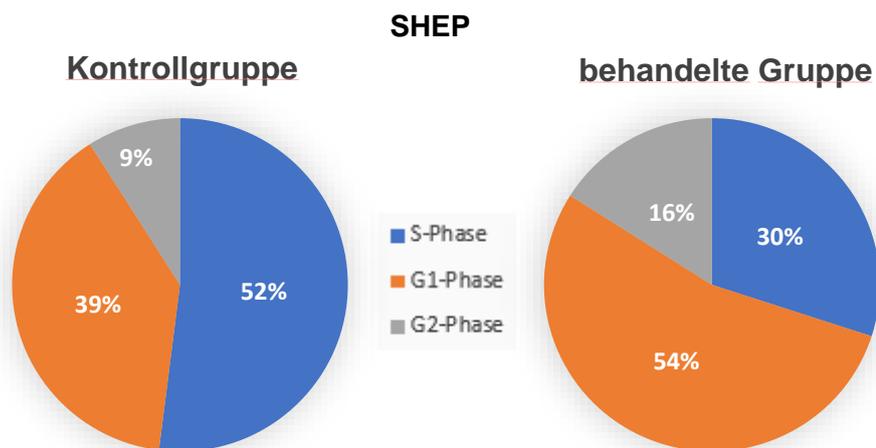


Abbildung 3.2.10. Anteil Zellzyklusphasen - SHEP: Mittelwerte der einzelnen Phasen gemessen im FACS-Gerät, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=3

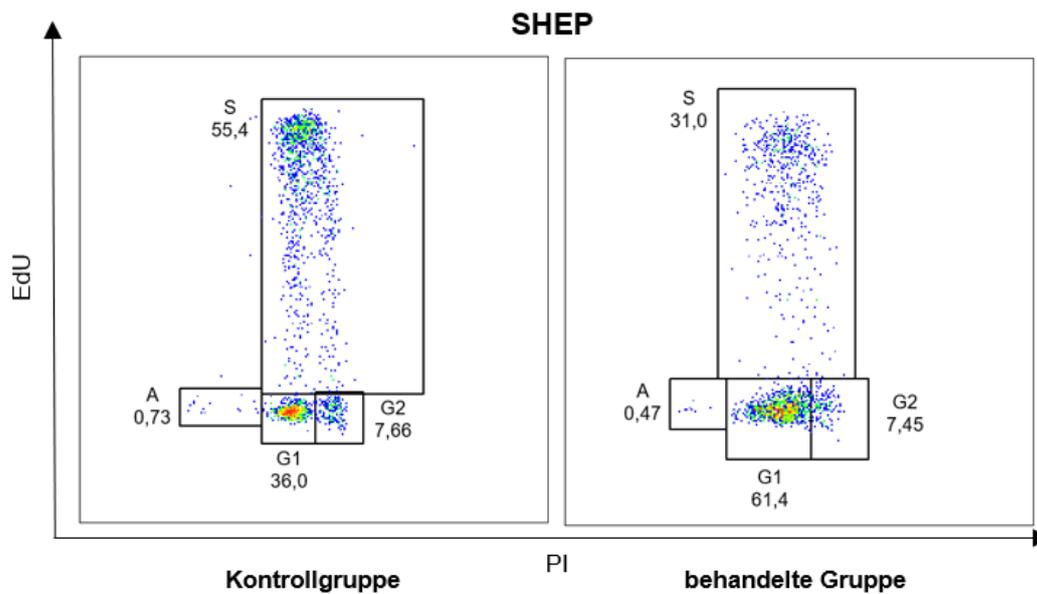


Abbildung 3.2.11. EdU Assay - SHEP: Repräsentative FACS-Analyse der Zelllinie SHEP, S-Phase, G1-Phase, G2-Phase, Angaben in Prozent, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, EdU: 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin, PI: Propidiumiodid, A: apoptotische Zellen

Geringe Veränderungen im Zellzyklus konnten bei den Zelllinien LAN-1 und Kelly beobachtet werden.

Die Zelllinie LAN-1 zeigte in der Kontrollgruppe in der S-Phase im Mittel eine Prozentzahl von 58 % (SD \pm 0,4, n=2) und in der behandelten Gruppe von 44 % (SD \pm 5, n=2). In der G1-Phase konnte in der Kontrollgruppe ein Anteil von 39 % (SD \pm 0,7, n=2) und in der behandelten Gruppe von 48 % (SD \pm 6, n=2) beobachtet werden. Die Kontrollgruppe zeigt in der G2-Phase einen Anteil von 3 % (SD \pm 0,3, n=2) in der behandelten Gruppe von 8 % (SD \pm 2, n=2) (Abb. 3.2.12.). In der S-Phase kann zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, dennoch kommt es zu einer leichten Abnahme der Zellen in der behandelten Gruppe. In der G1- und G2-Phase nimmt der Anteil der Zellen in der behandelten Gruppe leicht zu. Die Graphik einer FACS-Messung ist in Abbildung 3.2.13. abgebildet.

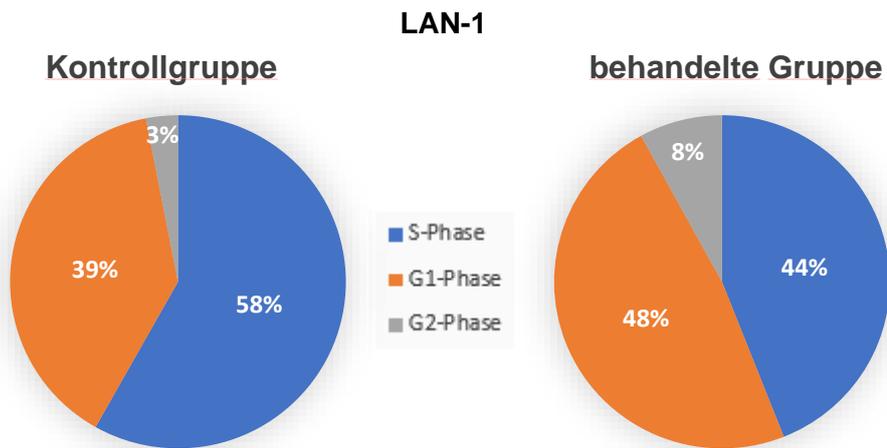


Abbildung 3.2.12. Anteil Zellzyklusphasen - LAN-1: Mittelwerte der einzelnen Phasen gemessen im FACS-Gerät, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=3

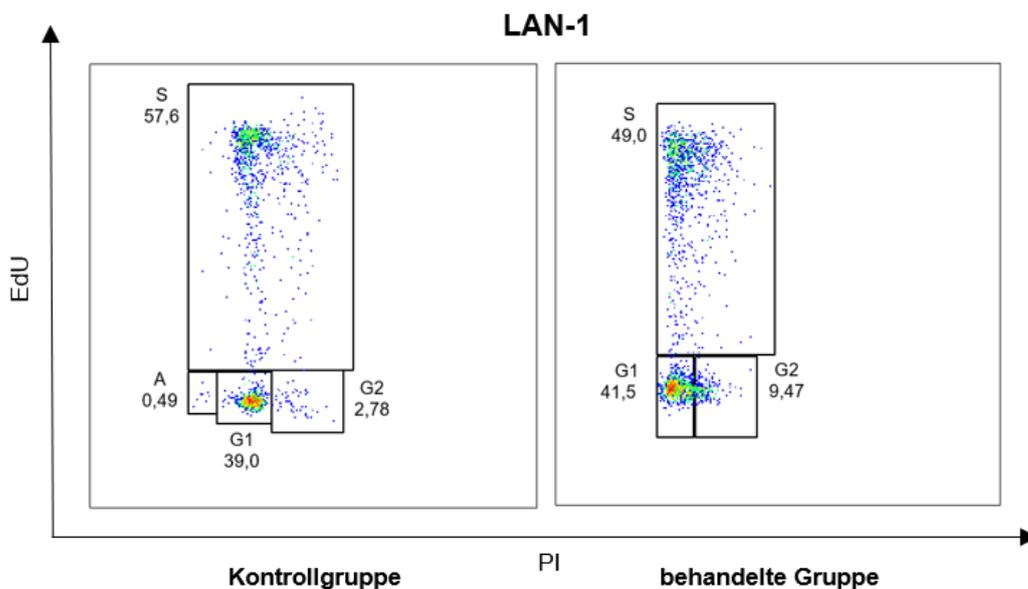


Abbildung 3.2.13. EdU Assay - LAN-1: Repräsentative FACS-Analyse der Zelllinie LAN-1, S-Phase, G1-Phase, G2, Angaben in Prozent, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, EdU: 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin, PI: Propidiumiodid, A: apoptotische Zellen

In der S-Phase in der Kontrollgruppe der Zelllinie Kelly wurde ein Anteil von 41 % (SD \pm 1, n=3) und in der behandelten Gruppe eine Prozentzahl von 34 % (SD \pm 4, n=3) beobachtet. Die Kontrollgruppe zeigte in der G1-Phase einen Anteil von 50 % (SD \pm 6, n=3) und in der behandelten Gruppe von 62 % (SD \pm 3, n=3). In der G2-Phase befinden sich 9 % (SD \pm 8, n=3) der Zellen der Kontrollgruppe und 4 % (SD \pm 1, n=3) der behandelten Gruppe (Abb. 3.2.14.). Hier lässt sich festhalten, dass es in der S-Phase zwischen den beiden Gruppen einen kleinen Unterschied gibt. Außerdem fällt auch in der G1-Phase eine kleine Differenz zwischen den Anteilen der Zellen auf. In der G2-Phase kommt es zu einer leichten Abnahme der Zellen in der behandelten Gruppe. Eine Graphik der FACS-Messung ist in Abbildung 3.2.15. abgebildet.

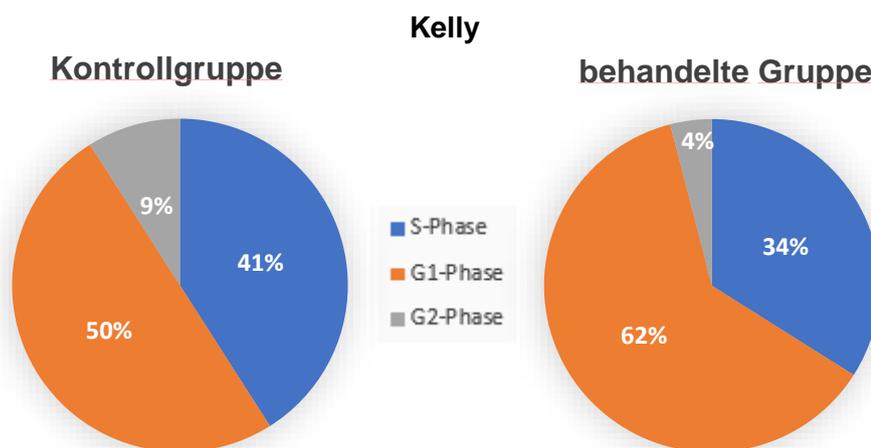


Abbildung 3.2.14. Anteil Zellzyklusphasen - Kelly: Mittelwerte der einzelnen Phasen gemessen im FACS-Gerät, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=3

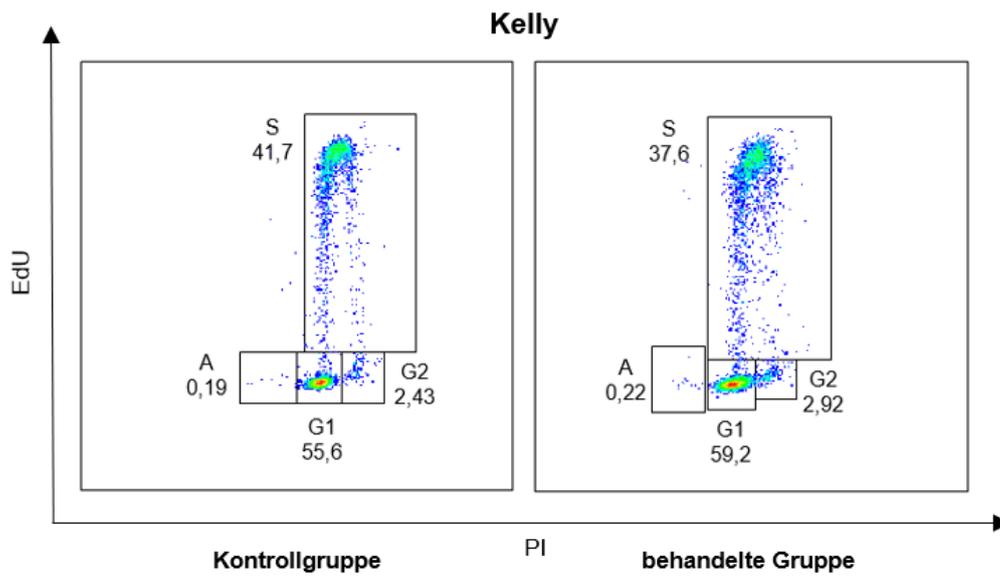


Abbildung 3.2.15. EdU Assay - Kelly: Repräsentative FACS-Analyse der Zelllinie Kelly, S-Phase, G1-Phase, G2-Phase, Angaben in Prozent, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, EdU: 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin, PI: Propidiumiodid, A: apoptotische Zellen

Bei der Zelllinien SK-N-BE(2) konnte keine Veränderung im Zellzyklus beobachtet werden.

In der Kontrollgruppe der Zelllinie SK-N-BE(2) wurde in der S-Phase eine Prozentzahl von 36 % (SD \pm 8, n=3), in der behandelten Gruppe von 32 % (SD \pm 2, n=3) beobachtet. In der G1-Phase zeigte sich in der Kontrollgruppe eine Prozentzahl von 57 % (SD \pm 4, n=3), in der behandelten Gruppe von 63 % (SD \pm 1, n=3). Einen Anteil von 7 % (SD \pm 3, n=3) umfasst die Kontrollgruppe in der G2-Phase und einen Anteil von 5 % (SD \pm 1, n=3) die behandelte Gruppe (Abb. 3.2.16.). Für die Zelllinie SK-N-BE(2) lässt sich festhalten, dass es in der S-Phase keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen gibt. Auch in der G1- und G2-Phase ist dies nicht zu beobachten. In Abbildung 3.2.17. ist eine FACS-Messung beispielhaft dargestellt.

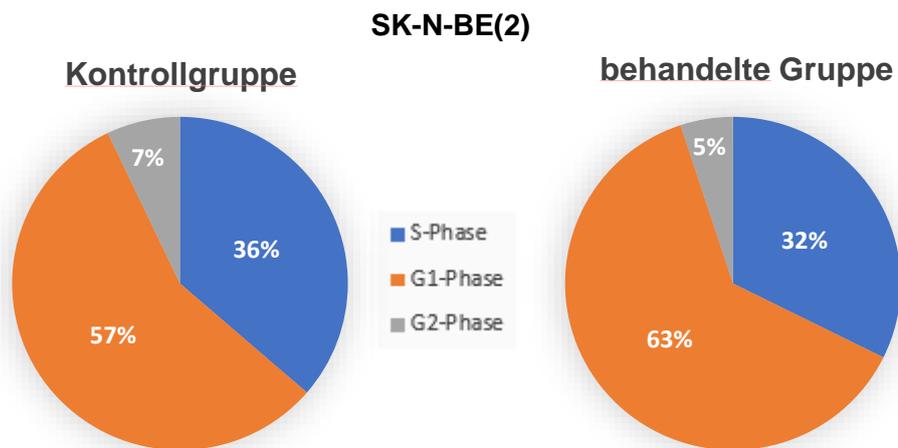


Abbildung 3.2.16. Anteil Zellzyklusphasen - SK-N-BE(2): Mittelwerte der einzelnen Phasen gemessen im FACS-Gerät, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=3

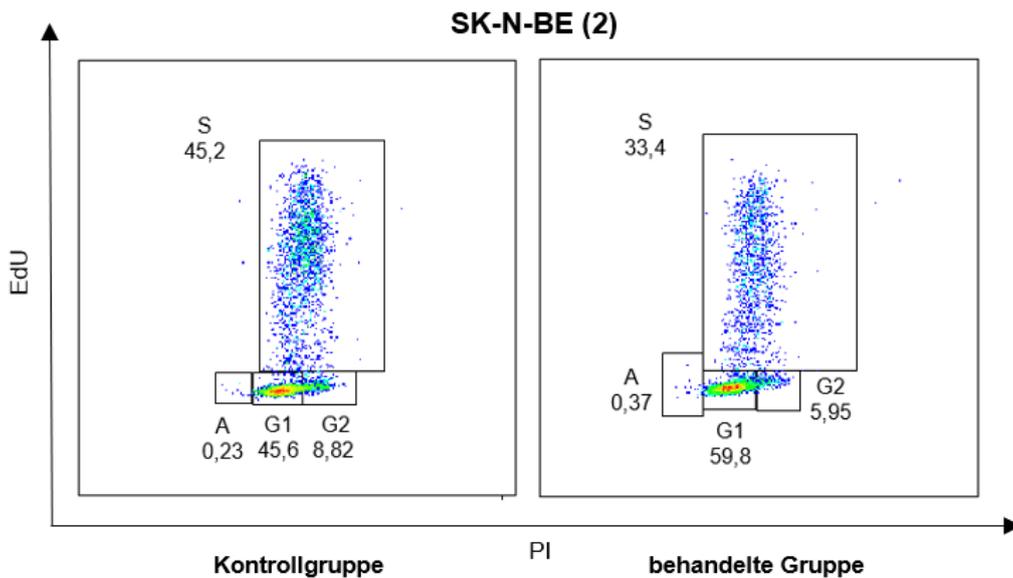


Abbildung 3.2.17. EdU Assay - SK-N-BE(2): Repräsentative FACS-Analyse der Zelllinie SK-N-BE(2), S-Phase, G1-Phase, G2-Phase, Angaben in Prozent, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, EdU: 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin, PI: Propidiumiodid, A: apoptotische Zellen

Zusammenfassend sind in den Abbildungen 3.2.18., 3.2.19. und 3.2.20. die S-Phase, G1-Phase und G2-Phase für alle Zelllinien in einem Balkendiagramm dargestellt. Es wurde ein t-Test ($p=0,05$) durchgeführt.

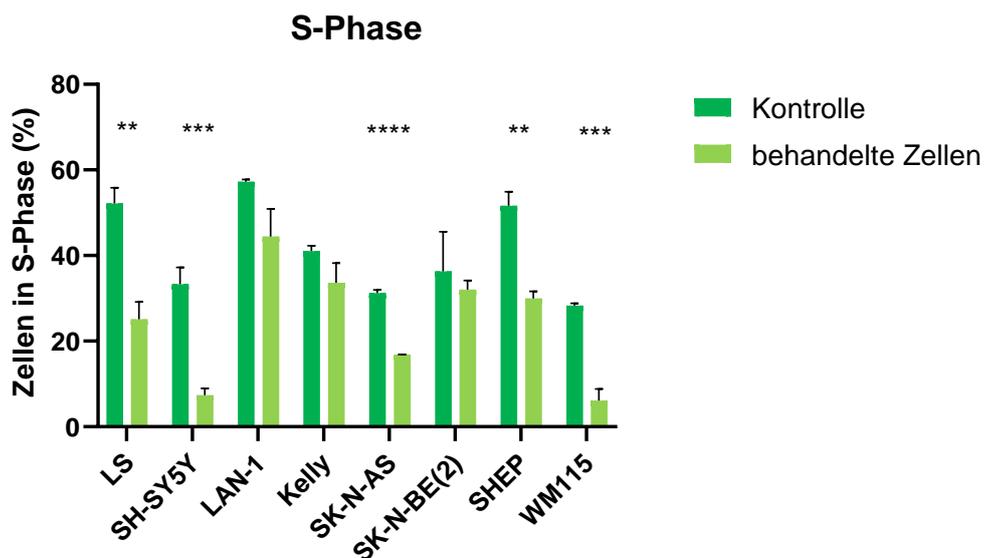


Abbildung 3.2.18. S-Phase: Prozentzahlen aller Zelllinien in der S-Phase, t-Test, $p=0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$, $n=3$: LS, SH-SY5Y, Kelly, SK-N-AS, SK-N-BE(2), SHEP, WM115, $n=2$: LAN-1

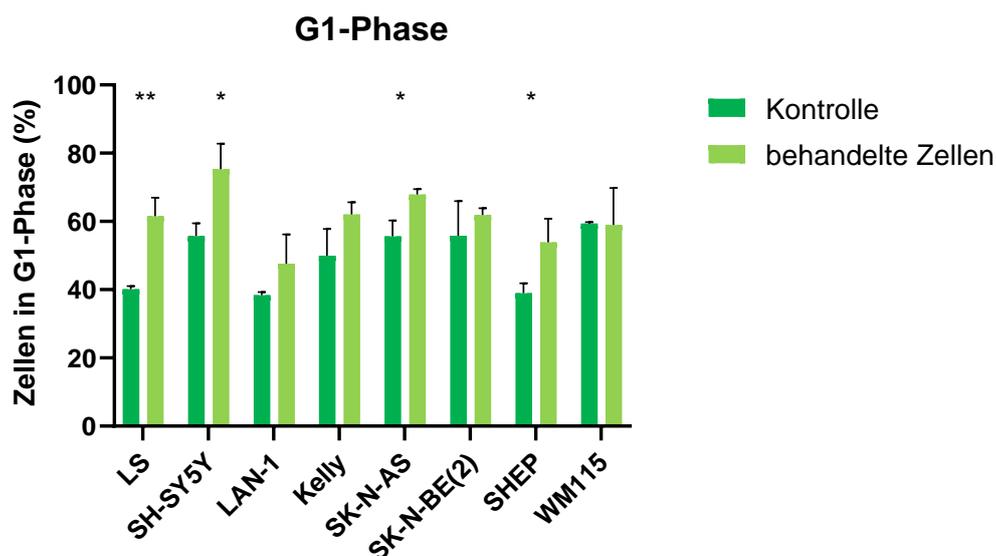


Abbildung 3.2.19. G1-Phase: Prozentzahlen aller Zelllinien in der G1-Phase, t-Test, $p=0,05$, * $p \leq 0,05$, $n=3$: LS, SH-SY5Y, Kelly, SK-N-AS, SK-N-BE(2), SHEP, WM115, $n=2$: LAN-1

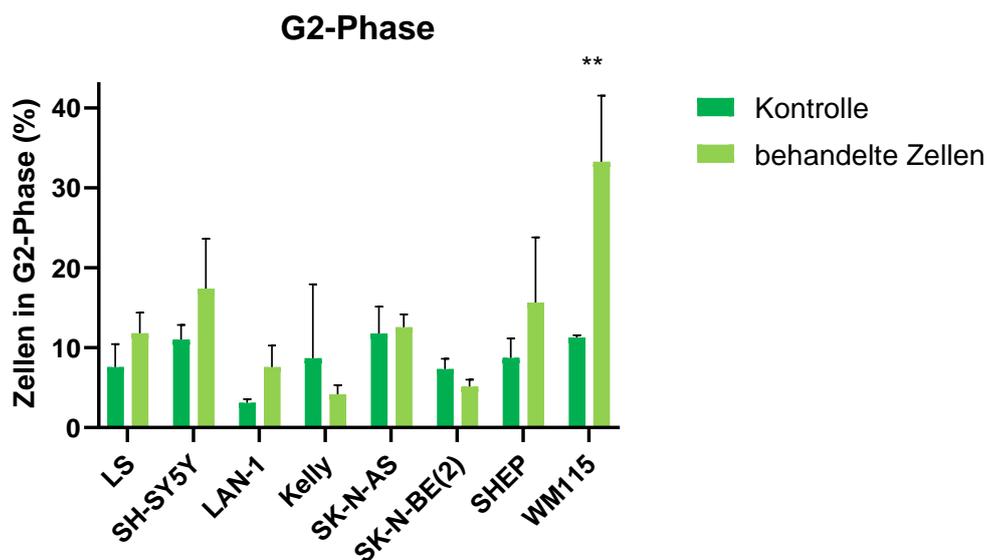


Abbildung 3.2.20. G2-Phase: Prozentzahlen aller Zelllinien in der G2-Phase, t-Test, $p=0,05$, ** $p \leq 0,01$, $n=3$: LS, SH-SY5Y, Kelly, SK-N-AS, SK-N-BE(2), SHEP, WM115, $n=2$: LAN-1

Die Mittelwerte des G1/S Verhältnisses (G1/S Ratio) sind für alle Zelllinien in der Tabelle 3.2.1. jeweils für die Kontrolle und behandelte Gruppe dargestellt. Die Veränderung des G1/S Verhältnisses nach Zytokinbehandlung kann als Maß für die Induktion eines Zellzyklusarrests gesehen werden. Wird das Verhältnis größer, so befinden sich nach Behandlung mehr Zellen in der G1-Phase und weniger Zellen in der S-Phase. Die Größe der Änderung der G1/S Verhältnisse zwischen unbehandelter und behandelter Kondition („*Fold Change*“) wurde aus den Mittelwerten der jeweiligen G1/S Verhältnisse erstellt. Die graphische Darstellung dieser Änderung kann man Abbildung 3.2.20. entnehmen. Anhand der Werte kann man nun festhalten, dass vor allen Dingen die Zelllinien LS und SH-SY5Y eine große Änderung im Verhältnis der Zellzyklusphasen G1 und S zeigen. Diese beiden Zelllinien weisen beide eine Änderung größer als 3 auf - zum Vergleich: Bei der Kontrollzelllinie WM115 ist eine Änderung von 5,61 zu beobachten. Auch die Zelllinien SK-N-AS und SHEP zeigen eine größere Änderung des Verhältnisses der G1- und S-Phase. Dies bestätigt nochmal, dass bei den Zelllinien LS, SH-SY5Y, SK-N-AS und SHEP eine Inhibition des Zellzyklus nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 3.2.1. Fold Change: Mittelwert der G1/S Ratio aller Zelllinien, Fold Change, n=3: LS, SH-SY5Y, Kelly, SK-N-AS, SK-N-BE(2), SHEP, WM115, n=2: LAN-1

	Mittelwert G1/S Ratio		Fold Change
	Kontrolle	behandelte Zellen	
LS	0,77	2,53	3,34
SH-SY5Y	1,70	10,81	6,71
LAN-1	0,67	1,10	1,64
Kelly	1,21	1,88	1,56
SK-N-AS	1,79	4,05	2,28
SK-N-BE(2)	1,66	1,94	1,32
SHEP	0,76	1,80	2,41
WM115	2,10	11,90	5,61

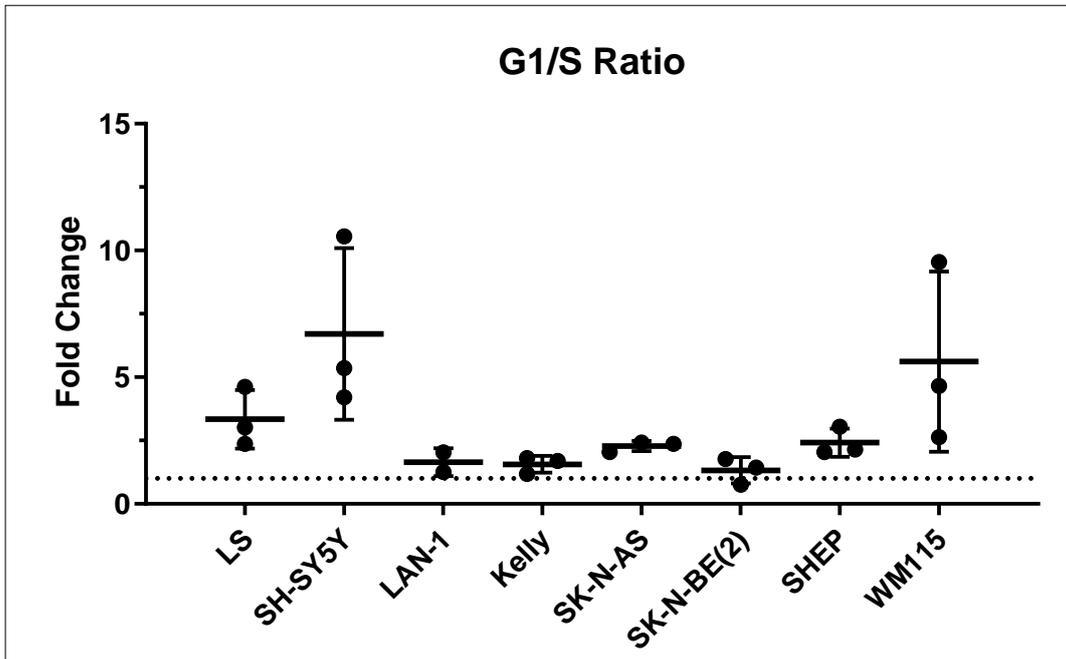


Abbildung 3.2.21. Fold Change der G1/S Ratio aller Zelllinien: n=3: LS, SH-SY5Y, Kelly, SK-N-AS, SK-N-BE(2), SHEP, WM115, n=2: LAN-1

3.3. CFSE-Färbung

Mit Hilfe der CFSE-Färbung lässt sich bestimmen, wie oft sich eine Zellpopulation geteilt hat. Somit lässt sich eine Aussage über die Proliferationsrate der Zellen treffen. Zu Beginn werden die Zellen mit CFSE gefärbt, mit jeder Zellteilung wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt. Demnach würde man bei seneszenten Zelllinien erwarten, dass insgesamt eine geringere Teilungsrate vorliegt, was bedeutet, dass die Intensität des CFSE Signals der gefärbten Zellen nicht so stark abnimmt, wie bei der Kontrollgruppe.

