

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Claus Belka

**Charakterisierung lokaler und systemischer immunologischer Effekte  
nach intra-operativer Strahlentherapie des Mammakarzinoms**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anna-Maria Tiefenthaller

aus Scharnstein

2023

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Kirsten Lauber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Sebastian Kobold

PD Dr Kristian Unger

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2023

*Meiner Familie  
und  
Konstantin*

Diese Arbeit wurde durch die Heuer-Stiftung sowie das Förderprogramm *Immunotargeting of Cancer iTarget* des Elitenetzwerks Bayern unterstützt.

# **1. Inhaltsverzeichnis**

1. Inhaltsverzeichnis .....	5
2. Abkürzungsverzeichnis .....	8
3. Abstract.....	10
4. Einführung .....	12
4.1. Therapie des Mammakarzinoms und klinische Hintergründe.....	12
4.2. Molekularonkologische Grundlagen der Strahlentherapie beim Mammakarzinom .....	13
4.2.1. Der abskopale Effekt.....	13
4.2.2. Strahlungsinduzierte Formen des Zelltodes und ihre Verbindung zu Anti-Tumor- Immunmechanismen.....	14
4.2.3. Interaktionen zwischen Tumor und Immunsystem.....	15
4.2.4. Strahlendosen höherer Intensität als Induktor von Anti-Tumor-Immunmechanismen .....	17
5. Ziel der Arbeit .....	19
6. Material und Methoden .....	20
6.1. Materialien .....	20
6.1.1. Hersteller .....	20
6.1.2. Verwendete Zellen .....	21
6.1.3. Reagenzien.....	21
6.1.4. Zusammensetzung hergestellter Reagenzien.....	22
6.1.5. Antikörper.....	22
6.1.6. Kommerziell verfügbare Kits .....	23
6.1.7. Verbrauchsmaterialien .....	23
6.1.8. Geräte .....	24
6.1.9. Software .....	24
6.2. Methoden .....	25
6.2.1. Studiendesign .....	25
6.2.2. Patientenrekrutierung .....	25
6.2.3. Gewinnung von Biomaterial .....	26
6.2.4. Bestimmung hämatologischer Parameter.....	26

6.2.5. Zellkultur.....	27
6.2.6. FACS-Analyse .....	27
6.2.7. Aufbewahrung von Biomaterial.....	30
6.2.8. Multiplex-ELISA.....	30
6.2.9. ELISA .....	31
6.2.10. RNA-Sequenzierung.....	32
6.2.11. Anamnestische Datenanalyse.....	32
6.2.12. Statistische Analyse .....	32
<b>7. Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
7.1. Die Kohorten sind hinsichtlich klinischer und histologischer Daten im Wesentlichen vergleichbar ..	33
.....	
7.2. Einblutungsgrad, Volumen und Zellularität der Wundflüssigkeitsproben in beiden Kohorten sind im Wesentlichen vergleichbar .....	35
7.3. IORT mit 20 Gy induziert eine verstärkte Rekrutierung von Monozyten, eosinophilen Granulozyten, pDCs und B-Zellen in die Tumorloge .....	36
7.3.1. IORT induziert einen lokalen und systemischen Anstieg eosinophiler Granulozyten.....	37
7.3.2. Rekrutierung von Monozyten und insbesondere klassischen Monozyten nach IORT in Blut und Wundflüssigkeit .....	37
7.3.3. IORT induziert die Einwanderung plasmazytoider dendritischer Zellen ins Wundbett .....	38
7.3.4. Rekrutierung von B-Zellen in die Wundflüssigkeit nach IORT .....	38
7.3.5. Die Kohorten unterscheiden sich hinsichtlich der Immunzellgruppen .....	38
7.4. IORT mit 20 Gy induziert in Normalgewebszellen der Brust eine Seneszenz-Antwort in vitro und die Menge bestimmter Seneszenz-assozierter Zytokine korreliert mit den rekrutierten Immunzellen in der Wundflüssigkeit .....	39
7.4.1. Normalgewebszellen der Brust reagieren auf Bestrahlung mit hohen Einzeldosen vorwiegend mit einer Seneszenz-Antwort .....	39
7.4.2. MIF und IL-3 zeigen höchste Korrelationen zwischen zellulären und humoralen Analysen und sind in der Wundflüssigkeit nach IORT erhöht.....	40
7.4.3. MIF und IL-3 werden in vitro nach Bestrahlung von Normalgewebszellen der Brust produziert .....	41
7.5. Zytokin-zu-Zytokin-Korrelationsanalysen identifizieren drei Cluster von Zytokinen, die über verschiedene Transkriptionsfaktor-Netzwerke gesteuert werden .....	41

7.6. Die <i>Gene-Set-Enrichment</i> -Analysen von RNA-Sequenzierungsdaten in Wundflüssigkeitszellen zeigen eine Aktivierung von Immunzellen unter Beteiligung von NFκB-, JAK-STAT-, TGF-β- und Hypoxie-assoziierten Signalwegen nach IORT .....	43
8. Diskussion .....	47
8.1. Eine Vergleichbarkeit der Patientenkohorten ist im Wesentlichen gegeben .....	49
8.2. IORT induziert die Einwanderung distinkter Immunzell-Populationen mit Antigen-präsentierenden Fähigkeiten ins Wundbett .....	50
8.3. Die Seneszenz-Induktion und Zytokin-Produktion im Normalgewebe stellen potenzielle Mechanismen für die Immunzellrekrutierung nach IORT dar .....	54
8.4. IORT aktiviert inflammatorische Gensets in den rekrutierten Immunzellen .....	57
9. Zusammenfassung .....	61
10. Literaturverzeichnis .....	62
11. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	71
12. Angaben zur Studiendurchführung .....	72
13. Danksagung .....	75
14. Affidavit .....	77
15. Publikationsliste .....	78

## 2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Al	Aluminium
APC	<i>Antigen-Presenting-Cell</i> (dt.: Antigen-päsentierende Zelle)
APC	Allophycocyanin
C <sub>12</sub> FDG	5-Dodecanoylaminoflourescein-di-β-D-Galaktopyranosid
CD	<i>Cluster-of-Differentiation</i> (dt.: Unterscheidungsmerkmal)
cDC	<i>Classical Dendritic-Cell</i> (dt.: klassische Dendritische Zelle)
CEPB	<i>CCAAT-Enhancer-Bindungsprotein-β</i>
cGAMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat
cGAS	Zyklische GMP-AMP-Synthase
Cu	Kupfer
d.h.	Das heißt
dt.	Deutsch
DAMPs	<i>Damage-Associated-Molecular-Patterns</i> (dt.: Schadens-assoziierte molekulare Strukturen)
DC	<i>Dendritic-Cell</i> (dt.: Dendritische Zelle)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's-Phosphate-Buffered-Saline</i> (dt.: Phosphatpufferlösung nach Dulbecco)
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
et al.	<i>Et alii</i> (dt.: und andere)
FACS	<i>Flourescence-Activated-Cell-Sorting</i> (dt.: Durchflusszytometrie)
FCS	<i>Fetal-Calf-Serum</i> (dt. Fetales Kälberserum)
FDR	<i>False-Discovery-Rate</i> (dt.: Falscherkennungsrate)
FGFR	<i>Fibroblast-Growth-Factor-Receptor</i> (dt.: Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor)
FITC	Flourescein-Isothiocyanat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	<i>Grading</i> (dt.: Graduierung)
GSEA	<i>Gene-Set-Enrichment-Analysis</i> (dt.: Analyse auf Anreicherung von Gensets)
Gy	Gray
h	Stunde
HGF	<i>Hepatocyte-Growth-Factor</i> (dt.: Hepatozyten-Wachstumsfaktor)
HIF-1α	<i>Hypoxia-inducible-Factor-1α</i> (dt.: Hypoxie-indizierbarer Faktor 1α)
HMEC	<i>Human-Mammary-Epithelial-Cells</i> (dt.: Humane Brustepithelzellen)
HMGB-1	<i>High-Mobility-Group-Box-1</i>
HSP	<i>Heat-Shock-Protein</i> (dt.: Hitzeschock-Protein)
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i> (dt.: Meerrettich-Peroxidase)
HUVEC	<i>Human-Umbilical-Vein-Endothelial-Cells</i> (dt.: humane Nabelven-Endothelzellen)
H <sub>2</sub> O	Wasser
i. d. R.	In der Regel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IORT	<i>Interoperative-Radiotherapy</i> (dt.: intra-operative Strahlentherapie)
IRF3	<i>Interferon-Regulatory-Factor-3</i> (dt.: Interferon-Regulations-Faktor 3)
JAK	Januskinase
Jhd. <sup>t</sup>	Jahrhundert
KO	Krome Orange
kV	Kilovolt
lat.	Lateinisch

mA	Milliampere
MDSC	<i>Myeloid-derived-Suppressor-Cell</i> (dt.: Myeloide Suppressor-Zelle)
MHC	<i>Major-Histocompatibility-Complex</i> (dt.: Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex)
MIF	<i>Macrophage-Migration-Inhibitory-Factor</i> (dt.: Makrophagen-Migrations-Hemmfaktor)
min	Minute
ml	Milliliter
mTOR	<i>Mammalian-Target-of-Rapamycin</i> (dt.: Rapamycin-Ziel im Säugetier)
µl	Mikroliter
NES	<i>Normalized-Enrichment-Score</i> (dt.: normierte Anreicherungs-Skala)
NFkB	<i>Nuclear-Factor-κ-Light-Chain-Enhancer-of-Activated-B-Cells</i>
ng	Nanogramm
NTP	Nukleotid-Triphosphat
NHDF-Ad	<i>Human-Dermal-Fibroblasts-of-the-Adult</i> (dt.: humane adulte Haut-Fibroblasten)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
o.g.	Oben genannter
PD	<i>Programmed-Cell-Death-Protein</i> (dt.: Protein des programmierten Zelltodes)
pDC	<i>plasmacytoid Dendritic-Cell</i> (dt.: Plasmazytoide Dendritische Zelle)
PE	Phycoerythrin
PCC	Peridinin-Chlorophyll-Protein/Cyanin
PI	Propidium-Iodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PRR	<i>Pattern-Recognition-Receptor</i> (dt.: Mustererkennungsrezeptor)
RAS	Ras-GTPase-codierendes Gen
REL	Codierendes Gen für Rel, ein Teilprotein von NFkB
RNA	<i>Ribonucleic-Acid</i> (dt.: Ribonukleinsäure)
ROS	<i>Reactive-Oxygen-Species</i> (dt.: Reaktive Sauerstoffspezies)
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SA-βgal	Seneszenz-assoziierte Beta-Galaktosidase
SASP	Seneszenzassoziiert Sekretorischer Phänotyp
SMAD	Familie der SMAD-Proteine
Sn	Zinn
SSC	<i>Sideward-Scatter</i> (dt.: Seitwärts-Streulicht)
STAT	<i>Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription-Protein-Family</i> (dt.: Proteinfamilie der Signalgeber und Transkriptionsaktivatoren)
STING	<i>Stimulator-of-Interferon-Genes</i> (dt.: Stimulator von Interferongenen)
Tab.	Tabelle
TAM	Tumorassozierter Makrophage
TGF	<i>Transforming-Growth-Factor</i> (dt.: Transformierender Wachstumsfaktor)
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
u.a.	Unter anderem
v.a.	Vor allem
VCAM	<i>Vascular-Cell-Adhesion-Molecule</i> (dt.: Gefäßzell-Adhäsionsmolekül)
x	Mal
%	Prozent
°C	Grad Celsius

### 3. Abstract

Die Strahlentherapie gilt als eine der Grundsäulen der onkologischen Therapie insbesondere nach einer brusterhaltenden Operation ein wesentlicher Bestandteil der Behandlung des Mammakarzinoms. Hierfür stehen Bestrahlungsschemata mit unterschiedlichen hohen Einzeldosen zur Verfügung, die von fraktionierten über hypofraktionierte bis hin zu ablativen Verfahren reichen. Die intra-operative Strahlentherapie (IORT) kommt als Methode mit hoher Bestrahlungsdosis noch unter Narkose der Tumor-Operation zum Einsatz und erlaubt nach Exzision des Tumors eine präzise Radiotherapie des ehemaligen Tumorbetts und damit eventuell verbliebener Tumorreste.

Präklinische Studien zeigen, dass die Strahlentherapie neben der Induktion von Tumorzelltod auch über Mechanismen der angeborenen und erworbenen Immunität einen wesentlichen Beitrag zur Tumorkontrolle leisten kann. Die Art des Tumorzelltodes scheint hierbei insofern eine wesentliche Rolle zu spielen, als hohe Einzeldosen eher zu nekrotischem Zelltod führen als fraktionierte. Über die konsekutive Freisetzung von *Damage-Associated-Molecular-Patterns (DAMPs)* und dadurch ausgelöste Reaktionen werden immunologische Signalkaskaden aktiviert, die zu einer Anti-Tumor-Immunität beitragen können. Ein wichtiger Schritt hierbei ist die Zugänglichkeit von Tumorzellen für das Immunsystem und damit die Modalitäten der Rekrutierung von Immunzellen in die nach Exzision verbleibende Tumorloge.

Um diese Beobachtungen aus In-vitro- und In-vivo-Experimenten in der klinischen Situation näher zu beleuchten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine klinische Begleitforschungsstudie konzipiert und durchgeführt, die peripheres Blut und Wundflüssigkeit von Mammakarzinom-Patientinnen nach brusterhaltender Operation mit und ohne IORT untersuchte. Das Biomaterial wurde auf Menge, Hämoglobingehalt und Gesamt-Leukozytenzahl untersucht und es wurden detaillierte Analysen zur Zusammensetzung der Leukozyten-Subpopulationen und Zytokin-Produktionsmuster sowie transkriptomische Charakterisierungen anhand von RNA-Sequenzierungs-Untersuchungen durchgeführt.

Nach IORT wanderten verstärkt Monozyten (insbesondere klassische Monozyten), eosinophile Granulozyten, plasmazytoide dendritische Zellen und B-Zellen ins ehemalige Tumorbett ein. Auf Zytokinebene ergaben sich in der Wundflüssigkeit der IORT-Patientinnen signifikant erhöhte Werte für MIF und IL-3. Beide Zytokine zeigten zudem eine signifikante Korrelation mit den eingewanderten Immunzellen, was auf eine Beteiligung an der Rekrutierung der Immunzellen hindeutet. Um dem Ursprung dieser beiden Zytokine nachzugehen, erfolgten ergänzende In-vitro-Versuche in nicht-malignem Normalgewebe. Hierbei zeigte sich nach Bestrahlung mit 20 Gy eine starke Seneszenz-Induktion mit einer gesteigerten Produktion von MIF und IL-3, sodass anzunehmen ist, dass bestrahltes, nicht-malignes Normalbrustgewebe an der Immunzell-Rekrutierung beteiligt ist.

Zur näheren Charakterisierung der Funktion der eingewanderten Leukozyten-Subpopulationen wurden Transkriptom-Analysen durch RNA-Sequenzierung und *Geneset-Enrichment*-Analysen durchgeführt. In der IORT-Kohorte zeigte sich eine Anreicherung von Genexpressionsmustern, die auf eine verstärkte

Inflammation hinweisen. Mechanismen, die mit den Transkriptionsfaktoren der NFkB- und STAT-Familie assoziiert sind, nahmen vorrangige Positionen ein und stellen damit auf Genexpressionsebene Schlüsselemente der immunologischen Antwort nach Bestrahlung mittels IORT dar.

Zusammenfassend liefert diese Studie erstmals Einblicke in die immunologischen Effekte nach höherdosierter Bestrahlung am Beispiel der IORT im klinischen Setting. Die dargestellten Ergebnisse zeigen lokale und systemische Effekte der IORT nach brusterhaltender Operation, bieten Einblicke in zugrundeliegende Immunzell-Rekrutierungsmuster, beleuchten die Involvierung des in diesem Zusammenhang bisher kaum untersuchten nicht-malignen Normalgewebes auf ionisierende Strahlung und verweisen auf dessen Beitrag bei der Rekrutierung von Immunzellen. Die Ergebnisse dieser Studie bilden in Zusammenschau mit präklinischen Vorpublikationen eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen und lenken das Interesse auf Bestrahlungsschemata mit höheren Einzeldosen zur gezielten immunologischen Modulation. Weitere Studien werden die lokalen und systemischen immunologischen Effekte der IORT näher charakterisieren und helfen, Therapiekonzepte, v.a. mit Hinblick auf Bestrahlungsdosen und deren zeitlicher Planung, weiter zu optimieren.

## **4. Einführung**

### **4.1. Therapie des Mammakarzinoms und klinische Hintergründe**

Die Strahlentherapie stellt neben der Chirurgie und der Chemotherapie einen Grundpfeiler in der Behandlung onkologischer Erkrankungen dar und wird etwa 60% der onkologischen Patient\*innen im Rahmen ihrer Krankheitsphase zuteil [1]. Insbesondere beim Mammakarzinom ist eine post-operative Bestrahlung nach brusterhaltender Operation ein wesentlicher Bestandteil der aktuellen Therapieleitlinien, da hierdurch insbesondere die lokoregionären Rezidivraten wesentlich reduziert werden können [2].

Für die adjuvante, sprich post-operative Strahlentherapie des Mammakarzinoms stehen verschiedene Schemata zur Verfügung. Entsprechend der aktuellen Interdisziplinären S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms von 2021 stellen hypofraktionierte und konventionell fraktionierte Schemata die momentanen adjuvanten Radiotherapiestandards der perkutanen Radiotherapie dar: Im Rahmen hypofraktionierter Schemata wird eine Gesamtdosis von ca. 40 Gy verteilt auf 15-16 Fraktionen über 3-5 Wochen auf das Tumorbett appliziert [3]. Eine konventionell fraktionierte Bestrahlung erfolgt hingegen in 25-28 werktäglichen Therapieeinheiten à 1,8-2,0 Gy mit einer Gesamtdosis von etwa 50 Gy über 5-6 Wochen [3].

Die aktuelle Datenlage zeigt, dass alle Mammakarzinom-Patientinnen nach brusterhaltender Operation von einem zusätzlichen Boost auf das ehemalige Tumorbett hinsichtlich lokaler Tumorkontrolle profitieren [3]. Diese lokale Dosissteigerung kann im Anschluss an das gewählte Bestrahlungsgrundschema als sogenannter sequenzieller Boost oder verteilt auf die einzelnen Fraktionen als simultan-integrierter Boost erfolgen [3]. Mögliche interstitielle Boost-Verfahren stellen die intraoperative Radiotherapie (IORT) oder die Brachytherapie dar [3].