Die Auswertung der CFSE-Färbung erfolgte anhand von vorher festgelegten Kriterien. Die MFIs (*Median Fluorescence Intensity*) der einzelnen FACS-Analysen (n=3) wurden für die Kontrollgruppe (K) und die behandelte Gruppe (B) ins Verhältnis (V) ($V=B/K$) zueinander gesetzt. Hier geht man davon aus, dass ein größeres Verhältnis für eine Seneszenz spricht, da die Zellen der behandelten Gruppe sich weniger oft teilen und somit die Detektion des CFSE Signals kaum abnimmt. Das Signal der Kontrollgruppe nimmt jedoch stärker ab, aufgrund von einer größeren Teilungszahl der Zellen. Somit wird das Verhältnis der beiden Gruppen zueinander mit einem größeren Wert erwartet. Für den Mittelwert dieser Verhältnisse wurden folgende Kriterien festgelegt:

Seneszent

- $V > 2$

Partiell seneszent

- $1,5 \leq V \leq 2$

Nicht seneszent

- $V < 1,5$

Für die Zelllinien LS, SH-SY5Y, SHEP und für die Positivkontrolle WM115 wurde ein Verhältnis größer als 2 ermittelt. Diese Zelllinien werden somit laut Definition als seneszent beschrieben. Die Zelllinie SK-N-AS zeigte ein Verhältnis der Mittelwerte von 1,70 und wurde somit als partiell seneszent eingestuft. Das Verhältnis der Mittelwerte der MFIs der Zelllinien LAN-1, Kelly, SK-N-BE(2) ist kleiner als 1,5. Diese Zelllinien sind somit nicht als seneszent zu betrachten (Tab. 3.3.1.).

Tabelle 3.3.1. CFSE-Färbung - Mittelwert Verhältnisse: In der Tabelle ist für jede Zelllinie das Verhältnis der gemittelten MFIs der behandelten Gruppe (B) zur jeweiligen Kontrollgruppe (K) abgebildet. n=3: SH-SY5Y, LAN-1, Kelly, SK-N-AS, SK-N-BE(2), WM115, n=2: LS, SHEP, pink: seneszent, blau: partiell seneszent, schwarz: nicht seneszent, MFI: Median Fluorescence Intensity

	MFI (B) / MFI (K)
LS	2,17
SH-SY5Y	2,25
LAN-1	1,09
Kelly	1,33
SK-N-AS	1,70
SK-N-BE(2)	1,38
SHEP	2,09
WM115	2,70

Als Positivkontrolle diente die Zelllinie WM115. Der Mittelwert der MFIs (*Median Fluorescence Intensity*) liegt in der Kontrollgruppe der Zelllinie WM115 bei 5535 (n=3) und in der behandelten Gruppe bei 14974 (n=3) (Abb. 3.3.1.).

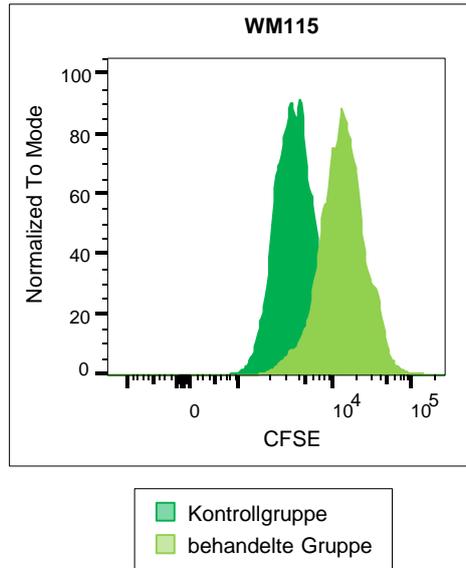


Abbildung 3.3.1. CFSE-Färbung - WM115: FACS-Analyse der Zelllinie WM115, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

Die Zelllinien LS, SH-SY5Y und SHEP konnten im Rahmen dieses Assays als seneszent beschrieben werden (Tab. 3.3.1.).

Bei der Zelllinie LS wurde im Mittel in der Kontrollgruppe ein MFI von 2963 (n=2) und in der behandelten Gruppe ein Median von 6798 (n=2) beobachtet. In der Kontrollgruppe der Zelllinie SH-SY5Y zeigte sich ein MFI von 2951 (n=3), in der behandelten Gruppe von 6493 (n=3). Für die Zelllinie SHEP wurde in der Kontrollgruppe ein MFI von 2217 (n=2) und in der behandelten Gruppe von 4806 (n=2) beobachtet (Abb. 3.3.2.).

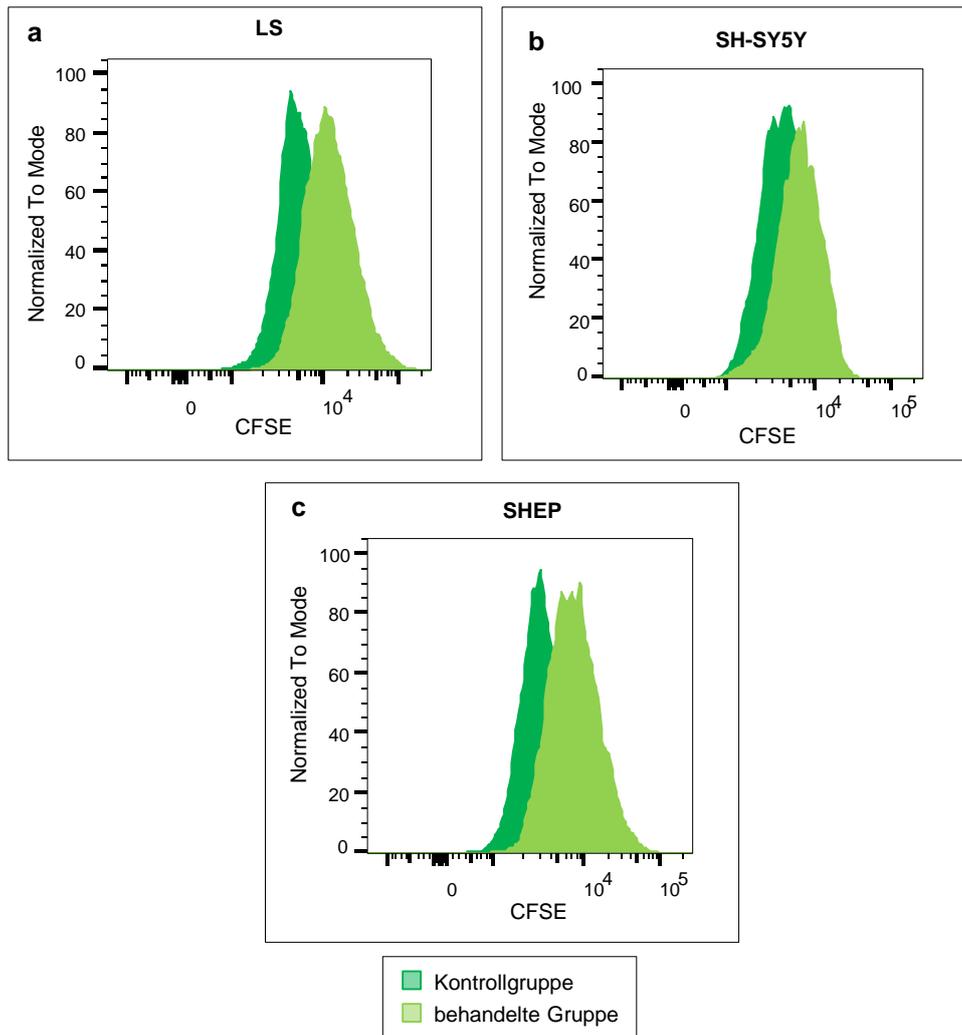


Abbildung 3.3.2. CFSE-Färbung - seneszente Zelllinien: FACS-Analyse der Zelllinie LS (a), SH-SY5Y (b), SHEP (c) a-c Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

Als partiell seneszent wurde die Zelllinie SK-N-AS beschrieben (Tab. 3.3.1.). Für die Zelllinie SK-N-AS zeigte sich in der Kontrollgruppe im Mittel ein MFI von 3362 (n=3), in der behandelten Gruppe ein MFI von 5651 (n=3) (Abb. 3.3.3.).

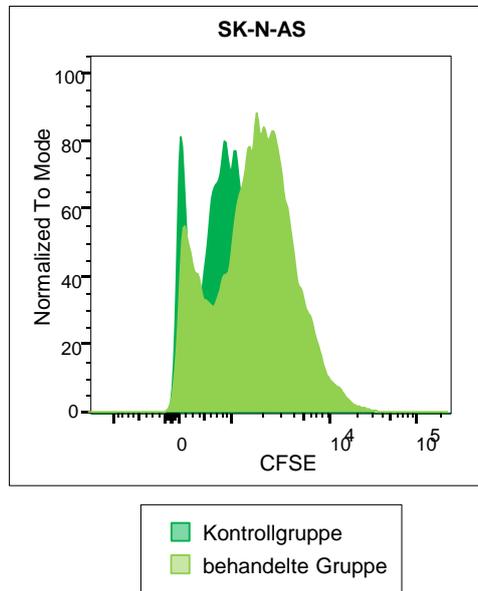


Abbildung 3.3.3. CFSE-Färbung - partiell seneszente Zelllinie: FACS-Analyse der Zelllinie SK-N-AS, Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

Im Vergleich zur Kontrolle konnte bei den Zelllinien LAN-1, Kelly und SK-N-BE(2) eine nur wenig oder gar nicht veränderte Proliferation der behandelten Zellen beobachtet werden (Tab. 3.3.1.). Dies spiegelt sich auch in den Verhältnissen der MFI wider. Diese Zelllinien sind somit per Definition in diesem Assay als nicht seneszent anzusehen.

Die Zelllinie LAN-1 zeigte in der Kontrollgruppe einen MFI von 2958 (n=3), in der behandelten Gruppe von 3118 (n=3). In der Kontrollgruppe zeigte die Zelllinie Kelly einen Wert von 2904 (n=3) und in der behandelten Gruppe von 3689 (n=3). Einen MFI von 2612 (n=3) zeigte die Zelllinie SK-N-BE(2) in der Kontrollgruppe und einen MFI von 3488 (n=3) in der behandelten Gruppe (Abb. 3.3.4.).

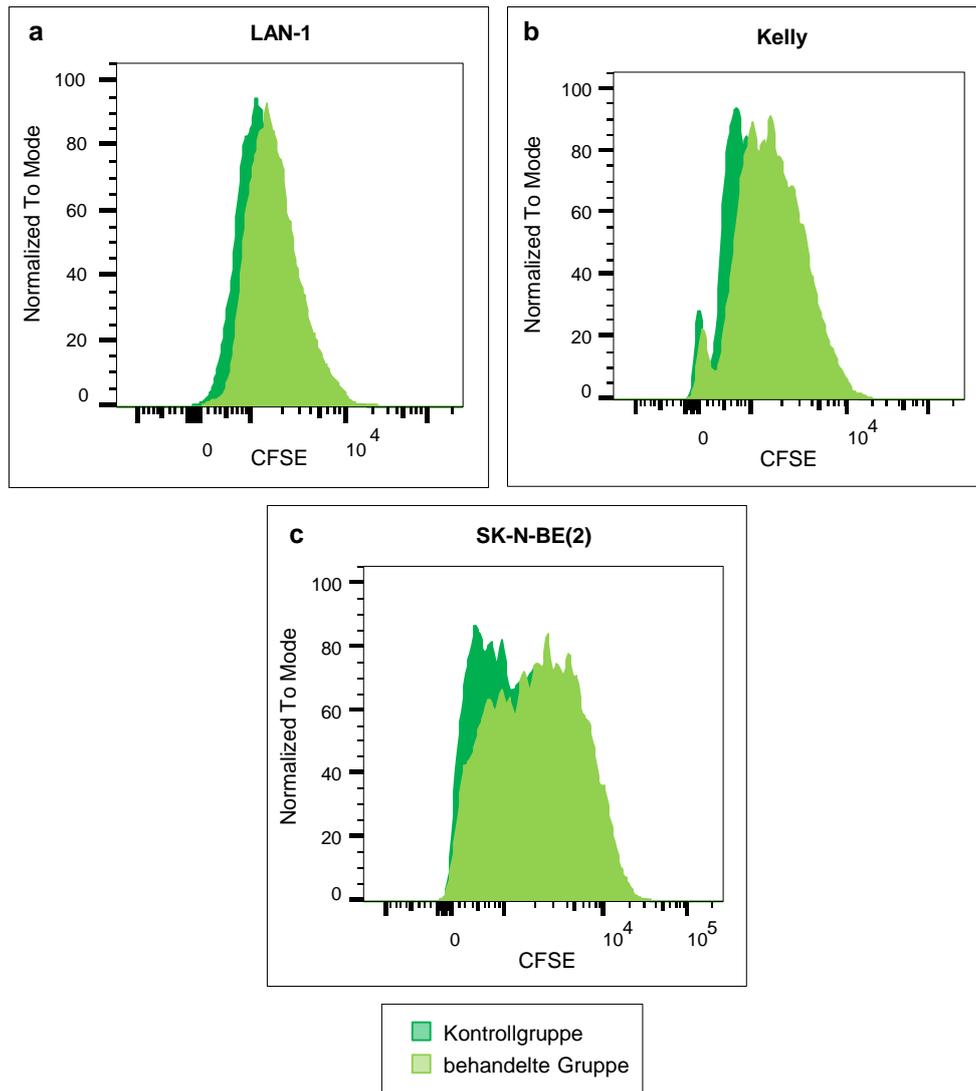


Abbildung 3.3.4. CFSE-Färbung - nicht seneszente Zelllinien: FACS-Analyse der Zelllinie LAN-1 (a), Kelly (b), SK-N-BE(2) (c) a-c Behandlungszeitraum: 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

Der Zeitraum der Behandlung, ein weiterer wichtiger Aspekt in Bezug auf die Seneszenz, wurde ebenfalls mit Hilfe der CFSE-Färbung untersucht. Hierzu wurde die FACS-Analyse nach 24, 48, 72 und 96 Stunden durchgeführt. Mit Hilfe dieses Assays wurde die Entwicklung der MFIs der unterschiedlichen Zelllinien im Verlauf von 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Zugabe der Zytokine dargestellt. Vergleichend wurden die Spannen der MFIs betrachtet. Hier nimmt man an, dass eine geringere Änderung der Spannweite der MFIs für eine geringere Anzahl an Teilungen der Zellen steht, da mit jeder Teilung die Intensität des CFSE Signals abnimmt. In der Kontrollgruppe würde man eine größere Spanne der MFIs erwarten, da sich die Zellen häufiger teilen.

Die Spanne der MFIs der Positivkontrolle WM115 liegt zwischen 4066 und 27541. Bei der behandelten Gruppe liegt eine Spanne von 13235 bis 29517 vor (Abb. 3.3.5. a). Die Werte der MFIs der Zelllinie SH-SY5Y in der Kontrollgruppe liegen zwischen 4125 und 50900. Zwischen 6321 und 25398 liegen die Werte der behandelten Gruppe (Abb. 3.3.5. b).

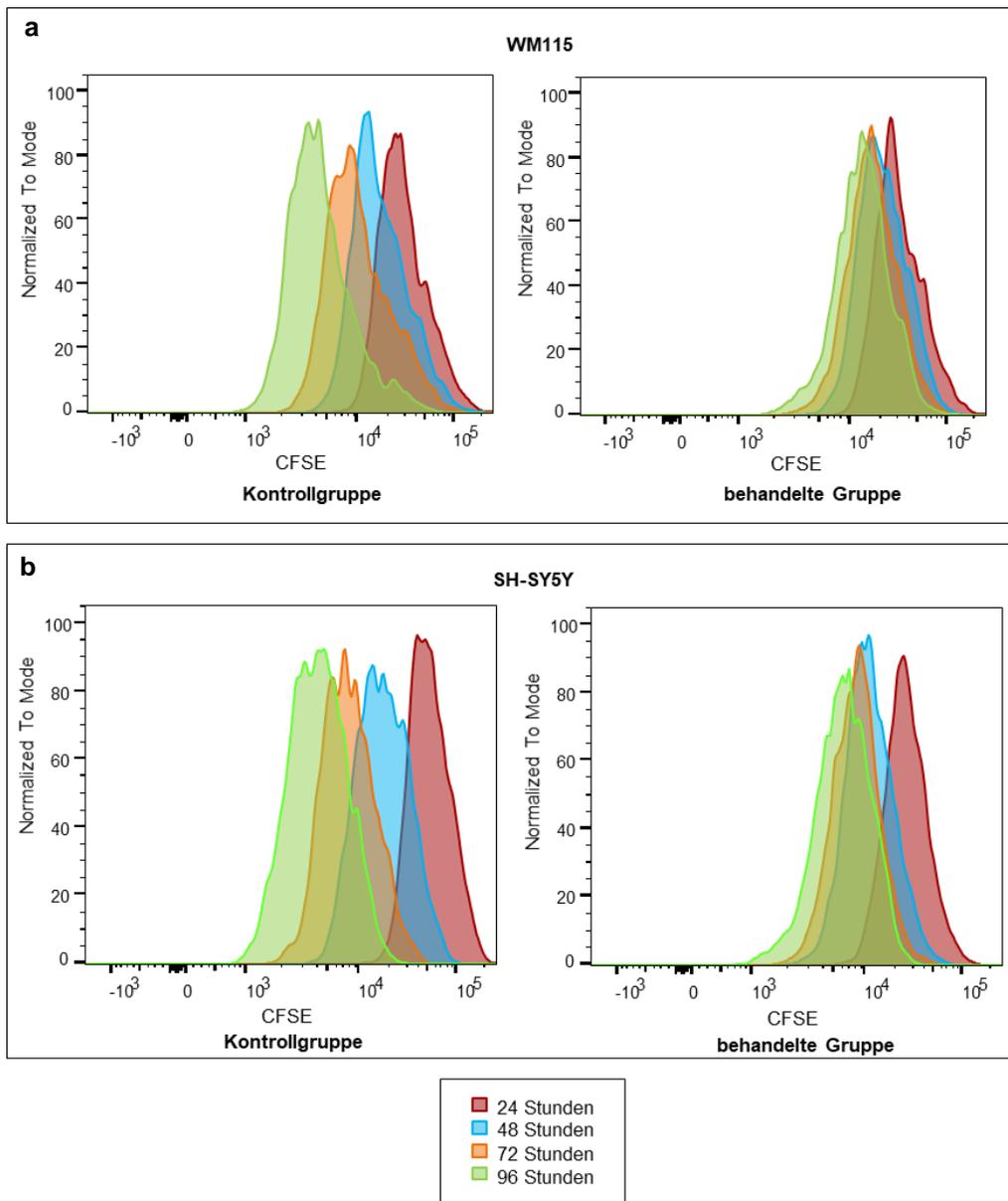


Abbildung 3.3.5. CFSE-Färbung im Verlauf - WM115 (a), SH-SY5Y (b): FACS-Analyse der CFSE Färbung im Verlauf von 24 bis 96 Stunden nach Beginn der Behandlung mit TNF- α (10 ng/ml) und IFN- γ (100 ng/ml), CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

Die Spanne der MFIs für die Kontrollgruppe der Zelllinie LS liegt zwischen 4997 und 50653. Bei der behandelten Gruppe liegt die Spanne zwischen 11746 und 55014 (Abb. 3.3.6. a). Die Entwicklung der MFIs der Zelllinie SHEP im Verlauf von 24, 48, 72 und 96 Stunden ist in Abbildung 3.3.6. b dargestellt. Die Spanne der MFIs für die Kontrollgruppe liegt zwischen 3227 und 31640. Zwischen 7301 und 35421 liegen die Werte der MFIs der behandelten Gruppe.

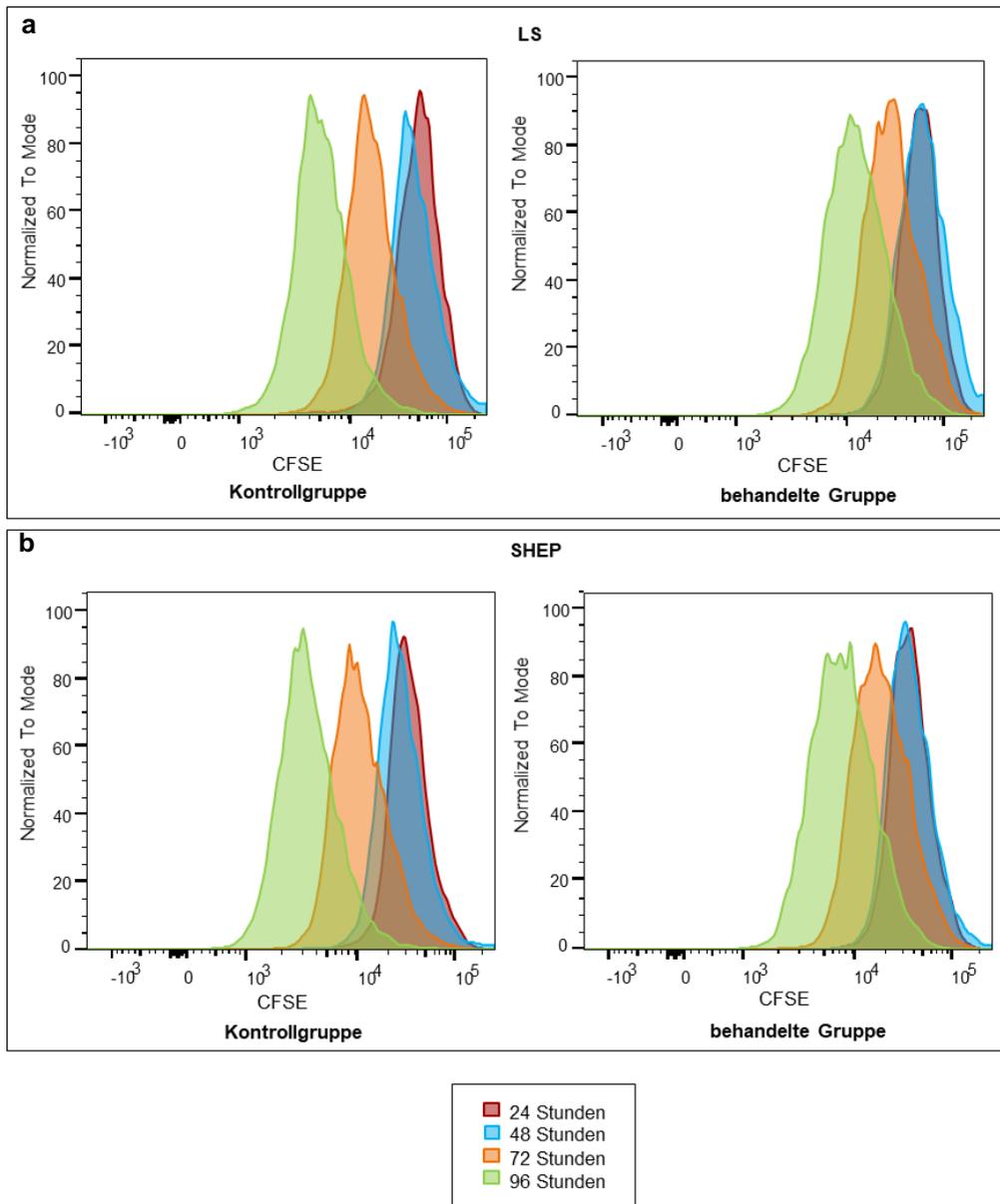


Abbildung 3.3.6. CFSE-Färbung im Verlauf - LS (a), SHEP (b): FACS-Analyse der CFSE Färbung im Verlauf von 24 bis 96 Stunden nach Beginn der Behandlung mit TNF- α (10 ng/ml) und IFN- γ (100 ng/ml), CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

Für den Behandlungszeitraum von 24, 48, 72 und 96 Stunden liegt bei der Kontrollgruppe der Zelllinie SK-N-AS eine Spanne der MFIs von 1049 bis 9951 vor. Die behandelte Gruppe weist eine Spanne von 1856 bis 9929 auf (Abb. 3.3.7.).

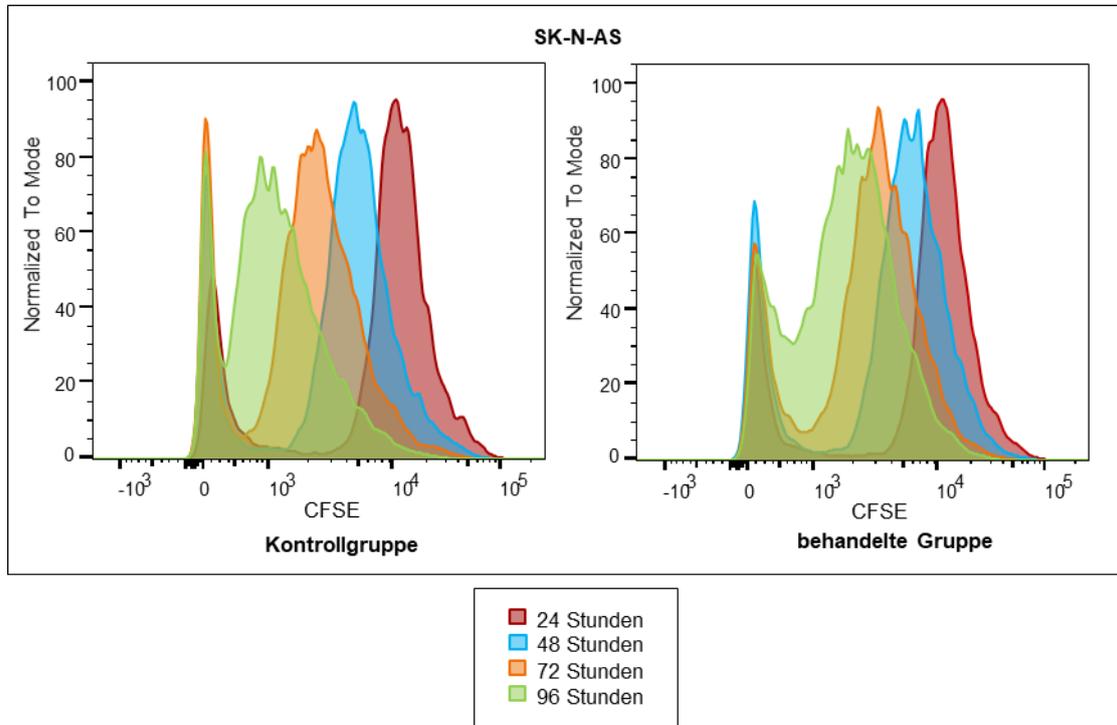


Abbildung 3.3.7. CFSE-Färbung im Verlauf - SK-N-AS: FACS-Analyse der CFSE Färbung im Verlauf von 24 bis 96 Stunden nach Beginn der Behandlung mit TNF- α (10 ng/ml) und IFN- γ (100 ng/ml), CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

Die Peaks der Kontrollgruppe der Zelllinie LAN-1 umfassen im Behandlungszeitraum von 24, 48, 72, und 96 Stunden die Werte von 1300 bis 15600. Die Spanne der behandelten Gruppe reicht von 1603 bis 15419 (Abb. 3.3.8. a). Die MFIs der Kontrollgruppe der Zelllinie Kelly liegen zwischen 1022 und 11881. Eine Spanne zwischen 1582 und 14283 weist die behandelte Gruppe auf (Abb. 3.3.8. b).

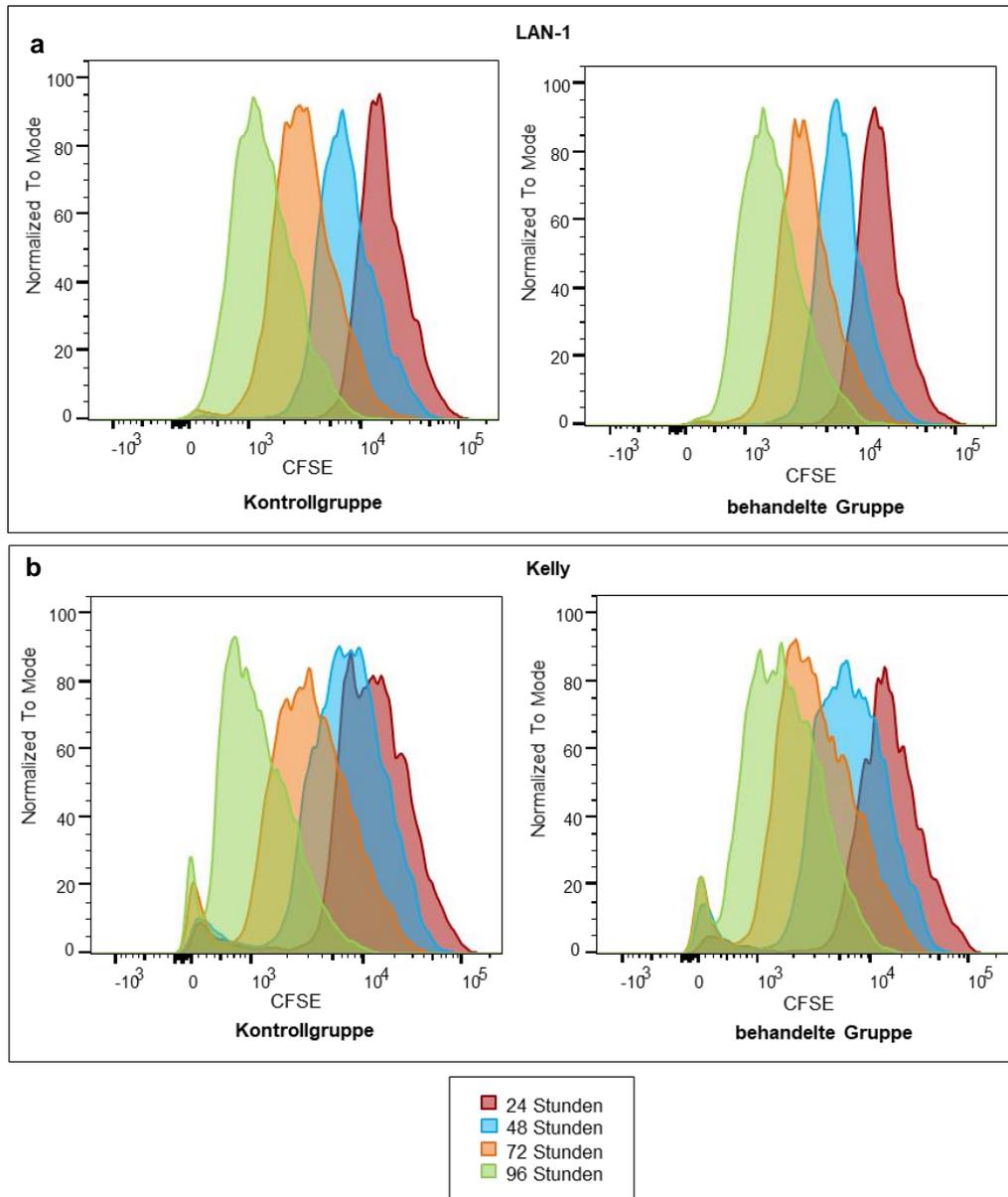


Abbildung 3.3.8. CFSE-Färbung im Verlauf - LAN-1 (a), Kelly (b): FACS-Analyse der CFSE Färbung im Verlauf von 24 bis 96 Stunden nach Beginn der Behandlung mit TNF- α (10 ng/ml) und IFN- γ (100 ng/ml), CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

In der Abbildung 3.3.9. ist die Entwicklung der MFIs der Zelllinie SK-N-BE(2) im Verlauf von 24, 48, 72 und 96 Stunden dargestellt. Bei der Kontrollgruppe liegt eine Spanne von 1350 bis 9795 vor. Die Spanne der MFIs für die behandelte Gruppe liegt zwischen 2115 und 10602.