Neben den genannten fraktionierten Schemata kommen auch Bestrahlungsverfahren mit höheren Einzeldosen von bis zu 20 Gy zum Einsatz [4]. Als Beispiel hierfür ist die intra-operative Radiotherapie (IORT) zu nennen. Im Rahmen der IORT wird direkt nach Exzision des Tumors noch in Narkose ein sphärischer Applikator eines mobilen Röntgengeräts durch die Inzisionsstelle in das ehemalige Tumorbett eingebracht und eine höhere Dosis niedrig-energetischer Röntgenstrahlung mit geringer Eindringtiefe appliziert [5, 6]. Dadurch kann eine sehr präzise, hochdosierte Bestrahlung der direkten ehemaligen Tumorumgebung oder sogar etwaiger verbliebener Tumorreste unter Schonung der Haut und des unterliegenden Gewebes gewährleistet werden [5, 6].

Je nach klinischer und histologischer Konstellation kann eine IORT somit die adjuvante perkutane Bestrahlung ersetzen oder als vorgezogener Boost dienen und somit die Therapiezeit entsprechend verkürzen [3].

## **4.2. Molekularonkologische Grundlagen der Strahlentherapie beim Mammakarzinom**

Die tumorbiologische Grundidee einer onkologischen Strahlentherapie versteht sich in der Induktion von zellulären DNA-Schäden und in weiterer Folge in der Induktion von Tumorzelltod durch ionisierende Strahlung [5]. Den gewünschten Unterschied in den Folgen der Strahlenwirkung zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe erlauben die Unterschiede der Gewebeeigenschaften, die u.a. die Reparatur von DNA-Schäden, Reoxygenierung, Redistribution hinsichtlich Zellzyklusphasen und die Repopulation von Gewebe betreffen – gemeinhin bekannt als “die vier R der Strahlentherapie” [7, 8]. Auf diesem Wissen fußen die heute geläufigen Bestrahlungsschemata, die sich die erhaltene Reparaturfähigkeit des gesunden, benignen Gewebes zwischen den Therapiefaktionen zunutze machen [5], die bei Tumorzellen verändert bzw. gestört verläuft [9]. Die Strahlentherapie zielt folglich durch exakte Bestrahlungsplanung auf eine hochpräzise lokoregionäre Tumorkontrolle ab, wobei die genannten strahlenbiologischen Eigenschaften eine Destruktion des Tumors bei gleichzeitiger Schonung des umliegenden benignen Gewebes erlauben [5].

Abgesehen von den Untersuchungsergebnissen zu lokalen Effekten der Strahlentherapie fanden sich in den letzten Jahrzehnten einige Fallberichte, in denen das Verschwinden von unbehandelten Metastasen oder Primärtumoren nach Bestrahlung einer oder mehrerer Metastasen beschrieben wurde [10, 11]. Diese Beobachtung wird als “abskopaler Effekt” [12] der Strahlentherapie bezeichnet und wurde bereits sehr früh mit einer systemischen Anti-Tumor-Immunantwort nach lokaler Bestrahlung in Verbindung gebracht [12, 13].

In den letzten Jahren verzeichnete die onkologische Forschung einen massiven Wissenszuwachs im Bereich der Tumor-Immunologie, was sich nicht zuletzt in einem Boom an Immuntherapien und hierbei vorrangig Immuncheckpoint-Blockern manifestierte, die mittlerweile bei verschiedenen Tumorentitäten Teil der klinischen Routine geworden sind [14]. Tumoren interagieren mit dem Immunsystem und entziehen sich teilweise dessen Überwachung, was einerseits die Tumorkontrolle erschwert, andererseits jedoch Angriffspunkte für neue Therapien bietet und insbesondere Kombinationstherapien, wie z.B. Stahlen- und Immuntherapie, ins Licht näherer Betrachtungen rückt [10, 15-17].

### **4.2.1. Der abskopale Effekt**

1953 prägte R. H. Mole den Begriff des “abskopalen Effekts” (Etymologie: lat. “ab”: entfernt von; griech. “scopós”: Ziel) [12] als Therapieeffekt außerhalb des Bestrahlungsgebietes [12].

Seit der ersten therapeutischen Applikation von Röntgenstrahlung Ende des 19. Jahrhunderts [18] sind mehrere Dutzend Fallberichte publiziert, in denen nach lokaler Strahlentherapie eine Regression oder gar ein Verschwinden unbestrahlter Metastasen oder Primärtumoren beschrieben wurde [10, 11]. Eine detailliertere Analyse der Fallberichte zeigt eine breite Heterogenität an Tumorentitäten und vorausgegangen Therapien, dennoch ist auffällig, dass diese abskopalen Effekte häufig bei älteren, palliativ behandelten Patient\*innen mit höheren Einzeldosen auftraten und bestimmte Tumorentitäten wie Melanome, Lymphome und Nierenzellkarzinome überrepräsentiert waren [10]. Werden diverse

Tumorentitäten hinsichtlich ihres Neoantigen-Repertoires gereiht, finden sich die genannten Entitäten unter denen mit hohem Neoantigenanteil [19, 20]. Da zelluläre Antigene insbesondere im Falle eines Tumorzelltodes Art und Ausmaß der daraus resultierenden immunologischen Antwort mitbestimmen [21], kann der Neoantigenanteil eines Tumors eine wichtige Rolle in der immunologischen Tumorkontrolle einnehmen [19].

Bei näherer Betrachtung der Fallberichte fällt auf, dass insbesondere Schemata mit höheren Strahlendosen, die aktuell häufig im palliativen Setting Verwendung finden [5], verstärkt immunologische Effekte induzieren [10]. Zudem finden sich in einzelnen Fallberichten Kombinationen von Strahlentherapie mit Immuntherapeutika, was auf einen synergistischen Effekt zwischen Strahlentherapie und Immuntherapie hindeutet [10, 11, 22-28].

#### **4.2.2. Strahlungsinduzierte Formen des Zelltodes und ihre Verbindung zu Anti-Tumor-Immunmechanismen**

Dosis und Fraktionierung der Bestrahlung scheinen somit einen Einfluss auf strahlungsinduzierte Immuneffekte zu haben. Am Beispiel einer präklinischen Arbeit mit murinen B16-Melanomen von Lugade et al. stellt sich die Frage, warum es im Falle höher dosierter Bestrahlung zu signifikant erhöhten Zahlen von Antigen-präsentierenden Zellen im Lymphknoten, höherer IFN- $\gamma$ -Sekretion und mehr antigenspezifischen T-Zellen im Tumor kommt, während diese Effekte in der fraktioniert bestrahlten Kohorte geringer ausgeprägt waren [29]. Einen möglichen Erklärungsansatz könnten die verschiedenen Formen des strahlungsinduzierten Zelltodes bieten, die folgend näher beleuchtet werden.

Die Apoptose verläuft als organisierter, programmierte Zelluntergang v.a. hämatopoetischer Zellen bei intakter Zellmembran und führt in weiterer Folge in der Regel zu Immuntoleranz hinsichtlich der freigesetzten Antigene der apoptotischen Zelle, da diese nach erfolgreicher Elimination durch Antigen-präsentierenden Zellen (APC) in einem eher anti-inflammatorischen Kontext präsentiert werden [21].

Nekrose hingegen versteht sich als lytischer Zelltod, der unkontrolliert bzw. akzidentell nach Exposition mit einem physikalischen oder chemischen Stressor auftreten kann oder auch sekundär post-apoptotisch, v.a. im Rahmen überschießender, für Phagozyten nicht unmittelbar bewältigbarer Apoptose zu beobachten ist [21]. Charakteristisch hierbei sind die Zerstörung der Zellmembran und der konsekutive Austritt intra-zellulärer Substanzen, die in ihrer Funktion als *Danger Signals* und *Damage-Associated-Molecular-Patterns (DAMPS)* Immunzellen anlocken [21]. Ergänzend zum unkontrollierten nekrotischen Zelltod sind Unterformen der Nekrose beschrieben, die kontrolliert ablaufen, wie etwa Nekroptose [21] oder Ferroptose [30], welche durch Veränderungen der zellulären Homöostase oder oxidative Prozesse über komplexe Signalwege gesteuert werden [30, 31].

Seneszenz beschreibt als weitere Form der zellulären Strahlenantwort einen permanenten Zellzyklusarrest. Grundlegende strukturelle und metabolische zelluläre Abläufe sind in seneszenten Zellen häufig verändert und in der Regel sind ausgeprägte Veränderungen auf transkriptomischer Ebene sowie im Hinblick auf die Produktion von Seneszenz-assoziierten Zytokinen beobachtbar [21].

Der Abbau und das immunologische Screening abgestorbener Zellen – die sogenannte Efferozytose – erfolgt durch professionelle Phagozyten wie Makrophagen oder dendritische Zellen (DCs), wobei erstere ausgedehntere Zellmassen eliminieren, während zweitere eher als hochpotente Antigenwächter dienen, um über MHC-Moleküle mittels Präsentation und Kreuzpräsentation gegenüber T-Zellen adaptive Immunantworten herbeizurufen. [21, 32-35] Neben professionellen Phagozyten sind residente, nicht-professionelle Phagozyten wie Fibroblasten, Endothelzellen und Mesothelzellen zu nennen [21]. Wird die Efferozytose-Kapazität der Phagozyten in einem Gewebe überstiegen, kann bei *in situ* verbliebenen apoptotischen Zellen eine sekundäre Nekrose eintreten, durch die eigentlich zu tolerierende, körpereigene Strukturen fehlgeleitet als immunologisch suspekt erkannt werden und potenziell zu Entzündungsreaktionen führen können [21]. Dieser Mechanismus spielt u.a. in der Pathogenese von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises eine grundlegende Rolle [32, 36].

Zusammenfassend betrachtet trägt die Art der zellulären Strahlenantwort zum Grad der Immunogenität eines bestrahlten Gewebes bei [21]. Lee et al. zeigten, dass die Interferon-vermittelte Immunkaskade bestrahlter Tumoren vor allem bei höheren Strahlendosen, nicht aber in fraktioniert bestrahlten experimentellen Maustumoren auftritt [37]. Auch in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe ergaben sich *in vitro* v.a. für höhere Einzeldosen höhere Raten an Apoptose, Nekrose und Seneszenz sowie das höchste Ausmaß an Sekretion Makrophagen-aktivierender Substanzen, die wiederum für eine Immunzell-Rekrutierung und konsekutive Antigen-Präsentation wichtig sind [38]. Ins klinisch-radiotherapeutische Setting übertragen bedeutet dies, dass die Wahl der Dosierung und Fraktionierung einer Strahlentherapie die Qualität und Quantität des Zelltodes und die dadurch generierten anti-tumoralen Immuneffekte erheblich beeinflussen kann und diese Immunkontrolle gegebenenfalls durch weitere Therapie-Adjuvantien, wie Immuntherapeutika, verstärkt werden könnte [39, 40].

#### **4.2.3. Interaktionen zwischen Tumor und Immunsystem**

P. Ehrlich berichtete 1909 über eine “natürliche Geschwulstimmunität” [41] und beschrieb, dass nach erfolgreicher Tumorimplantation im Tiermodell ein zweiter implantierter Tumor derselben Art ein geringeres Wachstum zeigte [41]. W. B. Coley beobachtete 1893 bei einem Patienten die Regression eines Sarkoms, nachdem ein post-operatives Erysipel aufgetreten war [42]. Die vermutete Verbindung zwischen Immunsystem und Tumorkontrolle konnte er bestätigen, als er in weiteren Therapieversuchen Streptokokken intra-tumoral injizierte, woraufhin sich bei einigen Patient\*innen mit teilweise bereits ausgedehnten Tumormassen und in hochgradig eingeschränktem Allgemeinzustand eine Regression der Tumoren zeigten [42].

Die Thematik der Tumor-Immunologie wurde im strahlentherapeutischen Kontext Jahrzehnte später u.a. von S. Demaria und S. C. Formenti et al. insofern wiederaufgegriffen, als erstmalig ein immun-vermitteltes Erklärungsmodell für abskopale Effekte herangezogen wurde [13]. In einem heterotopen Mammakarzinom-Mausmodell mit einem bestrahlten Primär- und einem nicht-bestrahlten Sekundärtumor konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass eine T-Zell-abhängige Tumorkontrolle des nicht-

bestrahlten Sekundärtumors erreicht wurde, wenn dieser hinsichtlich der Tumor-Antigene identisch mit dem bestrahlten Primärtumor war, während der abskopale Effekt in nicht-Antigen-identen Sekundärtumoren ausblieb [13]. Dieser Effekt konnte unter Stimulation von DCs mittels Flt3-Liganden noch verstärkt werden, was die Wichtigkeit der DCs im Rahmen der radiotherapeutischen Tumorkontrolle und das Potential kombinatorischer Therapieansätze betont [13].

Lugade et al. zeigten eine erhöhte Anzahl Antigen-präsentierender Zellen (APCs) sowie größere Mengen von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in Tumor-drainierenden Lymphknoten bestrahlter muriner Melanome, wobei sich für das Bestrahlungsregime mit höherer Strahlendosis der größte Effekt ergab [29]. Zudem wiesen diese Tumoren eine höhere Infiltration an Tumorantigen-spezifischen T-Zellen auf [29]. Die IFN- $\gamma$ -Produktion erwies sich als essenziell für die *Vascular-Cell-Adhesion-Molecule (VCAM)-1-Expression* und damit für die Leukozyten-Diapedese [43]. Des Weiteren regulierte IFN- $\gamma$  die Expression von *Major-Histocompatibility-Complex-I (MHC-I)*, was wiederum zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 führte [43].

Die therapeutische Effektivität der Radiotherapie korrelierte in der Arbeit von Lee et al. neben den DCs auch mit der Anzahl der durch DCs aktivierten CD8 $^{+}$  T-Zellen [37], und bei Gupta et al. erwiesen sich CD4 $^{+}$  T-Zellen und Makrophagen als entbehrlich [44]. Typ-I-Interferone, d.h. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ , zeigten sich essenziell für die intra-tumorale Rekrutierung diverser Immunzellen, insbesondere von CD8 $^{+}$  T-Zellen und DCs [45-47]. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  fungierten zudem als Stimulatoren für T-Zell-Differenzierung und Antigen-Kreuzpräsentation durch DCs [46, 48]. Das Typ-II-Interferon IFN- $\gamma$  leistete einen wichtigen Beitrag zur Immunogenität von Tumorzellen und war vorrangig im Tumormikromilieu vorzufinden [17]. Produziert wurde es hauptsächlich durch die für einen strahlentherapeutischen Erfolg essenziellen CD8 $^{+}$  T-Zellen [49].

Die Modulation des Tumor-Mikromilieus ist insofern von grundlegender Bedeutung, als dieses eher immunsuppressive und damit tolerogene Eigenschaften aufweist und somit als immunologisch okkluse Nische maßgeblich zur Tumor-Immunevasion beitragen kann [50]. Charakteristischerweise enthält es *Myeloid-derived-Suppressor-Cells (MDSCs)*, tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) und regulatorische CD4 $^{+}$  T-Zellen ( $T_{reg}$ ) [50]. Des Weiteren kommt es im Tumormikromilieu durch Zytokin-Sekretion und Aktivierung von Immun-Checkpoints, wie z.B. *Programmed-Cell-Death-Protein-1 (PD-1)* häufig zu T-Zell-Dysfunktionen, was die Tumorkontrolle zusätzlich erschwert [50]. Filatenkov et al. zeigten, dass höhere Strahlendosen im Gegensatz zu fraktionierter Strahlentherapie die CD8 $^{+}$  T-Zell-Infiltration und konsekutiv die Tumorkontrolle steigern und somit auch die Immunogenität des Tumor-Mikromilieus IFN- $\gamma$ -vermittelt verbessern konnte, während tolerogene Zellgruppen wie MDSCs und TAMs reduziert wurden [51].

Bezüglich der in diesem Zusammenhang zur Interferon-Ausschüttung führenden Signalkaskade identifizierten L. Deng et al. 2014 einen ursprünglich aus der Infektiologie bekannten [52] Mechanismus der interferonabhängigen Tumor-Immunkontrolle: die cGAS-STING-Kaskade [53]. Zytosolische DNA, die durch Zellschädigung freigesetzt wird, aktiviert hierbei die Produktion von zyklischem

Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat (cGAMP) durch die zyklische GMP-AMP-Synthase (cGAS), wodurch über das am endoplasmatischen Retikulum residente Protein *Stimulator-of-Interferon-Genes* (STING), den Transkriptionsfaktor *Interferon-Regulatory-Factor-3* (IRF3) und den Transkriptionsfaktor *Nuclear-Factor-κ-Light-Chain-Enhancer-of-Activated-B-Cells* (NF $\kappa$ B) die Typ-I-Interferon-Synthese induziert wird [53-55]. Ablasser et al. konnten zeigen, dass cGAS-produziertes cGAMP über *Gap-Junctions* auch benachbarte Zellen erreicht und damit eine STING-Aktivierung beziehungsweise potenziell eine konsekutive Tumor-Immunogenität in der unmittelbaren Tumorumgebung hervorgerufen wird [56].