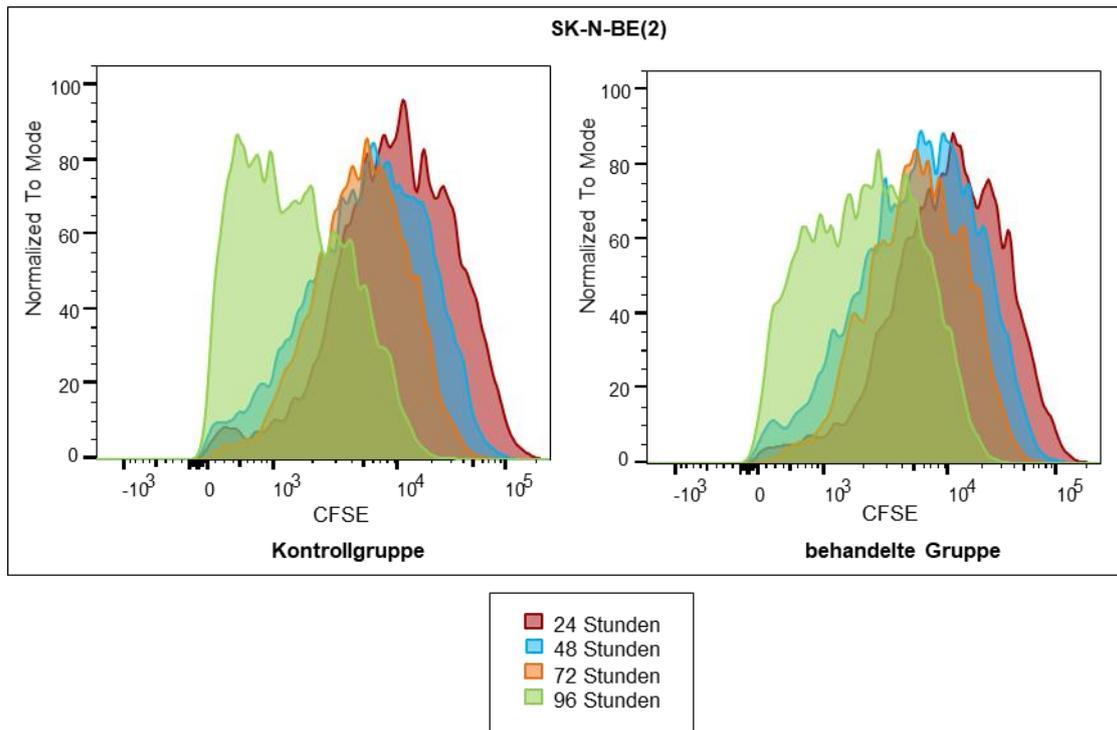


Abbildung 3.3.9. CFSE-Färbung im Verlauf - SK-N-BE(2): FACS-Analyse der CFSE Färbung im Verlauf von 24 bis 96 Stunden nach Beginn der Behandlung mit TNF- α (10 ng/ml) und IFN- γ (100 ng/ml), CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

Eine Zusammenfassung der Spanne der MFIs bei den Messungen nach 24, 48, 72 und 96 Stunden ist in Tabelle 3.3.2. dargestellt.

Tabelle 3.3.2. CFSE-Färbung im Verlauf - Zusammenfassung: In der Tabelle ist für jede Zelllinie die Spanne der MFIs zusammengefasst. MFI: Median Fluorescence Intensity

	MFIs Kontrollgruppe	MFIs behandelte Gruppe
LS	4997 - 50653	11746 - 55014
SH-SY5Y	4125 - 50900	6321 - 25398
LAN-1	1300 - 15600	1603 - 15491
Kelly	1022 - 11881	1582 - 14283
SK-N-AS	1049 - 9951	1856 - 9929
SK-N-BE(2)	1350 - 9795	2115 - 10602
SHEP	3227 - 31640	7301 - 35421
WM115	4066 - 27541	13235 - 29517

3.4. Growth Assay

Das Ziel dieses Assays liegt darin zu beobachten, wie sich die behandelten Zellen nach der Wegnahme der Zytokine verhalten, nachdem sie 2 Passagen, also 8 Tage, mit Zytokinen behandelt wurden. Außerdem soll das Ausmaß eines zweifachen Behandlungszeitraums beurteilt werden. Für Zellen, die sich im Zustand einer Seneszenz befinden, würde man erwarten, dass die Zellen nach Wegnahme der Zytokine in einem permanenten Wachstumsarrest verbleiben und keine erneute Proliferation zu beobachten ist. Außerdem könnte man bei Zelllinien, die sich in anderen Assays als nicht seneszent bewiesen haben, erwarten, dass sie durch den längeren Behandlungszeitraum doch in den Zustand einer Seneszenz übergehen.

Für die Auswertung des Growth Assays wurden bestimmte Kriterien festgelegt, die helfen sollen zu beurteilen, ob ein Wachstumsarrest und somit möglicherweise eine Seneszenz vorliegen oder nicht. Hierfür wurde der Proliferationsfaktor (PF) für die Kontrolle (K) und die behandelte Gruppe (B) von der zweiten zur dritten Passage als Grundlage herangezogen. Als Proliferationsfaktor ist hier das Verhältnis der Anzahl der Zellen aus der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe zu verstehen. Nachfolgend sind die festgelegten Kriterien aufgeführt:

Seneszent

- $0,5 < PF (B) \leq 1,5$
- $PF (B) \leq 50\% PF (K)$

Partiell seneszent

- $PF (B) > 1,5$
- $PF (B) \leq 50\% PF (K)$

Nicht seneszent

- $PF (B) < 0,5$ oder $PF (B) > 1,5$
- $PF (B) > 50\% PF (K)$

Die nachfolgende Tabelle 3.4.1. stellt die Proliferationsfaktoren für die Kontrolle und für die behandelten Zellen dar. Außerdem ist in der letzten Spalte das Verhältnis der beiden Proliferationsfaktoren der jeweiligen Zelllinie, also somit der prozentuelle Anteil, festgehalten.

Tabelle 3.4.1. Growth Assay - Proliferationsfaktor: In der Tabelle ist für jede Zelllinie der Proliferationsfaktor beider Gruppen und das Verhältnis der beiden Gruppen zueinander dargestellt. n=1, pink: seneszent, blau: partiell seneszent, schwarz: nicht seneszent

	Proliferationsfaktor		
	Kontrolle (K)	behandelte Zellen (B)	B/K
LS	2,3	1,0	0,43
SH-SY5Y	5,6	2,4	0,43
LAN-1	7,0	1,6	0,23
Kelly	6,4	1,5	0,23
SK-N-AS	6,1	3,3	0,54
SK-N-BE(2)	9,6	9,4	0,98
SHEP	13,0	0,7	0,05
WM115	3,8	0,7	0,18

Die Zelllinie WM115 diente als Positivkontrolle. Der Proliferationsfaktor in der Kontrollgruppe betrug 3,8 und in der behandelten Gruppe 0,7. Das Verhältnis der behandelten Gruppe zur Kontrollgruppe liegt daraus folgend bei 0,18. Dieser Wert liegt wie in der Definition festgehalten unter 50 %. Die Positivkontrolle WM115 zeigte somit einen Wachstumsarrest (Tab. 3.4.1.). Die Zelllinie WM115 zeigt keine Zunahme der Proliferation in Passage 3 nach Wegnahme der Zytokine (Abb. 3.4.1.). Wenn man die beiden Kurven betrachtet ist schon nach Passage 1 ein Unterschied zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellen zu erkennen. Dieser Unterschied der verminderten Proliferation nimmt in Passage 2 und auch in Passage 3 nach Wegnahme der Zytokine weiterhin zu.

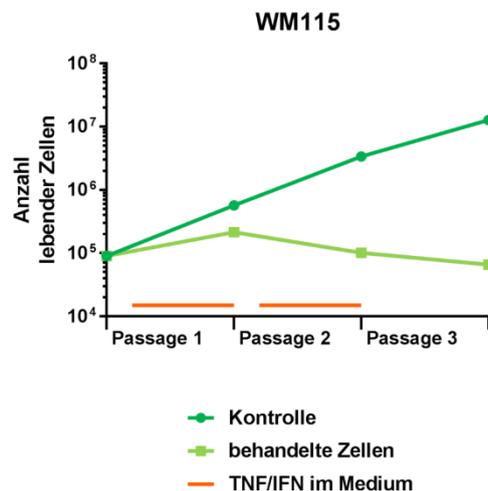


Abbildung 3.4.1. Growth Assay - WM115: 3 Passagen, davon 2 Passagen mit Zytokinen im Medium, dann Waschschrift und erneutes Ausplattieren ohne Zytokine, Behandlungszeitraum für eine Passage jeweils 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=1

Im Rahmen dieses Assays konnten die Zelllinien LS, Kelly und SHEP gemäß den zuvor festgelegten Kriterien als seneszent definiert werden.

Bei der Zelllinie LS lag der Proliferationsfaktor in der Kontrollgruppe bei 2,3 und in der behandelten Gruppe bei 1,0. Die Zelllinie wurde als seneszent beurteilt, da das Verhältnis der behandelten Gruppe zur Kontrollgruppe bei 0,43 liegt (Tab. 3.4.1.). Es zeigte sich, dass nach Wegnahme der Zytokine die Proliferation der behandelten Gruppe nicht ansteigt (Abb. 3.4.2. a). Die Kurven der beiden Gruppen weichen von Beginn an über alle drei Passagen deutlich voneinander ab, sodass eine verminderte Proliferation eindeutig abgelesen werden kann. In der Kontrollgruppe der Zelllinie Kelly wurde ein Proliferationsfaktor von 6,4 und in der behandelten Gruppe von 1,5 ermittelt. Auch diese Zelllinie wird als seneszent beschrieben (Tab. 3.4.1.). Das Verhältnis der beiden Gruppen zueinander ergibt einen Wert von 0,23. Nach Wegnahme von TNF- α und IFN- γ kann kaum ein Anstieg in der behandelten Gruppe beobachtet werden. Bei Betrachtung der Kurven der beiden Gruppen ist auffällig, dass es erst in Passage zwei zu einer Abflachung der Kurve bei den behandelten Zellen kommt. Nach Wegnahme der Zytokine ist nur ein minimaler Anstieg der Kurve der behandelten Gruppe wahrzunehmen (Abb. 3.4.2. b). Ein Proliferationsfaktor von 13,0 wurde in der Kontrollgruppe der Zelllinie SHEP beschrieben. In der behandelten Gruppe wurde ein Proliferationsfaktor von 0,7 ermittelt. Es liegt eine seneszente Zelllinie vor (Tab. 3.4.1.). Das Verhältnis liegt hier bei 0,05. Die Zelllinie SHEP zeigt keinen Anstieg in der Proliferation in der 3. Passage nach Wegnahme der Zytokine (Abb. 3.4.2. c). Hier ist anhand der Kurven ganz deutlich der Unterschied zwischen der steigenden Kurve der Kontrolle und der geraden, parallel zur x-Achse verlaufenden Kurve der behandelten Zellen zu erkennen. Dies ist auch nach Wegnahme der Zytokine zu beobachten.

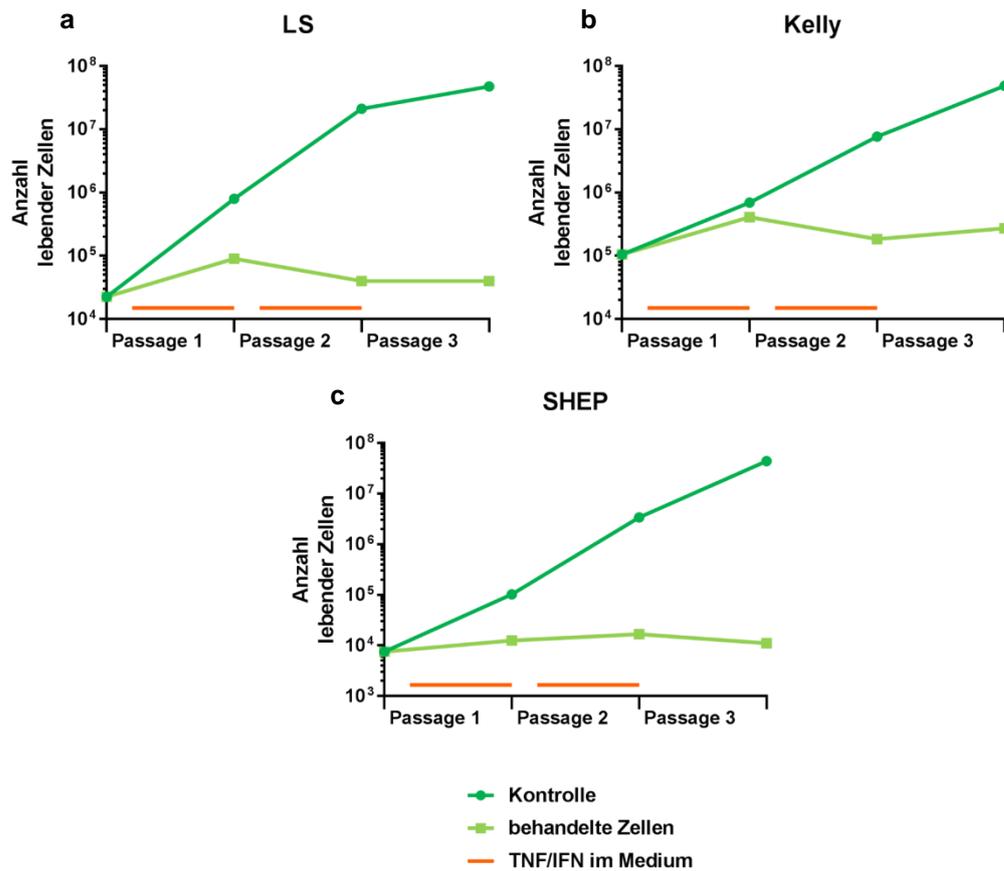


Abbildung 3.4.2. Growth Assay - seneszente Zelllinien: a-c 3 Passagen, davon 2 Passagen mit Zytokinen im Medium, dann Waschschrift und erneutes Ausplattieren ohne Zytokine, Behandlungszeitraum für eine Passage jeweils 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=1

Die Zelllinien SH-SY5Y und LAN-1 wurden als partiell seneszent beschrieben. Bei der Zelllinie SH-SY5Y wurde in der Kontrollgruppe ein Proliferationsfaktor von 5,6 ermittelt. In der behandelten Gruppe von 2,4. Aus diesen Ergebnissen erfolgte die Einstufung dieser Zellen als partiell seneszent (Tab. 3.4.1.). Das Verhältnis der beiden Gruppen wurde hier mit 0,43 ermittelt. Dieser Wert weist in Zusammenschau mit dem Proliferationsfaktor der behandelten Gruppe und laut Definition auf eine partielle Seneszenz hin. Die Zelllinie zeigt eine verminderte Proliferation in der behandelten Gruppe über den Zeitraum, in dem die Zytokine im Medium vorhanden sind. Bei Abwesenheit der Zytokine steigt die Proliferation allerdings wieder an (Abb. 3.4.3. a). Bei der Betrachtung der Kurven ist für die behandelten Zellen eine leicht fallende Kurve in Passage eins und in Passage zwei zu beobachten. Nach Wegnahme der Zytokine in Passage drei steigt die Anzahl der Zellen wieder an. Bei der Zelllinie LAN-1 wurde in der Kontrollgruppe ein Proliferationsfaktor von 7,0 und in der behandelten Gruppe von 1,6 beobachtet. Auch diese Zelllinie wurde als partiell seneszent beurteilt (Tab. 3.4.1.). Der Wert des Verhältnisses liegt hier bei 0,23. Ein Ansprechen der behandelten Gruppe der Zelllinie LAN-1 kann man erst in der 2. Passage beobachten, dies setzt sich dann allerdings in der 3. Passage fort (Abb. 3.4.3. b). Dies spiegelt sich auch deutlich in den Kurven wider. Ab Passage 2 steigt die Kurve der behandelten Zellen weniger steil bis kaum noch an und auch in der Passage drei nach Wegnahme der Zytokine ist nur ein minimaler Anstieg wahrnehmbar.

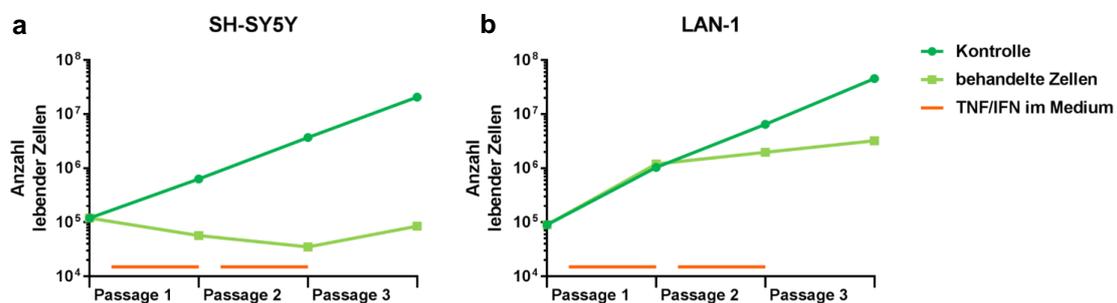


Abbildung 3.4.3. Growth Assay - partiell seneszente Zelllinien: a, b 3 Passagen, davon 2 Passagen mit Zytokinen im Medium, dann Waschschrift und erneutes Ausplattieren ohne Zytokine, Behandlungszeitraum für eine Passage jeweils 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=1

Bei den Zelllinien SK-N-AS und SK-N-BE(2) konnte keine Seneszenz beobachtet werden.

Der Proliferationsfaktor in der Kontrollgruppe der Zelllinie SK-N-AS betrug 6,1 und in der behandelten Gruppe 3,3. Diese Zelllinie ist nicht seneszent (Tab. 3.4.1.). Das Verhältnis der behandelten Gruppe zur Kontrollgruppe ergab einen Wert von 0,54. Die Zelllinie SK-N-AS zeigt kein Ansprechen der behandelten Gruppe auf die Zugabe der Zytokine (Abb. 3.4.4. a). Die Kurven der beiden Gruppen verlaufen nahezu parallel, wobei die Kurve der behandelten Zellen nur minimal unter der Kurve der Kontrollgruppe zum Liegen kommt. Auch bei der Zelllinie SK-N-BE(2) konnte keine Seneszenz festgestellt werden. Der Proliferationsfaktor in der Kontrollgruppe betrug 9,6 und in der behandelten Gruppe 9,4 (Tab. 3.4.1.). Mit 0,98 weist auch das Verhältnis der beiden Gruppe auf keinerlei Seneszenz hin. Es kann keine Abnahme der Proliferation durch die Zugabe von TNF- α und IFN- γ beobachtet werden (Abb. 3.4.4. b). Für diese Zelllinie verlaufen die Kurven von Beginn an parallel. Nur in der Passage 3 kommt es zu einer kleinen Abweichung zwischen den beiden Gruppen, indem die Kurve der behandelten Zellen etwas unterhalb der Kontrolle liegt. Dieser kleinen Abweichung wird allerdings keine Bedeutung zugeschrieben.

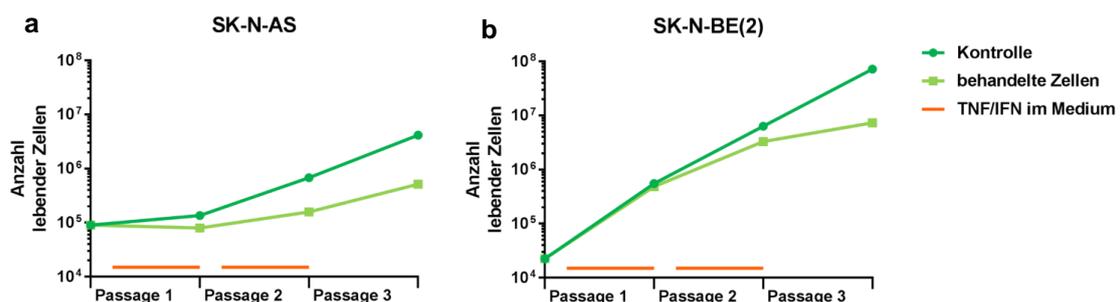


Abbildung 3.4.4. Growth Assay - nicht seneszente Zelllinien: a, b 3 Passagen, davon 2 Passagen mit Zytokinen im Medium, dann Waschschrift und erneutes Ausplattieren ohne Zytokine, Behandlungszeitraum für eine Passage jeweils 96 Stunden, TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 100 ng/ml, n=1

3.5. Luciferase Assay

In diesem Assay wurde die Auswirkung unterschiedlicher Konzentrationen von TNF- α auf das Wachstum der behandelten Zellen untersucht. Für die Zellen mit einer verminderten Proliferation würde man eine niedrigere Biolumineszenz erwarten, da sich die Zellen nicht so häufig teilen und somit der Anteil an Zellen, bei denen eine Biolumineszenz messbar ist, geringer ist. Außerdem wurde hier die Auswirkung unterschiedlicher TNF- α Konzentrationen bei gleichbleibenden IFN- γ Konzentrationen beobachtet.

Die Zelllinie SH-SY5Y mCh zeigt nur bei einer niedrigen Konzentration von TNF- α (0,01 ng/ml) eine deutlich geringere Biolumineszenz als die Kontrollgruppe. Dies lässt rein theoretisch Rückschlüsse auf eine verminderte Proliferation bei dieser Konzentration schließen. Paradoxe Weise liegen jedoch die Kurven für alle anderen Konzentrationen deutlich oberhalb der Kontrollgruppe und weisen damit höhere Werte als diese Gruppe auf. Das Ergebnis ist somit nicht verwertbar. Bei einer Konzentration von 0,01 ng/ml TNF- α zeigt die Zelllinie LAN-1 mCh ebenfalls eine geringere Biolumineszenz als die Kontrollgruppe und lässt somit auf eine geringere Proliferation schließen. Bei dieser Konzentration liegt ein signifikanter Unterschied vor. Bei den anderen Konzentrationen konnte allerdings kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden, sodass in Zusammenschau von keiner Veränderung der Proliferation ausgegangen wird. Eine geringere Biolumineszenz und einen signifikanten Unterschied zeigt die Zelllinie Kelly mCh erst bei einer Konzentration von TNF- α von 100 ng/ml. Auffällig ist hier, dass die Kurve leicht abfällt und die Zellen vermutlich teilweise sterben. Auch hier konnte nur bei einer Konzentration ein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Bei dieser Konzentration muss außerdem von einer erhöhten Zahl an apoptotischen oder toten Zellen ausgegangen werden, sodass auch hier keine Veränderung der Proliferation beobachtet werden konnte. Die Zelllinie SHEP mCh zeigt eine verringerte Proliferation und einen signifikanten Unterschied bei Konzentrationen von 10 ng/ml und 100 ng/ml (Abb. 3.5.1., Abb. 3.5.2.).

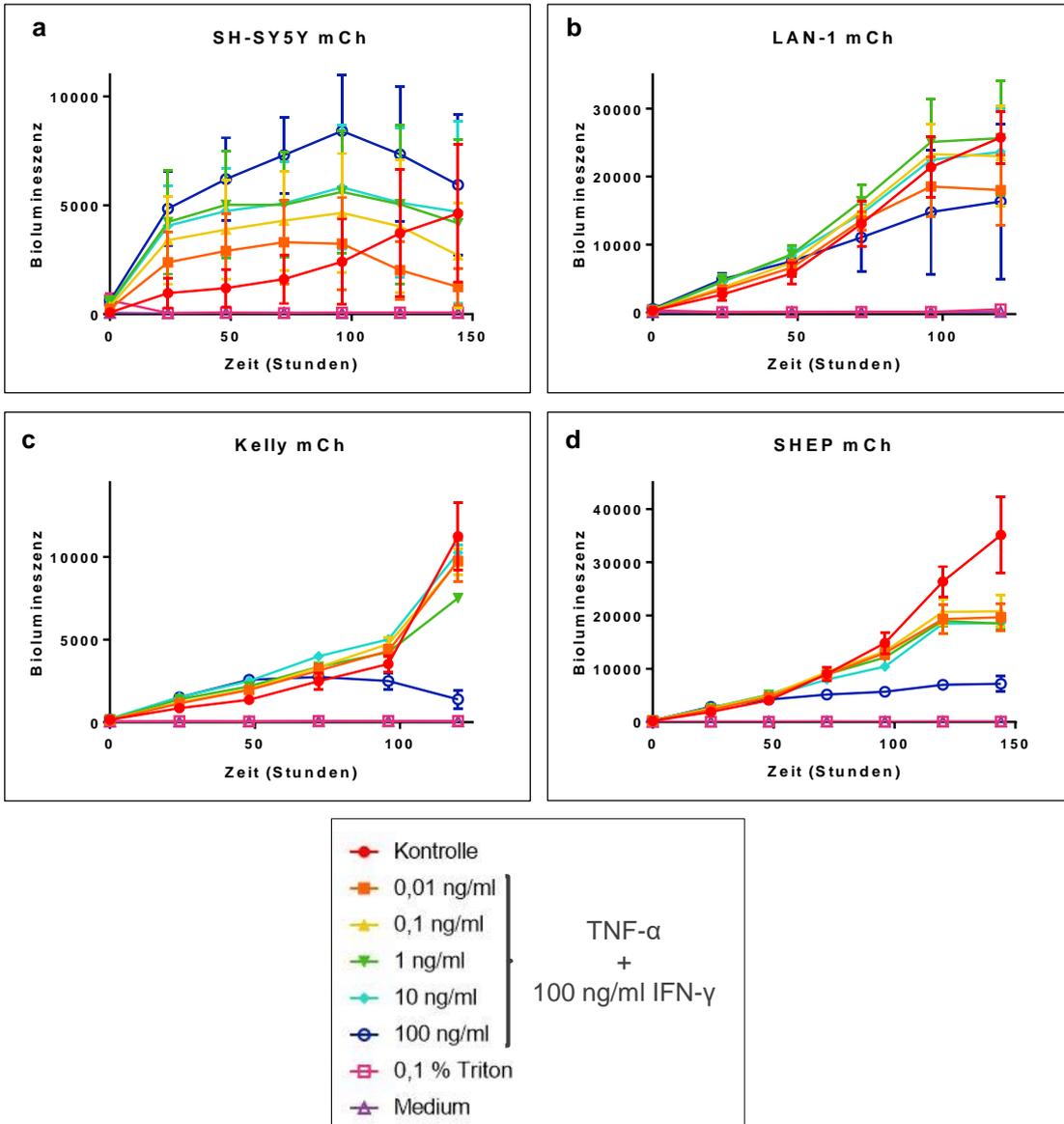


Abbildung 3.5.1. Luciferase Assay: Messung der Biolumineszenz, Kontrollen: 0,1 % Triton → tote Zellen, Medium → keine Zellen, Darstellung des Mittelwertes, technische Triplikate

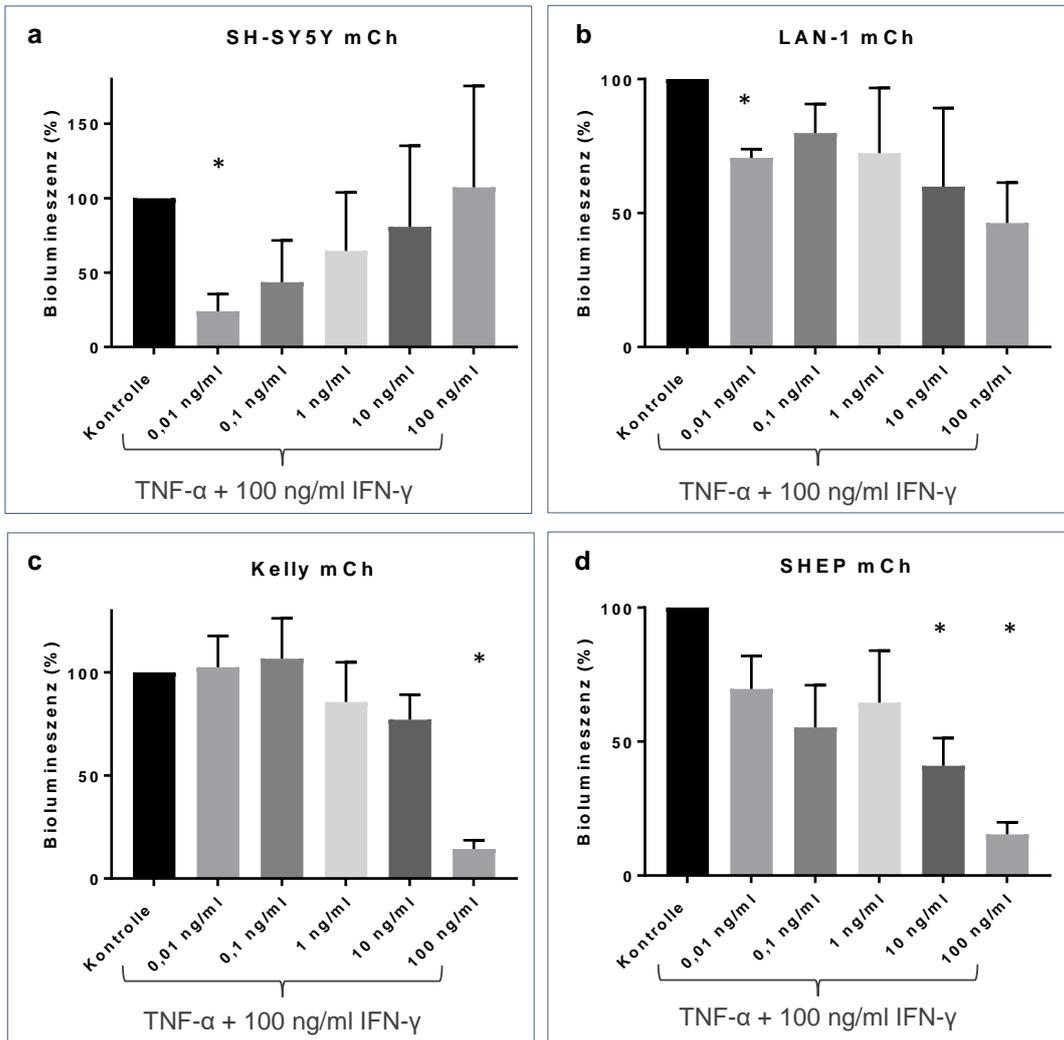


Abbildung 3.5.2. Luciferase Assay, Endzeitpunkt: Die Biolumineszenz der Kontrolle wurde nach 96 Stunde der Messung mit 100% festgelegt und die anderen Gruppen darauf bezogen. * → signifikant bezogen auf die Kontrolle, t-Test, p=0,05, technische Triplikate

3.6. IncuCyte® Assay

Bei diesem Assay wurde die Konfluenz der Kontrollgruppe und der behandelten Zellen über einen längeren Zeitraum beobachtet. Daraus kann ein Rückschluss auf die Proliferation der Zellen gezogen werden. Zusätzlich sollte im Rahmen dieses Assays eine mögliche Zytotoxizität durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ ausgeschlossen werden. Zur Bewertung der Zytotoxizität wurde ein Zytotoxreagens eingesetzt, dass zusätzlich zu den Zytokinen zu den Wells hinzugeben wurde. Am Ende der Messung sollte die Auswertung mit Hilfe dieses Zytotoxreagens und einem speziellen Programm ausgewertet werden. Die Auswertung war letztendlich nicht möglich, da die notwendige Kontrolle jeweils eines Wells nur mit Medium und Zytotoxreagens nicht vorhanden war und somit die Maske zur Auswertung der Zellen mit dem entsprechenden Programm nicht erstellt werden konnte.