#### **4.2.4. Strahlendosen höherer Intensität als Induktor von Anti-Tumor-Immunmechanismen**

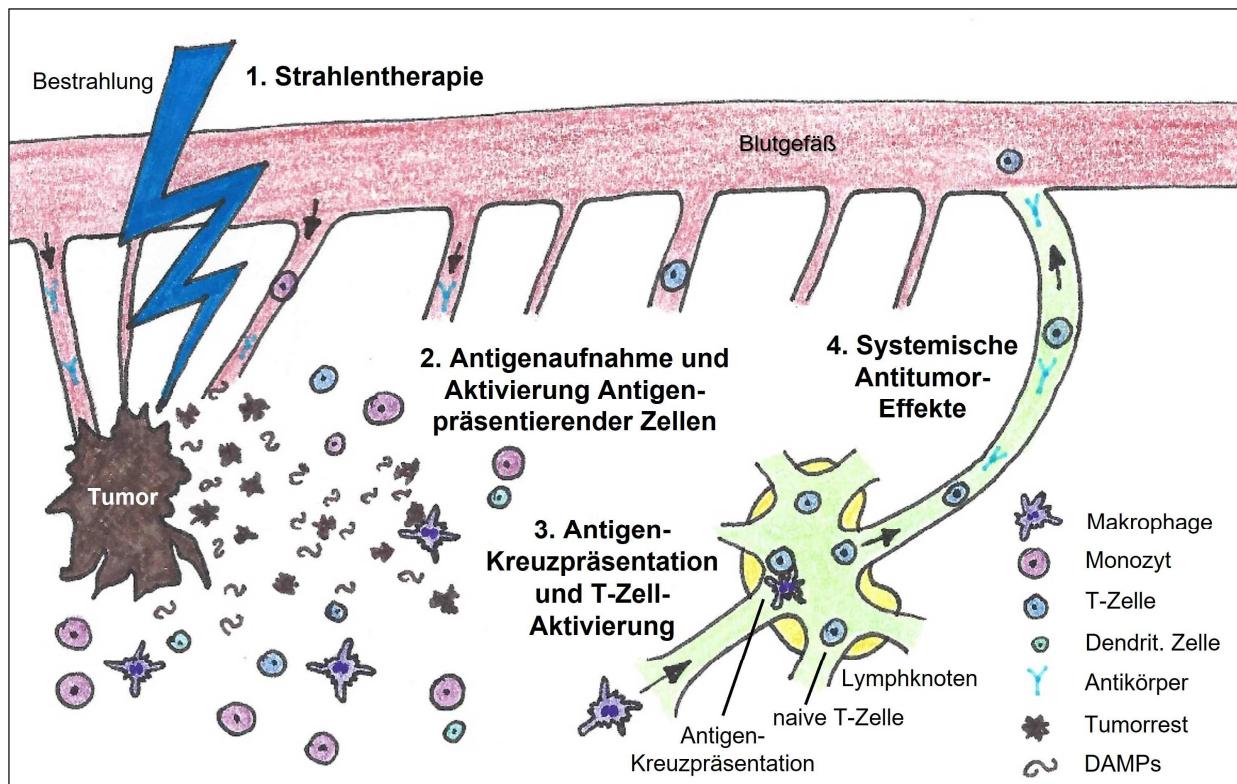
Die Grundidee der onkologischen Strahlentherapie versteht sich in der zytotoxischen Wirkung ionisierender Strahlung auf eukaryontische Zellen, die u.a. durch individuelle Anpassung von Einzel- und kumulativer Dosis, Dosisverteilung in Bezug auf das Gewebe und zeitlicher Fraktionierung moduliert werden kann [1]. Wie oben anhand mehrerer In-vitro- und In-vivo-Modelle dargestellt, ist neben der zytotoxischen auch eine immunologische Tumorkontrolle ein grundlegender Mechanismus der strahlentherapeutischen Wirkung, wobei letztere vorrangig nach Bestrahlungsmustern mit hohen Einzeldosen beschrieben wurde [37, 51]. Zudem scheinen bestimmte Chemotherapeutika in der Lage zu sein, immunogene Formen des Zelltods auszulösen, insbesondere, wenn eine Kombination mit immunstimulierenden Substanzen zum Einsatz kommt [57]. Diese und weitere Therapiekombinationen bieten wohl auch einen Erklärungsansatz für die Zunahme an Beobachtungen von abskopalen Tumoreffekten seit der Zulassung der ersten Immunkontrollen [10, 11].

Ein wichtiges Ereignis im Rahmen Therapie-induzierter, immunogener Formen des Tumorzelltods und der Aktivierung von Tumor-Immunmechanismen ist die Freisetzung von *Damage-Associated-Molecular-Patterns* (DAMPS) im Rahmen des Zelluntergangs, beispielsweise nach ionisierender Strahlung [57]. DAMPs, wie z.B. *High-Mobility-Group-Box-1* (HMGB-1), Hitzeschockproteine (HSPs) oder Proteine der S100-Familie können, genau wie freigesetzte Nukleotide, u.a. durch Wirkungen auf das Endothel [58], Monozyten aus der Blutzirkulation rekrutieren, wobei viele zugrundeliegende Signalwege nur teilweise verstanden sind [21, 38, 59]. Über derartige *Find-Me-* und *Danger-Signals* zum Ort des Zellschadens rekrutierte Antigen-präsentierende Zellen (APC) [21, 60, 61] treten aus dem Gefäßlumen ins periphere Gewebe aus und differenzieren zu diversen Makrophagen- und DC-Subtypen [34, 62]. Ionisierende Strahlung scheint hierbei die Extravasation von Immunzellen u.a. durch Effekte an Tumorgefäßen und am Tumormikromilieu weiter zu begünstigen [34, 43, 63-65].

Nach Erkennung und Phagozytose des Tumormaterials reifen DCs, wandern in tumordrainierende Lymphknoten und präsentieren und kreuzpräsentieren dort das prozessierte Antigenmaterial naiven T-Zellen via MHC-Moleküle, wobei die Präsentation über MHC-I eine CD-8-Antwort hervorruft, während über MHC-II eine CD-4-Antwort induziert wird [62, 66-68]. Die (Kreuz-)Präsentation an der immunologischen Synapse verläuft als hochkomplexer Prozess unter Beteiligung multipler ko-

stimulierender Faktoren wie beispielsweise CD28, CD80 und CD86 sowie ko-stimulierender Zytokine und führt schließlich zur Differenzierung und Proliferation der T-Zellen [67, 68]. Derartig aktivierte tumorspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnten schließlich zu einer systemischen Tumorkontrolle beitragen, indem sie residuale Tumorzellen erkennen und direkt abtöten [16, 69].

Zusammenfassend betrachtet deuten zahlreiche Publikationen auf den Beitrag der Strahlentherapie – insbesondere bei höher gewählten Einzeldosen [51] – zur systemischen Tumorkontrolle hin. Ionisierende Strahlung initiiert durch die Generation von DAMPs einen der ersten Schritte, das körpereigene Immunsystem für den immunevasiven Tumor zu sensibilisieren und generiert eine sogenannte „In-situ-Vakzine“, was insbesondere in Kombination mit weiteren Immuntherapien vielversprechende Therapieoptionen bieten könnte [10, 34, 70].



**Abb. 1: Prinzip der In-situ-Vakzinierung durch Strahlentherapie.**

Bisherige In-vitro- und In-vivo-Daten aus dem Mausmodell zeigen, dass Bestrahlung und vorrangig höhere Strahlendosen zur Invasion diverser Immunzellen aus der Blutbahn führen, wobei die Rekrutierung v.a. durch die Freisetzung von DAMPs induziert wird. Diese rekrutierten Monozyten und DCs nehmen Tumor-Antigene auf, prozessieren sie und reifen aus. Nach Migration in lokale Lymphknoten (kreuz-)präsentieren sie dort das prozessierte Antigen-Material naiven T-Zellen. Die aktivierte T-Zellen kehren in die systemische Zirkulation zurück und tragen so zur systemischen Immunität bei.

DAMPs, Damage-associated-Molecular-Patterns.

## **5. Ziel der Arbeit**

Die Strahlentherapie trägt als eine der Hauptsäulen der onkologischen Therapie maßgeblich zur Tumorkontrolle bei. Neben der Induktion von Tumorzelltod zeigen Daten der letzten Jahre, dass auch die Induktion komplexer Immunmechanismen zum therapeutischen Erfolg beitragen kann.

Anhand diverser In-vitro-Versuche, u.a. aus der eigenen Arbeitsgruppe, und anhand diverser muriner In-vivo-Experimente häufen sich Hinweise, dass insbesondere beim Mammakarzinom Bestrahlungsmuster mit höheren Strahlendosen im Vergleich zu fraktionierten Schemata in Hinblick auf eine immunologische Tumorkontrolle von Vorteil sein könnten.

Ziel der vorliegenden klinischen Begleitforschungsstudie war die Untersuchung lokaler und systemischer immunologischer Veränderungen auf zellulärer und humoraler Ebene in Wundflüssigkeits- und Peripherblut-Proben von Mammakarzinom-Patientinnen nach brusterhaltender Operation und IORT. Beobachtete Veränderungen sollten anhand von In-vitro-Bestrahlungsversuchen mit verschiedenen Zellpopulationen von gesundem, humanen Brustgewebe tiefer charakterisiert werden, um zugrundeliegende Mechanismen besser zu verstehen.

## 6. Material und Methoden

### 6.1. Materialien

#### 6.1.1. Hersteller

Tab. 1: Hersteller

Hersteller	Firmensitz
BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Biochrom AG	Berlin, Deutschland
BioLegend	Koblenz, Deutschland
Bio-Rad	München, Deutschland
BioTek Instruments GmbH	Bad Friedrichshall, Deutschland
BRAND	Wertheim, Deutschland
Braun	Melsungen, Deutschland
Clarivate Analytics	Aschaffenburg, Deutschland
Corning	Coning, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Glaswarenfabrik Karl Hecht	Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Greiner, BIO-ONE	Kremsmünster, Österreich
INTEGRA Biosciences	Zizers, Schweiz
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Kern & Sohn	Balingen, Deutschland
LC Laboratories	Woburn, USA
Lonza	Basel, Schweiz
Marker Gene Technologies	Millrace Drive, USA
Merck	Darmstadt, Deutschland
MicroCal	Massachusetts, USA
Microsoft	Redmond, USA
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
NeoLab	Heidelberg, Deutschland
Novogene	Cambridge, Großbritannien
Promega	Walldorf, Deutschland
PromoCell	Heidelberg, Deutschland
R&D Systems	Minneapolis, USA
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Sysmex	Norderstedt, Deutschland
Taylor-Wharton	Gent, Belgien
Thermo Fisher Scientific	Dreieich, Deutschland
Xstrahl	Camberley, Großbritannien

## 6.1.2. Verwendete Zellen

Tab. 2: Primäre Zellen

Zelltyp	Lieferant
<i>Human-Dermal-Fibroblasts-of-the-Adult (NHDF-Ad)</i>	Lonza
<i>Human-Mammary-Epithelial-Cells (HMEC)</i>	Lonza
<i>Human-Umbilical-Vein-Endothelial-Cells (HUVEC)</i>	PromoCell

## 6.1.3. Reagenzien

Tab. 3: Kommerziell verfügbare Reagenzien und Kulturmedien

Produkt	Hersteller
<i>Annexin-Staining-Buffer</i>	BD Biosciences
<i>Annexin-V-FITC</i>	BD Biosciences
<i>Bafilomycin A1</i>	LC Laboratories
<i>Biocoll Separating-Solution (1,077 g/ml)</i>	Biochrom AG
<i>Bovines Serumalbumin</i>	Sigma-Aldrich
<i>Brij-L23-Lösung 30%</i>	Sigma-Aldrich
<i>C<sub>12</sub>FDG</i>	Marker Gene Technologies
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	Sigma-Aldrich
<i>DMSO</i>	Sigma-Aldrich
<i>dNTP</i>	Promega
<i>Drabkin's-Reagent</i>	Sigma-Aldrich
<i>Dulbecco's-Phosphate-Buffered-Saline 1x (DPBS)</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>EDTA</i>	Sigma-Aldrich
<i>Endothelial-Cell-Growth-Kit</i>	PromoCell
<i>Ethanol</i>	Merck
<i>FACS-Staining-Buffer FBS</i>	BD Biosciences
<i>FACS-Count-Bright-Beads, Count-Bright-Absolute-Counting-Beads-for-Flow-Cytometry</i>	Invitrogen
<i>Fetal-Calf-Serum (FCS)</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>Fibroblast-Basal-Medium supplementiert mit FGM-2-SingleQuots-Kit</i>	Lonza
<i>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	Merck
<i>HEPES</i>	Sigma-Aldrich
<i>HEPES Buffer</i>	Life Technologies
<i>Humanes Hämoglobin, EightCheck-3WP-N</i>	Sysmex
<i>Lysing-Buffer, BD Pharm Lyse</i>	BD Biosciences
<i>MEBM supplementiert mit MEGM SingleQuots</i>	Lonza

NaCl	Sigma-Aldrich
Oligo(dT) <sub>18</sub>	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific
Random-Hexamere	Thermo Fisher Scientific
Revert-Aid-H-Minus-M-MuLV- <i>Reverse-Transcriptase</i>	Thermo Fisher Scientific
Ribolock-RNase-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific
TMB-Peroxidase-EIA-Substrate-Kit <i>Solution A and Solution B</i> enthaltend	Bio-Rad
TrypLE Express (1×)	Thermo Fisher Scientific
Tween ® 20	Sigma-Aldrich

#### 6.1.4. Zusammensetzung hergestellter Reagenzien

Tab. 4: Zusammensetzung hergestellter Reagenzien

Reagenz	Bestandteile	Menge bzw. Konzentration
Annexin-V-FITC/ PI-Färbemix	Annexin-V-FITC PI (1 mg/ml) 1× Annexin Staining Buffer	5 µl 0,2 µl 94,8 µl
Drabkin's-Lösung	Drabkin's Reagent in ddH <sub>2</sub> O Brij-L23-Lösung 30%	1 Phiole 1000 ml 0,5 ml
Einfriermedium	FBS South American DMSO	90 % 10 %
ELISA-Reagent-Diluent	BSA in DPBS	1 %
ELISA-Substrate-Solution	<i>Solution A</i> <i>Solution B</i>	A:B = 9+1
ELISA-Waschpuffer	Tween ® 20 in DPBS	0,05 %
Physiologische Kochsalzlösung	NaCl in ddH <sub>2</sub> O	0,9 %

#### 6.1.5. Antikörper

Tab. 5: Multicolor-FACS-Panel, Antikörper und Isotypen

Ursprung	Epitop	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Firma	Antikörpermengen [µl] pro 100µl Probenmaterial
murin	CD123	APC	7G3	IgG2a κ	BD Biosciences	2,0
murin	CD127	PE-Vio770	MB15-18C9	IgG2a	Miltenyi Biotec	2,0
murin	CD14	PCC 5.5	M5E2	IgG2a κ	BioLegend	0,5

murin	CD16	PE	3G8	IgG1 κ	BD Biosciences	0,1
murin	CD16	PE	B73.1	IgG1 κ	BD Biosciences	2,5
murin	CD19	PCC 5.5	HIB19	IgG1 κ	BD Biosciences	0,5
murin	CD20	PCC 5.5	2H7	IgG2b κ	BD Biosciences	0,1
murin	CD25	PE-D594	M-A251	IgG1 κ	BioLegend	5,0
murin	CD28	BB515	CD28.2	IgG1 κ	BD Biosciences	2,5
murin	CD3	KO	UCHT1	IgG1	Beckmann Coulter	5,0
murin	CD4	APC	RPA-T4	IgG1 κ	BD Biosciences	0,5
murin	CD45	BUV395	HI30	IgG1 κ	BD Biosciences	6,0
murin	CD56	APC-R700	NCAM16.2	IgG2b κ	BD Biosciences	4,0
murin	CD69	BV421	FN50	IgG1 κ	BD Biosciences	5,0
murin	CD8a	PCC 5.5	HIT8a	IgG1 κ	BioLegend	0,5
human	HLA-DR	APC-Vio770	REA 332	IgG1	Miltenyi Biotec	1,0

### 6.1.6. Kommerziell verfügbare Kits

Tab. 6: Kommerziell verfügbare Kits

Produkt	Hersteller
Bio-Plex Pro Human <i>Chemokine Panel</i> , 40-Plex	Bio-Rad
Bio-Plex Pro Human <i>Cytokine Screening Panel</i> , 48-Plex	Bio-Rad
Human Flt-3 Ligand DuoSet® ELISA	R&D Systems
Human IL-3 DuoSet® ELISA	R&D Systems
Human MIF DuoSet® ELISA	R&D Systems
NucleoSpin® miRNA Kit	Macherey-Nagel
XCL-1 / Lymphotacin DuoSet® ELISA	R&D Systems

### 6.1.7. Verbrauchsmaterialien

Tab. 7: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6- und 96-Well-Flachboden- und V-Boden-Platten	Corning
Combitips Advanced	Eppendorf
Cryo Tube™, Sterilgefäß	Thermo Fisher Scientific
ep T.I.P.S.	Eppendorf
FACS-Reagenzgefäße, 1,3 ml, Polypropylen	Greiner BIO-ONE
Glasröhrchen, 100 x 12 mm, dickwandig	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Mr. Frosty™-Box	Sigma-Aldrich
Neubauer-Zählkammer (Blaubrand-Zählkammer)	BRAND

Reagenzgefäße mit Sicherheitsverschluss, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Reagenzgefäße, konisch zulaufend, 15 ml und 50 ml, Polypropylen	Sarstedt
Redovac, 400 ml, mit Bayonett-Sicherheitskonnektor	Braun
S-Monovette, 7,5 ml, Serum mit Gerinnungsaktivator	Sarstedt
S-Monovette, 7,5 ml, K3 EDTA	Sarstedt
Stripetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning
T-75-, T-175-Zellkulturflaschen	Corning

### 6.1.8. Geräte

Tab. 8: Geräte

Produkt	Hersteller
Analysenwaage ABJ-NM	Kern & Sohn
Bio-Plex 200	Bio-Rad
Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific
LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences
NanoDrop2000c UV-Vis	Thermo Fisher Scientific
Pipettierhilfe <i>Pipetboy</i>	INTEGRA Biosciences
RS225 Röntgenbestrahlungsgerät für Forschungszwecke	Xstrahl
Sicherheitswerkbank Maxisafe 2020	Thermo Fisher Scientific
Stickstoff-Zelltank LS6000	Taylor-Wharton
SynergyMx Floureszenz-Messgerät	BioTek Instruments GmbH
Thermomix comfort	Eppendorf
Vortex-Schüttler 7-2020	NeoLab
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific

### 6.1.9. Software

Tab. 9: Software

Produkt, Version	Hersteller
EndNote X9	Clarivate Analytics
FACSDiva, 6.1.3.	BD Biosciences
Microsoft Access, 2010	Microsoft
Microsoft Excel, 2010	Microsoft
Microsoft Word, 2010	Microsoft
Origin, Version 9.1.	MicroCal

## 6.2. Methoden

### 6.2.1. Studiendesign

Die vorliegende klinische Begleitforschungsstudie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung von 2013 und nach Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München (Projektnummern 246-15 und 20-488) durchgeführt. Die Rekrutierung der Patientinnen erfolgte durch die Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des LMU Klinikums. Die Patientinnen wurden nach den im Folgenden beschriebenen und in Abb. 7B dargestellten Kriterien in die Studie aufgenommen. Alle Daten sowie Proben wurden anfangs pseudonymisiert und vor der RNA-Sequenzierung schließlich irreversibel anonymisiert. Das gesammelte Patientenmaterial (venöses Blut und Wundflüssigkeit) wurde quantifiziert und auf Immunzell-Populationen, Zytokine und Transkriptionsfaktoren untersucht. Zudem erfolgte eine Integration der aus dem Biomaterial erhaltenen Ergebnisse mit anamnestischen und histologischen Daten.

### 6.2.2. Patientenrekrutierung

Der Einschluss in die Studie erfolgte nach ausführlicher Aufklärung und mit dem schriftlichen Einverständnis der Patientinnen. Ausgewählt wurden ausschließlich Patientinnen mit histologisch bestätigtem Mammakarzinom, die für eine brusterhaltende Operation mit oder ohne intra-operative Strahlentherapie vorgesehen waren.

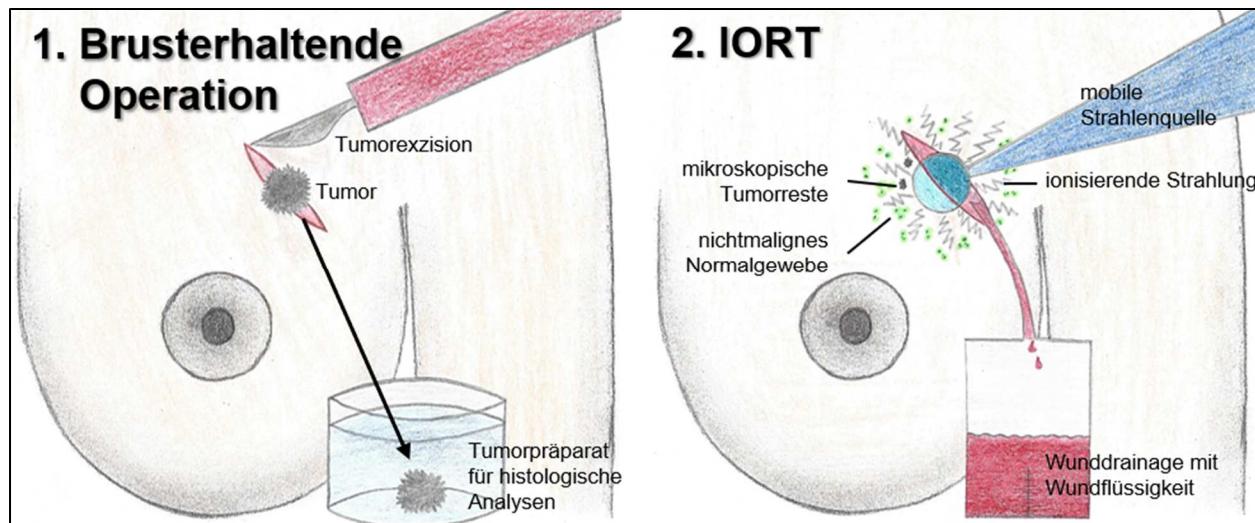


Abb. 2: Studiendesign.

Mammakarzinom-Patientinnen mit einem Tumordurchmesser unter 4 cm, die für eine brusterhaltende Operation mit oder ohne IORT (Verabreichung von 20 Gy unmittelbar nach der Operation) geplant waren und in den acht Wochen vor Operation keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten, wurden nach Aufklärung mit ihrem Einverständnis in die Studie eingeschlossen. Den Patientinnen wurde am Tag vor Operation sowie am dritten und 28. post-operativen Tag Blut abgenommen, zudem wurden die Wunddrainagen der ersten drei Tage nach Operation gesammelt. Das gesammelte Biomaterial wurde auf Volumen, Hämoglobingehalt und Zellzahl untersucht, weitere Analysen wurden mittels Durchfluszytometrie, Multiplex-ELISA und RNA-Sequenzierung durchgeführt. Weitere anamnestische und histologische Daten wurden aus den Patientinnenakten erhoben.

Die prä-operativ (i.d.R. radiologisch) bestimmte Tumogröße durfte einen Maximaldurchmesser von 4 cm nicht überschreiten, da eine intra-operative Bestrahlung größerer Tumore meist u.a. aus Gründen der

hautnahen Tumorlokalisierung und der verfügbaren Applikatorgröße des IORT-Geräts erschwert ist. Um Einflüssen durch immun-modulierende Pharmaka oder Erkrankungen aus dem immunologischen Formenkreis und solchen mit immunologischer Begleitkomponente vorzubeugen, wurden entsprechend behandelte Patientinnen von der Studie ausgeschlossen. Um immunologische Interferenzen durch Chemotherapeutika auszuschließen, wurden Patientinnen nach neoadjuvanter Chemotherapie, die innerhalb von acht Wochen prä-operativ stattgefunden hatte, ebenfalls nicht in die Studie eingeschlossen (s. auch Abb. 7A).

### **6.2.3. Gewinnung von Biomaterial**

Der Operationstag wurde als Zeitpunkt Null (Tag 0) definiert. Zur Blutanalyse wurden jeweils venöses Serum und EDTA-Blut im Rahmen der prä-operativen (Tag -1) und post-operativen (Tag 3) Laborkontrolle vor Entlassung aus der Klinik sowie im Rahmen der post-operativen ambulanten Verlaufskontrolle ( $\pm$  Tag 28) abgenommen. Während der Hospitalisations-Phase wurden die Wunddrainagen aus der Brust an den ersten drei post-operativen Tagen gesammelt. Axilläre Wunddrainagen wurden, sofern vorhanden, verworfen.

### **6.2.4. Bestimmung hämatologischer Parameter**

#### **6.2.4.1. Volumenbestimmung und Zellquantifizierung**

Serum, EDTA-Vollblut und Wundflüssigkeit wurden hinsichtlich Volumens und Leukozytenzahl quantifiziert.

Zur Volumenbestimmung erfolgte der Transfer der Wundflüssigkeit aus den Drainage-Behältern in Reaktionsgefäße. Als Vorbereitung für weitere Analysen wurde sowohl für Vollblut als auch Wundflüssigkeit eine Erythrozytenlyse vorgenommen. Diese wurde mit 100  $\mu$ l EDTA-Blut oder 100  $\mu$ l Wundflüssigkeit durchgeführt, wobei 1 ml Lysepuffer für Blut und 3 ml Lysepuffer für Wundflüssigkeit verwendet wurden. Nach einer zwanzigminütigen Inkubation bei Raumtemperatur und wiederholtem Invertieren der Falcon-Reaktionsgefäße während der Inkubationsphase erfolgten die Zentrifugation (5 min, 314 g) und das Waschen mit Phosphatpufferlösung nach Dulbecco (DPBS), danach wurden die isolierten Leukozyten im ursprünglich eingesetzten Volumen DPBS resuspendiert. Die Leukozyten-Zählung wurde daraufhin sowohl manuell mittels Neubauer-Zählkammer als auch maschinell mittels *FACS-Count-Bright-Beads*-Analyse vorgenommen.

Zur Zählung mittels *FACS-Count-Bright-Beads* wurden 100  $\mu$ l lysiertes Blut oder Wundflüssigkeit mit 6  $\mu$ l des Anti-CD45-BUV395-Antikörpers gefärbt. Nach einer zwanzigminütigen Inkubation im Dunkeln und anschließendem Waschen erfolgte die Resuspendierung der Zellen in FACS-Färbe puffer und die Zugabe von 10  $\mu$ l *FACS-Count-Bright-Beads*. Die Analyse erfolgte unmittelbar anschließend am Durchflusszytometer. Unter Einbeziehung der manuellen Zählwerte mittels Neubauer-Zählkammer wurde ein Mittelwert gebildet, der als Grundlage für weitere Berechnungen diente.

#### **6.2.4.2. Hämoglobinmessung**

Jeweils 5 µl EDTA-Vollblut wurden in den Verdünnungsstufen unverdünnt, 1:2, 1:5 und 1:10 in 250 µl *Drabkin's*-Lösung gelöst. Als Standardkurve diente eine Verdünnungsreihe mit dem humanen Hämoglobin EightCheck-3WP-N. Die Auslesung der Proben erfolgte in technischen Triplikaten an einem SynergyMx bei einer Absorptionslänge von 540 nm, wobei dieser Wert um die Hintergrund-Absorption bei 680 nm korrigiert wurde.

#### **6.2.5. Zellkultur**

##### **6.2.5.1. Kultivierung primärer Zellen**

Humane Brust-Epithelzellen (HMECs) wurden in MEBM supplementiert mit MEGM wie vom Hersteller empfohlen im wasserdampfgesättigten Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Humane adulte Hautfibroblasten (NHDF-Ad) wurden gemäß der Herstellerangaben in *Fibroblast-Basal-Medium* mit FGM-2 kultiviert, humane Nabelvenen-Endothelzellen (HUVECs) in *Endothelial-Cell-Growth-Kit-Medium*. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

##### **6.2.5.2. Zellbestrahlung bei In-vitro-Experimenten**

Die Bestrahlung der primären Zellen erfolgte nach Aussäen der Zellen zu je 5 000 – 80 000 Zellen pro Kavität in *Six-Well*-Platten. Nach einer Adhärenz-Zeit von etwa 16 Stunden (für Zellkulturüberstände) bzw. 4-6 Stunden (für durchflusszytometrische Messungen) und einem Medium-Wechsel (2 ml pro Well) wurden die Zellen mit 0 Gy bzw. 20 Gy bestrahlt (RS225 X-Ray-Bestrahlungsgerät für Forschungszwecke, 200 kV, 10 mA, mit Thoraeus-Filter: 0,38 mm Sn, 0,23 mm Cu, 0,99 mm Al). Die Inkubation bis zu den Messzeitpunkten zur Gewinnung von Zellkulturüberständen sowie bis zur Messung von Zelltod- und Seneszenz-Induktion erfolgte im Wassertampf-gesättigten Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### **6.2.6. FACS-Analyse**

##### **6.2.6.1. Zelltodanalysen mittels Annexin-V-FITC- und PI-Färbung**

Zur Differenzierung der Art des Zelltodes erfolgten durchflusszytometrische Analysen mittels Annexin-V-FITC und Propidium-Iodid (PI). Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, das in apoptotischen Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert wird, während es in gesunden Zellen an der inneren Membranseite lokalisiert ist [38, 71]. Aufgrund der fehlenden Membrangängigkeit von Annexin-V ist mittels Fluorochrom-gekoppeltem Annexin-V-FITC die Darstellung apoptotischer Zellen im FACS möglich [38, 71]. PI lagert sich als DNA-Interkalator im Falle einer Zellmembran-Desintegration, die charakteristisch für Nekrose ist, in die DNA ein und dient zum Nachweis nekrotischer Zellen [38, 71]. Da PI eine intakte Zellmembranen nicht durchdringt und somit nicht interkalieren kann, sind doppelt negative Zellen als viabel zu werten [38, 71].

HMECs, NHDF-Ad und HUVECs wurden, wie in Abschnitt 6.2.5. beschrieben, ausgesät und bestrahlt. Die Messungen erfolgten an den ersten vier Tagen nach Bestrahlung.

Nach Abnahme der Überstände aus den *Six-Well*-Platten der HMECs, NHDF-Ad und HUVECs wurden diese mittels TrypLE(x) abgelöst, dieses mit 200-300 µl fetalem Kälberserum (FCS) inaktiviert die Zellen

anschließend durch Zentrifugation (314 g, 5 min) gesammelt. Nach Resuspendierung in 100 µl 1x Färbepuffer wurden diese in 96-V-Well-Platten überführt. Nach erneuter Zentrifugation (314 g, 5 min) wurde der zellfreie Überstand verworfen und die Zellen mittels 100 µl Annexin-V-PI-Färbemix (Details s. Tab. 4) für 15 min im Dunkeln auf Eis gefärbt. Hierauf erfolgten die Zugabe von 100 µl Färbepuffer und mehrere Waschschrifte, um die Zellen schließlich in 100 µl Färbepuffer zu resuspendieren und die FACS-Analyse auf Annexin-V und PI vorzunehmen. Ausschließlich für Annexin-V positive Zellen wurden als apoptotische Zellen gewertet, doppelt positive Zellen als nekrotische. Doppelt negative Zellen wurden als viabel gezählt. Für alle Zelltypen wurden zwei unabhängige biologische Replikate in technischen Triplikaten gemessen. Zur Analyse diente die Software FACSDiva.

#### 6.2.6.2. Messung der Seneszenz-Induktion mittels Seneszenz-assoziiierter β-Galaktosidase

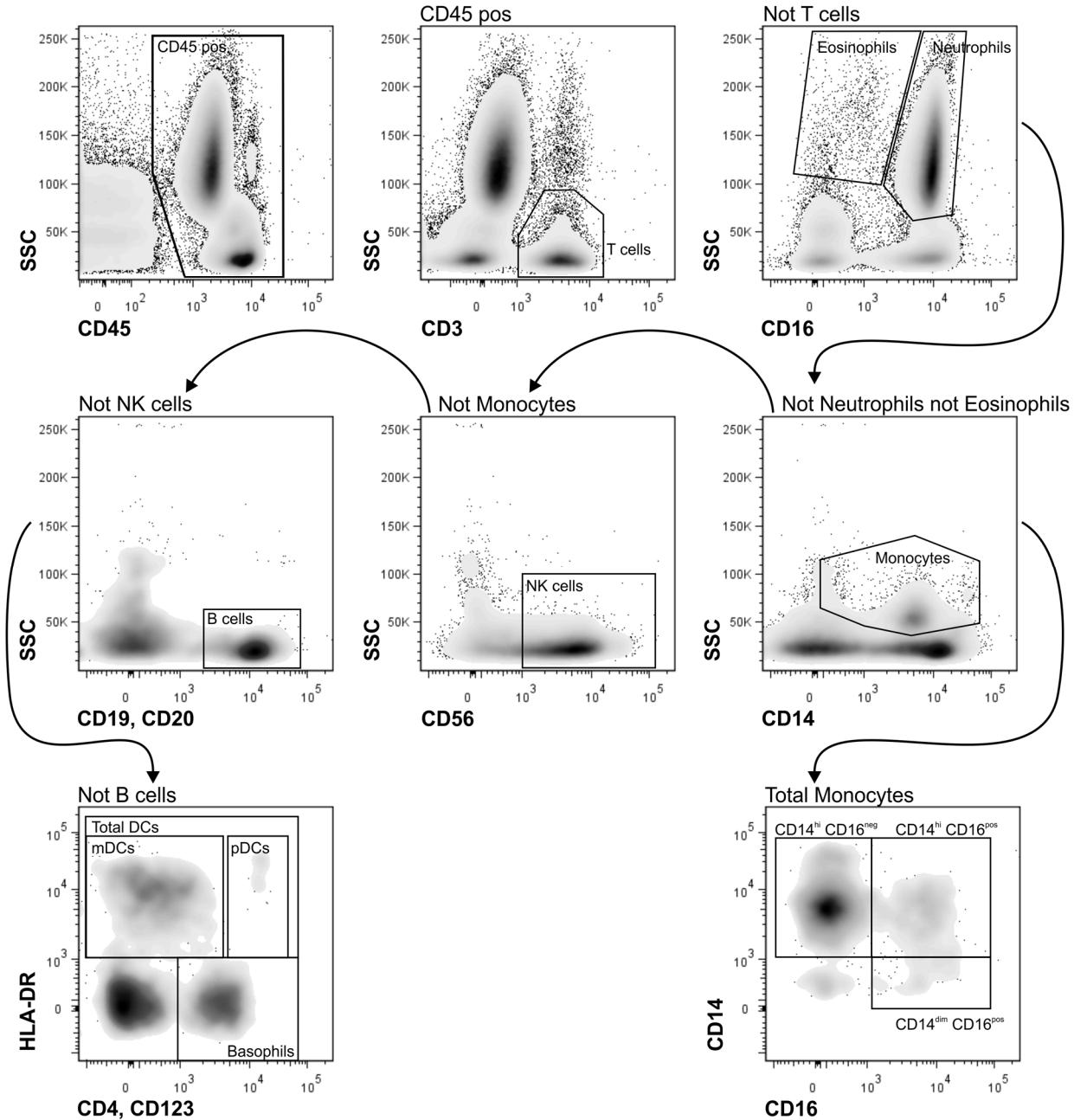
Die zelluläre Seneszenz wurde durchflusszytometrisch mittels der Aktivität der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase (SA-βgal) in Kombination mit dem *Sideward-Scatter* (SSC) als Maß der zellulären Granularität bestimmt. 5-Dodecanoylaminoflorescein di-β-D-Galaktopyranosid ( $C_{12}$ FDG) ist als im FITC-Kanal detektierbares fluorogenes Substrat der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase ein Indikator senescenter Säugetierzellen in der Zellkultur [72]. Die Messung der SA-βgal erfolgt nach Alkalinisierung der Lysosomen, da die SA-βgal bei einem pH von 6,0 bestimmt wird, während andere β-Galaktosidasen bei saureren pH-Werten und auch in nicht-seneszenten Zellen bestimbar sind [72]. Aussaat und Bestrahlung der Zellen erfolgten wie unter Abschnitt 6.2.5. beschrieben. Messungen zweier unabhängiger biologischer Replikate wurden in technischen Triplikaten an den Tagen 1-4 nach Bestrahlung vorgenommen.

Zur lysosomalen Alkalisierung wurden die Zellen in serumfreiem Medium mit 100 nM Bafilomycin A1 inkubiert (1 h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Hierauf folgte die Zugabe von  $C_{12}$ FDG in serumfreiem Medium (50 µM finale Substratkonzentration) und eine erneute Inkubationsphase (1 h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Die Überstände wurden abgenommen, die Zellen mittels TrypLE(x) abgelöst und die Zellsuspension in eisgekühlten 15-ml-Röhrchen gesammelt. Nach Zentrifugation (314 g, 5 min) wurden die Zellen in 200 µl eiskaltem DPBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert. Zellen mit hohem SSC-Signal und erhöhtem Signal im FITC-Kanal wurden als seneszent gewertet.