Eine Konfluenzunterschied von mehr als 50 % zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe wird als verminderte Proliferation definiert. Alle hier genannten Werte der Konfluenz wurden am Endzeitpunkt ermittelt.

Die Zelllinie WM115, die als Positivkontrolle dient, erreicht in der Kontrollgruppe 99,1 % und in der behandelten Gruppe zu diesem Zeitpunkt 47,7 % (Abb. 3.6.1.). An den Kurven der beiden Gruppen kann man ablesen, dass die Konfluenz der Kontrollgruppe kontinuierlich ansteigt, bis der komplette Platz im Well verbraucht ist und eine Konfluenz von 100 % erreicht ist. Hier kommt es dann zu einer Sättigung. Die Kurve der behandelten Gruppe hingegen zeigt kaum eine Steigung und verläuft nahezu gerade bei einer Konfluenz um die 45 %.

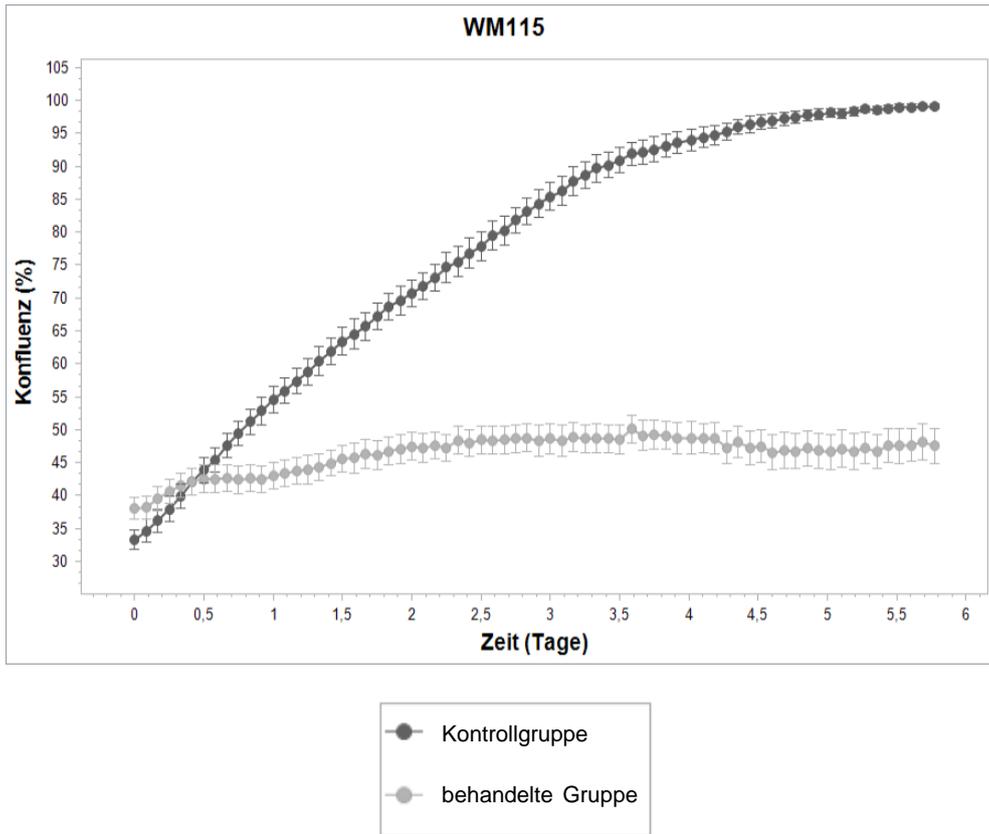


Abbildung 3.6.1. IncuCyte® Assay, Konfluenz - WM115: Angabe der Konfluenz in Prozent, Inkubation mit TNF- α (10 ng/ml) & IFN- γ (100 ng/ml) im kompletten Beobachtungszeitraum, Werte aus technischen Triplikaten

Eine deutlich langsamer zunehmende Konfluenz und damit eine verminderte Proliferation wurde in den behandelten Gruppen der Zelllinien LS, SH-SY5Y und SHEP beobachtet.

Für die Zelllinie LS ist die Zunahme der Konfluenz der Kontrollgruppe bis zu 96 % zu erkennen. In der behandelten Gruppe ist eine Zunahme der Konfluenz an diesem Punkt bis zu 44,9 % zu beobachten (Abb. 3.6.2.). Die Kurven der beiden Gruppen decken sich zunächst gegenseitig. Nach circa 2 Tagen allerdings, steigt die Konfluenz der Kontrollgruppe deutlich schneller und es kommt nach ungefähr 4,5 Tagen zu einer Sättigung bei einer Konfluenz von annähernd 100 %. Die Kurve der behandelten Gruppe steigt nach 2 Tagen auch weiter an, allerdings erreicht sie für die Konfluenz nur einen Anteil von circa 45 % und nach 5,5 Tagen kann ebenfalls eine Sättigung bei diesem Wert erahnt werden.

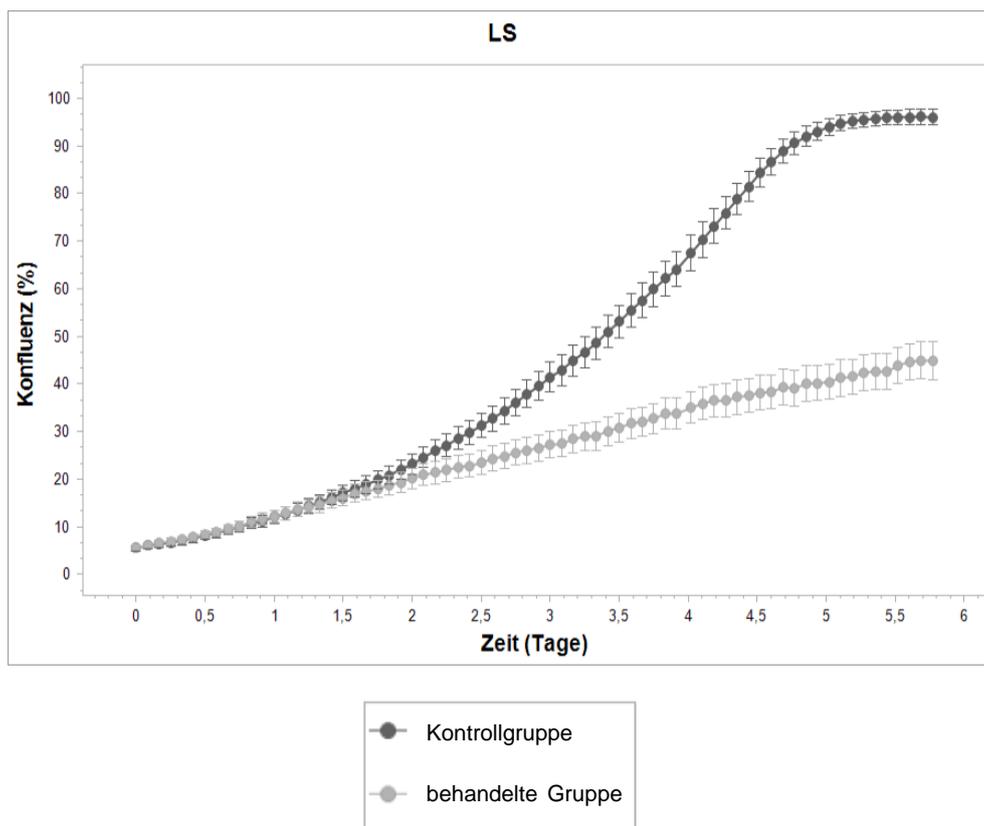


Abbildung 3.6.2. IncuCyte® Assay, Konfluenz - LS: Angabe der Konfluenz in Prozent, Inkubation mit TNF- α (10 ng/ml) & IFN- γ (100 ng/ml) im kompletten Beobachtungszeitraum, Werte aus technischen Triplikaten

Die Konfluenz der Kontrollgruppe der Zelllinie SH-SY5Y nimmt bis zu 99,8 % zu. Die behandelte Gruppe erreicht zu diesem Zeitpunkt eine Konfluenz von 20,4 % (Abb. 3.6.3.). Bis zu der Zeiteinheit von 0,5 Tagen verlaufen die beiden Kurven annähernd gleich. Danach steigt die Kurve der Kontrollgruppe bis zu einer Sättigung bei einer Konfluenz von nahezu 100 % nach ungefähr 4 Tagen. Die Kurve der behandelten Gruppe zeigt keine Steigung und verläuft fast gerade, wobei sogar eine leichte Abnahme der Konfluenz beobachtet werden kann. Dies deutet auf eine mögliche Zytotoxizität hin.

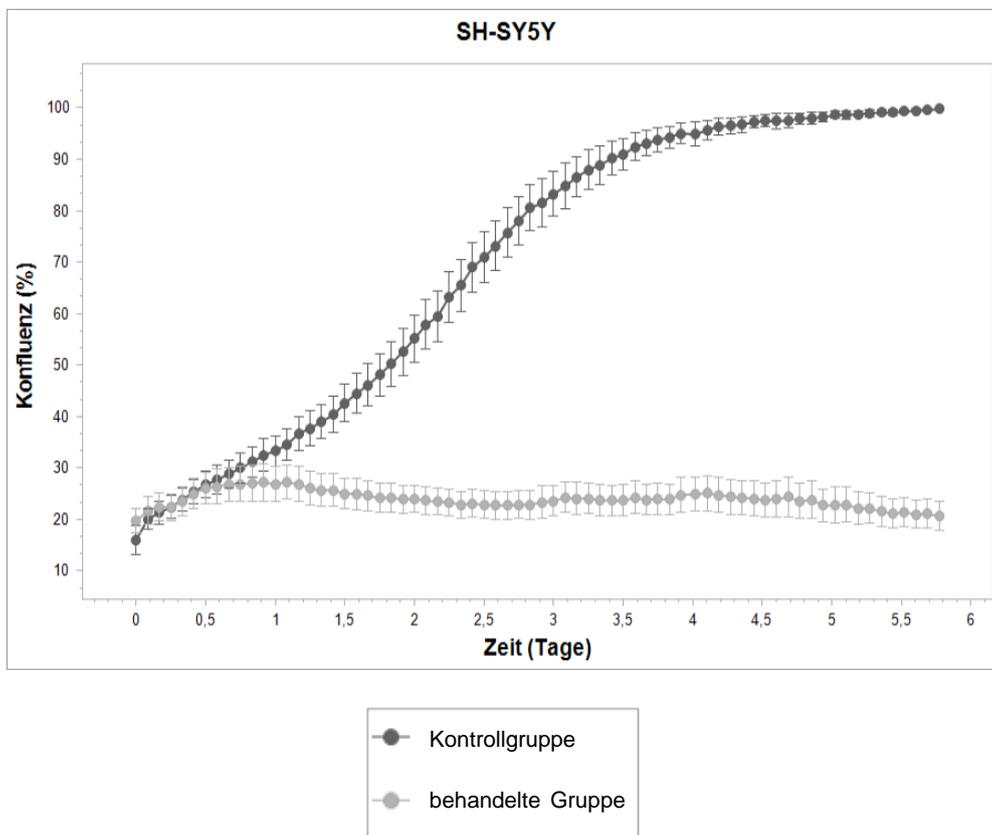


Abbildung 3.6.3. IncuCyte® Assay, Konfluenz - SH-SY5Y: Angabe der Konfluenz in Prozent, Inkubation mit TNF- α (10 ng/ml) & IFN- γ (100 ng/ml) im kompletten Beobachtungszeitraum, Werte aus technischen Triplikaten

Eine Konfluenz von maximal 75,7 % erreicht die Zelllinie SHEP in der Kontrollgruppe. In der behandelten Gruppe ist eine Konfluenz von maximal 22,6 % zu beobachten (Abb. 3.6.4.). Die beiden Kurven verlaufen bis zum Zeitpunkt von 2 Tagen gleich. Ab diesem Zeitpunkt nimmt die Konfluenz in der Kontrollgruppe exponentiell zu. Leider wurde der Assay vorzeitig beendet, die Kontrollgruppe konnte daher nicht die Sättigung erreichen. Dennoch ist festzuhalten, dass bereits zu diesem Zeitpunkt die Konfluenz der behandelten Gruppe weniger als 50 % der Konfluenz der Kontrollgruppe beträgt. Die Kurve der behandelten Gruppe steigt nur noch leicht bis zu einer Konfluenz von ca. 23 % an.

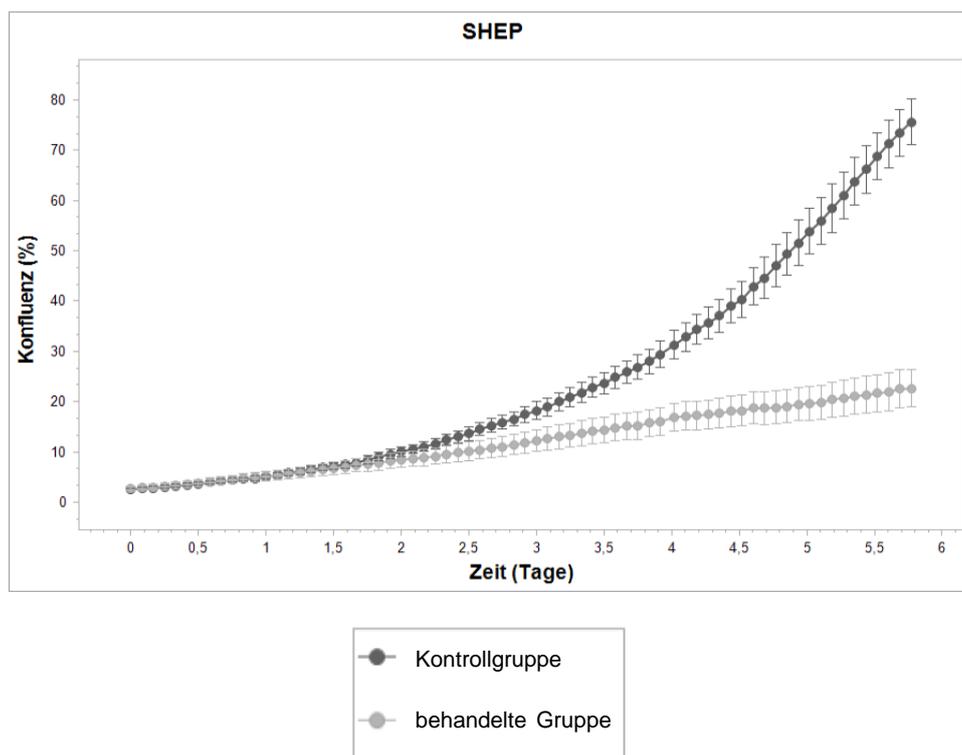


Abbildung 3.6.4. IncuCyte® Assay, Konfluenz - SHEP: Angabe der Konfluenz in Prozent, Inkubation mit TNF- α (10 ng/ml) & IFN- γ (100 ng/ml) im kompletten Beobachtungszeitraum, Werte aus technischen Triplikaten

Keinen wesentlichen Unterschied in Bezug auf die Konfluenz und auf die Proliferation der unterschiedlichen Gruppen wurde bei den Zelllinien LAN-1, Kelly, SK-N-AS und SK-N-BE(2) festgestellt.

In der Kontrollgruppe der Zelllinie LAN-1 kann eine Konfluenz von maximal 92 % beobachtet werden. Die Konfluenz in der behandelten Gruppe beträgt zu diesem Zeitpunkt 60 % (Abb. 3.6.5.). Hier decken sie die beiden Kurven bis zu dem Zeitpunkt von 2 Tagen. Danach steigt die Konfluenz der Kontrollgruppe zwar schneller als die Konfluenz der behandelten Gruppe, allerdings steigt diese mit 60 % über eine Konfluenz von 50 % und es kommt somit laut der Definition nicht zu einer verminderten Proliferation.

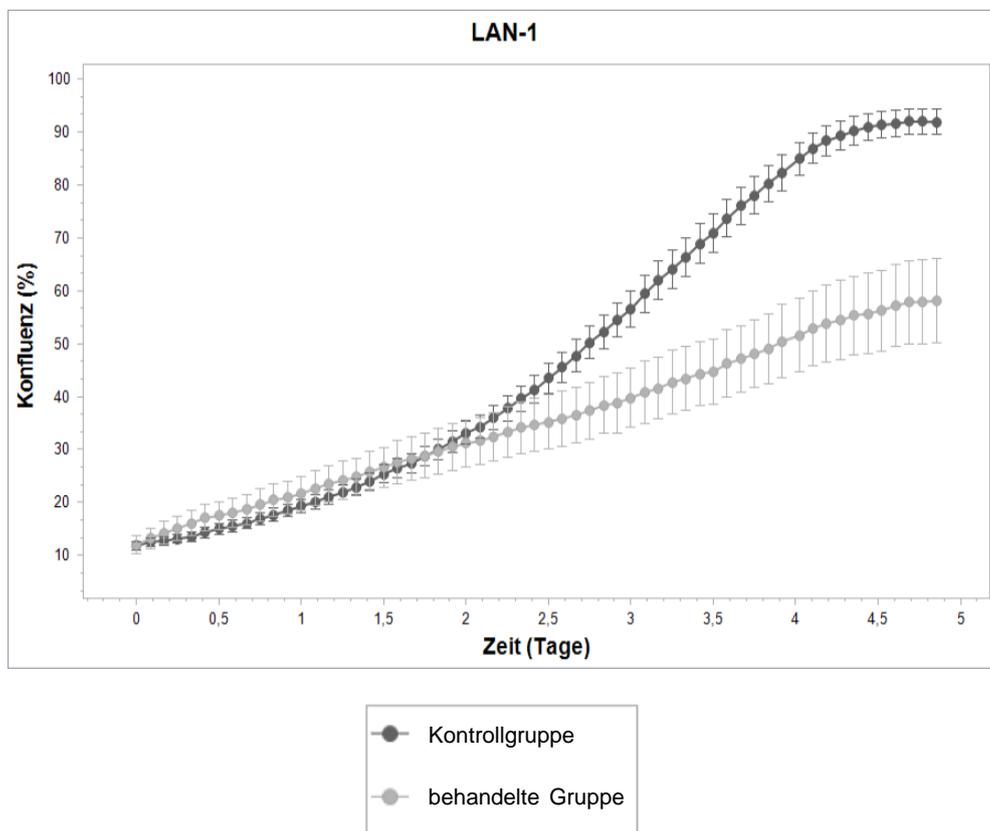


Abbildung 3.6.5. IncuCyte® Assay, Konfluenz - LAN-1: Angabe der Konfluenz in Prozent, Inkubation mit TNF- α (10 ng/ml) & IFN- γ (100 ng/ml) im kompletten Beobachtungszeitraum, Werte aus technischen Triplikaten

Die Kontrollgruppe der Zelllinie Kelly erreicht eine Konfluenz von 67,6 %, die behandelte Gruppe von 37,3 % (Abb. 3.6.6.). Bis zum Zeitpunkt von einem Tag decken sich die Gruppen gegenseitig ab. Ab diesem Zeitpunkt steigt die Zunahme der Konfluenz in der Kontrollgruppe etwas schneller als in der behandelten Gruppe. Hier kann nicht von einer verminderten Proliferation ausgegangen werden, da die Kontrollgruppe bereits bei 67,6 % sättigt und somit der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe nicht größer als 50 % ist.

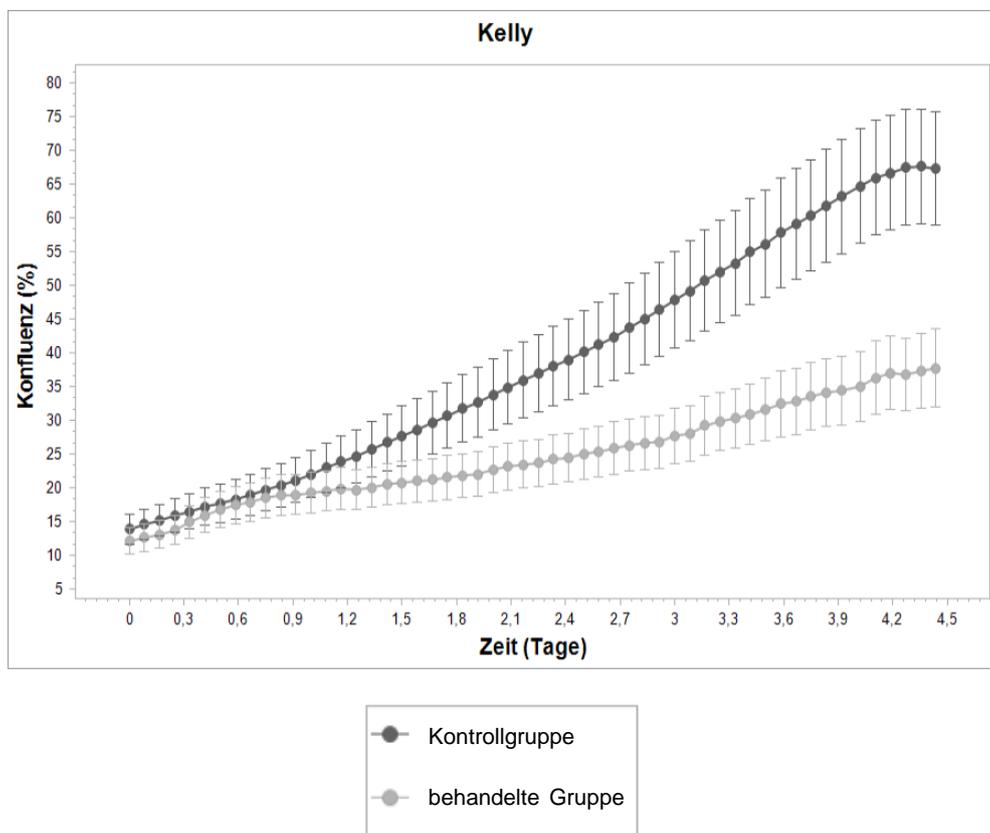


Abbildung 3.6.6. IncuCyte® Assay, Konfluenz - Kelly: Angabe der Konfluenz in Prozent, Inkubation mit TNF- α (10 ng/ml) & IFN- γ (100 ng/ml) im kompletten Beobachtungszeitraum, Werte aus technischen Triplikaten

Die Zelllinie SK-N-AS erreicht in der Kontrollgruppe eine Konfluenz von 99,2 %. In der behandelten Gruppe liegt eine Konfluenz von bis zu 92,9 % vor (Abb. 3.6.7.). Die beiden Kurven für die Zelllinie SK-N-AS verlaufen nahezu parallel. Die Kurve der Kontrollgruppe verläuft leicht s-förmig, wohingegen die Kurve der behandelten Gruppe relativ linear verläuft.

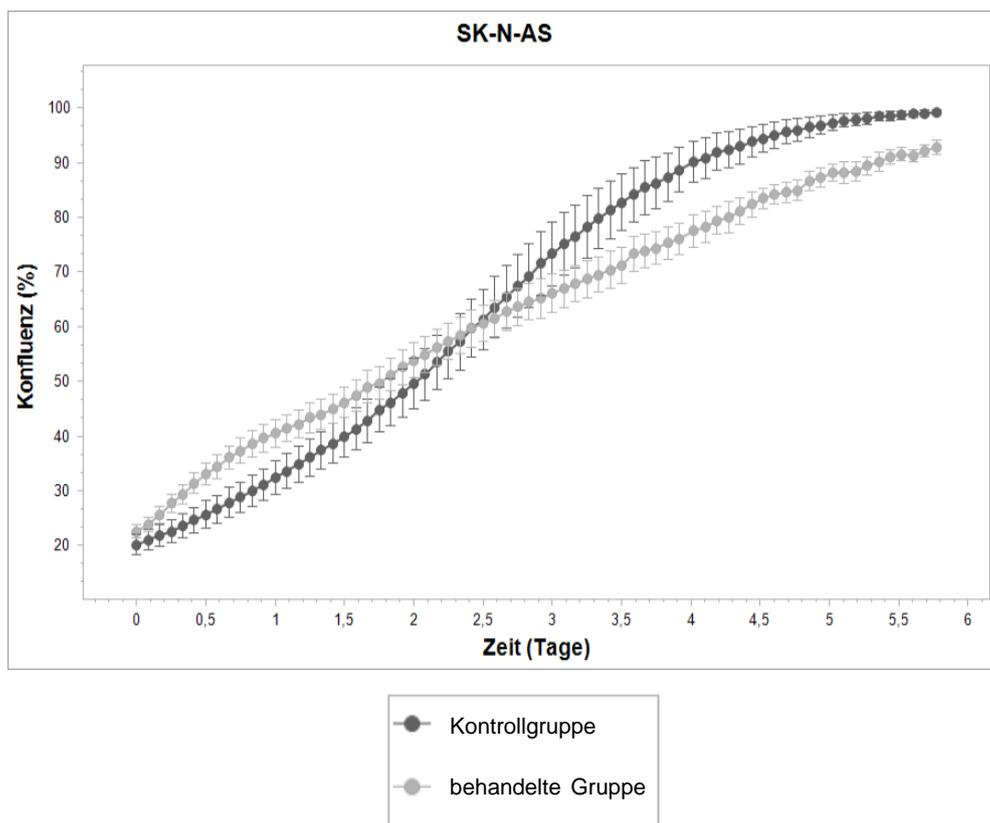


Abbildung 3.6.7. IncuCyte® Assay, Konfluenz - SK-N-AS: Angabe der Konfluenz in Prozent, Inkubation mit TNF- α (10 ng/ml) & IFN- γ (100 ng/ml) im kompletten Beobachtungszeitraum, Werte aus technischen Triplikaten

In der Kontrollgruppe der Zelllinie SK-N-BE(2) erreichen die Zellen eine Konfluenz von 94,7 % und in der behandelten Gruppe von 92,2 % (Abb. 3.6.8.). Auch die beiden Kurven der Zelllinie SK-N-BE(2) verlaufen fast parallel. Zuerst steigt die Konfluenz der Zellen nur leicht. Ab dem Zeitpunkt von 3,5 Tagen kommt es allerdings zu einem steilen Anstieg der Konfluenz und nach circa 5,5 Tagen wird eine Sättigung bei einer Konfluenz von 100 % erreicht.