#### 6.2.6.3. Bestimmung der Leukozyten-Subpopulationen in peripherem Blut und Wundflüssigkeit

Die Leukozyten-Subpopulationen wurden mittels eines 11-Farben-Panels aus 16 Antikörpern und korrespondierenden Isotypen differenziert. Die methodische Beratung zur Antikörperauswahl und *Gating*-Strategie erfolgte durch Prof. Dr. Udo Gaapl und Dr. Paul Rühle. Für die Analyse wurden jeweils 100 µl EDTA-Blut mit Antikörpern oder Isotypen gefärbt (siehe Tab. 5). Die Erythrozytenlyse erfolgte nach einer zwanzigminütigen Antikörper-Färbephase bei 4°C mittels oben beschriebener Methode. Analoge Schritte galten für die Färbung der Wundflüssigkeit mit dem Unterschied, dass ein zusätzlicher Lyseschritt vor der Färbung eingeführt wurde. Nach zwei Waschschriften und der Resuspendierung im Originalvolumen in Färbepuffer erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Die Unterscheidung der

Leukozyten-Populationen wurde durch sequenzielles Gating mittels der FACSDiva-Software vorgenommen, wie in Abb. 3 dargestellt. Für Blut und Wundflüssigkeit wurden Prozentanteile der Subpopulationen an CD45<sup>+</sup> Zellen sowie mediane Fluoreszenz-Intensitäten berechnet. Für die Wundflüssigkeit wurde unter Einbeziehung der Ergebnisse aus gewonnenem Volumen und Zellzahlen pro Volumen zusätzlich die Gesamtzellzahl jeder Subpopulation in der gewonnenen Wundflüssigkeitsprobe berechnet.



**Abb. 3: FACS-Gating-Strategie.**

Blut und Wundflüssigkeit wurden mittels eines Antikörper-Panels von 11 Fluorochromen gefärbt und via Durchflusszytometrie auf Leukozyten-Subpopulationen untersucht. Zuerst erfolgte die Bestimmung von Leukozyten durch den Panleukozytenmarker CD45. Mittels CD3 wurden T-Zellen detektiert, ihre weitere Subdivision erfolgte mittels CD4 und CD8 (nicht gezeigt). Die Population der CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen wurde mittels Negativgating für CD127 separiert (nicht gezeigt). Die verbleibenden CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Zellen wurden weiter in CD16<sup>+</sup> eosinophile und CD16<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten unterteilt, aus den verbleibenden Zellen wurden mittels CD14 Monozyten und mittels CD56 NK-Zellen detektiert. CD19 und CD20 erlaubten die Bestimmung von B-Zellen, Basophile Granulozyten konnten als CD123<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> Population separiert werden. Unter den HLA-DR<sup>+</sup> Zellen ließen sich schwach CD123<sup>+</sup> klassische DCs (cDCs) und stark CD123<sup>+</sup> plasmazytoide DCs (pDCs) unterscheiden. Unter

den CD14<sup>+</sup> Monozyten fanden sich die Untergruppen der CD14<sup>hi</sup> CD16- klassischen Monozyten, die CD14<sup>hi</sup> CD16<sup>+</sup> intermediären Monozyten und die CD14<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> nicht-klassischen Monozyten. [73]  
CD, Cluster-of-Differentiation; DC, Dendritische Zelle; dim, niedrig; FACS, Durchflusszytometrie; hi, hoch; HLA-DR, Humanes Leukozytenantigen DR (MHC-II); m, myeloid; neg., negativ; p, plasmazytoid; pos., positiv; SSC, Seitwärts-Streulicht.

### 6.2.7. Aufbewahrung von Biomaterial

Nach oben genannten Analysen wurde verbleibendes Biomaterial (Serum, Plasma und Wundflüssigkeit) für weitere Analysen aufbewahrt. Zur Präparation peripherer Blutleukozyten aus Blut und Wundflüssigkeit wurden EDTA-Blut und Wundflüssigkeit zentrifugiert (10 min, 200 g, ohne Bremse), überständiges Plasma bzw. Serum verworfen und der aufliegende Leukozytensaum abgenommen. Dieser wurde nach Resuspendierung in DPBS mittels Zentrifugation durch einen Biocoll-Dichtegradienten aufgereinigt (20 min, 787 g, ohne Bremse). Die so separierten Leukozyten wurden nach einem Waschschritt mit DPBS in eiskaltem Einfriermedium wieder aufgenommen, in einer *Mr. Frosty*<sup>TM</sup>-Box langsam gekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Zudem wurden Überstände von Serum, Plasma und Wundflüssigkeit nach einer ersten Zentrifugation (1 200 g, 3 min, 4°C) abgenommen und erneut zentrifugiert (14 000 g, 3 min, 4°C). Die Überstände hiervon wurden schließlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

### 6.2.8. Multiplex-ELISA

Wundflüssigkeit des zweiten post-operativen Tages wurde mittels der kommerziell erhältlichen ELISA-Multiplex-Analysekits Bio-Plex Pro Human Chemokine Panel (40-Plex) und Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel (48-Plex) auf die in Tab. 10 und Tab. 11 angeführten Zytokine und Chemokine analysiert. Das Analyseprinzip basierte hierbei auf einem Mehrfach-ELISA, der je nach Kit mehr als 40 Zytokine pro Probe parallel detektierte. Alle Analyseschritte erfolgten laut Herstellerprotokoll. Die Messung der Wundflüssigkeit erfolgte in 1:5-Verdünnung mit der im Kit enthaltenen Verdünnungslösung. Sämtliche für die Durchführung notwendigen Reagenzien sowie die 96-Well-Platten waren in den Kits enthalten. Alle Reagenzien wurden nach Vorschrift verdünnt. Die zu untersuchenden Proben wurden nach Lagerung bei -80°C auf Eis aufgetaut. Je 50 µl der 1:5 verdünnten Wundflüssigkeiten wurden nach Vorlegen und Waschen von 50 µl der Assay-Beads in einer 96-Well-Platte aufgetragen und nach Inkubation mit 25 µl Detektionsantikörper versehen. Nach Inkubation und Waschschritten erfolgte die Zugabe von 50 µl Streptavidin-PE. Schließlich wurde die Analyse im Bioplex-200-System vorgenommen. Die Quantifizierung erfolgte über Regression mit Hilfe einer Standardkurve.

Analoge Analysen wurden in Serumproben des dritten post-operativen Tages und in den Überständen der primären Zellen HMEC, NHDF-Ad und HUVEC durchgeführt mit dem Unterschied, dass die Überstände der primären Zellen unverdünnt gemessen wurden.

Tab. 10: Bio-Plex Pro Human Chemokine Panel (40-Plex)

CCL1	CCL19	CCL23	CCL3	CXCL10	CXCL2	IFN-γ	IL-4
CCL11	CCL2	CCL24	CCL7	CXCL11	CXCL5	IL-10	IL-6
CCL13	CCL20	CCL25	CCL8	CXCL12	CXCL6	IL-16	IL-8
CCL15	CCL21	CCL26	CXC3CL1	CXCL13	CXCL9	IL-1β	MIF
CCL17	CCL22	CCL27	CXCL1	CXCL16	GM-CSF	IL-2	TNF-α

Tab. 11: Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel (48-Plex)

BasicFGF	GRO-α	IL-12 p70	IL-1RA	IL-4	IP-10	MIG	SCGF-β
β-NGF	HGF	IL-13	IL-1α	IL-5	LIF	MIP-1α	SDF-1α
CTACK	IFN-α	IL-15	IL-1β	IL-6	MCP-1	MIP-1β	TNF-α
Eotaxin	IFN-γ	IL-16	IL-2	IL-7	MCP-3	PDGF-BB	TNF-β
G-CSF	IL-10	IL-17	IL2-RA	IL-8	M-CSF	RANTES	TRAIL
GM-CSF	IL-12 p40	IL-18	IL-3	IL-9	MIF	SCF	VEGF

### 6.2.9. ELISA

Ergänzend zum Multiplex-ELISA erfolgte die Analyse auf XCL-1 in der Wundflüssigkeit des zweiten post-operativen Tages mittels eines XCL-1/Lymphotactin-DuoSet®-ELISA-Kit, welcher die notwendigen Antikörper und Standards sowie Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (HRP) enthielt. Für die genannten Zellen wurde ihr jeweiliges Kulturmedium als Negativkontrolle verwendet. Laut Herstellerangaben wurde die 96-Well-Platte über Nacht mit 100 µl XCL-1-Fänger-Antikörper beschichtet. Hierauf wurde die Platte erneut gewaschen und mittels Reagenzlösung blockiert. Nach einem erneuten Waschschritt erfolgte die Zugabe von je 100 µl der unverdünnten Zellkulturüberstände und der 1:5 verdünnten Wundflüssigkeit, die zuvor auf Eis aufgetaut war. Auf die Inkubation folgte die Zugabe von 100 µl Detektions-Antikörper in vorgeschriebener Verdünnung, nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur die Zugabe von 100 µl Streptavidin-HRP pro Probe. Die Substratlösung wurde in einem 9+1-Verhältnis der Bio-Rad-Lösungen A und B vorbereitet und 100 µl Substratlösung wurden nach Inkubation und Waschen hinzugegeben. 20 min später wurde die Reaktion durch 50 µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beendet und mittels SynergyMx bei einer Absorptionslänge von 450 nm ausgelesen. Quantifiziert wurde anhand einer Standardkurve.

Zur Bestimmung des Flt3-Liganden wurden obengenannte Materialien mittels eines Human Flt-3-Ligand DuoSet® ELISA-Kits untersucht. Antikörper, Standards und Streptavidin-HRP waren wiederum im Kit enthalten. Am Versuchsvortag erfolgte die Beschichtung der Platte mit 100 µl Flt3-L-Fänger-Antikörper. Nach Waschen, Zugabe von 300 ml Reagenzverdünnungsmittel und Inkubation wurde je 100 µl verdünntes Probenmaterial hinzugegeben (Probendetails und Verdünnung analog zum XCL-1-ELISA). Hierauf wurden nach den jeweiligen Waschschritten 100 µl Detektions-Antikörper und 100 µl Streptavidin-HRP hinzugegeben. Nach 100 µl Substratlösung in o.g. Konzentration und dem Reaktionsstopp durch 50 µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> erfolgte nach analogen Inkubationszeiten die Auslesung am SynergyMx-Photometer bei 450 nm. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe einer Standardkurve durchgeführt.

In den primären Zellkulturüberständen von HMECs, HUVECs und NHDF-Ad wurde am zweiten Tag nach einer Bestrahlung mit 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 20 Gy die Zytokinbestimmungen von MIF und mit 0, 2, 4, 6, 8, 12 und 20 Gy für IL-3 vorgenommen. Die notwendigen Reagenzien waren in den Kits (Human MIF DuoSet® ELISA, Human IL-3 DuoSet® ELISA) enthalten und wurden laut Herstellerprotokollen verdünnt. Für die MIF-Bestimmung wurde die Platte über Nacht mit 100 µl MIF-Fänger-Antikörper versehen, am Versuchstag dann drei Mal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen und mit 300 µl Reagenzlösung blockiert. Nach Inkubation und erneutem Waschen wurden 100 µl Standard und 100 µl 1:1-verdünnte Überstände aufgetragen. 100 µl Detektions-Antikörper wurde nach erneuten drei Waschschriften hinzugegeben, hierauf wurden Streptavidin-HRP und schließlich die obengenannte Substratlösung hinzugefügt, nach 20 min Inkubation analog zu o. g. Protokoll gestoppt und ausgelesen. Die analoge Analyse wurde mittels Human IL-3 DuoSet® ELISA Kit durchgeführt mit dem Unterschied, dass unverdünntes Probenmaterial verwendet wurde.

### **6.2.10. RNA-Sequenzierung**

Vorbereitend wurden die zuvor kryokonservierten und in flüssigem Sauerstoff gelagerten Immunzellen (gesammelt und vorbereitet durch Anna-Maria Tiefenthaller) rasch aufgetaut und in 20 ml kühlem DPBS resuspendiert. Nach Zentrifugation (4°C, 314 g, 5 min) und einem Waschschritt in DPBS erfolgte die Verarbeitung der Pellets nach dem Protokoll des NucleoSpin®-miRNA-Kit. Die dabei isolierte Total-RNA (kurze und lange RNA) wurde in 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration mittels NanoDrop2000c UV-Vis-Spektrometer bestimmt (RNA-Isolation durchgeführt durch MSc. Nikko Brix).

Die Sequenzierung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe für Strahlenzytogenetik am HMGU Neuherberg (Leitung: Prof. Zitzelsberger) und der Firma Novogene (Library-Präparation am HMGU, Sequenzierung bei der Firma Novogene, Daten-Prozessierung und -Aufarbeitung durch PD Dr. Kristian Unger).

### **6.2.11. Anamnestische Datenanalyse**

Zur Erfassung von Alter, Allgemeinzustand, Menopausenstatus, Vorerkrankungen, Dauermedikation (v.a. in Hinblick auf Ausschlusskriterien, siehe hierzu Abschnitt 6.2.2.), Tumorbiologie und Histologie wurden die Patientinnenakten analysiert und beide Kohorten verglichen.

### **6.2.12. Statistische Analyse**

Die statistischen Analysen wurden mit OriginPro durch Prof. Dr. Kirsten Lauber durchgeführt. Die statistische Beratung erfolgte durch PD Dr. Steffen Unkel (Georg-August-Universität Göttingen).

Die Daten wurden entweder als Patientenzahlen, Prozentsätze, Mittelwerte oder Mediane einer Kohorte unter Angabe der Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Folgende statistische Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet: *Exact-Wilcoxon-Rank-Test*, ANOVA (*one-way* und *two-way*), Spearman-Korrelation, hierarchische Clusteranalyse und Netzwerkanalyse. Die Verwendung der statistischen Methoden erfolgte laut Angabe in den zugehörigen Abbildungstexten des Ergebnisteils.

## 7. Ergebnisse

Zwischen Juli 2015 und Dezember 2016 wurden 49 Patientinnen mit histologisch bestätigtem Mammakarzinom an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des LMU Klinikums, München, Deutschland, in diese klinische Begleitforschungsstudie eingeschlossen. Während 29 Patientinnen für die Kontrollgruppe rekrutiert werden konnten, waren es in der IORT-Gruppe 20 Patientinnen (siehe Abb. 4).

### 7.1. Die Kohorten sind hinsichtlich klinischer und histologischer Daten im Wesentlichen vergleichbar

Eine detaillierte Analyse der Kohorten-Eigenschaften ist den Abb. 4-6 zu entnehmen. Die Erhebung erfolgte aus den vorliegenden Krankengeschichten. Im Wesentlichen waren die beiden Kohorten vergleichbar. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass in der klinischen Routine IORT-Protokolle vor allem älteren Patientinnen angeboten werden. Daher ergaben sich signifikante Unterschiede hinsichtlich des Patientenalters, wobei die IORT-Kohorte mit einem Durchschnittsalter von 67,5 Jahren einen größeren Anteil älterer Patientinnen aufwies als die Kontroll-Kohorte (Durchschnittsalter 59,0 Jahre) (Abb. 5A).

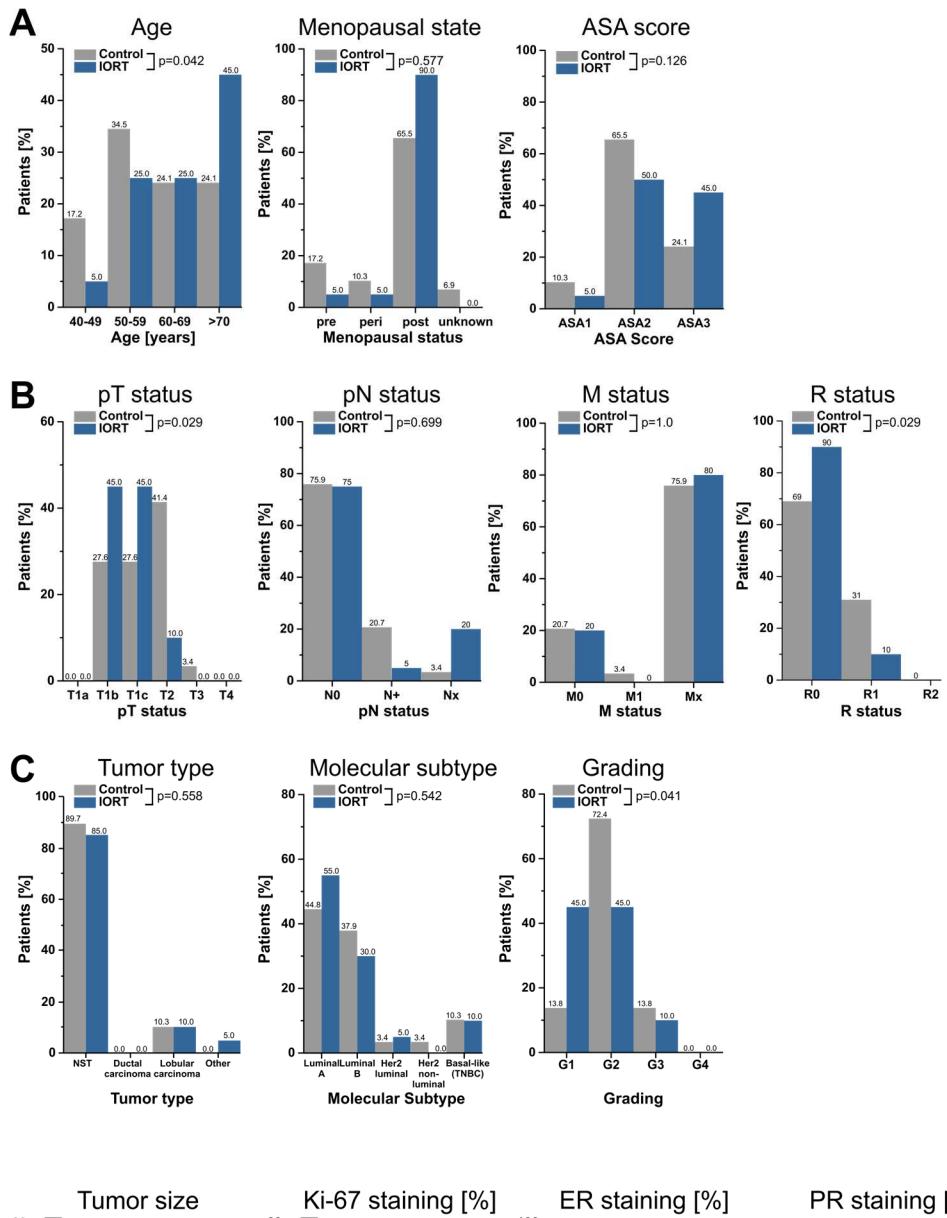
		Ctrl (N=29)	IORT (N=20)				
age [y]	median	59.00	67.50	molecular subtype [no. (%)]	Luminal A	13 (44.8)	11 (55.0)
	range	40-84	47-87		Luminal B	11 (37.9)	6 (30.0)
ASA [score]	mean	2.1	2.4		Her2/neu luminal	1 (3.4)	1 (5.0)
	median	2.0	2.0		Her2/neu non-luminal	1 (3.4)	0 (0.0)
	range	1-3	1-3		basal-like (TNBC)	3 (10.3)	2 (10.0)
pT status [no. (%)]	T1a	0 (0)	0 (0)	R status [no. (%)]	R0	20 (69.0)	18 (90.0)
	T1b	8 (27.6)	9 (45.0)		R1	9 (31.0)	2 (10.0)
	T1c	8 (27.6)	9 (45.0)	Axilla dissection [no. (%)]	performed	1 (3.4)	0 (0.0)
	T2	12 (41.4)	2 (10.0)		not performed	28 (96.6)	20 (100.0)
	T3	1 (3.4)	0 (0.0)	tumor size [mm]	median	16.0	11.0
pN status [no. (%)]	N0	22 (75.9)	15 (75.0)		range	6.0-50,0	18.0-34.0
	N1	6 (20.7)	1 (5.0)	menopausal status [no. (%)]	premenopausal	5 (17.2)	1 (5.0)
	Nx	1 (3.4)	4 (20.0)		postmenopausal	19 (65.5)	18 (90.0)
M status [no. (%)]	M0	6 (20.7)	4 (20.0)		perimenopausal	3 (10.3)	1 (5.0)
	M1	1 (3.4)	0 (0.0)		n.a.	2 (6.9)	0 (0.0)
	Mx	22 (75,9)	16 (80)				
Grading [no. (%)]	G1	4 (13.8)	9 (45.0)				
	G2	21 (72.4)	9 (75.0)				
	G3	4 (13.8)	2 (10.0)				
ER [%]	median	90.00	92.50				
	range	0-100	0-100				
PR [%]	median	80.00	40,00				
	range	0-100	0-100				
Her2/neu [no. (%)]	Her2/neu (-)	17 (58.6)	12 (60.0)				
	Her2/neu (+)	8 (27.6)	6 (30.0)				
	Her2/neu (++/neg.)	1 (3.4)	1 (5.0)				
	Her2/neu (++/pos.)	0 (0.0)	1 (5.0)				
	Her2/neu (+++)	2 (6.9)	0 (0.0)				
	Her2/neu (n.a., neg.)	1 (3.4)	0 (0.0)				
	Σ Her2 neg. (-/+/++/neg.)	26 (89.7)	19 (95.0)				
	Σ Her2 pos. (++/pos./+++)	3 (10.3)	1 (5.0)				
Ki-67 [%]	median	15.0	10.0				
	range	2.0-50.0	1.0-30.0				

**Abb. 4: Detaildarstellung der Vergleichsparameter.**

Der Vergleich von IORT- und Kontrollgruppe erfolgte anhand von Alter, Allgemeinzustand, Menopausenstatus, Tumogröße, TNM-Klassifikation, Gradierungsstufe, histologischen und tumorbiologischen Daten. Dargestellt ist die Anzahl der für das jeweilige Merkmal zutreffenden Patientinnen bzw. deren Median. Der prozentuale Anteil ist in runden Klammern angegeben. Deklarationen von Einheiten finden sich in eckiger Klammer. Sämtliche Informationen wurden der Krankengeschichte entnommen.

ASA, American Society of Anesthesiologists; ER, Östrogenrezeptor; IORT, intra-operative Radiotherapie; M, Metastasierung; N, Nodalstatus; n.a., keine Angabe; neg., negativ; no, Nummer; p, pathologisch; pos., positiv; PR, Progesteronrezeptor; R, Resektion; T, Tumor; TNBC, tripelnegatives Mammakarzinom; y, Jahre.

In den TNM-Stadien zeigten sich insofern Differenzen, als sich für die Patientinnen der Kontrollgruppe höhere Tumorstadien im pT-Status und häufigere R1-Resektionen ergaben (Abb. 5B). Auch dieser Unterschied lässt sich durch die Indikationsstellung erklären. Hinsichtlich des Differenzierungsgrades ergab sich für die Kontrollgruppe ein höherer Anteil an G2-Stadien (Abb. 5C). Die übrigen Parameter wie Allgemeinzustand, Menopausenstatus, N- und M-Status sowie die tumorbiologischen Eigenschaften ergaben keine signifikanten Unterschiede (Abb. 5, 6).



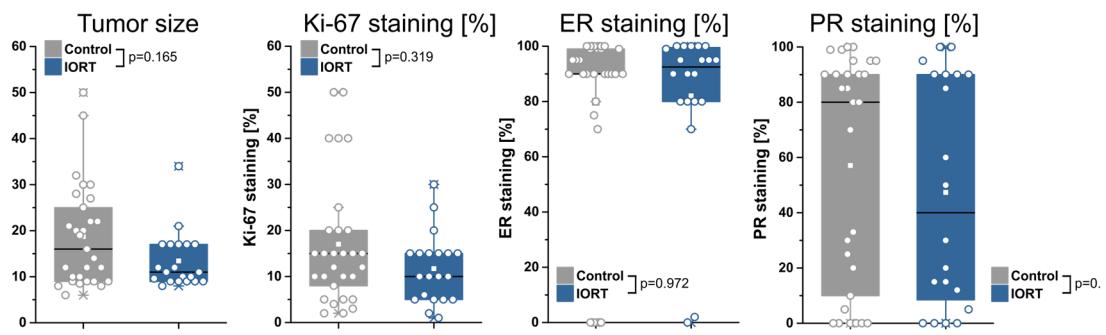
**Abb. 5:** Die Kohorten sind hinsichtlich klinischer und histologischer Eigenschaften vergleichbar.

**(A)** Darstellung der klinischen Parameter Alter, Menopausenstatus und Performance-Score laut der American Society of Anesthesiologists.

**(B)** TNM-Stadien der exzidierten Tumoren laut histologischem Befund.

**(C)** Tumorbiologische Eigenschaften und *Tumograding* laut histologischem Befund. Sämtliche statistischen Berechnungen erfolgten mittels Exact-Wilcoxon-Rank-Test.

ASA, American Society of Anesthesiologists; IORT, intra-operative Radiotherapie; M, Metastasierungs-Status; N, Nodal-Status; p, pathologisch; T, Tumor.

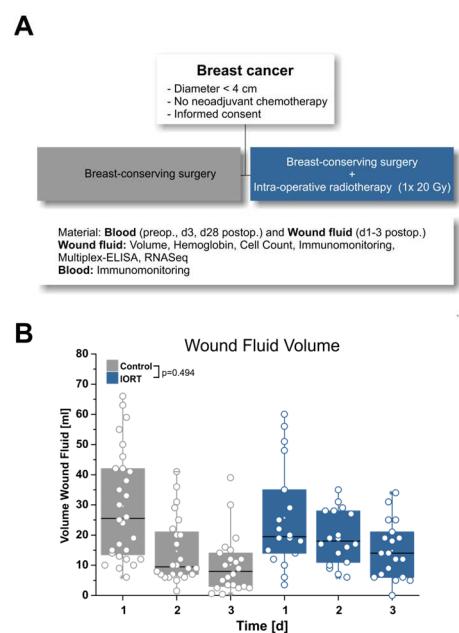


**Abb. 6:** Die Kohorten zeigen keine signifikante Unterschiede hinsichtlich Tumorgröße und tumorbiologischer Eigenschaften. Erhebung von Tumorgröße und TumorbioLOGIE anhand histopathologischer und tumorbiologischer Befunde aus der Patientinnengeschichte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Exact-Wilcoxon-Rank-Test.

## 7.2. Einblutungsgrad, Volumen und Zellularität der Wundflüssigkeitsproben in beiden Kohorten sind im Wesentlichen vergleichbar

Nach der Gewinnung des Drainage-Inhaltes wurde das Volumen der Wundflüssigkeit bestimmt. Der Hämoglobingehalt wurde als Maß des post-operativen Bluteinstroms und damit der passiven Einschwemmung von Immunzellen photometrisch mit Hilfe der *Drabkin*-Reaktion erhoben. Die Gesamt-Leukozytenzahl wurde sowohl manuell mittels Neubauer-Zählkammer als auch maschinell mittels *FACS-Count-Bright-Beads* bestimmt, als Grundlage für weitere Berechnungen diente der Mittelwert aus manueller und maschineller Quantifizierung. Weder hinsichtlich des Volumens noch des Hämoglobin-Gehaltes ergaben sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Kohorten (Abb. 7B, C). Die Gesamt-Leukozytenzahl war in den IORT-Proben am zweiten und dritten post-operativen Tag erhöht, der Unterschied erreichte allerdings keine statistische Signifikanz (Abb. 7D).

Wie in Abb. 7C dargestellt, war am ersten post-operativen Tag in der Wundflüssigkeit ein relativ hoher Hämoglobinanteil verglichen mit den Werten des venösen Blutes festzustellen, sodass von einem beachtlichen Anteil an post-operativ in die Wundhöhle eingeflossenen Blutes auszugehen war. Für den dritten post-operativen Tag zeigten sich die Analysen häufig erschwert, da die Menge der Wundflüssigkeit bereits deutlich reduziert war, sodass Materialbedingt teilweise nicht alle Analysen durchgeführt werden konnten. Als methodisch optimaler Beobachtungszeitpunkt wurde daher der zweite post-operative Tag gewählt, auf dessen Biomaterial sich alle folgenden Auswertungen beziehen.



**(B)** Bestimmung des Wundflüssigkeitsvolumens zu fixen Analysezeitpunkten mittels geeichter Messvorrichtungen. **(C)** Hämoglobinbestimmung in der Wundflüssigkeit als Maß zur Differenzierung zwischen aktiver Rekrutierung und passiver post-operativer Einschwemmung von Blutbestandteilen. Die Analyse erfolgte photometrisch anhand der *Drabkin*-Reaktion. **(D)** Gesamt-Leukozytenzahl in der Wundflüssigkeit zu den Messzeitpunkten. Die Zählung erfolgte manuell mittels Neubauer-Zählkammer und durchflusszytometrisch mittels *FACS-Count-Bright-Beads*, dargestellt ist der errechnete Mittelwert aus manueller und maschineller Zählung und der Standardfehler des Mittelwertes. Sämtliche statistischen Berechnungen erfolgten mittels two-way ANOVA. Dargestellt sind die p-Werte in Bezug auf den Faktor "IORT ja/nein".

d, Tag; Gy, Gray; IORT, intra-operative Radiotherapie.

**Abb. 7: Einblutungsgrad, Volumen und Zellzahl sind in den Wundflüssigkeitsproben beider Kohorten vergleichbar.**

**(A)** Darstellung des Studiendesigns. Mammakarzinom-Patientinnen, die die genannten Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten, wurden einer brusterhaltenden Operation mit oder ohne IORT unterzogen. Blut und Wundflüssigkeit wurde prä- und post-operativ mit Zustimmung der Patientinnen zu definierten Zeitpunkten gesammelt und auf die genannten Eigenschaften untersucht.

### 7.3. IORT mit 20 Gy induziert eine verstärkte Rekrutierung von Monozyten, eosinophilen Granulozyten, pDCs und B-Zellen in die Tumorloge

Wie bereits in Kapitel 4 erläutert, gibt es in der Literatur Hinweise auf die Induktion immunologischer Effekte durch Bestrahlung mit höheren Einzeldosen. Um diese Effekte auch im klinischen Setting zu beobachten, wurden venöses Blut am prä-operativen, am dritten und am 28. post-operativen Tag sowie Wundflüssigkeit an den ersten drei post-operativen Tagen auf diverse Immunzellsubpopulationen untersucht. Blut und Wundflüssigkeit wurden einer Erythrozytenlyse unterzogen und mittels eines 11-Farben-Antikörperpanels gefärbt [73]. Die durchflusszytometrische Analyse ermöglichte eine Darstellung diverser Leukozyten-Subpopulationen, wobei die Strategie der Bestimmung in Abb. 3 angeführt ist. Für die Wundflüssigkeit sind stets die Ergebnisse des zweiten post-operativen Tages dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Exact-Wilcoxon-Rank-Test* mit *Bonferroni-Holm-Multiple-Testing-Korrektur* in der Wundflüssigkeit und mittels *one-way ANOVA* (Faktor Tag nach Operation) im Blut.

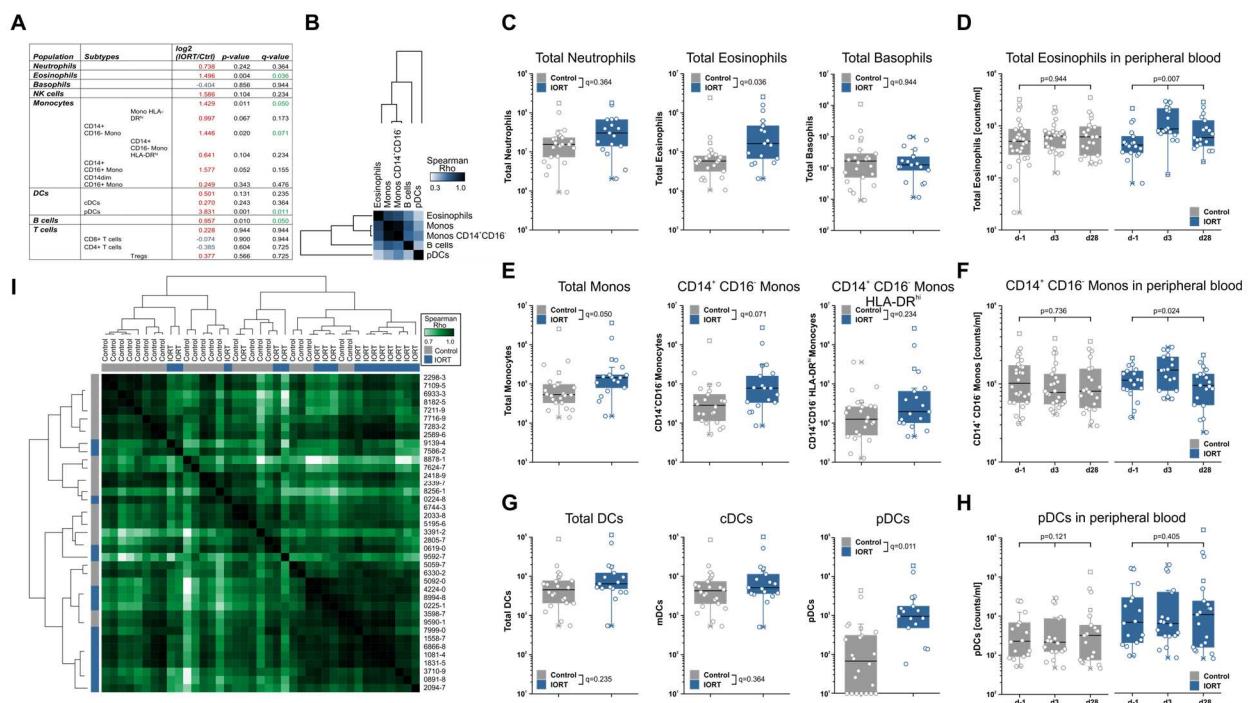


Abb. 8: IORT (1x20 Gy) induziert einen Anstieg an Monozyten, eosinophilen Granulozyten, pDCs und B-Zellen im ehemaligen Tumorbett.

Blut und Wundflüssigkeit wurden nach Gewinnung und Erythrozyten-Lyse mittels Multicolor-FACS auf diverse Immunzell-Populationen untersucht. Diese wurden nach der in Abb. 3 angeführten Gating-Strategie definiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Wundflüssigkeits-Analysen am zweiten post-operativen Tag. Für die Blutanalysen sind die Verläufe vom prä-operativen über den dritten bis zum 28. post-operativen Tag dargestellt. (A) Tabellarische Übersichtsdarstellung der untersuchten Leukozyten-Subpopulationen der Wundflüssigkeit und die (B) hierarchische Clusteranalyse signifikant veränderter Subpopulationen. (C) Detaildarstellung der Quantifizierung neutrophiler, eosinophiler und basophiler Granulozyten in der Wundflüssigkeit anhand der Oberflächenmarker CD16, CD123, HLA-DR und SSC. (D) Darstellung der eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut anhand des Oberflächenmarkers CD16 und des SSC im Zeitverlauf. (E) Analyse der Monozyten und ihrer Subpopulationen in der Wundflüssigkeit mittels der Oberflächenmarker CD14 und CD16. (F) Analoge Analysen für die Subgruppe der CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> Monozyten des peripheren Blutes im Zeitverlauf. (G) Quantifizierung von DCs und ihren Untergruppen cDCs und pDCs mittels ihrer Oberflächenantigene CD123 und HLA-DR in Wundflüssigkeit und Blut. (H) Darstellung der pDCs des Blutes im Zeitverlauf. (C, E, G) Die statistischen Analysen erfolgten mittels *Exact-Wilcoxon-Rank-Test* mit *Bonferroni-Holm-Multiple-Testing-Korrektur*. (D, F, H) Sämtliche Analysen wurden einer *one-way ANOVA* unterzogen. (I) Sample-to-Sample-Korrelation (nach Spearman) der Wundflüssigkeit des zweiten post-operativen Tages und ihre hierarchische Clusteranalyse.

c, klassisch; CD, Cluster-of-Differentiation; d, Tag; DC, Dendritische Zelle; dim, niedrig; FACS, Durchflusszytometrie; hi, hoch; HLA-DR, Humanes-Leukozytenantigen-DR (MHC-II); IORT, intra-operative Radiotherapie; log, Logarithmus; neg., negativ; p, plasmazytid; pos., positiv; SSC, Seitwärts-Streulicht.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten (auf welche in den folgenden Unterkapiteln noch detaillierter eingegangen wird) ergaben sich in der Wundflüssigkeit für eosinophile Granulozyten, Gesamtmonozyten, CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> klassische Monozyten, pDCs und B-Zellen am zweiten post-operativen Tag (Abb. 8A), während der Unterschied in der Gesamt-Leukozytenzahl zwischen den Kohorten keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 7D). Für Eosinophile und klassische Monozyten konnte ein transienter Anstieg im Blut an Tag 3 nachgewiesen werden (Abb. 8D, F). Für neutrophile und basophile Granulozyten, NK-Zellen und T-Zellen ergaben sich weder lokal noch systemisch signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten (Abb. 8A).