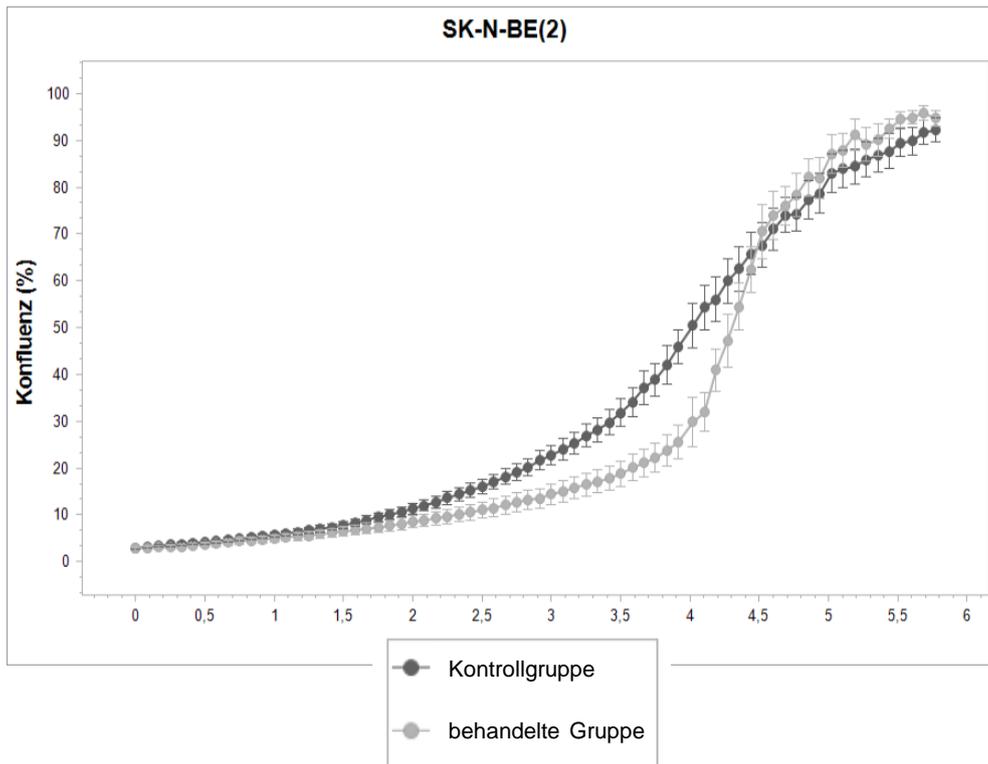


Abbildung 3.6.8. IncuCyte® Assay, Konfluenz - SK-N-BE(2): Angabe der Konfluenz in Prozent, Inkubation mit TNF- α (10 ng/ml) & IFN- γ (100 ng/ml) im kompletten Beobachtungszeitraum, Werte aus technischen Triplikaten

3.7. Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe dieses Assays sollten die Proliferationsmarker Ki67 und PCNA (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) und die Seneszenzmarker HP1- γ (Heterochromatin-Protein 1- γ) und p16^{INK4A} untersucht werden.

Hierbei wurden im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung, die schon für andere Zelllinien etabliert wurde, verschiedene Varianten, Konzentrationen und Substanzen getestet. Allerdings konnten noch keine Ergebnisse erzielt werden. Es müssen noch weitere Varianten erprobt werden und Fehlerquellen ausgeschlossen werden, um die Methode für diese Zelllinien zu etablieren und Ergebnisse zu erzielen.

3.8. Zusammenfassung anhand der einzelnen Zelllinien

Für einen besseren Überblick über die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien sind alle Assays nochmals in den unten folgenden Tabellen zusammengefasst (Tab. 3.8.1.-8.).

Die Positivkontrolle WM115 gibt in allen durchgeführten Assays einen Hinweis auf eine Seneszenz (Tab. 3.8.1.).

Tabelle 3.8.1. Zusammenfassung Assays - WM115: grün: Seneszenz

	WM115
β-Galactosidase-Färbung	Färbung
EdU Assay	Inhibition des Zellzyklus
CFSE-Färbung	Seneszenz
Growth Assay	Seneszenz
IncuCyte® Assay	verminderte Proliferation
Immunfluoreszenzfärbung	kein Ergebnis

In allen Assays bis auf die β -Galactosidase-Färbung gibt die Zelllinie LS einen Hinweis auf eine Seneszenz (Tab. 3.8.2.).

Tabelle 3.8.2. Zusammenfassung Assays - LS: grün: Seneszenz, rot: keine Seneszenz

	LS
β-Galactosidase-Färbung	keine Färbung
EdU Assay	Inhibition des Zellzyklus
CFSE-Färbung	Seneszenz
Growth Assay	Seneszenz
IncuCyte® Assay	verminderte Proliferation
Immunfluoreszenzfärbung	kein Ergebnis

In dem EdU Assay, der CFSE-Färbung und in der Untersuchung mit Hilfe des IncuCyte zeigt die Zelllinie SH-SY5Y Hinweise auf eine Seneszenz. In dem Growth Assay konnten nur bedingt Hinweise auf eine Seneszenz beobachtet werden. Das Luciferase Assay war nicht verwertbar. Bei der β -Galactosidase-Färbung konnte keine Färbung festgestellt werden (Tab. 3.8.3.).

Tabelle 3.8.3. Zusammenfassung Assays - SH-SY5Y: grün: Seneszenz, gelb: partielle Seneszenz, rot: keine Seneszenz, * großer Anteil an apoptotischen Zellen in der behandelten Gruppe

	SH-SY5Y
β-Galactosidase-Färbung	keine Färbung
EdU Assay	Inhibition des Zellzyklus*
CFSE-Färbung	Seneszenz
Growth Assay	partielle Seneszenz
Luciferase Assay	nicht verwertbar
IncuCyte® Assay	verminderte Proliferation
Immunfluoreszenzfärbung	kein Ergebnis

Bei der Zelllinie LAN-1 konnte im Rahmen des EdU Assays ein Hinweis auf eine geringe Inhibition des Zellzyklus beobachtet werden. Im Growth Assay konnte ein Hinweis auf eine partielle Seneszenz festgestellt werden. Die anderen Assays zeigten keine Veränderung der Proliferation (Tab. 3.8.4.).

Tabelle 3.8.4. Zusammenfassung Assays - LAN-1: **gelb:** partielle Seneszenz, **rot:** keine Seneszenz

	LAN-1
β-Galactosidase-Färbung	keine Färbung
EdU Assay	geringe Inhibition des Zellzyklus
CFSE-Färbung	keine Seneszenz
Growth Assay	partielle Seneszenz
Luciferase Assay	keine Veränderung der Proliferation
IncuCyte® Assay	keine Veränderung der Proliferation
Immunfluoreszenzfärbung	kein Ergebnis

Das Growth Assay weist bei der Zelllinie Kelly auf eine Seneszenz hin. Im EdU Assay konnte eine geringe Inhibition des Zellzyklus beobachtet werden. Die anderen Assays zeigen keinen Hinweis auf eine Seneszenz (Tab. 3.8.5.).

Tabelle 3.8.5. Zusammenfassung Assays - Kelly: grün: Seneszenz, gelb: partielle Seneszenz, rot: keine Seneszenz

	Kelly
β-Galactosidase-Färbung	keine Färbung
EdU Assay	geringe Inhibition des Zellzyklus
CFSE-Färbung	keine Seneszenz
Growth Assay	Seneszenz
Luciferase Assay	keine Veränderung der Proliferation
IncuCyte® Assay	keine Veränderung der Proliferation
Immunfluoreszenzfärbung	kein Ergebnis

Im Rahmen des EdU Assays konnte für die Zelllinie SK-N-AS eine Inhibition des Zellzyklus festgestellt werden. Im Rahmen der CFSE-Färbung zeigte sich eine partielle Seneszenz. Die übrigen Assays ergaben keinen Hinweis auf eine Seneszenz oder eine Veränderung der Proliferation (Tab. 3.8.6.).

Tabelle 3.8.6. Zusammenfassung Assays - SK-N-AS: grün: Seneszenz, gelb: partielle Seneszenz, rot: keine Seneszenz

	SK-N-AS
β-Galactosidase-Färbung	keine Färbung
EdU Assay	Inhibition des Zellzyklus
CFSE-Färbung	partielle Seneszenz
Growth Assay	keine Seneszenz
IncuCyte® Assay	keine Veränderung der Proliferation
Immunfluoreszenzfärbung	kein Ergebnis

Die Zelllinie SK-N-BE(2) weist in keinem Assay auf eine Seneszenz hin (Tab. 3.8.7).

Tabelle 3.8.7. Zusammenfassung Assays - SK-N-BE(2): rot: keine Seneszenz

	SK-N-BE(2)
β-Galactosidase-Färbung	keine Färbung
EdU Assay	keine Inhibition des Zellzyklus
CFSE-Färbung	keine Seneszenz
Growth Assay	keine Seneszenz
IncuCyte® Assay	keine Veränderung der Proliferation
Immunfluoreszenzfärbung	kein Ergebnis

Einen Hinweis auf eine Seneszenz geben bei der Zelllinie SHEP alle Assays, bis auf die β-Galactosidase-Färbung (Tab. 3.8.8.).

Tabelle 3.8.8. Zusammenfassung Assays - SHEP: grün: Seneszenz, rot: keine Seneszenz

	SHEP
β-Galactosidase-Färbung	keine Färbung
EdU Assay	Inhibition des Zellzyklus
CFSE-Färbung	Seneszenz
Growth Assay	Seneszenz
Luciferase Assay	verminderte Proliferation
IncuCyte® Assay	verminderte Proliferation
Immunfluoreszenzfärbung	kein Ergebnis

Zum Überblick sind nochmals alle Assays aller Zelllinien in einer Tabelle zusammengefasst (Tab. 3.8.9.).

Tabelle 3.8.9. Zusammenfassung aller Assays & aller Zelllinien: grün: Seneszenz, gelb: partielle Seneszenz, rot: keine Seneszenz, * großer Anteil an apoptotischen Zellen in der behandelten Gruppe

	β -Galactosidase-Färbung	EdU Assay	CFSE-Färbung	Growth Assay	Luciferase Assay	IncuCyte® Assay	Immunfluoreszenzfärbung
WM115	Färbung	Inhibition des Zellzyklus	Seneszenz	Seneszenz	nicht durchgeführt	verminderte Proliferation	kein Ergebnis
LS	keine Färbung	Inhibition des Zellzyklus	Seneszenz	Seneszenz	nicht durchgeführt	verminderte Proliferation	kein Ergebnis
SH-SY5Y	keine Färbung	Inhibition des Zellzyklus*	Seneszenz	partielle Seneszenz	nicht verwertbar	verminderte Proliferation	kein Ergebnis
LAN-1	keine Färbung	geringe Inhibition des Zellzyklus	keine Seneszenz	partielle Seneszenz	keine Veränderung der Proliferation	keine Veränderung der Proliferation	kein Ergebnis
Kelly	keine Färbung	geringe Inhibition des Zellzyklus	keine Seneszenz	Seneszenz	keine Veränderung der Proliferation	keine Veränderung der Proliferation	kein Ergebnis
SK-N-AS	keine Färbung	Inhibition des Zellzyklus	partielle Seneszenz	keine Seneszenz	nicht durchgeführt	keine Veränderung der Proliferation	kein Ergebnis
SK-N-BE(2)	keine Färbung	keine Inhibition des Zellzyklus	keine Seneszenz	keine Seneszenz	nicht durchgeführt	keine Veränderung der Proliferation	kein Ergebnis
SHEP	keine Färbung	Inhibition des Zellzyklus	Seneszenz	Seneszenz	verminderte Proliferation	verminderte Proliferation	kein Ergebnis

4. Diskussion

Den Anstoß für diese Arbeit gab das Paper: *T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence*, publiziert von Braumüller et. al. im Jahre 2013. In diesem Paper wurde gezeigt, dass die Zytokine TNF- α und IFN- γ , die durch T_H1-Zellen ausgeschüttet werden, bei β -Inselkarzinomzellen des Pankreas im Mausmodell einen permanenten Wachstumsarrest auslösen. So wurde nachgewiesen, dass durch diese Zytokine eine Seneszenz induziert wird.

Durch die Methoden und die Ergebnisse dieses Papers kam die Idee auf, eine mögliche Seneszenzinduktion durch Zytokine auch bei Neuroblastomzelllinien zu untersuchen. Das Neuroblastom an sich ist eine Erkrankung, die häufig erst im metastasierten Stadium diagnostiziert wird und somit eine schlechte Prognose hat. Daher sind hier weitere Grundlagenforschungen im Hinblick auf eventuell neue Therapieoptionen notwendig. Eine genauere Literaturrecherche ergab außerdem, dass bis zu diesem Zeitpunkt kaum Arbeiten zu einer möglichen Seneszenz bei Neuroblastomen veröffentlicht wurden. Eine Arbeit, die zu diesem Thema veröffentlicht wurde, beschreibt beispielsweise eine Seneszenzinduktion durch Hydroxyharnstoff bei MYCN-amplifizierten Neuroblastomzelllinien (Narath et al., 2007). Generell ist die Seneszenz in den letzten Jahren bei unterschiedlichen Zellen und auch Tumoren untersucht worden und auch in Bezug auf mögliche Therapien von Krebserkrankungen immer weiter in den Vordergrund gerückt. Aufgrund der oben aufgeführten Punkte fiel letztendlich der Entschluss sich mit diesem Thema zu befassen und in diesem Bereich zu forschen.

Bereits zu Beginn dieser Arbeit wurde festgelegt, dass mit mehreren Neuroblastomzelllinien gearbeitet werden sollte, da man so einen besseren Überblick über eine mögliche Seneszenz bei einem Neuroblastom erlangen kann. In der kompletten Arbeit wurde mit diesen sieben Zelllinien gearbeitet: LS, SH-SY5Y, LAN-1, Kelly, SK-N-AS, SK-N-BE(2) und SHEP. Zusätzlich wurde fast jede Methode noch mit der Melanomzelllinie WM115 durchgeführt. Diese Zelllinie diente als Positivkontrolle, da hier bereits eine Zytokin-induzierte Seneszenz nachgewiesen wurde (Rau et al., 2018a). Außerdem wurde

festgelegt, dass die Zytokine TNF- α und IFN- γ immer gemeinsam verwendet und untersucht werden sollen, da schon in der Veröffentlichung von Braumüller et al. (2013) deutlich geworden ist, dass vor allen Dingen die Anwesenheit dieser beiden Zytokine in Kombination einen permanenten Wachstumsarrest beziehungsweise eine Seneszenz induziert. Aus dieser Arbeit wurden auch die Konzentrationen von TNF- α und IFN- γ mit 10 ng/ml und 100 ng/ml sowie der Behandlungszeitraum von meist 96 Stunden oder länger übernommen. Der Entwurf der vorliegenden Arbeit enthält zudem die Durchführung mehrerer unterschiedlicher Assays, da eine Seneszenz nicht nur durch ein Assay nachgewiesen werden kann, sondern nur die Zusammenschau von mehreren Assays auf eine mögliche Seneszenz hinweisen kann.

4.1. Kein Nachweis von Seneszenz-assoziiertes β -Galactosidase bei Neuroblastomzelllinien

Am Beginn der Arbeit stand der Nachweis des Seneszenz-assoziierten Biomarkers β -Galactosidase. Diese Färbung ist einer der ersten Methoden, die für den Nachweis einer Seneszenz herangezogen wurde (Dimri et al., 1995). Die Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase (SA- β -gal) ist relativ leicht zu bestimmen und daher ein weit verbreiteter Biomarker der Seneszenz. Generell wurde nachgewiesen, dass bei einem pH-Wert von 6,0 nur in seneszenten Zellen diese β -Galactosidase exprimiert und angefärbt werden kann. Weder in präseneszenten, noch in quieszenten Zellen zeigte sich eine Färbung und somit ein Nachweis des Biomarkers. Durch dieses Wissen kann bei einer Färbung der Zellen eine denkbare Präseneszenz oder eine Quieszenz quasi ausgeschlossen werden und eine Seneszenz ist sehr wahrscheinlich (Dimri et al., 1995).

Für eine seneszente Zelllinie würde man erwarten, dass bei den Zellen nach der Behandlung mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ unter dem Mikroskop eine kräftige Blaufärbung zu erkennen ist (Dimri et al., 1995).

Mithilfe dieses Assays konnte nach Behandlung mit TNF- α und IFN- γ eine vermehrte Blaufärbung der Melanomzelllinie WM115 gezeigt und somit der Nachweis für eine Seneszenzinduktion erbracht werden. Die Zelllinie WM115 dient als Kontrolle für die richtige Durchführung der Methode, da bei dieser Zelllinien bereits ein Nachweis der SA- β -gal Aktivität durch eine positive Färbung im Rahmen einer Seneszenz beschrieben wurde (Rau et al., 2018a). Die Neuroblastomzelllinien zeigten alle keine Färbung und somit konnte der Seneszenz-assoziierte Biomarker β -Galactosidase nicht nachgewiesen werden. Generell lässt sich festhalten, dass der Versuch richtig durchgeführt worden ist, da in der Positivkontrolle der Melanomzelllinie WM115 eine Färbung mehrfach reproduziert werden konnte. Hier zeigte sich in der Kontrollgruppe ein Anteil an gefärbten Zellen von 3 % und in der behandelten Gruppe von 16 %. Dennoch konnte für keine der untersuchten Neuroblastomzelllinien eine Färbung detektiert werden. Dies könnte daran liegen, dass hier für die Neuroblastomzellen eine andere Methode zum Nachweis von Seneszenz-assoziiertes β -Galactosidase von Nöten ist. Hierzu sind auch schon unterschiedliche Methoden publiziert worden (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Seneszenz-assoziiertes β -Galactosidase Aktivität ist zum Beispiel eine Detektion mithilfe einer Fluoreszenz. Bei diesem Ansatz werden die Zellen mit einem β -Galactosidase-Substrat inkubiert, dieses fluoresziert nach der Spaltung durch die β -Galactosidase und kann so unter anderem in einem FACS detektiert werden (Itahana et al., 2007). Aber auch der Nachweise von β -Galactosidase durch eine andere Methode setzt allerdings voraus, dass diese überhaupt vorhanden ist. Durch die Färbung der Positivkontrolle WM155 ergibt sich allerdings eher der Hinweis, dass dies vielleicht nicht der Fall ist. So wäre eine andere mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer SA- β -gal Färbung bei den Neuroblastomzelllinien, dass eine Färbung der Zelllinien einfach nicht möglich ist, da SA- β -gal schlicht nicht vorhanden ist. Dies wurde auch schon von anderen Zelllinien beschrieben. Hier konnte bei einer Gruppe von Nävi bei einem konstanten pH-Wert keine SA- β -gal Färbung detektiert werden. (Cotter et al., 2007). Als Beispiel ist hier eine weitere Arbeit zu nennen, in welcher

alternde Neurone, bei denen eine Seneszenz zu erwarten ist, mit Hilfe der β -Galactosidase-Färbung untersucht wurden. Hierbei konnte keine eindeutige Färbung und somit auch kein Nachweis des Biomarkers beobachtet werden. Dennoch konnte eine Induktion des *RE1-Silencing Transcription-Factor* (REST) bei alternden Neuronen nachgewiesen werden. Dies könnte ein Marker für eine Seneszenz darstellen (Piechota et al., 2016). Eine weitere Arbeit befasst sich generell mit der Frage, ob der Nachweis der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase überhaupt ein Hinweis oder ein Beleg für eine Seneszenz oder eher ein nicht-spezifischer Marker von Lysosomen ist. In Bezug darauf zeigte sich, dass generell die Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase gleichzusetzen ist mit der lysosomalen β -Galactosidase (Lee et al., 2006). Dieser Aspekt wurde dadurch nachgewiesen, dass bei einem Defekt im Lysosom gleichzeitig eine Verringerung der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase-Aktivität vorliegt. Diese verringerte Aktivität bedeutet jedoch nicht, dass keine Seneszenz vorliegt, da andere Seneszenzmarker trotzdem nachgewiesen werden konnten, wie zum Beispiel eine Veränderung in der Morphologie. Zusammenfassend lässt sich daraus also schließen, dass ein Nachweis einer Aktivität einer Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase nicht unbedingt notwendig für den Nachweis einer Seneszenz ist (Lee et al., 2006).

4.2. Inhibition des Zellzyklus bei den Zelllinien LS, SH-SY5Y, SK-N-AS & SHEP

Genau aus dem Grund, dass ein fehlender Nachweis einer Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase nicht gegen eine Seneszenz spricht, wurden weitere Aspekte einer möglichen Seneszenz untersucht. An erster Stelle stand die Untersuchung der Anteile der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus. Hierzu wurde ein EdU Assay durchgeführt.

Mithilfe dieses EdU Assay wurde die Zellproliferation genauer beobachtet. 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) wird durch Zugabe zur Zellkultur als Thymidinanalogon bei der Teilung der Zellen in die DNA eingebaut und dient somit als Nachweis für die Teilungsaktivität lebender Zellen. EdU kann mit Hilfe

eines Farbstoffes im FACS-Gerät gemessen und somit der aktuelle Status des Zellzyklus ermittelt werden.

Bei den Zellen, die mit TNF- α und IFN- γ behandelt wurden, erwartet man im Falle einer Seneszenzinduktion einen Arrest des Zellzyklus, d.h. dass die Zellen keine Synthese für eine erneute Teilung durchführen, sondern in der G1/G0-Phase oder G2-Phase des Zellzyklus verbleiben. Dies zeigt sich schließlich in einem verringerten Anteil von Zellen, die sich in der S-Phase, also aktiv in der Phase der Zellteilung, befinden. Gleichzeitig sollte der Anteil an Zellen, die sich in der G1/G0-Phase befinden, zunehmen (Braumuller et al., 2013).

In den FACS-Analysen für die jeweils behandelte Gruppe der Zelllinien LS, SH-SY5Y, SK-N-AS und SHEP zeigte sich, wie für eine seneszente Zelle erwartet, eine größere Änderung der einzelnen Phasen des Zellzyklus. Für diese Zelllinien konnte eine signifikante Abnahme des Anteils der Zellen in der S-Phase dokumentiert werden, während sich der Anteil der Zellen in der G1-Phase signifikant erhöht hat. Eine besonders hohe "Fold Change", diese Zahl bildet die Größe der Änderung des Verhältnisses zwischen der G1-Phase und S-Phase nach der Behandlung der Zellen, zeigten die Zelllinien LS und SH-SY5Y. In Bezug auf die Zelllinie SH-SY5Y ist zu bemerken, dass bei den behandelten Zellen 50 % als apoptotische Zellen detektiert werden. In der Kontrollgruppe hingegen wurden nur 5 % apoptotische Zellen detektiert, sodass die signifikante Abnahme der Zellen in der S-Phase auch durch die hohe Anzahl der apoptotischen Zellen erklärt werden kann. Dieser hohe Anteil an apoptotischen Zellen sollte aber dennoch auch mit anderen Assays nochmals verifiziert werden, da für die behandelte Gruppe die Standardabweichung mit 27 relativ hoch ist. Hier ist auf jeden Fall das Ergebnis des Growth Assays für die Zelllinie SH-SY5Y zu erwähnen. Hier ist in der behandelten Gruppe eine abfallende Kurve zu beobachten. Dies könnte ebenfalls auf ein Sterben der Zellen in dieser Gruppe hindeuten. Bei Ausschluss der apoptotischen Zellen kann dennoch eine Zunahme der Zellen in der G1- und G2-Phase festgestellt werden. Im Vergleich dazu konnte für die behandelte Gruppe der Zelllinien LAN-1 und Kelly nur eine geringe Inhibition des Zellzyklus festgestellt werden.

Bei der Zelllinie SK-N-BE(2) konnte quasi keine Veränderung des Zellzyklus nachgewiesen werden.

Besonders auffällig ist hier die Zelllinie SK-N-AS. Diese zeigt nur hier eine Inhibition des Zellzyklus, ansonsten ist nur durch die CFSE-Färbung ein Hinweis auf eine partielle Seneszenz gegeben. Alle anderen Assays geben keinen Hinweis auf eine mögliche Seneszenz. Denkbar wäre auch, dass das EdU Assay eine relativ sensible Methode ist, um eine mögliche Seneszenz durch eine Veränderung des Zellzyklus, zu detektieren. Sodass vielleicht auch in den anderen Assays für die Zelllinie SK-N-AS eine Seneszenz vorliegt, die Methoden diese aber nicht detektieren können, da sie nicht sensitiv genug sind.

Außerdem sollte auch die Zelllinie SH-SY5Y gesondert erwähnt werden. Das EdU Assay ist in dieser Arbeit das Assay, bei dem gut detektiert wird, dass bei der Behandlung mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ eine hohe Anzahl an apoptotischen Zellen anfällt. Sodass diese Erkenntnis unbedingt bei den anderen Assays berücksichtigt und mögliche Konsequenzen für die Auswertung und Beurteilung dieser bedacht werden sollten. So wird im Growth Assay die Zelllinie SH-SY5Y mit den festgelegten Kriterien als partiell seneszent beschrieben, da die Zellen nach der Wegnahme der Zytokine erneut anfangen zu wachsen. Bis zu diesem Zeitpunkt nimmt die Anzahl der Zellen während der ersten beiden Passagen unter Behandlung mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ ab. Die Abnahme der Zellen kann unter Behandlung dadurch erklärt werden, dass viele Zellen dieser Zelllinie durch das Vorhandensein der Zytokine in eine Apoptose übergehen und sterben. Werden die Zytokine in der dritten Passage nun entfernt, könnten die Zellen, die nicht apoptotisch sind, erneut anfangen zu wachsen und zu proliferieren. Dies würde auch den nahezu parallelen Anstieg in der 3. Passage im Vergleich zur Kontrollgruppe erklären. Außerdem ist es trotzdem möglich, dass von den verbleibenden Zellen, die während der Behandlung nicht apoptotisch werden, ein Teil in einem Wachstumsarrest übergeht. Möglicherweise fangen diese Zellen nach Wegnahme der Zytokine ebenfalls wieder an zu proliferieren.

Auch der Verlauf der Kurve im IncuCyte® Assay und die Einstufung der Zelllinie SH-SY5Y als seneszent für dieses Assay könnte durch eine große Anzahl an apoptotischen Zellen erklärt werden.

Zusammenfassend muss für die Zelllinie SH-SY5Y also genau differenziert werden, ob eine mögliche Seneszenz vorliegt, oder ob manche Effekte schlicht darauf zurückzuführen sind, dass ein Großteil der Zellen apoptotisch wird.

Wie in der Arbeit von Braumüller et al. (2013) beschrieben charakterisiert ein großer Anteil von Zellen in der G1-Phase eine Seneszenz, da sie aus dieser Phase nicht mehr in die S-Phase eintreten und sich somit nicht erneut teilen können. So kommt es zu einem Wachstumsarrest. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Zellen, die sich vor der Behandlung mit den Zytokinen in der S-Phase des Zyklus befunden haben, in die G1-Phase übergehen und dort irreversibel verbleiben. Zusätzlich wurde auch ein möglicher Arrest in der G2-Phase in einer anderen Arbeit beschrieben (Gire and Dulić, 2015).

Auffällig ist, dass bei allen Zelllinien, bei denen eine Inhibition des Zellzyklus detektiert werden konnte, bei Abnahme des Anteils der Zellen in der S-Phase, gleichzeitig ein relativ gleicher Anstieg der Anteile in der G1- und G2-Phase zu beobachten ist.

Generell eignet sich diese Methode sehr gut für die Analyse des Zellzyklus und somit zur Beurteilung für das Vorliegen einer möglichen Seneszenz. Nachdem in der β -Galactosidase-Färbung zunächst keinerlei Färbung erzielt und somit keinerlei Hinweis auf eine Seneszenz gefunden werden konnte, so konnte mit der Zellzyklusanalyse nun gezeigt werden, dass TNF- α und IFN- γ , zumindest auf einen Teil der Neuroblastomzelllinien, einen deutlichen Einfluss auf den Status des Zellzyklus haben.

Weiterführend könnte auch ein EdU Assay und somit eine Zellzyklusanalyse nach Wegnahme der Zytokine und erneuter Kultivierung durchgeführt werden, um einen permanenten Wachstumsarrest genauer nachweisen zu können.

4.3. Abnahme der Teilungszahl im Verlauf der Behandlung bei den Zelllinien LS, SH-SY5Y & SHEP

Das EdU Assay ergab somit bei einigen Zelllinien einen Hinweis auf eine Seneszenz. Diese Ergebnisse wurden nochmals mit einer anderen Methode, nämlich der CFSE-Färbung, für drei der fünf Zelllinien bestätigt. Außerdem sollten weitere Aspekte einer Seneszenz untersucht werden. Von Interesse war hier unter anderem auch die Entwicklung der Teilungszahl über die Dauer der Behandlung. Auch hierfür wurde die CFSE-Färbung an unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung durchgeführt.

Zur Messung der Proliferation von Zellen wurde die CFSE-Färbung eingesetzt. Mit dieser Färbung kann beobachtet werden, wie oft sich eine Zellpopulation geteilt hat, da durch das Einbringen von CFSE in die Zellen dort die Azetatgruppe durch die Esterase enzymatisch abgespalten wird. Durch diese Abspaltung entsteht ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit einem FACS-Gerät detektiert wird. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt mit jeder Zellteilung um die Hälfte ab, da mit der Teilung das vorhandene CFSE gleichmäßig auf beide Zellen aufgeteilt wird.

Für die Zelllinien, die mit den Zytokinen behandelt wurden und somit eine Seneszenz erwartet wird, würde man davon ausgehen, dass die Teilungszahl geringer ist, d.h. dass eine höhere Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes im FACS nachgewiesen werden kann (Quah and Parish, 2010). Die Auswertung wurde anhand von vorher festgelegten Kriterien durchgeführt. Hierfür wurde der MFI der einzelnen FACS-Analysen für die Kontrollgruppe und die jeweilige behandelte Gruppe ins Verhältnis gesetzt. Von den Verhältnissen wurde ein Mittelwert gebildet und dieser wie folgt bewertet. Bei einem Wert von größer als 2 liegt eine Seneszenz vor, da hier die MFIs der behandelten Gruppe deutlich weiter rechts auf der x-Achse liegen und somit einen höheren Wert und damit eine geringere Teilungszahl aufweisen. Im Vergleich dazu liegt bei der Kontrollgruppe eine höhere Teilungszahl und somit ein geringerer Wert der MFIs vor. Wenn nun die beiden Gruppen ins Verhältnis zueinander gesetzt werden bedeutet ein Wert größer 2, dass der MFI der behandelten Gruppe

doppelt so groß ist wie der der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu steht ein Wert von annähernd 1 für kaum einen Unterschied zwischen den beiden Zellgruppen. Somit wurde als Definition für nicht seneszente Zellen ein Verhältnis von kleiner 1,5 festgelegt. Die partiell seneszenten Zellen wurden der Spanne der Verhältnisse zwischen 1,5 und 2 zugeordnet.

Für die mit TNF- α und IFN- γ behandelten Gruppen der Zelllinien LS, SH-SY5Y und SHEP, konnte eine im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen geringere Teilungszahl festgestellt werden. Das Verhältnis der MFIs lag bei 2,17, 2,25 bzw. 2,09. Somit sind diese Zelllinien nach eigener Definition als seneszent einzustufen. Zum Vergleich lag das Verhältnis der MFIs bei der Positivkontrolle WM115 bei 2,7. Laut eigener Definition ist in diesem Assay die Zelllinie SK-N-AS als partiell seneszent zu betrachten. Das MFI Verhältnis lag hier bei 1,70. Das bedeutet, dass hier die Erwartung eines starken Rückgangs der Teilungszahl nicht ganz erfüllt wurde. Dennoch lässt sich festhalten, dass es insgesamt zu einem Abfall der Teilungszahl gekommen ist. Möglicherweise sprechen einige Zellen der Zelllinie SK-N-AS auf die Behandlung mit TNF- α und IFN- γ an, was dazu führt, dass sich das CFSE Signal verringert, was insgesamt auch den MFI reduziert, allerdings nicht so stark, wie man es bei den drei zuvor genannten Neuroblastomzelllinien gesehen hat. Für die Zelllinien LAN-1, Kelly und SK-N-BE(2) konnte keine Verringerung der Teilungszahl nachgewiesen werden. Alle MFI Verhältnisse waren kleiner 1,5, d.h. diese Zelllinien sind laut Definition nicht als seneszent zu betrachten.

Auffallend ist jedoch, dass im EdU Assay für die Zelllinien LS, SH-SY5Y, Kelly, SK-N-AS und SHEP eine Inhibition des Zellzyklus festgestellt werden konnte. In der CFSE-Färbung konnte allerdings nur für die Zelllinien LS, SH-SY5Y und SHEP eine Seneszenz nachgewiesen werden. Für die Zelllinie SK-N-AS konnte eine partielle Seneszenz und für die Zelllinie Kelly keine Seneszenz festgehalten werden. Hier lässt sich nun diskutieren, woran das liegen könnte. Bei der Zelllinie SK-N-AS ist hier auf jeden Fall zu erwähnen, dass ein zweiter Peak im Graphen auffällt, der vermutlich auf Grund von technischen Problemen zustande gekommen ist. Wenn man sich die Graphen genau anschaut und sich den Peak wegdenkt, ist auf jeden Fall eine Ähnlichkeit zu den Graphen der

Zelllinien LS, SH-SY5Y und SHEP zu erkennen. So wäre es denkbar, dass bei Behebung der technischen Probleme eine Seneszenz beobachtet werden kann. Ein anderer möglicher Ansatz ist eine Arbeit in der veröffentlicht wurde, dass die Zugabe von EdU-Derivaten zu Leukämiezellen einen antiproliferativen Effekt zeigte (Balzarini et al., 1984). Dieser Aspekt sollte in diesem Zusammenhang auch bedacht werden. Dennoch sollte auch beachtet werden, dass in dieser Arbeit EdU-Derivate verwendet wurden und dass das EdU Assay eine weit verbreitete Methode zur Zellzyklusanalyse darstellt. Außerdem wird eine Zellzyklusanalyse mithilfe von 5'-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) in der Arbeit von Braumüller et al. (2013) beschrieben, um eine Inhibition des Zellzyklus und somit eine Seneszenz nachzuweisen. BrdU ist EdU bei der Verwendung im Assay sehr ähnlich, zudem ist bei der Verwendung von EdU beschrieben, dass es zu weniger Denaturierungen der doppelsträngigen DNA kommt (Oberleitner et al., 2014).

Ein weiterer Aspekt, der mithilfe der CFSE-Färbung untersucht werden konnte, ist die Entwicklung der Teilungszahlen nach 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Behandlung mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ .

Hier würde man erwarten, dass die Teilungszahl mit Zunahme der Dauer der Behandlung mit den Zytokinen vermehrt abnimmt (Braumüller et al., 2013, Wieder et al., 2017).

Für die Beurteilung der Entwicklung der Teilungsrate wurde die Spanne der MFIs herangezogen. Eine kleinere Spanne als in der Kontrollgruppe spricht hier für eine geringere Teilungszahl während des Beobachtungszeitraums, da der MFI aufgrund einer geringeren Proliferationsrate weniger stark abnimmt. Hier sollte erwähnt werden, dass die Beurteilung der Spannen der MFIs der beiden Gruppen eventuell nicht die optimale Auswertungsvariante darstellt. Diese Variante setzt voraus, dass man für die Kontrollgruppe und die behandelte Gruppe am gleichen Ausgangswert startet. Außerdem sollte beim FACS-Gerät für jede Messung exakt dieselben Einstellungen vorliegen. Dennoch können die hier aufgeführten Spannen einen guten Eindruck über die Proliferationsfähigkeit

der beiden Gruppen geben, da sehr ähnliche Einstellungen am FACS-Gerät verwendet wurden und die Ausgangswerte relativ ähnlich sind.

Anhand der Graphiken kann man, vor allen Dingen bei der Positivkontrolle WM115 und bei der Zelllinie SH-SY5Y deutlich nachvollziehen, dass vor allem mit der Dauer der Behandlung der Zellen mit den Zytokinen der Abstand zur unbehandelten Kontrollgruppe immer größer wird. Die Kurven nach einer Behandlungszeit von 48 bis 96 Stunden überlagern sich fast und decken sich sozusagen beinahe gegenseitig ab, d. h. dass zwischen den Zeitpunkten kaum mehr eine Proliferation stattfindet. Gleichzeitig ist zwischen der Behandlungszeit von 24 und 48 Stunden noch ein deutlicher Versatz zu erkennen ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Wirkung der Zytokine erst nach mindestens 24 Stunden einsetzt, was sich dann in den Messungen im Zeitraum zwischen 48 und 96 Stunden widerspiegelt. Die Graphen für die Zelllinien LS und SHEP decken sich bereits früher gegenseitig ab. Hier ist kaum eine Verschiebung zwischen 24 Stunden und 48 Stunden zu erkennen. Wohingegen eine kleinere Abweichung in den Graphen für den Behandlungszeitraum von 72 Stunden und 96 Stunden zu erkennen ist. Anhand dieser Beobachtung wäre ein mögliches Aufbrauchen der Zytokine denkbar, sodass diese Zelllinien eventuell von einer erneuten Zugabe von Zytokinen für einen anhaltenden Proliferationsstopp profitieren würden. Für die Zelllinie SK-N-AS konnte eine leichte Differenz in der Spanne der MFIs zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe beobachtet werden, sodass man hier von einem leichten Rückgang der Zellteilungszahl ausgeht. Man könnte anhand der Graphen auch festhalten, dass eine Abdeckung der Graphen eher für den Behandlungszeitraum von 72 und 96 Stunden zu erkennen ist und eventuell eine längere Behandlungszeit von Nöten ist, um eine mögliche Seneszenz zu induzieren. Auch hier ist aus technischen Problemen wieder ein zusätzlicher Peak links auf der x-Achse im Graphen zu sehen. Wenn man diesen Peak ausblendet ist ein deutlicher Unterschied der Graphen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe zu sehen. Bei den Zelllinien LAN-1, Kelly und SK-N-BE(2) war keine Unterschied in der Spanne der MFIs zwischen den Gruppen erkennbar, d.h. die behandelten Zellen haben ähnlich

stark proliferiert wie die in der jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppe. Somit konnte quasi kein Rückgang der Zellteilungszahl festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich hier festhalten, dass sich dieses Assay gut zur Beurteilung der Proliferationsrate eignet. Ebenfalls lässt sich sehr gut der Verlauf an unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung festhalten. Auch hier wäre eine häufigere Durchführung der Methode von Vorteil, um die Ergebnisse zu festigen, da nicht für alle Zelllinien $n=3$ Versuche durchgeführt werden konnten. Für eine bessere Auswertung der Beobachtung der Zellen 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Zugabe der Zytokine könnte eventuell bei jedem Messzeitpunkt das Verhältnis der MFIs der beiden Gruppen zu einer genaueren Auswertung führen.

4.4. Nachweis einer permanenten Seneszenz bei den Zelllinien LS, Kelly & SHEP

Nach dem Nachweis der Veränderung des Zellzyklus und der Abnahme der Teilungszahlen für einige Zelllinien ist das Verhalten der Zellen nach Wegnahme der Zytokine von Interesse. Für die Untersuchung dieses Aspekts wurde ein Growth Assay durchgeführt.

In diesem Assay wurde das Verhalten der Zellen nach zweifacher Behandlung der Zellen mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ und nachfolgender Wegnahme der Zytokine beobachtet.

Für eine Zelllinie, die eine Seneszenz aufweist, würde man erwarten, dass sich auch nach Wegnahme der Zytokine ein permanenter Growth Arrest zeigt (Braumuller et al., 2013). Außerdem könnten Zelllinien, die durch eine einfache Behandlung keine Seneszenz zeigen, erst durch eine zweifache Behandlung eine Seneszenz aufweisen.

Die Zelllinien LS, Kelly und SHEP zeigten in diesem Growth Assay der Erwartung entsprechend nach der Wegnahme der Zytokine eine Seneszenz. Zellen der Linien SH-SY5Y und LAN-1 wiesen eine partielle Seneszenz auf. Es zeigte sich nach der Wegnahme der Zytokine wieder ein Anstieg der Zellzahl. Hier sollte bei der Zelllinie SH-SY5Y bedacht werden, dass der anfängliche

Rückgang der Anzahl der Zellen auch durch einen hohen Anteil an apoptotischen Zellen erklärt werden könnte. Dieser große Anteil an apoptotischen Zellen wurde im EdU Assay nachgewiesen. Die Zellen der Linien SK-N-AS und SK-N-BE(2) wurden als nicht seneszent beschrieben.

Besonders erwähnenswert sind hier auf jeden Fall die Zelllinien LS und SHEP. Diese beiden Zelllinien zeigen schon nach der ersten Passage einen deutlichen Rückgang der lebenden Zellen in der behandelten Gruppe gegenüber den Zellen in der Kontrollgruppe. In der zweiten Passage fällt die Kurve bei der Zelllinie LS noch etwas weiter ab. Bei der Zelllinie SHEP bleibt der Rückgang in der zweiten Passage ähnlich wie in der ersten Passage bestehen und die Kurve verläuft parallel zur x-Achse. Nach Wegnahme der Zytokine in der dritten Passage kommt es zu keinem erneuten Anstieg der lebenden Zellen und es kann von einer permanenten Seneszenz gesprochen werden. Dieses Phänomen spielt in der Definition einer Seneszenz eine große Rolle. Die Zellen gehen durch einen Auslöser, in diesem Fall die Zytokine, in eine Seneszenz über und auch nach Wegnahme dieses Auslösers oder Triggers kommt es nicht erneut zu einem Eintritt in den Zellzyklus und es findet keine erneute Proliferation statt. Der Zustand der Seneszenz ist irreversibel. Spannend wäre sicherlich für diese beiden Zelllinie noch zu untersuchen, ob eine permanente Seneszenz auch schon nach nur einer Passage der Behandlung beobachtet werden kann. Generell gesehen passt das hier erhobene Ergebnis sehr gut zu dem Rest der Assays, da für diese beiden Zelllinien in allen anderen Assays ebenfalls eine Inhibition des Zellzyklus, eine Seneszenz oder eine verminderte Proliferation beobachtet werden konnte.

Einen besonderen Blick sollte auch auf die Zelllinie Kelly geworfen werden. Das Growth Assay ist das einzige Assay, in dem für diese Zelllinie eine Seneszenz detektiert werden konnte. Ansonsten konnte nur im EdU Assay eine geringe Inhibition des Zellzyklus beobachtet werden. Im Growth Assay ist nun zu erkennen, dass in der ersten Passage nur ein minimaler Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe beobachtet werden kann. Erst in der zweiten Passage kann man einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen festhalten. Nach Wegnahme der Zytokine bleibt die Anzahl der

lebenden Zellen nahezu gleich und es kommt nicht zu einer erneuten Proliferation. Hier lässt sich auf jeden Fall festhalten, dass die Zelllinie im Hinblick auf eine Seneszenz von einer zweifachen Behandlung profitiert. Das Growth Assay stellt in dieser Arbeit das einzige Assay dar, bei dem die Zellen über einen längeren Zeitraum mit den Zytokinen behandelt werden. Im Edu Assay gab es durch die Beobachtung einer geringen Inhibition des Zellzyklus schon einen kleinen Hinweis auf eine mögliche Seneszenz. Dieser konnte dann im Growth Assay, allerdings erst nach zweifacher Behandlung, bestätigt werden. Es wäre hier sicherlich sinnvoll weitere Assays mit einer längeren Behandlungsdauer durchzuführen. Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Seneszenz bei längerer Behandlungszeit bei der Zelllinie Kelly kann meiner Meinung nach in der CFSE-Färbung beobachtet werden. Wenn man die Graphen über 24, 48, 72 und 96 Stunden genauer betrachtet, erkennt man eine zunehmende Abdeckung der Graphen für die Stunden 72 und 96, sodass ein Effekt schon hier erst nach einer längeren Behandlungszeit erkennbar wird. Für das IncuCyte® Assay fällt ebenfalls auf, wenn man sich den Graphen unter dem Aspekt des längeren Behandlungszeitraums anschaut, dass die Kurve der behandelten Gruppe gegen Ende der Aufzeichnungen deutlich flacher verläuft als am Anfang.

Bei der Zelllinie LAN-1 konnte im Growth Assay eine partielle Seneszenz detektiert werden. Auch bei dieser Zelllinie sieht man erst in der zweiten Passage einen deutlichen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe. In der dritten Passage verläuft die Kurve der behandelten Gruppe relativ parallel zur x-Achse. Hier ist also auch davon auszugehen, dass die Zelllinie LAN-1 im Hinblick auf eine Zytokin-induzierte Seneszenz von einem längeren Behandlungszeitraum profitieren würde. Auch für diese Zelllinie wurde, wie für die Zelllinie Kelly, eine geringe Inhibition des Zellzyklus im Edu Assay beobachtet. Im IncuCyte® Assay fällt für die Zelllinie LAN-1 auch auf, dass es zu einer deutlichen Abflachung der Kurve der behandelten Gruppe mit Zunahme der Behandlungsdauer kommt.

Im Verlauf des Graphens der Zelllinie SH-SY5Y ist, wie bereits zuvor in der Arbeit erwähnt, ein deutliches Fallen der Kurve in der ersten und zweiten Passage zu beobachten. Dies kann, wie im EdU Assay detektiert, auf eine größere Anzahl an apoptotischen Zellen zurückgeführt werden. Dennoch fällt nach Wegnahme der Zytokine ein erneutes Ansteigen der Kurve auf. Hier ist nun auch wieder die Frage, ob die Kurven nun einen Hinweis auf eine Seneszenz geben können oder ob es mit der Behandlung nur zu einem Gleichgewicht zwischen apoptotischen Zellen und lebenden Zellen kommt, wobei die lebenden Zellen nach Wegnahme der Zytokine erneut proliferieren. In Zusammenschau mit dem EdU Assay, bei dem nach Ausschluss der apoptotischen Zellen dennoch ein Hinweis auf eine Seneszenz detektiert werden kann, liegt hier vermutlich eine Kombination aus beiden Möglichkeiten vor. Einige Zellen gehen in den Zustand einer Seneszenz über und einige Zellen beginnen mit einer erneuten Proliferation nach Wegnahme der Zytokine. Denkbar wäre auch, dass die nicht apoptotischen Zellen nur eine partielle Seneszenz eingehen und nach Wegnahme der Zytokine wieder beginnen sich zu teilen. Diese Möglichkeiten sollten auf jeden Fall noch weiter differenziert werden.

Für die Zelllinie SK-N-AS sollte erwähnt werden, dass sie sich mit einem Verhältnis der Proliferationsfaktoren der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe mit 0,54 sehr nahe an der Grenze zur Definition mit kleiner oder gleich 0,5 befindet und somit eine partielle Seneszenz nur knapp nicht nachgewiesen werden konnte.

An diesem Assay ist besonders der Aspekt der zweifachen Behandlung, aber auch die Entfernung der Zytokine aus dem Medium von großem Interesse. Der Gedanke dahinter ist, dass zum einen bei manchen Zelllinien möglicherweise erst nach einem längeren Behandlungszeitraum mit den Zytokinen eine Seneszenz induziert werden kann. Zum anderen beschreibt der Zustand der Seneszenz einen permanenten Wachstumsstopp oder Wachstumsarrest, sodass auch nach Wegnahme der Zytokine ein Ausbleiben einer Proliferation der Zellen von großer Bedeutung ist.

Dieses Assay ist auf jeden Fall sehr gut dafür geeignet die Zellzahl nach der Wegnahme der Zytokine zu beurteilen. Dennoch ist zu überlegen, ob es nicht noch eine andere Möglichkeit gibt die Zellen auszuzählen, da es mit dieser Methode nur unter dem Mikroskop mit einer Handauszählung und einer anschließenden Hochrechnung möglich war. Zusätzlich sollte überlegt werden den Aspekt der Wegnahme der Zytokine und auch die zweifache Behandlung der Zellen in weiteren Assays zu untersuchen. Auch eine häufigere Durchführung der Methode würde das Ergebnis festigen, hier wurde jedes Assay nur einmalig durchgeführt. Zudem wäre es von Interesse den Wachstumsstopp über zwei Passagen nach Wegnahme der Zytokine zu verfolgen, um besser beurteilen zu können, ob man möglicherweise von einem permanenten Arrest sprechen kann.

4.5. Verminderte Proliferation bei der Zelllinie SHEP mithilfe von Biolumineszenz beobachtet

Nachdem bereits in einigen unterschiedlichen Methoden starke Hinweise für eine Seneszenz vor allen Dingen für die Zelllinie SHEP beobachtet werden konnten, dient das Luciferase Assay mithilfe der Messung der Biolumineszenz zu einer weiteren Unterstreichung einer möglichen Seneszenz bei dieser Zelllinie.

Mithilfe des Luciferase Assays wurde die Auswirkung unterschiedlicher Konzentrationen von TNF- α bei gleichbleibender Konzentration von IFN- γ auf die Proliferation einiger Neuroblastomzelllinien untersucht. Hierzu wurde die Messung der Biolumineszenz nach Zugabe des Substrates D-Luciferin zur Hilfe genommen.

Bei einer verminderten Proliferation einer Zelllinie würde man in der Messung eine niedrigere Biolumineszenz erwarten, da durch die verringerte Anzahl an Zellteilungen weniger Luciferin durch einen geringeren Anteil an Zellen mit Luciferase-Aktivität vorhanden ist (Nogawa et al., 2005, Tiffen et al., 2010).

Eine geringere Biolumineszenz und somit eine erwartete verminderte Proliferation konnte bei der Zelllinie SHEP mCh nachgewiesen werden. Ein besonders gutes Ansprechen der Zellen auf die Behandlung der Zytokine ist schon ab einem frühen Behandlungszeitpunkt bei einer Konzentration von TNF- α von 100 ng/ml zu beobachten. Für die anderen Untersuchungen kann auch eine verminderte Proliferation beobachtet werden, allerdings erst ab einem Behandlungszeitraum zwischen 100 und 125 Stunden. Dies ist relativ schwierig nachzuvollziehen, da fast alle anderen Assays für die Zelllinie SHEP in einem Behandlungszeitraum von 96 Stunden gute Ergebnisse geliefert haben, die auf eine Seneszenzinduktion durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ hinweisen. Somit wäre denkbar, dass generell über einen längeren Zeitraum der Behandlung und eventuell auch über eine höhere Konzentration von TNF- α für die Zelllinie SHEP nachgedacht werden sollte. Dennoch sollte das hier ermittelte Ergebnis sicherlich nochmals und gegebenenfalls mit einer anderen Methode überprüft werden. Die Zelllinien LAN-1 mCh und Kelly mCh zeigten in diesem Assay keine Veränderung der Proliferation. Die Zelllinie SH-SY5Y mCh zeigte hier ein paradoxes Ergebnis, das nicht wirklich zu erklären ist. Das Ergebnis ist somit nicht verwertbar. Eine verminderte Proliferation der Zellen ist nur bei einer Konzentration von TNF- α von 0,01 ng/ml zu beobachten, allerdings auch nur bei den letzten beiden Messpunkten. Bei allen anderen Konzentrationen nicht, wobei die Kurven hier deutlich oberhalb der Kontrollgruppe liegen und somit höhere Werte aufweisen. Hier muss auf jeden Fall von einem Messfehler ausgegangen werden. Darauf weisen auch die hohen Standardabweichungen hin. Bei der Zelllinie LAN-1 mCh ist zwar bei einer Konzentration von 0,01 ng/ml und 100 ng/ml eine leicht verminderte Proliferation erkennbar. Allerdings ist bei der Konzentration von 10 ng/ml, die auch in den anderen Assays verwendet wurde, keine Veränderung zu erkennen. Zusammenfassend wird hier keine Veränderung der Proliferation der Zelllinie LAN-1 festgehalten. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der anderen Assays, da nur im Growth Assay nach einer zweifachen Behandlung eine partielle Seneszenz nachgewiesen werden konnte. Im EdU Assay wurde auch nur eine geringe Inhibition des Zellzyklus beschrieben. So bestehen nur

kleine Hinweise auf eine Seneszenz. Die Zelllinie Kelly mCh zeigte in diesem Assay eine verminderte Proliferation für eine Konzentration von TNF- α von 100 ng/ml. Bei der bisher eingesetzten Konzentration von 10 ng/ml in den vorausgegangenen Assays sieht man kaum einen Effekt auf die Proliferationsrate der Zellen. Das Ergebnis deckt sich also mit den bisherigen Beobachtungen für die Zelllinie Kelly. Im EdU Assay konnte nur eine geringe Inhibition des Zellzyklus nachgewiesen werden. Im Growth Assay wurde allerdings eine Seneszenz nachgewiesen. Im Rest der Assays gab es keinen Hinweis auf eine Seneszenz. Somit scheint die Zelllinie Kelly wohl erst bei zweifacher Behandlung oder einer höheren Konzentration von TNF- α mit einem Wachstumsarrest zu reagieren. Bei der höheren Konzentration von TNF- α sollte allerdings beachtet werden, dass die Kurve leicht abfällt und auch ein mögliches Sterben der Zellen in Betracht gezogen werden muss.

Das Luciferase Assay stellt zwar eine Möglichkeit dar, um mit einer anderen Methode und einem anderen Messgerät eine Veränderung der Proliferation nach Zugabe der Zytokine zu beobachten. Dennoch scheint diese Methode recht fehleranfällig zu sein und muss somit kritisch betrachtet werden. In diesem Assay wurde die Veränderung der Proliferation bei unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α beobachtet werden. Dennoch ist zu bedenken, dass für dieses Assay transduzierte Zellen benötigt werden. Fraglich ist, ob es durch diese Transduktion zu Veränderungen in der Zelllinie und mit den Ergebnissen in diesem Assay trotzdem Rückschlüsse auf, die nicht transduzierten Zelllinien gezogen werden können. Ein weiterer fragwürdiger Punkt ist, ob ein niedrigeres Signal der Biolumineszenz auch wirklich mit einer geringeren Proliferation der Zellen gleichzusetzen ist. Des Weiteren ist bei diesem Assay zu beachten, dass dieser auf enzymatische Aktivität der im Reaktionsvolumen befindlichen Zellen beruht. Vergleicht man mehrere Gruppen miteinander, so ist es extrem wichtig auf eine für alle Konditionen exakt ausplattiert Zellzahl zu achten. Zu große Unterschiede können die Ergebnisse bei Langzeitassays in diesem Format verfälschen. Dieses Assay ist daher recht fehleranfällig, da mehrere Konditionen verglichen werden, für die jeweils einzeln zuvor die exakte Zellzahl ermittelt werden muss. Dies erklärt möglicherweise

auch die größeren Standardabweichungen beziehungsweise die generell paradoxen Ergebnisse bei SH-SY5Y mCh,

Generell lässt sich zusammenfassen, dass das Assay für die Zelllinie SHEP ein plausibles Ergebnis für die unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α liefert und es generell sinnvoll ist Methoden zu verwenden, die auf unterschiedlichen Grundlagen zu beruhen. Dennoch ist zu beachten, dass das Ergebnis für die Zelllinien SH-SY5Y paradox ist und aufgrund von einem Messfehler gar nicht verwertbar ist. Somit wäre es sicherlich sinnvoll die unterschiedlichen Konzentrationen der Zytokine nochmals in einem anderen Assay, zum Beispiel dem EdU Assay, auszutesten und zu beurteilen.

Das Assay wurde nur mit vier der sieben Neuroblastomzelllinien durchgeführt. Dies sollte für die anderen Zelllinien noch ergänzt werden. Ein weiterer Punkt, der untersucht werden könnte, ist eine Titration des Zytokins IFN- γ , da hier nur unterschiedliche Konzentrationen von TNF- α untersucht wurden.

4.6. Beobachtung einer verminderten Konfluenz bei den Zelllinien LS, SH-SY5Y & SHEP

Es wäre denkbar, dass im soeben diskutierten Teil in Bezug auf das Luciferase Assay eine niedrige Biolumineszenz nicht einen Wachstumsarrest, sondern eine mögliche zytotoxische Wirkung der Zytokine auf die Zellen widerspiegelt. Dies ist aber ein Problem, das man sicherlich auch im Growth Assay hat. Sind die Verläufe bei den behandelten Zellen flach, so könnte dies immer daran liegen, dass sich sterbende und proliferierende Zellen im Gleichgewicht befinden, es also eigentlich keine Zellen gibt, die in einen Wachstumsarrest übergehen. Im EdU und CFSE Assay können solche Effekte schon eher ausgeschlossen werden, da man hier tote Zellen explizit von der Analyse ausschließen kann. Sodass es durchaus zu einem vermehrten Zelltod und damit zu einem scheinbaren Wachstumsarrest kommen kann. Dies wird bei der Zelllinie SH-SY5Y deutlich. Es konnte im EdU Assay deutlich gezeigt werden, dass über die Hälfte der Zellen in Apoptose geht. Wachstumskurven sind bei dieser Zelllinie mit Vorsicht zu genießen. Bei allen anderen Zelllinien konnte in den FACS-basierten Assays kein Hinweis auf einen übermäßig hohen Anteil an

toten Zellen festgestellt werden. Daher können in diesen Fällen flache Wachstumskurven mit ziemlicher Sicherheit auf einen Wachstumsarrest schließen lassen. Um die Zytotoxizität eindeutig auszuschließen, wurde außerdem eine Echtzeitanalyse in einem IncuCyte® Assay durchgeführt.

Das IncuCyte® Assay dient zur optischen Nachverfolgung der Konfluenz der einzelnen Zelllinien über einen längeren Zeitraum. Hier können die Zellen so zu sagen in Echtzeit beobachtet werden, da alle zwei Stunden ein Bild von den Zellen in Kultur angefertigt wird. Anhand der Konfluenz der Zellen kann man Rückschlüssen auf die Proliferation dieser Zellen ziehen. Diese Beobachtung über den kompletten Zeitraum der Behandlung unterstreicht nochmals eine mögliche Seneszenz bei einigen Zelllinien. Somit würde man bei einer verminderten Proliferation der einzelnen Zelllinien auch eine verminderte Konfluenz erwarten (Johnston et al., 2015, Artymovich et al.). Durch ein spezielles Reagenz sollte die Möglichkeit einer Zytotoxizität durch die Zytokine ausgeschlossen werden. Dies war aufgrund von fehlenden Kontrollen jedoch leider nicht möglich.

Eine erwartete, verminderte Konfluenz und somit eine verminderte Proliferation konnte bei den Zelllinien LS, SH-SY5Y und SHEP nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie SH-SY5Y sollte dennoch bedacht werden, dass eine Abnahme der Proliferation auch durch einen hohen Anteil an apoptotischen Zellen durch die Behandlung erklärt werden kann. Dieser hohe Anteil wurde im EdU Assay nachgewiesen. Bei genauerer Betrachtung der Wachstumskurve der behandelten Gruppe fällt auf, dass diese tendenziell sogar etwas abfällt, das heißt, dass Zellen sterben. Keine Veränderungen in der Proliferation konnten bei den Zelllinien LAN-1, Kelly, SK-N-AS und SK-N-BE(2) beobachtet werden. Wobei bei der Zelllinie LAN-1 dennoch ein Unterschied der behandelten Gruppe zur Kontrollgruppe in Bezug auf die Konfluenz zu erkennen ist. Die Konfluenz der behandelten Gruppe liegt allerdings nicht 50 % oder mehr als 50 % unterhalb der Kontrollgruppe und weist damit laut der Definition keine verminderte Proliferation auf. Dennoch sollte dieser beobachtete Unterschied nicht missachtet werden.

Auch in Bezug auf das IncuCyte® Assay sollte die Zelllinie SH-SY5Y nochmals besonders diskutiert werden. Die Kurve verläuft für diese Zelllinie sehr flach und nahezu parallel zur x-Achse. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass viel Zellen sterben. Es ist allerdings auch denkbar, dass sich die Rate der sterbenden Zellen im Gleichgewicht mit einer Proliferation der lebenden Zellen befindet und durch dieses Gleichgewicht die flache Kurve zustande kommt. Bei diesem Gleichgewicht würde man davon ausgehen, dass keinerlei Zellen seneszent sind, sondern der beschriebene Effekt nur aus diesem beschriebenen Gleichgewicht hervorgeht. Für das Vorliegen dieses Gleichgewichts spricht, dass die Kurve im Growth Assay nach Wegnahme der Zytokine nahezu parallel zur Kontrollgruppe ansteigt. Gegen das Gleichgewicht spricht, dass bei Ausschluss der apoptotischen Zellen eine signifikante Zunahme der Zellen in der G1-Phase in der behandelten Gruppe im EdU Assay beobachtet werden kann. Auch in der G2-Phase kann eine Zunahme der Zellen in der behandelten Gruppe beobachtet werden. Zusammenfassend wäre es also denkbar, dass beide Fälle vorliegen. Einige Zellen sterben durch die Behandlung mit den Zytokinen. Die anderen Zellen, die nicht sterben, gehen teilweise in eine Seneszenz über oder gehen, wenn überhaupt, nur in eine partielle Seneszenz über und können nach Wegnahme der Zytokine erneut proliferieren.