Eine hierarchische Clusteranalyse der Spearman-Korrelationsmatrix signifikant veränderter Zellpopulationen in den Wundflüssigkeiten ist in Abb. 8B dargestellt. Das Dendrogramm teilt die Populationen hierbei nach Ähnlichkeit des Rekrutierungsmusters in drei Gruppen. Die erste Gruppe bildeten Gesamt-Monozyten und klassische Monozyten, was zu erwarten war, da klassische Monozyten eine Subpopulation der Monozyten bilden. Die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten war der der Monozyten am ähnlichsten. Das Rekrutierungsmuster der B-Zellen unterschied sich hingegen deutlich von dem der vorgenannten Populationen und noch erheblich größere Unterschiede ergaben sich für die pDCs.

### **7.3.1. IORT induziert einen lokalen und systemischen Anstieg eosinophiler Granulozyten**

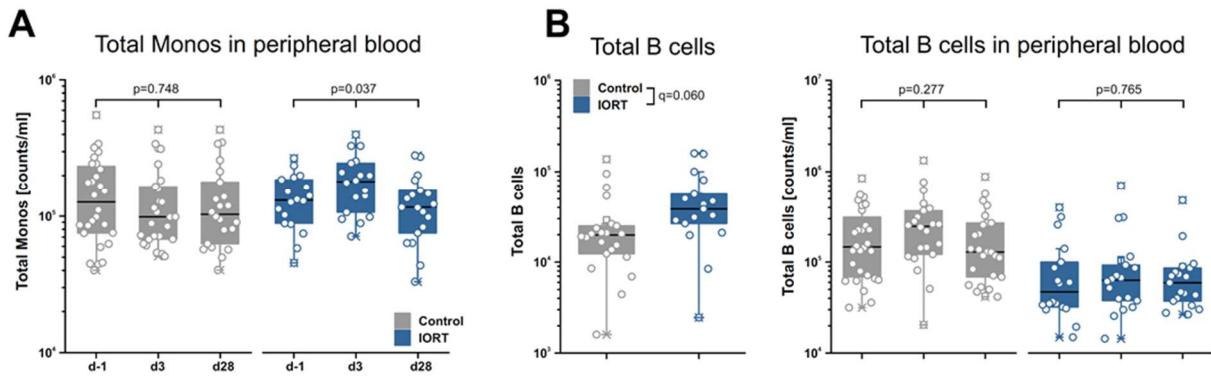
Eosinophile Granulozyten werden traditionellerweise mit Parasiteninfektionen, Autoimmunkrankheiten und allergischen Reaktionen in Verbindung gebracht und wurden erst später Gegenstand onkologischer Forschung [74, 75]. Hierbei sind sie insbesondere als prognostische Marker ins Licht näherer Betrachtung gerückt [75-80].

In der aktuellen Studie zeigte sich eine signifikante Erhöhung eosinophiler Granulozyten im Tumorbett IORT-behandelter Mammakarzinome. Diese war begleitet von einem signifikanten transienten Anstieg der Eosinophilen im peripheren Blut am dritten post-operativen Tag (siehe Abb. 8C, D).

### **7.3.2. Rekrutierung von Monozyten und insbesondere klassischen Monozyten nach IORT in Blut und Wundflüssigkeit**

Monozyten nehmen als professionelle Phagozyten eine wichtige immunologische Rolle ein. Ihre Unterteilung erfolgt anhand ihrer Oberflächenmarker CD14 und CD16 in drei Gruppen. Der häufigste Typ sind die CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> klassischen Monozyten. Die CD16<sup>+</sup> Monozyten lassen sich in CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> nicht-klassische und CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> intermediäre Monozyten unterteilen. [81]

Blut und Wundflüssigkeit wurden zu den genannten Zeitpunkten auf CD14 und CD16 gefärbt und auf diverse Monozyten-Subpopulationen untersucht. Für die IORT-Gruppe zeigte sich eine signifikant erhöhte Infiltration der Gesamt-Monozyten, insbesondere aber der CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> klassischen Monozyten ins ehemalige Wundbett. Diese Entwicklungen spiegelten sich auch im peripheren Blut wider, wobei sich ein passagerer systemischer Anstieg am dritten post-operativen Tag zeigte. (Abb. 8E, F, 9A).



**Abb. 9: Lokale Bestrahlung mit hohen Einzeldosen induziert am zweiten Tag nach Therapie einen signifikanten Monozyten-Anstieg im peripheren Blut.**

(A) Durchflusszytometrische Analyse von Monozyten im peripheren Blut. Nach Erythrozyten-Lyse erfolgten die FACS-Färbung und das Gating auf CD14, CD16 und HLA-DR. (B) Analoge Darstellung der B-Zellen nach Gating auf CD19 und CD20 in Wundflüssigkeit und Blut. Die Berechnungen erfolgten für das periphere Blut mittels one-way ANOVA und für die Wundflüssigkeit mittels Exact-Wilcoxon-Rank-Test unter Bonferroni-Holm-Multiple-Testing-Korrektur.

d, Tag; IORT, intra-operative Radiotherapie.

### 7.3.3. IORT induziert die Einwanderung plasmazytoider dendritischer Zellen ins Wundbett

Dendritische Zellen sind als Antigen-präsentierende Zellen ebenfalls an der Elimination und Kontrolle körpereigener und -fremder Substanzen beteiligt. Durchflusszytometrisch lassen sie sich mittels CD123 und HLA-DR bestimmen und in zwei Subgruppen unterteilen: die klassischen (cDCs) und die v.a. Typ-I-Interferon-produzierenden plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs). [73, 82, 83]

Durchflusszytometrisch ergab sich eine signifikante Erhöhung der pDCs in der ehemaligen Tumorloge am zweiten Tag nach IORT, die sich in der systemischen Zirkulation jedoch nicht abzeichnete (Abb. 8G, H).

### 7.3.4. Rekrutierung von B-Zellen in die Wundflüssigkeit nach IORT

B-Zellen sind ein wichtiges Element der adaptiven und humoralen Immunantwort und sind wesentlich an der Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses beteiligt [84]. Ein wichtiger Beitrag an immunologischen Reaktionen ist die Antikörper-Sekretion [84].

Analog zu den pDCs zeigten auch die B-Zellen nur eine lokale Infiltration des ehemaligen Wundbettes, ein systemischer Anstieg im peripheren Blut war nicht zu beobachten (Abb. 9B).

### 7.3.5. Die Kohorten unterscheiden sich hinsichtlich der Immunzellgruppen

Zur Darstellung gemeinsamer Eigenschaften wurden alle Wundflüssigkeitsproben des zweiten postoperativen Tages einander gegenübergestellt. In der hierarchischen Sample-to-Sample-Korrelations-Clusteranalyse ergaben sich zwei Hauptarme, die die beiden Kohorten unscharf trennten. Dennoch war zu erkennen, dass der an Patientenzahl größere der beiden Arme bis auf drei Ausnahmen alle IORT-Patientinnen enthielt (Abb. 8I). Die IORT-Proben wiesen somit offensichtlich ähnliche zelluläre Eigenschaften auf, eine vollständige Kohorten-Trennung war jedoch auf zellulärer Ebene nicht möglich.

## **7.4. IORT mit 20 Gy induziert in Normalgewebszellen der Brust eine Seneszenz-Antwort in vitro und die Menge bestimmter Seneszenz-assozierter Zytokine korreliert mit den rekrutierten Immunzellen in der Wundflüssigkeit**

Wie in Abb. 8 gezeigt, kann Bestrahlung mit hohen Einzeldosen eine lokale Rekrutierung bestimmter Immunzell-Subpopulationen, teilweise mit parallelen transienten Anstiegen im peripheren Blut, induzieren. An dieser Stelle ergibt sich die Frage, wie diese Immunzellen rekrutiert und welche zellulären und humoralen Komponenten vorrangig an der Rekrutierung beteiligt sind.

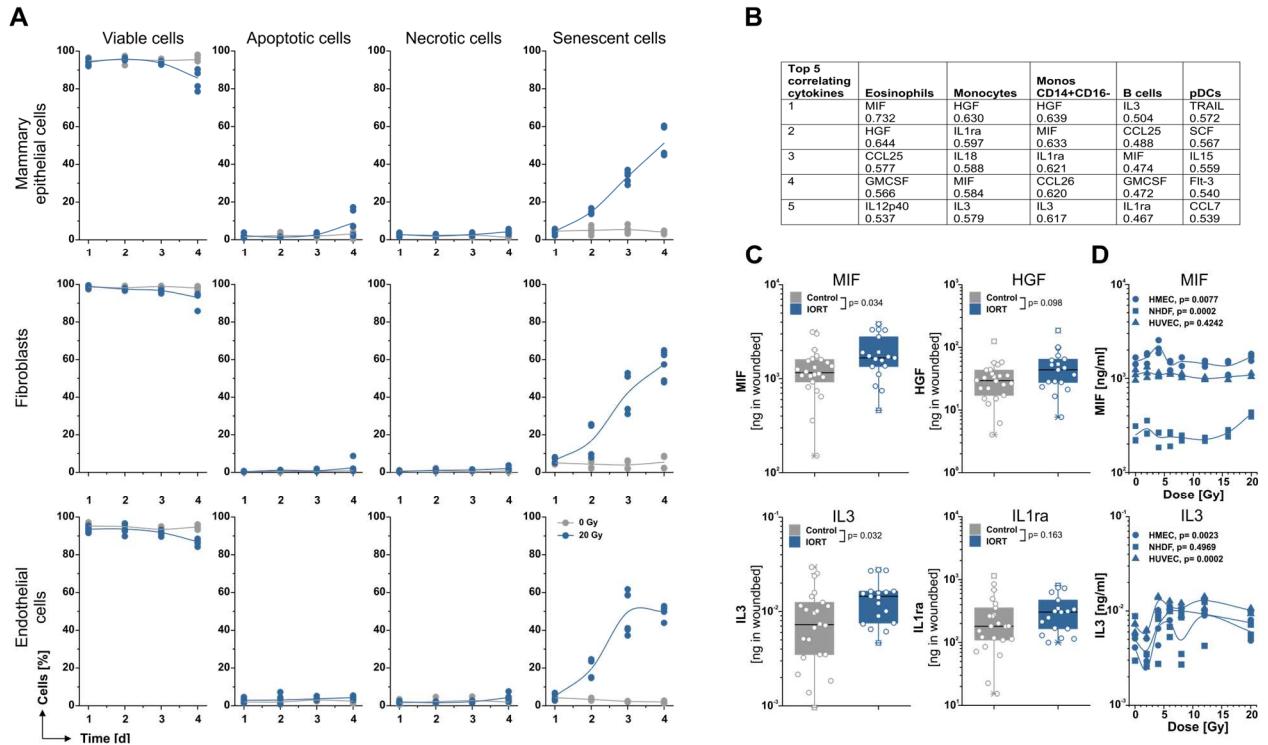
### **7.4.1. Normalgewebszellen der Brust reagieren auf Bestrahlung mit hohen Einzeldosen vorwiegend mit einer Seneszenz-Antwort**

Im Rahmen einer brusterhaltenden Operation wird der Tumor exzidiert und das umliegende nicht-maligne Brustgewebe mit etwaig verbliebenen Tumorzellen anschließend durch eine IORT bestrahlt (s. Abb. 2). Um näher zu beleuchten, wie nicht-malignes Brustgewebe auf Bestrahlung mit hohen Einzeldosen reagiert und um herauszufinden, welche Zelltypen zu dieser Immunzell-Rekrutierung beitragen könnten, wurden repräsentative primäre Zellen verschiedener Normalgewebs-Zelltypen mit und ohne Bestrahlung in vitro untersucht.

In dieser Untersuchung wurden Brustepithelzellen (HMECs), adulte Fibroblasten (NHDF-Ad) und Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs) nicht oder mit 20 Gy bestrahlt und an den vier darauffolgenden Tagen auf Viabilität und Zelltod-Induktion analysiert. Viabilitäts- und Zelltodanalysen erfolgten durchflusszytometrisch, wobei für Annexin-V-positive Zellen apoptotisch, doppelt positive Zellen (Annexin-V- und PI-positiv) als nekrotisch und doppelt negative Zellen als viabel gewertet wurden. Die Seneszenz wurde anhand der SA- $\beta$ gal-Aktivität und des SSC bestimmt.

Die Viabilität der primären Zelltypen blieb nach Bestrahlung mit 20 Gy weitgehend erhalten (Abb. 10A). Während sich das Ausmaß an apoptotischen und nekrotischen Zellen nach höher dosierter Bestrahlung in Grenzen hielt, traten post-radiogen innerhalb von vier Tagen hingegen mehr als die Hälfte der Zellen in eine Seneszenz über. Zusammenfassend zeigt Abb. 10A, dass verschiedene Normalgewebe eine Einzeldosisbestrahlung von 20 Gy durchaus ohne nennenswerte Viabilitäts-Verluste tolerieren, was sich in sehr niedrigen Apoptose- und Nekrose-Raten widerspiegelt, dass diese Dosis jedoch eine ausgeprägte Seneszenz-Antwort induziert.

Seneszenz bedeutet einen Zustand permanenten Zellzyklusarrests bei erhaltenem, wenn auch verändertem Metabolismus [21]. Senescente Zellen produzieren diverse Zytokine, Chemokine, pro-angiogenetische und Wachstumsfaktoren – ein Spektrum, das in seiner Gesamtheit als Seneszenz-assozierter sekretorischer Phänotyp (SASP) bezeichnet wird [85]. Somit können senescente Zellen einen maßgeblichen Einfluss auf Angiogenese, Metastasierung und Leukozytenrekrutierung ausüben und Immunreaktionen modulieren [85].



**Abb. 10: In nicht-malignem Brustgewebe erfolgt durch Bestrahlung mit hohen Einzeldosen eine Seneszenz-Induktion und Seneszenz-assoziierte Zytokinveränderungen entsprechen rekrutierten Immunzell-Populationen in der Wundflüssigkeit.**

(A) HMECs, NHDF-Ad und HUVECs wurden unbestrahlt oder nach 20 Gy Bestrahlung an den ersten vier Tagen nach Bestrahlung auf ihre Viabilität und auf diverse Zelltod-Formen untersucht. Die Analysen erfolgten durchflusszytometrisch mittels Annexin-V-FITC/PI-Färbung. Das Seneszenz-Ausmaß wurde anhand von SA- $\beta$ gal-Aktivität und SSC-Zunahme bestimmt. (B) Korrelation der untersuchten Zytokine mit der Zellzahl der nach IORT in signifikantem Ausmaß eingewanderten Zellpopulationen im Wundbett (gezeigt sind die Top-5-Korrelationen). Die Zytokine wurden mittels Multiplex-ELISA bestimmt, die Immunzell-Charakterisierung und -Zählung mittels FACS durchgeführt. Die statistischen Berechnungen erfolgten mittels Spearman-Korrelation. (C) Darstellung der Zytokinmengen von MIF, HGF, IL-3 und IL-1ra im Wundbett. Die Bestimmung erfolgte mittels Multiplex-ELISA, die statistische Auswertung mittels Exact-Wilcoxon-Rank-Test. (D) Zytokin-Analysen von MIF und IL-3 für kultivierte primäre Zellen (HMEC, NHDF-Ad und HUVEC) nach Bestrahlung mit 0-20 Gy. Der Einfluss des Faktors Bestrahlungsdosis wurde über eine one-way ANOVA bestimmt.

d, Tag; CCL, CC Chemokinligand; GM-CSF, Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor; Gy, Gray; IL, Interleukin; MIF, Macrophage-Migration-Inhibitory-Factor; HGF, Hepatocyte-Growth-Factor; IL, Interleukin; Macrophage-Migration-Inhibition-Factor; ra, Rezeptorantagonist; SSC, Seitwärts-Streulicht; TRAIL, Tumornekrosefaktor-verwandter-Apoptose-induzierender Ligand.

#### 7.4.2. MIF und IL-3 zeigen höchste Korrelationen zwischen zellulären und humoralen Analysen und sind in der Wundflüssigkeit nach IORT erhöht

Um zu untersuchen, welche Zytokine und Chemokine vorrangig nach einer IORT ausgeschüttet werden und mit einer Rekrutierung distinkter Immunzell-Populationen einhergehen, wurden Korrelationsanalysen der in den IORT-Wundflüssigkeiten signifikant veränderten Zellpopulationen mit den untersuchten Zytokinen der Wundflüssigkeit durchgeführt (Abb. 10B, gezeigt sind die Top-5-Korrelationen). Hierbei fiel auf, dass bestimmte Zytokine mit der Rekrutierung mehrerer Zellpopulationen sehr stark korrelierten. So zeigte sich beispielsweise der Makrophagen-Migrations-hemmende Faktor (MIF) in vier der fünf untersuchten Populationen unter den Top-5, der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra) und IL-3 jeweils in drei der fünf Populationen. Auffällig war zudem, dass die Korrelation der pDC-Rekrutierung ein völlig anderes führendes Zytokinmuster aufwies, während sich jene der anderen vier genannten Immunzell-Gruppen ähnelten.

Bei isolierter Betrachtung der Zytokin-ELISA-Ergebnisse zeigten sich MIF und IL-3 nach IORT in der Wundflüssigkeit signifikant erhöht, während HGF und IL-1ra im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar tendenziell, aber nicht signifikant erhöht waren (Abb. 10C).