Die Erklärung einer flachen Wachstumskurve anhand eines Gleichgewichts könnte man nun auch auf andere Zelllinien übertragen und somit eine Seneszenz hinterfragen. Dies kann man allerdings damit widerlegen, dass nur für die Zelllinie SH-SY5Y eine große Anzahl an apoptotischen Zellen im EdU Assay detektiert wurde. Für die anderen Zelllinien war dies nicht der Fall, sodass hier eine flache Kurve definitiv auf eine Seneszenz hinweisen kann.

Um genau diesen Zweifel nochmals auszuschließen wurde das IncuCyte® Assay mit einem Reagens zum Nachweis einer Zytotoxizität durchgeführt. Die Auswertung konnte letztendlich leider nicht erfolgen, da spezifische Kontrollen für die Auswertung gefehlt haben.

Mithilfe des IncuCyte® Assays kann man hervorragend die Proliferation der Zellen zu jedem Zeitpunkt der Behandlung mit Zytokinen beobachten. Ein weiterer Aspekt, der hier leider nicht untersucht wurde, wäre außerdem eine mögliche Beobachtung der Konfluenz und somit der Proliferation der Zellen nach Wegnahme der Zytokine. Außerdem wurde bei diesem Assay ein Reagenz zum Nachweis der Zytotoxizität von TNF- α und IFN- γ hinzugegeben. Hier kam es bei den Auswertungen leider zu Problemen, da die Referenzkontrolle nicht effizient genutzt werden konnte. Die Zytotoxizität der hier verwendeten Zytokine sollte auf jeden Fall, ob in diesem Assay oder einem Anderen, erneut untersucht und ausgeschlossen werden. So kann eine verminderte Proliferation der Zellen durch eine eventuelle Zytotoxizität (Kevin J. Tracey and Anthony Cerami, 1994) ausgeschlossen werden und die Verminderung der Proliferation kann mit Sicherheit auf einen Wachstumsarrest durch Seneszenz zurückgeführt werden.

4.7. Untersuchung der Proliferationsmarker und Tumorsupressorproteine

In den vorangegangenen Assays konnten für einige Zellen viele Hinweise für eine Induktion einer Seneszenz durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ gefunden werden. Eine zentrale Rolle für den Nachweis einer Seneszenz spielen auch diverse Proliferationsmarker und Tumorsupressorproteine. Diese sollten in einer Immunfluoreszenzfärbung untersucht werden. Die Abwesenheit des Proliferationsmarkers Ki67 wurde beispielsweise bei einer Stress-induzierten Seneszenz bei Fibroblasten nachgewiesen (Lawless et al., 2010). Eine andere Arbeit beschreibt, dass zum Beispiel das Tumorsupressorprotein p53 eine große Rolle bei der Kontrolle einer zellulären Seneszenz spielt, indem es einen Zellzyklusarrest auslöst (Campisi, 2001)

In dieser Immunfluoreszenzfärbung sollte vor allen Dingen das Vorhandensein von Proliferationsmarkern, wie Ki67 und PCNA, sowie Tumorsupressorproteinen, wie p16^{INK4A} und HP1- γ , nachgewiesen werden.

Der Wiedereintritt der Zellen von der G1-Phase in die S-Phase wird durch das Tumorsupressorprotein p16^{INK4a} verlangsamt oder teilweise sogar ganz

unterdrückt (Vandenberk et al., 2011, Coppe et al., 2011). Das Heterochromatin-Protein 1 (HP1)- γ spielt insoweit eine Rolle, dass durch die Erhöhung dieses Proteins ein größerer Anteil an Heterochromatin nachgewiesen werden kann (Bartkova et al., 2011). Dies kann ein Hinweis auf die Seneszenz-assoziierten Heterochromatin Foci (SAHF) darstellen (Narita et al., 2003). Typisch für seneszente Zellen ist unter anderem auch die Abwesenheit von Proliferationsmarkern. Ki67 als Proliferationsmarker wird als Marker für einen Zellzykluseintritt beschrieben (Sobecki et al., 2017). PCNA an sich weist ebenfalls Zellzyklus-abhängige Eigenschaften auf (Schönenberger et al., 2015).

Bei den hier untersuchten Neuroblastomzelllinien wäre ein Unterschied in dem Vorkommen dieser Proliferationsmarker oder Tumorsupressorproteinen zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe zu erwarten gewesen. Bei einer durch die Behandlung mit TNF- α und IFN- γ seneszente Zelllinie wäre eine Zunahme der Tumorsupressorproteine (Vandenberk et al., 2011, Narita et al., 2006) und eine Abnahme der Proliferationsmarker (Rentschler et al., 2018, Lawless et al., 2010) zu erwarten. In einer Arbeit wurde beispielsweise beschrieben, dass das Tumorsupressorprotein p16^{INK4A} als ein Protein fungiert, dass Zellen in einen G1-Arrest versetzt und somit zu einem Zellzyklusarrest führt (Vandenberk et al., 2011). Durch die Behandlung mit TNF- α und IFN- γ konnte zum Beispiel bei Brustkrebszellen die Abnahme von Ki67 mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (Rentschler et al., 2018).

Im Bereich der Immunfluoreszenzfärbung konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Methode für die Färbung von Neuroblastomzelllinien etabliert werden und so auch keine Ergebnisse erzielt werden. Es wurden unterschiedliche Blocking Puffer getestet, unterschiedliche Verdünnungen der primären Antikörper verwendet, unterschiedliche Konjugate des sekundären Antikörpers ausprobiert und auch der Waschvorgang wurde in unterschiedlichen Varianten ausgetestet. Außerdem wurden Veränderungen in der Fixierung wie auch in der Permeabilisierung vorgenommen. Dennoch konnte keine zufriedenstellende Färbung der Zellen erreicht werden. In der Literatur spielt die Immunfärbung

von Tumorsupressorproteinen, wie p16^{INK4A} und HP1- γ , und Proliferationsmarkern, wie Ki67 und PCNA, dennoch eine große Rolle und konnte im Rahmen der Seneszenz auch mehrfach beschrieben werden (Noren Hooten and Evans, 2017, Correia-Melo et al., 2013). Im Immunoblot kann beispielsweise p16^{INK4a} detektiert werden (Noren Hooten and Evans, 2017). Ki67 und PCNA können mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen und quantifiziert werden (Correia-Melo et al., 2013). So sollte in Zukunft diese Färbung für die Neuroblastomzelllinien etabliert werden. Mögliche Änderungen im Protokoll wären, veränderte Antikörperkonzentrationen, längere oder auch kürzere Inkubationszeiten und auch Veränderungen in der Fixation oder bei den Puffern. Wenn eine Färbung der Tumorsupressorproteine und Proliferationsmarkern in Zukunft bei Neuroblastomzelllinien nach einer Behandlung mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ möglich ist, kann diese Färbung eine Zytokin-induzierte Seneszenz (ZIS) bei diesen Zellen unterstreichen.

4.8. Abschließender Überblick

Im abschließenden Überblick kann man festhalten, dass für den Nachweis einer möglichen Seneszenz bei unterschiedlichen Neuroblastomzelllinien unterschiedlichste Assays durchgeführt wurden und dass auch nur aus der Zusammenschau mehrerer Ergebnisse und Marker ein Rückschluss auf eine mögliche Seneszenz gezogen werden kann.

Aufgeschlüsselt für die einzelnen Zelllinien bedeutet das, dass die Zelllinien LS und SHEP nach den in dieser Arbeit festgelegten Definitionen als seneszent angesehen werden können. Beide Zelllinien zeigten in allen durchgeführten Assays, bis auf die β -Galactosidase-Färbung eine Seneszenz, eine Inhibition des Zellzyklus oder eine verminderte Proliferation. Besonders zu erwähnen ist für diese beiden Zelllinien, dass im Growth Assay auch eine permanente Seneszenz nachgewiesen werden konnte, dass bedeutet, dass die Zellen auch nach Wegnahme der Zytokine nicht erneut proliferieren. Der Zustand der nachgewiesenen Seneszenz ist somit irreversibel. Auch die Zelllinie SH-SY5Y zeigt in vielen Assays einen Hinweis auf eine Seneszenz. Im EdU Assay wurde

eine Inhibition des Zellzyklus beobachtet, jedoch wurde hier auch ein großer Anteil apoptotischer Zellen detektiert. In der CFSE-Färbung wurde eine Seneszenz und im IncuCyte® Assay eine verminderte Proliferation beobachtet. Im Growth Assay wurde eine partielle Seneszenz nachgewiesen. Wobei auch hier eine fallende Kurve, Hinweise auf einen Anteil an apoptotischen Zellen geben kann. Das Luciferase Assay war nicht verwertbar. Für die Zelllinie SH-SY5Y sollte generell genau differenziert werden, ob eine mögliche Seneszenz vorliegt, oder ob ein großer Teil der Zellen durch die Behandlung apoptotisch wird.

Die Zelllinien LAN-1, Kelly und SK-N-AS können als partiell seneszent angesehen werden. Wenn man alle Assays zusammen betrachtet zeigte die Zelllinien LAN-1 in einem Teil der Assays kleine Hinweise für eine Seneszenz. Für die Zelllinie LAN-1 konnte im Growth Assay eine partielle Seneszenz und im EdU Assay eine geringe Inhibition des Zellzyklus festgestellt werden. Die CFSE-Färbung zeigte keine Seneszenz. Im Luciferase Assay und im IncuCyte® Assay wurde keine Veränderung der Proliferation in der behandelten Gruppe detektiert. Für die Zelllinie LAN-1 sollte auf jeden Fall festgehalten werden, dass sie im Hinblick auf eine Seneszenz von einer längeren Behandlung mit den Zytokinen profitiert. Dies lässt sich zum einen am Growth Assay festmachen, in dem erst in der zweiten Passage ein Unterschied zwischen der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe beobachtet werden kann. Zum anderen war die Auswertung im IncuCyte® Assay mit 40 % Unterschied zwischen den Gruppen, anstatt, wie definiert 50 %, knapp. So konnte nur mit einem geringen Unterschied der Differenz zur Definition keine verminderte Proliferation nachgewiesen werden. Wenn man sich die Kurve der behandelten Gruppe außerdem genauer anschaut, fällt auf, dass sie mit Zunahme der Behandlungsdauer deutlich abfällt. Die Zelllinie Kelly zeigte im Growth Assay eine Seneszenz und im EdU Assay eine geringe Inhibition des Zellzyklus. Im Luciferase Assay und im IncuCyte® Assay konnte keine Veränderung in der Proliferation detektiert werden. Keine Seneszenz zeigte die Zelllinie Kelly außerdem in der CFSE-Färbung. Auch für die Zelllinie Kelly ist zu erwähnen, dass sie im Zusammenhang mit einer Seneszenz von einem längeren

Behandlungszeitraum profitiert. Im Growth Assay wurde auch erst in der zweiten Passage ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe festgestellt. Hinweise auf ein besseres Ansprechen lassen sich auch aus der CFSE-Färbung und dem IncuCyte® Assay ableiten. Im EdU Assay zeigte die Zelllinie SK-N-AS eine Inhibition des Zellzyklus. In der CFSE-Färbung konnte eine partielle Seneszenz nachgewiesen werden. Die Neuroblastomzelllinie SK-N-AS zeigte weder im Growth Assay eine Seneszenz noch im IncuCyte® Assay eine verminderte Proliferation. Für das Growth Assay ist bei der Zelllinie SK-N-AS allerdings zu beachten, dass nur sehr knapp keine partielle Seneszenz nachgewiesen werden konnte.

Die Zelllinie SK-N-BE(2) zeigte in keinem der Assays eine Seneszenz.

4.9. Fortführende Forschung

Die Zielsetzung dieser Arbeit umfasst ein Voranbringen der Grundlagenforschung für eine mögliche Seneszenz von Neuroblastomzellen durch die Behandlung mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ . Rückblickend konnte diese Zielsetzung auf jeden Fall erfüllt werden und eine Seneszenz für einige Zelllinien in unterschiedlichen Methoden und Assays nachgewiesen werden. Dennoch bedarf es noch weitaus mehr Forschungsarbeiten, um den Mechanismus einer Seneszenz, der bei einigen Neuroblastomzelllinien durch die Zytokine ausgelöst werden kann, genauer nachzuweisen und zu verstehen. Ein großes Ziel wäre es natürlich mit Hilfe dieser Ergebnisse auf lange Sicht eine Therapieoption für erkrankte Kinder zu etablieren, um so ihre Prognose zu verbessern.

Die nächsten sinnvollen Schritte bestünden darin die hier erzielten Ergebnisse zu festigen und weiter fortzuführen. Weitblickend könnten außerdem Methoden etabliert werden, bei denen untersucht wird, ob die Stimulation von Effektorzellen, die physiologisch die Zytokine TNF- α und IFN- γ ausschütten (z.B. Makrophagen oder Lymphozyten), eine Seneszenz bei Neuroblastomzellen hervorrufen könnte. Außerdem sollte auch eine Erkennung und somit eine Zerstörung der senszenten Zellen durch das Immunsystem nicht aus den Augen verloren werden. Denn nur durch eine Vernichtung der

Neuroblastomzellen könnte eine vollständige Remission der Erkrankung erfolgen.

Zusätzlich sollte außerdem eine mögliche Zytotoxizität durch TNF- α und auch IFN- γ ausgeschlossen werden. Hier wäre es möglich das IncuCyte® Assay erneut mit der geeigneten Kontrolle zur Einstellung der Maske durchzuführen. Es wären auch andere Zytotoxizitätsassays wie zum Beispiel ein Versuch mit Hilfe des xCELLigence® Gerätes denkbar. Hierbei können mit Hilfe der elektrischen Impedanz Veränderungen von adhärenen Zellen nach zum Beispiel der Zugabe von bestimmten Substanzen in einer Echtzeitmessung detektiert werden. Weiterhin könnte die veränderte Morphologie der seneszenten Zellen untersucht und beobachtet werden. Generell werden adhärenente, seneszente Zellen als abgeflacht und vergrößert beschrieben (Ren et al., 2009). Als weiterer Hinweis auf eine mögliche Seneszenz könnte der Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phenotyp (SASP) untersucht werden. Hier untersucht man Botenstoffe wie Zytokine, Chemokine und Proteasen, die von seneszenten Zellen sezerniert werden. Die seneszenten Zellen können so über ihre Grenzen hinweg wirken und Einfluss auf das umliegende Gewebe nehmen (Kuilman and Peeper, 2009).

Des Weiteren sollte man versuchen die molekularen Signalwege, über welche die Seneszenz jeweils ausgelöst wird, zu ermitteln. Hierbei könnte man sich mittels qPCR unterschiedliche, am Zellzyklus beteiligte Gene anschauen und untersuchen, ob und welche Gene nach Zytokinbehandlung hoch- oder runterreguliert werden. So könnte man beispielsweise herausfinden, ob die Seneszenz über den p16 oder p21 Signalweg vermittelt wird.

Ein weiterer Punkt, der außerdem untersucht werden sollte, sind die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Neuroblastomzelllinien. Einige Zelllinien sind den Ergebnissen nach seneszent und andere nicht. Woran könnte es liegen? Sind bei einigen Neuroblastomzelllinien genetische Veränderungen vorhanden, die eine Seneszenz erst ermöglichen? In einer Arbeit wurden zum Beispiel chromosomale oder genetische Veränderungen oder auch genetische Modifikationen bei den unterschiedlichen

Neuroblastomzelllinien beschrieben (Thiele, 1998). Oder gibt es wieder andere Strukturen und Mechanismen, die eine Seneszenz verhindern?

Diese und weitere Fragen bleiben weiterhin offen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für nachfolgende Forschungsprojekte zur Seneszenz bei Neuroblastomen.

5. Zusammenfassung

Eine Krebserkrankung ist bei Kindern in den Industrieländern die zweithäufigste Todesursache. Jedes Jahr erkranken ca. 1800 Kinder unter 15 Jahren in Deutschland neu an einer Krebserkrankung. Mit 7% der Krebserkrankungen macht das Neuroblastom eine relativ große Gruppe der Tumoren im Kindesalter aus. Hinzu kommt außerdem, dass ein Neuroblastom häufig erst sehr spät diagnostiziert wird, da bei den Kindern sehr wenige Symptome auftreten. Wenn der Tumor dann entdeckt wird, ist er meist schon sehr groß und bereits metastasiert, sodass die Kinder eine schlechte Prognose haben.

Um in Zukunft vielleicht bessere Therapieoptionen für die Behandlung des Neuroblastoms zu entwickeln, beschäftigt sich diese Arbeit mit dem Titel: TNF- α & IFN- γ vermittelte Seneszenz bei Neuroblastomzelllinien, im Gebiet der Grundlagenforschung mit einer möglichen Seneszenzinduktion bei Neuroblastomzelllinien durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ .

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sieben unterschiedliche Neuroblastomzelllinien (LS, SH-SY5Y, LAN-1, Kelly, SK-N-AS, SK-N-BE(2) und SHEP) in verschiedenen Assay und unter Anwendung verschiedener Methoden auf eine Induktion einer Seneszenz durch die Zugabe von TNF- α und IFN- γ hin untersucht.

An erster Stelle steht hier die Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase Färbung. Mit dieser Färbung kann der Seneszenz-assoziierte Biomarker β -Galactosidase nachgewiesen werden. Für keine der Neuroblastomzelllinien konnte eine Färbung beobachtet werden.

Das EdU Assay dient zur Untersuchung der Zellzyklusphasen nach Behandlung der Zellen mit den Zytokinen.

Im Weiteren wurde eine CFSE-Färbung der Zellen durchgeführt, um die Proliferation zu beurteilen. Außerdem wurde im Rahmen dieses Assays die Entwicklung der Proliferation im Verlauf der Behandlung dokumentiert.

Das durchgeführte Growth Assay diente zur Untersuchung des Verhaltens der Zellen nach zweifacher Behandlung der Zellen mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ und nachfolgender Wegnahme der Zytokine.

Die Auswirkung unterschiedlicher Konzentrationen von TNF- α auf die Proliferation einiger Neuroblastomzelllinien wurde mit Hilfe des Luciferase Assays untersucht.

Für eine kontinuierliche Beurteilung der Konfluenz und so der Proliferation der Zellen über den kompletten Zeitraum der Behandlung wurde ein IncuCyte® Assay durchgeführt.

Außerdem wurde versucht eine Immunfluoreszenzfärbung für diese Neuroblastomzelllinien zu etablieren, um so eine Veränderung der Proliferationsmarker Ki67 und PCNA und der Tumorsupressorproteine p16^{INK4A} und HP1- γ zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe nachzuweisen. Die Methode konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht etabliert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass folgende Zelllinien als seneszent angesehen werden können: LS und SHEP. Diese beiden Zelllinien zeigten in allen durchgeführten Assays, bis auf die β -Galactosidase-Färbung, eine Seneszenz, eine Inhibition des Zellzyklus oder eine verminderte Proliferation. Auch die Zelllinie SH-SY5Y zeigt in vielen Assays einen Hinweis auf eine Seneszenz. Im EdU Assay wurde eine Inhibition des Zellzyklus beobachtet, jedoch wurde hier auch ein großer Anteil apoptotischer Zellen detektiert. In der CFSE-Färbung wurde eine Seneszenz und im IncuCyte® Assay eine verminderte Proliferation beobachtet. Im Growth Assay wurde eine partielle Seneszenz nachgewiesen. Das Luciferase Assay war nicht verwertbar. Für die Zelllinie SH-SY5Y sollte generell genau differenziert werden, ob eine mögliche Seneszenz vorliegt, oder ob ein großer Teil der Zellen durch die Behandlung apoptotisch wird.

Die Zelllinien LAN-1, Kelly und SK-N-AS können als partiell seneszent angesehen werden. Wenn man alle Assays zusammen betrachtet, zeigte die Zelllinien LAN-1 in einem Teil der Assays kleine Hinweise für eine Seneszenz. Für die Zelllinie LAN-1 konnte im Growth Assay eine partielle Seneszenz und im EdU Assay eine geringe Inhibition des Zellzyklus festgestellt werden. Die CFSE-Färbung zeigte keine Seneszenz. Im Luciferase Assay und im IncuCyte® Assay wurde keine Veränderung der Proliferation in der behandelten Gruppe detektiert. Die Zelllinie Kelly zeigte im Growth Assay eine Seneszenz und im EdU Assay eine geringe Inhibition des Zellzyklus. Im Luciferase Assay und im IncuCyte® Assay konnte keine Veränderung in der Proliferation detektiert werden. Keine Seneszenz zeigte die Zelllinie Kelly außerdem in der CFSE-Färbung. Im EdU Assay zeigte die Zelllinie SK-N-AS eine Inhibition des Zellzyklus. In der CFSE-Färbung konnte eine partielle Seneszenz nachgewiesen werden. Die Neuroblastomzelllinie SK-N-AS zeigte weder im Growth Assay eine Seneszenz noch im IncuCyte® Assay eine verminderte Proliferation.

Die Zelllinie SK-N-BE(2) zeigte in keinem der Assays eine Seneszenz.

In Zukunft kann diese Arbeit als Grundlage für weitere Assays angesehen werden. Dennoch können die Ergebnisse weiter verifiziert werden und in neuen Bereichen weitere Forschungsarbeiten initiiert werden.

6. Literaturverzeichnis

- ACOSTA, J. C., BANITO, A., WUESTEFELD, T., GEORGILIS, A., JANICH, P., MORTON, J. P., ATHINEOS, D., KANG, T. W., LASITSCHKA, F., ANDRULIS, M., PASCUAL, G., MORRIS, K. J., KHAN, S., JIN, H., DHARMALINGAM, G., SNIJDERS, A. P., CARROLL, T., CAPPER, D., PRITCHARD, C., INMAN, G. J., LONGERICH, T., SANSOM, O. J., BENITAH, S. A., ZENDER, L. & GIL, J. 2013. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*, 15, 978-90.
- ADERKA, D. 1991. Role of tumor necrosis factor in the pathogenesis of intravascular coagulopathy of sepsis: potential new therapeutic implications. *Isr J Med Sci*, 27, 52-60.
- ARTYMOVICH, K., PATEL, K., SZYBUT, C., GARAY, P. M., O'CALLAGHAN, T., DALE, T., TREZISE, D. & APPLIEDORN, D. M. CellPlayer™ Kinetic Proliferation Assay.
- BALIS, F. M., BUSCH, C. M., DESAI, A. V., HIBBITTS, E., NARANJO, A., BAGATELL, R., IRWIN, M. & FOX, E. 2020. The ganglioside G(D2) as a circulating tumor biomarker for neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 67, e28031.
- BALZARINI, J., DE CLERCQ, E., KIEFER, G., KEPPELER, K. & BUCHELE, A. 1984. Antitumor cell and antimetabolic effects of 5-ethyl-2'-deoxyuridine and 5'-substituted 5-ethyl-2'-deoxyuridine derivatives. *Invest New Drugs*, 2, 35-47.
- BARTKOVA, J., MOUDRY, P., HODNY, Z., LUKAS, J., RAJPERT-DE MEYTS, E. & BARTEK, J. 2011. Heterochromatin marks HP1gamma, HP1alpha and H3K9me3, and DNA damage response activation in human testis development and germ cell tumours. *Int J Androl*, 34, e103-13.
- BARTKOVA, J., REZAEI, N., LIONTOS, M., KARAKAIDOS, P., KLETSAS, D., ISSAEVA, N., VASSILIOU, L. V., KOLETTAS, E., NIFOROU, K., ZOUMPOURLIS, V. C., TAKAOKA, M., NAKAGAWA, H., TORT, F., FUGGER, K., JOHANSSON, F., SEHESTED, M., ANDERSEN, C. L., DYRSKJOT, L., ORNTOFT, T., LUKAS, J., KITTAS, C., HELLEDAY, T., HALAZONETIS, T. D., BARTEK, J. & GORGOLIS, V. G. 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444, 633-7.
- BERTHOLD, F., BOOS, J., BURDACH, S., ERTTMANN, R., HENZE, G., HERMANN, J., KLINGEBIEL, T., KREMENS, B., SCHILLING, F. H., SCHRAPPE, M., SIMON, T. & HERO, B. 2005. Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 6, 649-58.
- BIANCHI, F., TAMBURRINI, G., GESSI, M., FRASSANITO, P., MASSIMI, L. & CALDARELLI, M. 2018. Central nervous system (CNS) neuroblastoma. A case-based update. *Childs Nerv Syst*, 34, 817-823.
- BLAGOSKLONNY, M. V. 2011. Cell cycle arrest is not senescence. *Aging*, 3, 94-101.
- BRADLEY, J. R. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*, 214, 149-60.
- BRAUMULLER, H., WIEDER, T., BRENNER, E., ASSMANN, S., HAHN, M., ALKHALED, M., SCHILBACH, K., ESSMANN, F., KNEILLING, M., GRIESSINGER, C., RANTA, F., ULLRICH, S., MOCIKAT, R., BRAUNGART, K., MEHRA, T., FEHRENBACHER, B., BERDEL, J., NIESSNER, H., MEIER, F., VAN DEN BROEK, M., HARING, H. U., HANDGRETINGER, R., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., FEND, F., PESIC, M., BAUER, J., ZENDER, L., SCHALLER, M., SCHULZE-OSTHOFF, K. & ROCKEN, M. 2013. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, 494, 361-5.
- BRODEUR, G. M., MINTURN, J. E., HO, R., SIMPSON, A. M., IYER, R., VARELA, C. R., LIGHT, J. E., KOLLA, V. & EVANS, A. E. 2009. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res*, 15, 3244-50.
- BRODEUR, G. M., PRITCHARD, J., BERTHOLD, F., CARLSEN, N. L., CASTEL, V., CASTELBERRY, R. P., DE BERNARDI, B., EVANS, A. E., FAVROT, M., HEDBORG, F. & ET AL. 1993. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*, 11, 1466-77.
- CAMPISI, J. 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in Cell Biology*, 11, S27-S31.
- CAMPISI, J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*, 75, 685-705.

- CHANG, B. D., BROUDE, E. V., DOKMANOVIC, M., ZHU, H., RUTH, A., XUAN, Y., KANDEL, E. S., LAUSCH, E., CHRISTOV, K. & RONINSON, I. B. 1999. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res*, 59, 3761-7.
- CHEUNG, N. K. & DYER, M. A. 2013. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 13, 397-411.
- CHEUNG, N. K., ZHANG, J., LU, C., PARKER, M., BAHRAMI, A., TICKOO, S. K., HEGUY, A., PAPPO, A. S., FEDERICO, S., DALTON, J., CHEUNG, I. Y., DING, L., FULTON, R., WANG, J., CHEN, X., BECKSFORT, J., WU, J., BILLUPS, C. A., ELLISON, D., MARDIS, E. R., WILSON, R. K., DOWNING, J. R. & DYER, M. A. 2012. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *Jama*, 307, 1062-71.
- CHIEN, Y., SCUOPPO, C., WANG, X., FANG, X., BALGLEY, B., BOLDEN, J. E., PREMSRIRUT, P., LUO, W., CHICAS, A., LEE, C. S., KOGAN, S. C. & LOWE, S. W. 2011. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev*, 25, 2125-36.
- CLAVIEZ, A., LAKOMEK, M., RITTER, J., SUTTORP, M., KREMENS, B., DICKERHOFF, R., HARMS, D., BERTHOLD, F. & HERO, B. 2004. Low occurrence of familial neuroblastomas and ganglioneuromas in five consecutive GPOH neuroblastoma treatment studies. *Eur J Cancer*, 40, 2760-5.
- COHN, S. L., PEARSON, A. D., LONDON, W. B., MONCLAIR, T., AMBROS, P. F., BRODEUR, G. M., FALDUM, A., HERO, B., IEHARA, T., MACHIN, D., MOSSERI, V., SIMON, T., GARAVENTA, A., CASTEL, V. & MATTHAY, K. K. 2009. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*, 27, 289-97.
- CONTI, B., TABAREAN, I., ANDREI, C. & BARTFAI, T. 2004. Cytokines and fever. *Front Biosci*, 9, 1433-49.
- COPPE, J. P., DESPREZ, P. Y., KRTOLICA, A. & CAMPISI, J. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 5, 99-118.
- COPPE, J. P., PATIL, C. K., RODIER, F., SUN, Y., MUNOZ, D. P., GOLDSTEIN, J., NELSON, P. S., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 6, 2853-68.
- COPPE, J. P., RODIER, F., PATIL, C. K., FREUND, A., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. 2011. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem*, 286, 36396-403.
- CORREIA-MELO, C., JURK, D. & PASSOS, J. F. 2013. Robust Multiparametric Assessment of Cellular Senescence. In: Galluzzi L., Vitale I., Kepp O., Kroemer G. (eds) *Cell Senescence. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 965. Humana Press, Totowa, NJ.
- COTTER, M. A., FLORELL, S. R., LEACHMAN, S. A. & GROSSMAN, D. 2007. Absence of senescence-associated beta-galactosidase activity in human melanocytic nevi in vivo. *J Invest Dermatol*, 127, 2469-71.
- COWLEY, S. C., HAMILTON, E., FRELINGER, J. A., SU, J., FORMAN, J. & ELKINS, K. L. 2005. CD4-CD8- T cells control intracellular bacterial infections both in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 202, 309-319.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., ERUSALIMSKY, J. D., CAMPISI, J. & TOUSSAINT, O. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 4, 1798-806.
- DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E. E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O. & ET AL. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7.
- ENGELMANN, B. & MASSBERG, S. 2013. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13, 34-45.
- EVANS, A. E. 1980. Staging and Treatment of Neuroblastoma. *Cancer*, 45 Suppl 7, 1799-1802.

- FAROOQI, A. S., DAGG, R. A., CHOI, L. M., SHAY, J. W., REYNOLDS, C. P. & LAU, L. M. 2014. Alternative lengthening of telomeres in neuroblastoma cell lines is associated with a lack of MYCN genomic amplification and with p53 pathway aberrations. *J Neurooncol*, 119, 17-26.
- GAO, J., SHI, L. Z., ZHAO, H., CHEN, J., XIONG, L., HE, Q., CHEN, T., ROSZIK, J., BERNATCHEZ, C., WOODMAN, S. E., CHEN, P. L., HWU, P., ALLISON, J. P., FUTREAL, A., WARGO, J. A. & SHARMA, P. 2016. Loss of IFN-gamma Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell*, 167, 397-404.e9.
- GATTA, G., ZIGON, G., CAPOCACCIA, R., COEBERGH, J. W., DESANDES, E., KAATSCH, P., PASTORE, G., PERIS-BONET, R. & STILLER, C. A. 2009. Survival of European children and young adults with cancer diagnosed 1995-2002. *Eur J Cancer*, 45, 992-1005.
- GEORGE, R. E., SANDA, T., HANNA, M., FROHLING, S., LUTHER, W., 2ND, ZHANG, J., AHN, Y., ZHOU, W., LONDON, W. B., MCGRADY, P., XUE, L., ZOZULYA, S., GREGOR, V. E., WEBB, T. R., GRAY, N. S., GILLILAND, D. G., DILLER, L., GREULICH, H., MORRIS, S. W., MEYERSON, M. & LOOK, A. T. 2008. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*, 455, 975-8.
- GIRE, V. & DULIĆ, V. 2015. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle*, 14, 297-304.
- GORDON, J. R. & GALLI, S. J. 1990. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature*, 346, 274-276.
- HANDGRETINGER, R., ANDERSON, K., LANG, P., DOPFER, R., KLINGEBIEL, T., SCHRAPPE, M., REULAND, P., GILLIES, S. D., REISFELD, R. A. & NEITHAMMER, D. 1995. A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer*, 31a, 261-7.
- HAYFLICK, L. 1965. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res*, 37, 614-36.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- HERNANDEZ-SEGURA, A., NEHME, J. & DEMARIA, M. 2018. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*, 28, 436-453.
- HERO, B., BERTHOLD, F., GRAF, N., KLINGEBIEL, T., KREMENS, B., KRUG, B., SIMON, T., SCHMIDT, M., VON SCHWEINITZ, D. & FRANZIUS, C. 2011. Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Neuroblastom.
- HERTWIG, F., PEIFER, M. & FISCHER, M. 2016. Telomere maintenance is pivotal for high-risk neuroblastoma. *Cell Cycle*, 15, 311-2.
- HORIUCHI, T., MITOMA, H., HARASHIMA, S.-I., TSUKAMOTO, H. & SHIMODA, T. 2010. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 49, 1215-1228.
- HORTOBAGYI, G. N., STEMMER, S. M., BURRIS, H. A., YAP, Y. S., SONKE, G. S., PALUCH-SHIMON, S., CAMPONE, M., BLACKWELL, K. L., ANDRÉ, F., WINER, E. P., JANNI, W., VERMA, S., CONTE, P., ARTEAGA, C. L., CAMERON, D. A., PETRAKOVA, K., HART, L. L., VILLANUEVA, C., CHAN, A., JAKOBSEN, E., NUSCH, A., BURDAEVA, O., GRISCHKE, E. M., ALBA, E., WIST, E., MARSCHNER, N., FAVRET, A. M., YARDLEY, D., BACHELOT, T., TSENG, L. M., BLAU, S., XUAN, F., SOUAMI, F., MILLER, M., GERMA, C., HIRAWAT, S. & O'SHAUGHNESSY, J. 2016. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*, 375, 1738-1748.
- HUBACKOVA, S., KUCEROVA, A., MICHLITS, G., KYJACOVA, L., REINIS, M., KOROLOV, O., BARTEK, J. & HODNY, Z. 2016. IFN-gamma induces oxidative stress, DNA damage and tumor cell senescence via TGFbeta/SMAD signaling-dependent induction of Nox4 and suppression of ANT2. *Oncogene*, 35, 1236-49.
- HUNDER, N. N., WALLEN, H., CAO, J., HENDRICKS, D. W., REILLY, J. Z., RODMYRE, R., JUNGBLUTH, A., GNJATIC, S., THOMPSON, J. A. & YEE, C. 2008. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med*, 358, 2698-703.

- ITAHANA, K., CAMPISI, J. & DIMRI, G. P. 2007. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol*, 371, 21-31.
- JOHNSTON, S. T., SHAH, E. T., CHOPIN, L. K., SEAN MCELWAIN, D. L. & SIMPSON, M. J. 2015. Estimating cell diffusivity and cell proliferation rate by interpreting IncuCyte ZOOM™ assay data using the Fisher-Kolmogorov model. *BMC Systems Biology*, 9, 38.
- KAATSCH, P., GRABOW, D. & SPIX, C. 2019. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2018 (1980-2017). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 2019.
- KANG, T. W., YEWSA, T., WOLLER, N., HOENICKE, L., WUESTEFELD, T., DAUCH, D., HOHMEYER, A., GEREKE, M., RUDALSKA, R., POTAPOVA, A., IKEN, M., VUCUR, M., WEISS, S., HEIKENWALDER, M., KHAN, S., GIL, J., BRUDER, D., MANNS, M., SCHIRMACHER, P., TACKE, F., OTT, M., LUEDDE, T., LONGERICH, T., KUBICKA, S. & ZENDER, L. 2011. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479, 547-51.
- KEVIN J. TRACEY, M. D. & ANTHONY CERAMI, P. D. 1994. TUMOR NECROSIS FACTOR: A Pleiotropic Cytokine and Therapeutic Target. *Annual Review of Medicine*, 45, 491-503.
- KONSMAN, J. P., PARNET, P. & DANTZER, R. 2002. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci*, 25, 154-9.
- KUILMAN, T., MICHALOGLU, C., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev*, 24, 2463-79.
- KUILMAN, T. & PEEPER, D. S. 2009. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer*, 9, 81.
- LADENSTEIN, R., AMBROS, I. M., POTSCHGER, U., AMANN, G., URBAN, C., FINK, F. M., SCHMITT, K., JONES, R., SLOCIAK, M., SCHILLING, F., RITTER, J., BERTHOLD, F., GADNER, H. & AMBROS, P. F. 2001. Prognostic significance of DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*, 36, 83-92.
- LANDSBERG, J., KOHLMAYER, J., RENN, M., BALD, T., ROGAVA, M., CRON, M., FATHO, M., LENNERZ, V., WOLFEL, T., HOLZEL, M. & TUTING, T. 2012. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature*, 490, 412-6.
- LASSMANN, M. & TREVES, S. T. 2014. Paediatric radiopharmaceutical administration: harmonization of the 2007 EANM paediatric dosage card (version 1.5.2008) and the 2010 North American consensus guidelines. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 41, 1036-41.
- LAWLESS, C., WANG, C., JURK, D., MERZ, A., ZGLINICKI, T. & PASSOS, J. F. 2010. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp Gerontol*, 45, 772-8.
- LEE, B. Y., HAN, J. A., IM, J. S., MORRONE, A., JOHUNG, K., GOODWIN, E. C., KLEIJER, W. J., DIMAIO, D. & HWANG, E. S. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5, 187-95.
- LEE, M. & LEE, J.-S. 2014. Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy. *BMB reports*, 47, 51-59.
- LIMPT, V. V., SCHRAMM, A., LAKEMAN, A., SLUIS, P. V., CHAN, A., NOESEL, M. V., BAAS, F., CARON, H., EGGERT, A. & VERSTEEG, R. 2004. The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas. *Oncogene*, 23, 9280-9288.
- LOPES-PACIENCIA, S., SAINT-GERMAIN, E., ROWELL, M. C., RUIZ, A. F., KALEGARI, P. & FERBEYRE, G. 2019. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*, 117, 15-22.
- MAH, A. Y. & COOPER, M. A. 2016. Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN- γ Production. *Critical reviews in immunology*, 36, 131-147.
- MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A. & LOCATI, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25, 677-686.
- MARIS, J. M. 2010. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*, 362, 2202-11.
- MASSARON, S., SEREGNI, E., LUKSCH, R., CASANOVA, M., BOTTI, C., FERRARI, L., MARTINETTI, A., MOLTENI, S. N., BELLANI, F. F. & BOMBARDIERI, E. 1998. Neuron-specific enolase evaluation in patients with neuroblastoma. *Tumour Biol*, 19, 261-8.

- MATTHAY, K. K., GEORGE, R. E. & YU, A. L. 2012. Promising therapeutic targets in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 18, 2740-53.
- MCKENZIE, J. A. & RIDLEY, A. J. 2007. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability. *J Cell Physiol*, 213, 221-8.
- MEHTA, A. K., GRACIAS, D. T. & CROFT, M. 2018. TNF activity and T cells. *Cytokine*, 101, 14-18.
- MOLENAAR, J. J., KOSTER, J., ZWIJNENBURG, D. A., VAN SLUIS, P., VALENTIJN, L. J., VAN DER PLOEG, I., HAMDI, M., VAN NES, J., WESTERMAN, B. A., VAN ARKEL, J., EBUS, M. E., HANEVELD, F., LAKEMAN, A., SCHILD, L., MOLENAAR, P., STROEKEN, P., VAN NOESEL, M. M., ORA, I., SANTO, E. E., CARON, H. N., WESTERHOUT, E. M. & VERSTEEG, R. 2012. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature*, 483, 589-93.
- MORENO, L., CARON, H., GEOERGER, B., EGGERT, A., SCHLEIERMACHER, G., BROCK, P., VALTEAU-COUANET, D., CHESLER, L., SCHULTE, J. H., DE PRETER, K., MOLENAAR, J., SCHRAMM, A., EILERS, M., VAN MAERKEN, T., JOHNSEN, J. I., GARRETT, M., GEORGE, S. L., TWEDDLE, D. A., KOGNER, P., BERTHOLD, F., KOSTER, J., BARONE, G., TUCKER, E. R., MARSHALL, L., HEROLD, R., STERBA, J., NORGA, K., VASSAL, G. & PEARSON, A. D. 2017. Accelerating drug development for neuroblastoma - New Drug Development Strategy: an Innovative Therapies for Children with Cancer, European Network for Cancer Research in Children and Adolescents and International Society of Paediatric Oncology Europe Neuroblastoma project. *Expert Opin Drug Discov*, 12, 801-811.
- MULLER-HERMELINK, N., BRAUMULLER, H., PICHLER, B., WIEDER, T., MAILHAMMER, R., SCHAACK, K., GHORESCHI, K., YAZDI, A., HAUBNER, R., SANDER, C. A., MOCIKAT, R., SCHWAIGER, M., FORSTER, I., HUSS, R., WEBER, W. A., KNEILLING, M. & ROCKEN, M. 2008. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell*, 13, 507-18.
- MURPHY, J. M. & LA QUAGLIA, M. P. 2014. Advances in the surgical treatment of neuroblastoma: a review. *Eur J Pediatr Surg*, 24, 450-6.
- MURRAY, H. W. 1988. Interferon-Gamma, the Activated Macrophage, and Host Defense Against Microbial Challenge. *Annals of Internal Medicine*, 108, 595-608.
- MURRAY, H. W., RUBIN, B. Y. & ROTHERMEL, C. D. 1983. Killing of intracellular Leishmania donovani by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *J Clin Invest*, 72, 1506-10.
- NAM, S. O., YOTSUMOTO, F., MIYATA, K., SOUZAKI, R., TAGUCHI, T., KUROKI, M. & MIYAMOTO, S. 2015. Validity of HB-EGF as Target for Human Neuroblastoma Therapy. *Anticancer Res*, 35, 4433-40.
- NARATH, R., AMBROS, I. M., KOWALSKA, A., BOZSAKY, E., BOUKAMP, P. & AMBROS, P. F. 2007. Induction of senescence in MYCN amplified neuroblastoma cell lines by hydroxyurea. *Genes Chromosomes Cancer*, 46, 130-42.
- NARITA, M., NARITA, M., KRIZHANOVSKY, V., NUÑEZ, S., CHICAS, A., HEARN, S. A., MYERS, M. P. & LOWE, S. W. 2006. A Novel Role for High-Mobility Group A Proteins in Cellular Senescence and Heterochromatin Formation. *Cell*, 126, 503-514.
- NARITA, M., NUNEZ, S., HEARD, E., NARITA, M., LIN, A. W., HEARN, S. A., SPECTOR, D. L., HANNON, G. J. & LOWE, S. W. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113, 703-16.
- NATHAN, C. F., MURRAY, H. W., WIEBE, M. E. & RUBIN, B. Y. 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 158, 670.
- NEUHAUS, T., TOTZKE, G., GRUENEWALD, E., JUESTEN, H. P., SACHINIDIS, A., VETTER, H. & KO, Y. 2000. Tumour necrosis factor-alpha gene expression and production in human umbilical arterial endothelial cells. *Clin Sci (Lond)*, 98, 461-70.
- NIEMEYER, C. & EGGERT, A. 2018. pädiatrische Hämatologie und Onkologie. *Springer*, 2. Auflage, S. 424.
- NOGAWA, M., YUASA, T., KIMURA, S., KURODA, J., SATO, K., SEGAWA, H., YOKOTA, A. & MAEKAWA, T. 2005. Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different in vivo models. *Cancer Letters*, 217, 243-253.

- NOREN HOOTEN, N. & EVANS, M. K. 2017. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 55533.
- OBERLEITNER, B., MANETTO, A. & FRISCHMUTH, T. 2014. EdU statt BrdU: eine Alternative zur Detektion der Zellproliferation. *BIOspektrum*, 20, 188-190.
- OBERTHUER, A., JURAEVA, D., HERO, B., VOLLAND, R., STERZ, C., SCHMIDT, R., FALDUM, A., KAHLERT, Y., ENGESSER, A., ASGHARZADEH, S., SEEGER, R., OHIRA, M., NAKAGAWARA, A., SCARUFFI, P., TONINI, G. P., JANOUeix-LEROSEY, I., DELATTRE, O., SCHLEIERMACHER, G., VANDESOMPELE, J., SPELEMAN, F., NOGUERA, R., PIQUERAS, M., BENARD, J., VALENT, A., AVIGAD, S., YANIV, I., GRUNDY, R. G., ORTMANN, M., SHAO, C., SCHWAB, M., EILS, R., SIMON, T., THEISSEN, J., BERTHOLD, F., WESTERMANN, F., BRORS, B. & FISCHER, M. 2015. Revised risk estimation and treatment stratification of low- and intermediate-risk neuroblastoma patients by integrating clinical and molecular prognostic markers. *Clin Cancer Res*, 21, 1904-15.
- ONITAKE, Y., HIYAMA, E., KAMEI, N., YAMAOKA, H., SUEDA, T. & HIYAMA, K. 2009. Telomere biology in neuroblastoma: telomere binding proteins and alternative strengthening of telomeres. *J Pediatr Surg*, 44, 2258-66.
- ORIGONE, P., DEFFERRARI, R., MAZZOCCO, K., LO CUNSOLO, C., DE BERNARDI, B. & TONINI, G. P. 2003. Homozygous inactivation of NF1 gene in a patient with familial NF1 and disseminated neuroblastoma. *Am J Med Genet A*, 118a, 309-13.
- PARAMESWARAN, N. & PATIAL, S. 2010. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 20, 87-103.
- PEIFER, M., HERTWIG, F., ROELS, F., DREIDAX, D., GARTLGRUBER, M., MENON, R., KRAMER, A., RONCAIOLI, J. L., SAND, F., HEUCKMANN, J. M., IKRAM, F., SCHMIDT, R., ACKERMANN, S., ENGESSER, A., KAHLERT, Y., VOGEL, W., ALTMULLER, J., NURNBERG, P., THIERRY-MIEG, J., THIERRY-MIEG, D., MARIAPPAN, A., HEYNCK, S., MARIOTTI, E., HENRICH, K. O., GLOECKNER, C., BOSCO, G., LEUSCHNER, I., SCHWEIGER, M. R., SAVELYEVA, L., WATKINS, S. C., SHAO, C., BELL, E., HOFER, T., ACHTER, V., LANG, U., THEISSEN, J., VOLLAND, R., SAADATI, M., EGGERT, A., DE WILDE, B., BERTHOLD, F., PENG, Z., ZHAO, C., SHI, L., ORTMANN, M., BUTTNER, R., PERNER, S., HERO, B., SCHRAMM, A., SCHULTE, J. H., HERRMANN, C., O'SULLIVAN, R. J., WESTERMANN, F., THOMAS, R. K. & FISCHER, M. 2015. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature*, 526, 700-4.
- PEREZ-MANCERA, P. A., YOUNG, A. R. & NARITA, M. 2014. Inside and out: the activities of senescence in cancer. *Nat Rev Cancer*, 14, 547-58.
- PIECHOTA, M., SUNDERLAND, P., WYSOCKA, A., NALBERCZAK, M., SLIWINSKA, M. A., RADWANSKA, K. & SIKORA, E. 2016. Is senescence-associated β -galactosidase a marker of neuronal senescence? *Oncotarget*, 7, 81099-81109.
- PINTO, N. R., APPLEBAUM, M. A., VOLCHENBOUM, S. L., MATTHAY, K. K., LONDON, W. B., AMBROS, P. F., NAKAGAWARA, A., BERTHOLD, F., SCHLEIERMACHER, G., PARK, J. R., VALTEAU-COUANET, D., PEARSON, A. D. & COHN, S. L. 2015. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 33, 3008-17.
- POBER, J. S. & COTRAN, R. S. 1990. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev*, 70, 427-51.
- PUGH, T. J., MOROZOVA, O., ATTIYEH, E. F., ASGHARZADEH, S., WEI, J. S., AUCLAIR, D., CARTER, S. L., CIBULSKIS, K., HANNA, M., KIEZUN, A., KIM, J., LAWRENCE, M. S., LICHENSTEIN, L., MCKENNA, A., PEDAMALLU, C. S., RAMOS, A. H., SHEFLER, E., SIVACHENKO, A., SOUGNEZ, C., STEWART, C., ALLY, A., BIROL, I., CHIU, R., CORBETT, R. D., HIRST, M., JACKMAN, S. D., KAMOH, B., KHODABAKSHI, A. H., KRZYWINSKI, M., LO, A., MOORE, R. A., MUNGALL, K. L., QIAN, J., TAM, A., THIESSEN, N., ZHAO, Y., COLE, K. A., DIAMOND, M., DISKIN, S. J., MOSSE, Y. P., WOOD, A. C., JI, L., SPOSTO, R., BADGETT, T., LONDON, W. B., MOYER, Y., GASTIER-FOSTER, J. M., SMITH, M. A., GUIDRY AUVIL, J. M., GERHARD, D. S., HOGARTY, M. D., JONES, S. J., LANDER, E. S., GABRIEL, S. B., GETZ, G., SEEGER, R. C., KHAN, J., MARRA, M. A., MEYERSON, M. & MARIS, J. M. 2013. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet*, 45, 279-84.

- QUAH, B. J. & PARISH, C. R. 2010. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *J Vis Exp*.
- RAU, B., PISO, P. & KÖNIGSRAINER, A. 2018a. Peritoneale Tumoren und Metastasen: Operative, intraperitoneale und systemische Therapie. *Springer*, S. 145.
- RAU, B., PISO, P. & KÖNIGSRAINER, A. 2018b. Peritoneale Tumoren und Metastasen: Operative, intraperitoneale und systemische Therapie. *Springer*, S. 147.
- REN, J.-L., PAN, J.-S., LU, Y.-P., SUN, P. & HAN, J. 2009. Inflammatory signaling and cellular senescence. *Cellular signalling*, 21, 378-383.
- RENTSCHLER, M., CHEN, Y., PAHL, J., SORIA-MARTINEZ, L., BRAUMÜLLER, H., BRENNER, E., BISCHOF, O., RÖCKEN, M. & WIEDER, T. 2018. Nuclear Translocation of Argonaute 2 in Cytokine-Induced Senescence. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51, 1103-1118.
- RIZVI, N. A., HELLMANN, M. D., SNYDER, A., KVISTBORG, P., MAKAROV, V., HAVEL, J. J., LEE, W., YUAN, J., WONG, P., HO, T. S., MILLER, M. L., REKHTMAN, N., MOREIRA, A. L., IBRAHIM, F., BRUGGEMAN, C., GASMI, B., ZAPPASODI, R., MAEDA, Y., SANDER, C., GARON, E. B., MERGHOUB, T., WOLCHOK, J. D., SCHUMACHER, T. N. & CHAN, T. A. 2015. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348, 124-8.
- RODIER, F. & CAMPISI, J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 192, 547-56.
- SAHASRABUDHE, K., OTTO, M., HEMATTI, P. & KENKRE, V. 2019. TCR $\alpha\beta$ /CD19+ cell depletion in haploidentical hematopoietic allogeneic stem cell transplantation: a review of current data. *Leuk Lymphoma*, 60, 598-609.
- SALAMA, R., SADAIE, M., HOARE, M. & NARITA, M. 2014. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev*, 28, 99-114.
- SCHAIBLE, U. E., COLLINS, H. L. & KAUFMANN, S. H. 1999. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv Immunol*, 71, 267-377.
- SCHILBACH, K., ALKHALED, M., WELKER, C., ECKERT, F., BLANK, G., ZIEGLER, H., STERK, M., MULLER, F., SONNTAG, K., WIEDER, T., BRAUMULLER, H., SCHMITT, J., EYRICH, M., SCHLEICHER, S., SEITZ, C., ERBACHER, A., PICHLER, B. J., MULLER, H., TIGHE, R., LIM, A., GILLIES, S. D., STRITTMATTER, W., ROCKEN, M. & HANDGRETINGER, R. 2015. Cancer-targeted IL-12 controls human rhabdomyosarcoma by senescence induction and myogenic differentiation. *Oncimmunology*, 4, e1014760.
- SCHÖNENBERGER, F., DEUTZMANN, A., FERRANDO-MAY, E. & MERHOF, D. 2015. Discrimination of cell cycle phases in PCNA-immunolabeled cells. *BMC Bioinformatics*, 16, 180.
- SCHULZ, E. G., MARIANI, L., RADBRUCH, A. & HÖFER, T. 2009. Sequential Polarization and Imprinting of Type 1 T Helper Lymphocytes by Interferon- γ and Interleukin-12. *Immunity*, 30, 673-683.
- SCHWAB, M. 1990. [Amplification of N-myc in neuroblastoma: paradigm for clinical use of an oncogene alteration]. *Klin Padiatr*, 202, 197-201.
- SHARPLESS, N. E. & SHERR, C. J. 2015. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*, 15, 397-408.
- SHIMADA, H., AMBROS, I. M., DEHNER, L. P., HATA, J., JOSHI, V. V. & ROALD, B. 1999. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*, 86, 349-63.
- SIMON, T., HERO, B., EGGERT, A., LODE, H., FISCHER, M., TIMMERMANN, B., SCHWARZ, R., FUCHS, J., VON SCHWEINITZ, D., VOKUHL, C., SCHMIDT, M., KÖRBER, F. & SCHÄFER, J. 2019. Leitlinie: Neuroblastom.
- SIMON, T., HERO, B., SCHULTE, J. H., DEUBZER, H., HUNDSDOERFER, P., VON SCHWEINITZ, D., FUCHS, J., SCHMIDT, M., PRASAD, V., KRUG, B., TIMMERMANN, B., LEUSCHNER, I., FISCHER, M., LANGER, T., ASTRAHANTSEFF, K., BERTHOLD, F., LODE, H. & EGGERT, A. 2017. 2017 GPOH Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients with Neuroblastic Tumors. *Klin Padiatr*, 229, 147-167.
- SOBECKI, M., MROUJ, K., COLINGE, J., GERBE, F., JAY, P., KRASINSKA, L., DULIC, V. & FISHER, D. 2017. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res*, 77, 2722-2734.

- SUCKER, A., ZHAO, F., PIEPER, N., HEEKE, C., MALTANER, R., STADTLER, N., REAL, B., BIELEFELD, N., HOWE, S., WEIDE, B., GUTZMER, R., UTIKAL, J., LOQUAI, C., GOGAS, H., KLEIN-HITPASS, L., ZESCHNIGK, M., WESTENDORF, A. M., TRILLING, M., HORN, S., SCHILLING, B., SCHADENDORF, D., GRIEWANK, K. G. & PASCHEN, A. 2017. Acquired IFN γ resistance impairs anti-tumor immunity and gives rise to T-cell-resistant melanoma lesions. *Nat Commun*, 8, 15440.
- TACCHINI-COTTIER, F., VESIN, C., REDARD, M., BUURMAN, W. & PIGUET, P. F. 1998. Role of TNFR1 and TNFR2 in TNF-Induced Platelet Consumption in Mice. *The Journal of Immunology*, 160, 6182.
- TARTAGLIA, L. A. & GOEDDEL, D. V. 1992. Two TNF receptors. *Immunology Today*, 13, 151-153.
- THIELE, C. 1998. Neuroblastoma Cell Lines. *J. Human Cell Culture*, 1, 21-53.
- TIFFEN, J. C., BAILEY, C. G., NG, C., RASKO, J. E. J. & HOLST, J. 2010. Luciferase expression and bioluminescence does not affect tumor cell growth in vitro or in vivo. *Molecular Cancer*, 9, 299.
- TRACEY, K. J., FONG, Y., HESSE, D. G., MANOGUE, K. R., LEE, A. T., KUO, G. C., LOWRY, S. F. & CERAMI, A. 1987. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*, 330, 662-4.
- UNANUE, E. R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol*, 2, 395-428.
- VALENTIJN, L. J., KOSTER, J., ZWIJNENBURG, D. A., HASSELT, N. E., VAN SLUIS, P., VOLCKMANN, R., VAN NOESEL, M. M., GEORGE, R. E., TYTGAT, G. A., MOLENAAR, J. J. & VERSTEEG, R. 2015. TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors. *Nat Genet*, 47, 1411-4.
- VANDENBERK, B., BROUWERS, B., HATSE, S. & WILDIERS, H. 2011. p16INK4a: A central player in cellular senescence and a promising aging biomarker in elderly cancer patients. *Journal of Geriatric Oncology*, 2, 259-269.
- WATERS, J. P., POBER, J. S. & BRADLEY, J. R. 2013. Tumour necrosis factor in infectious disease. *J Pathol*, 230, 132-47.
- WHITMIRE, J. K., TAN, J. T. & WHITTON, J. L. 2005. Interferon- γ acts directly on CD8⁺ T cells to increase their abundance during virus infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 201, 1053.
- WIEDER, T., BRAUMULLER, H., BRENNER, E., ZENDER, L. & ROCKEN, M. 2013. Changing T-cell enigma: cancer killing or cancer control? *Cell Cycle*, 12, 3146-53.
- WIEDER, T., BRENNER, E., BRAUMULLER, H., BISCHOF, O. & ROCKEN, M. 2017. Cytokine-induced senescence for cancer surveillance. *Cancer Metastasis Rev*, 36, 357-365.
- WIEDER, T., EIGENTLER, T., BRENNER, E. & ROCKEN, M. 2018. Immune checkpoint blockade therapy. *J Allergy Clin Immunol*, 142, 1403-1414.
- ZHENG, C., SHEN, R., LI, K., ZHENG, N., ZONG, Y., YE, D., WANG, Q., WANG, Z., CHEN, L. & MA, Y. 2016. Epidermal growth factor receptor is overexpressed in neuroblastoma tissues and cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 48, 762-7.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen in der Abteilung für Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie unter Betreuung von Prof. Dr. Peter Lang durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden mit Unterstützung durch meinen Betreuer Florian Heubach durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig und nach Beratung durch das Institut für Biometrie, sowie nach Anleitung durch Florian Heubach durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 04.01.2021

Unterschrift

8. Veröffentlichungen

Posterpräsentation und Einreichung eines Abstracts:

CRI-CIMT-EATI-AACR Fourth International Cancer Immunotherapy Conference, 30th September - 3th October 2018, New York City

- https://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/7/2_Supplement/A080

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Lang bedanken. Er hat mir die Möglichkeit gegeben in seiner Arbeitsgruppe zu forschen und diese Dissertation zu schreiben. Während der kompletten Zeit profitierte ich immer wieder von seiner konstruktiven Kritik und ich konnte mich immer wieder mit meinen Fragen an ihn wenden. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Florian Heubach. Du hast mich immer unterstützt und ich konnte mit all meinen Fragen jeder Zeit zu Dir kommen. Diese Unterstützung hat mir die Arbeit unendlich erleichtert. Meiner kompletten Arbeitsgruppe (Florian Heubach, Anne-Marie Lang, Armin Rabsteyn und Roksana Wojcik) danke ich für das tolle Arbeitsklima. Ich habe mich bei Euch während meiner Zeit im Labor und auch danach immer wohl und aufgehoben gefühlt.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Apl. Prof. Dr. Thomas Wieder, Leiter der AG Signaltransduktion der Seneszenz an der Hautklinik des Universitätsklinikums Tübingen. Er hat mich immer wieder in den Methoden zum Nachweis einer Seneszenz unterstützt, mir neue Denkanstöße und Tipps gegeben und mir alle meine Fragen beantwortet.

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Für die Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Eichner herzlich bedanken.

Auch bei meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden bedanke ich mich für: Euer offenes Ohr, Eure Unterstützung und Eure Motivation. Ich danke euch allen von Herzen! Ihr habt mir die Arbeit sehr erleichtert.