MIF ist an der Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten sowie deren Transmigration beteiligt [86]. HGF ist in Wundheilungsprozessen, Angiogenese und Zellproliferation involviert und in der Signaltransduktion eng mit dem Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B verbunden [87]. IL-3 ist in der Myelopoiese und in inflammatorischen Prozessen involviert [88]. IL-1ra reguliert diverse Rezeptoren der IL-1-Familie negativ. Da letztere über nachgeschaltete immunologische Signalkaskaden bekanntlich Tumorprogress, Angiogenese und Metastasierung fördern, kommt IL-1ra eine relevante tumorprotektive Rolle zu. [89]

#### **7.4.3. MIF und IL-3 werden *in vitro* nach Bestrahlung von Normalgewebszellen der Brust produziert**

Um die Zytokin-Produktion nach Bestrahlung auch im Zellkulturmodell zu untersuchen, wurden HMECs, HUVECs und NHDF-Ad mit 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 20 Gy bestrahlt und MIF und IL-3 analog zur Studiensituation an Tag 2 nach Bestrahlung im ELISA bestimmt. Quantitativ wurde MIF insbesondere von Mamma-Epithelzellen sezerniert, während die IL-3-Spiegel in den Überständen aller Zelltypen deutlich geringer und insgesamt auf ähnlichem Niveau lagen. Für MIF ergab die *one-way* ANOVA einen signifikanten Einfluss der Bestrahlung auf Mamma-Epithelzellen und Fibroblasten, für IL-3 eine Signifikanz für Mamma-Epithelzellen und Endothelzellen. Auffällig war, dass sich in Epithelzellen für beide Zytokine ein Maximum bei 4-6 Gy zeigte, für MIF ergab sich ein zweiter Anstieg bei 20 Gy, für IL-3 bei ca. 12 Gy. Analog zu Mamma-Epithelzellen traten in Endothelzellen IL-3-Maxima bei 4-6 Gy und bei ca. 12 Gy auf. In NHDF-Ad war die MIF-Konzentration in den Überständen insgesamt erheblich geringer, wobei eine Induktion im höheren Dosisbereich beobachtet wurde (Abb. 10D).

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine strahlungsinduzierte MIF-Freisetzung vor allem in Mamma-Epithelzellen beobachtet werden kann, wobei diese Induktion bei einer Dosis von 4 Gy ihr absolutes Maximum erreichte. Die MIF-Freisetzung aus Fibroblasten war im Vergleich hierzu erheblich geringer, jedoch konnte auch hier eine Induktion vor allem nach Bestrahlung mit 20 Gy beobachtet werden, wohingegen eine strahlungsindizierte Freisetzung von MIF bei Endothelzellen nicht erkennbar war.

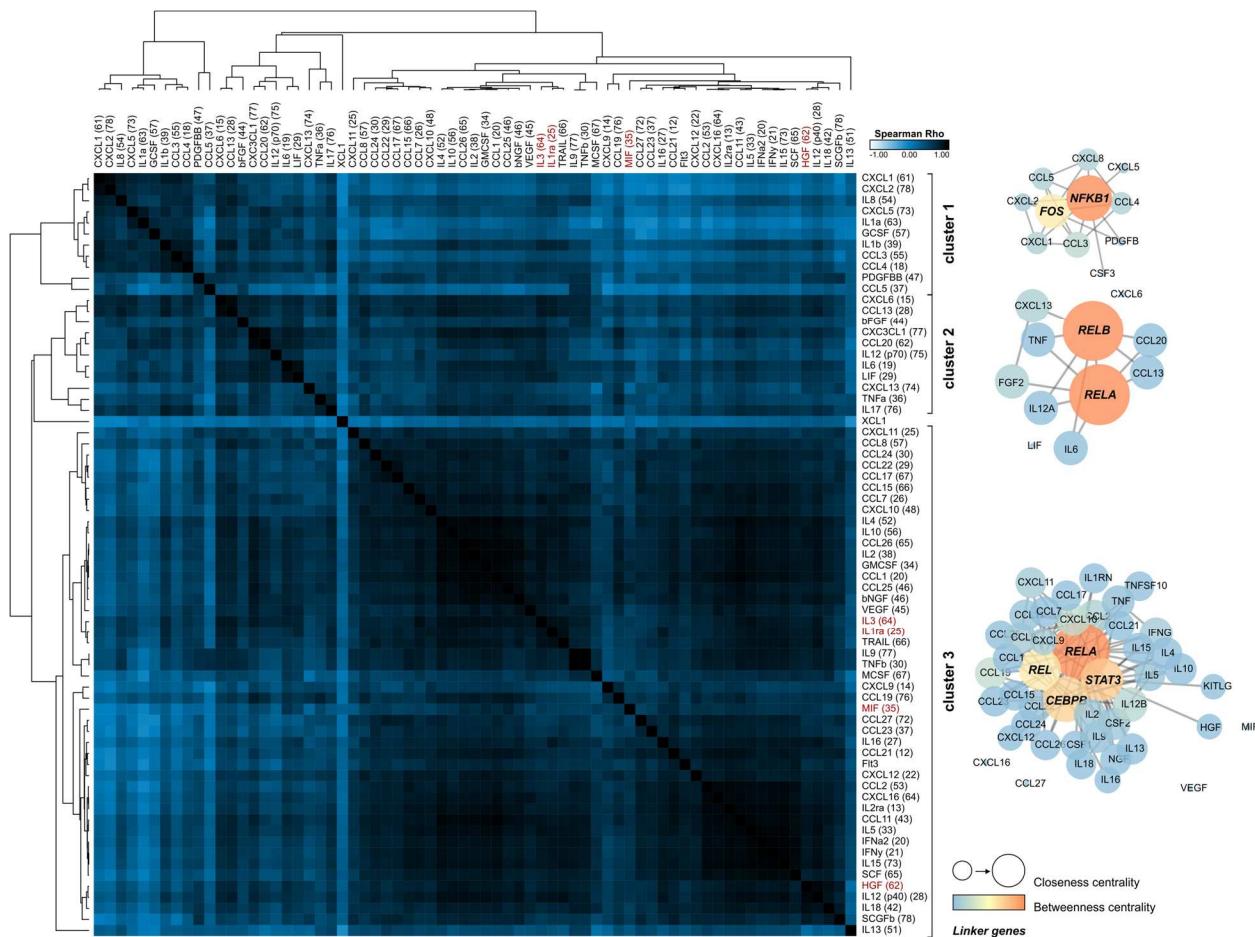
IL-3 wurde strahlungsinduziert vorrangig von Epithelzellen sowie nicht-malignen Mamma-Epithelzellen produziert, wobei im Dosisbereich von 4-6 Gy und bei ca. 12 Gy die stärkste Freisetzung gemessen wurde.

#### **7.5. Zytokin-zu-Zytokin-Korrelationsanalysen identifizieren drei Cluster von Zytokinen, die über verschiedene Transkriptionsfaktor-Netzwerke gesteuert werden**

Zur Evaluation der Zytokin-Veränderungen nach Bestrahlung im In-vitro- sowie In-vivo-Setting wurde die Wundflüssigkeit des zweiten post-operativen Tages mittels Multiplex-ELISA einer Zytokin- und Chemokin-Bestimmung unterzogen. Hierbei zeigten sich MIF und IL-3 signifikant erhöht (Abb. 10C).

Eine hierarchische Zytokin-zu-Zytokin-Korrelationsanalyse unterteilte diese in drei Cluster und damit Gruppen ähnlicher Eigenschaften, wobei sich alle vier der bestkorrelierenden Zytokine aus Abb. 10B – in

Abb. 11 in Rot dargestellt – im dritten Cluster befanden. Eine Netzwerkanalyse der Transkriptionsfaktoren (mit *Linker-Genes*) anhand der drei Cluster stellt die Nähezentralität als Maß für die Distanz zu anderen Punkten des Netzwerks und die Zwischenzentralität als Maß der Verbindung zwischen Elementen dar [90]. In Cluster 1 ergeben sich zentrale Positionen für die Transkriptionsfaktoren NF<sub>k</sub>B1 und FOS, in Cluster 2 ragen RELA und RELB aus dem Netzwerk, die Untereinheiten des Transkriptionsfaktors NF<sub>k</sub>B bilden. Unter den Transkriptionsfaktoren des Clusters 3, der die mit den Immunzellen bestkorrelierenden Zytokine enthält, nehmen RELA, STAT3, CEBPB und REL zentrale Stellungen ein, wobei RELA und REL wiederum Familienmitglieder der NF<sub>k</sub>B-Familie sind.



Zuständen infektiologischen und malignen Ursprungs [91]. Die Proteine RelA, RelB und c-Rel stellen Teilproteine des Proteinkomplexes NF $\kappa$ B dar, ihre entsprechenden Gene werden als RELA, RELB und REL bezeichnet [92].

Das CEBPB-Gen codiert den Transkriptionsfaktor *CCAAT-Enhancer-Bindungsprotein- $\beta$* , der in der Adipozyten-Differenzierung, B-Zell-Lymphopoese, Granulopoese, in akuten Infektsituationen, der Makrophagen-Polarisation und Regulation immunologisch relevanter Gene involviert ist [93-95].

Mitglieder der FOS-Familie bilden Teile eines größeren Transkriptionsfaktoren-Komplexes, der häufig am Tumorprogress beteiligt ist, je nach Tumorentität variiert jedoch die Funktion von FOS [96].

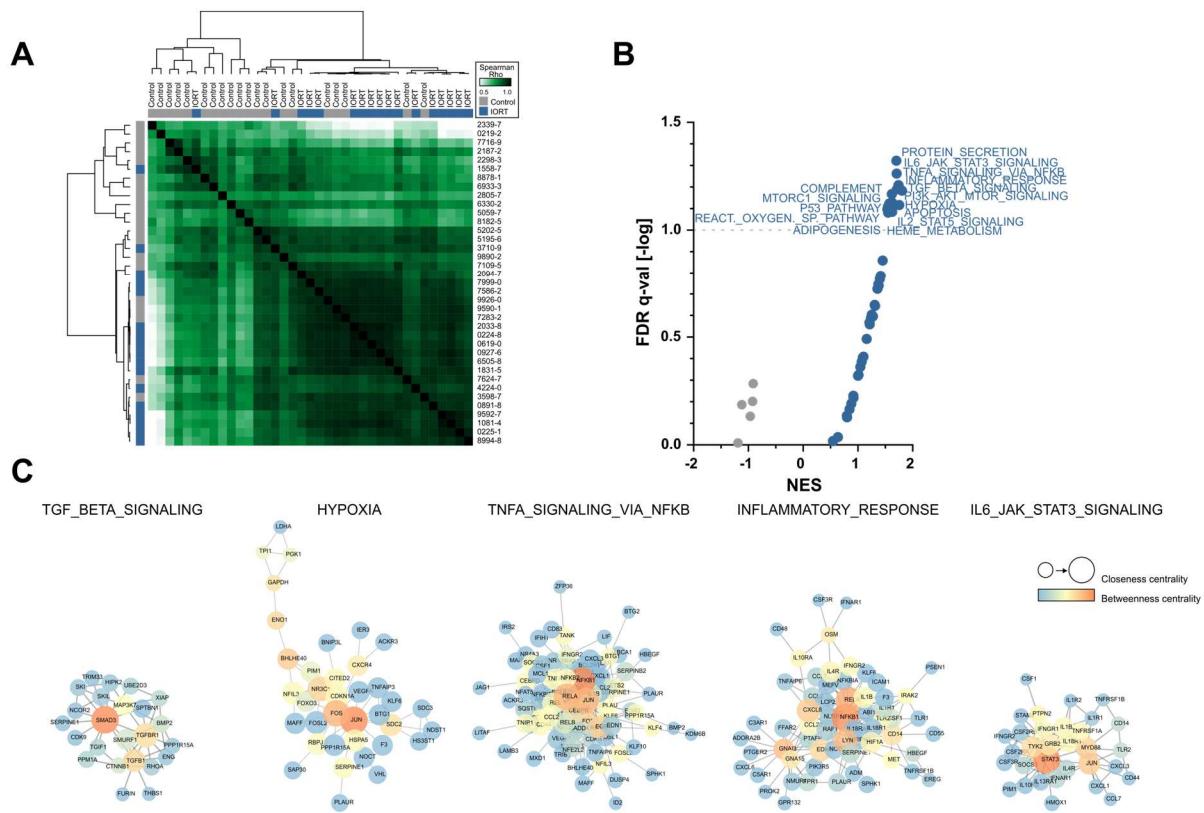
## **7.6. Die *Gene-Set-Enrichment-Analysen* von RNA-Sequenzierungsdaten in Wundflüssigkeitszellen zeigen eine Aktivierung von Immunzellen unter Beteiligung von NF $\kappa$ B-, JAK-STAT-, TGF- $\beta$ - und Hypoxie-assoziierten Signalwegen nach IORT**

Zur Darstellung der biologischen Konvergenz der Kohorten auf RNA-Ebene wurden die Proben unter Verwendung der 100 am stärksten differenziell exprimierten Gene einer *Sample-to-Sample*-Korrelation unterzogen (Abb. 12A). Somit erfolgte im Rahmen dieser *Sample-to-Sample*-Korrelationsanalyse kein direkter Vergleich der beiden Kohorten, sondern ein qualitativer Vergleich aller Proben beider Kohorten untereinander. In der hierarchischen Clusteranalyse der *Sample-to-Sample*-Korrelationsanalyse ergaben sich zwei Hauptgruppen, die die beiden Kohorten nur unscharf, aber doch tendenziell trennen konnten. Eine Gruppe enthielt elf Kontrollpatientinnen und eine IORT-Patientin, die zweite Hauptgruppe alle übrigen IORT- und neun Kontrollpatientinnen. Somit war keine eindeutige Separation der beiden Kohorten möglich, eine tendenzielle Gruppierung war jedoch v.a. für die IORT-Gruppe zu beobachten, da sich diese mit einer Ausnahme einer Hauptgruppe zuordnen ließ.

Die nähere Differenzierung der Genexpressions-Unterschiede in den Wundflüssigkeits-Leukozyten der beiden Kohorten (IORT vs. Kontrolle) wurde anhand von GSEA auf Basis der *MSigDB-Hallmarks*-Sammlung durchgeführt (Abb. 12B). Als Signifikanzniveau wurde ein q-Wert von 0,1 festgelegt. Für die IORT-Kohorte zeigten sich als signifikant positiv angereicherte Gensets die *Inflammatory-Response*, der IL-6-JAK-STAT3-Signalweg, der TNF $\alpha$ -Signalweg-via-NF $\kappa$ B, der TGF- $\beta$ -Signalweg, der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg, der IL-2-STAT5-Signalweg und das Komplementsystem, eine Gruppe mit Hypoxie und Signalwegen reaktiver Sauerstoffspezies sowie p53, Proteinsekretion, der mTOR-Signalweg und Apoptose.

Um der Frage nachzugehen, welche Gensets in welchen Zellpopulationen vorrangig und verstärkt assoziiert waren, wurden die RNA-Sequenzierungsdaten mit den zugehörigen Immunzell-FACS-Daten korreliert, GSEA-Untersuchungen auf Basis der *MSigDB-Reactome*-Sammlung durchgeführt und abschließend *Enrichment-Maps* zur Visualisierung der Überlappung der identifizierten Gensets angefertigt (Abb. 13). Rot dargestellt sind positiv angereicherte Gensets, blau negativ angereicherte Gensets. Die Populationen sind hierbei in der Gesamtheit aller Proben dargestellt und nicht nach Kohorten aufgegliedert. Da die IORT-Gruppe für alle dargestellten Zellpopulationen signifikant erhöhte

Zellzahlen zeigte, könnten angereicherte Gensets möglicherweise eher der IORT-Kohorte zuzuschreiben sein – eine klare Zuordnung zu Kohorten ist jedoch anhand dieser Daten nicht möglich.



**Abb. 12:** RNA-Sequenzierungsdaten zeigen in Immunzellen aus IORT-Wundflüssigkeiten eine Anreicherung von Gensets, die mit NFκB, JAK-STAT- und TGF-β-Signalwegen assoziiert sind, sowie mit Hypoxie.

(A) Darstellung der *Sample-to-Sample*-Korrelation (nach Spearman) auf Basis der 100 stärksten differenziell exprimierten Gene sowie ihre hierarchische Clusteranalyse. (B) Gene-Set-Enrichment-Analysen (GSEA) der IORT- vs. Kontroll-Kohorte. Dargestellt ist der nominelle *Enrichment-Score* (NES) gegen den FDR q-Wert. Gensets mit FDR < 0,1 sind gekennzeichnet. (C) Funktionelle Interaktionsanalyse der Top-Gensets aus (B). Gezeigt sind funktionelle Interaktionsnetzwerke der *Leading-Edge*-Gene (ohne *Linker-Genes*).

*CEBPB*, *CCAAT-Enhancer-Binding-Protein β*; *CCL*, *Chemokinligand*; *CD*, *Cluster-of-Differentiation*; *FGFR*, *Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor*; *HIF*, *Hypoxieinduzierter Faktor*; *IL*, *Interleukin*; *MAPK*, *Mitogen-aktivierte Proteinkinase*; *mTOR*, *Mammalian-Target-of-Rapamycin*; *NFKB*, *Nuclear-Factor-κ-Light-Chain-Enhancer-of-Activated-B-Cells*; *PRR*, *Pattern Recognition Receptor*; *RTK*, *Rezeptortyrosinkinase*; *STAT*, *Signal Transducers and Activators of Transcription*; *TGF*, *transformierender Wachstumsfaktorrezeptor*; *TNF*, *Tumornekrosefaktor*.

Bei näherer Betrachtung der einzelnen Zellgruppen aus Abb. 13 und der assoziierten Gensets zeigten sich einige parallele Expressionsmuster, die auf die Funktion der einzelnen Zellgruppen in dieser speziellen Situation im ehemaligen Wundbett mögliche Rückschlüsse erlaubten. Folgend eine kurze Darstellung der Expressionsmuster der jeweiligen Zellgruppen (Tab. 12):

Für die Gesamtmonozyten (Abb. 13) wie auch für die Untergruppe der CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> Monozyten fiel auf, dass die Gensets für Rezeptortyrosinkinasen (RTK), Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR) und den PRR stark angereichert waren. Ebenso die Gene des Proteasoms und Lysosoms, was mit Hinblick auf die induzierten DNA- und Zellschäden nach Operation mit oder ohne IORT naheliegend war. Ähnliches war für die Plättchenaktivierung anzunehmen, die nach einem chirurgischen Eingriff im Rahmen der Wundheilung ebenfalls zu erwarten war.

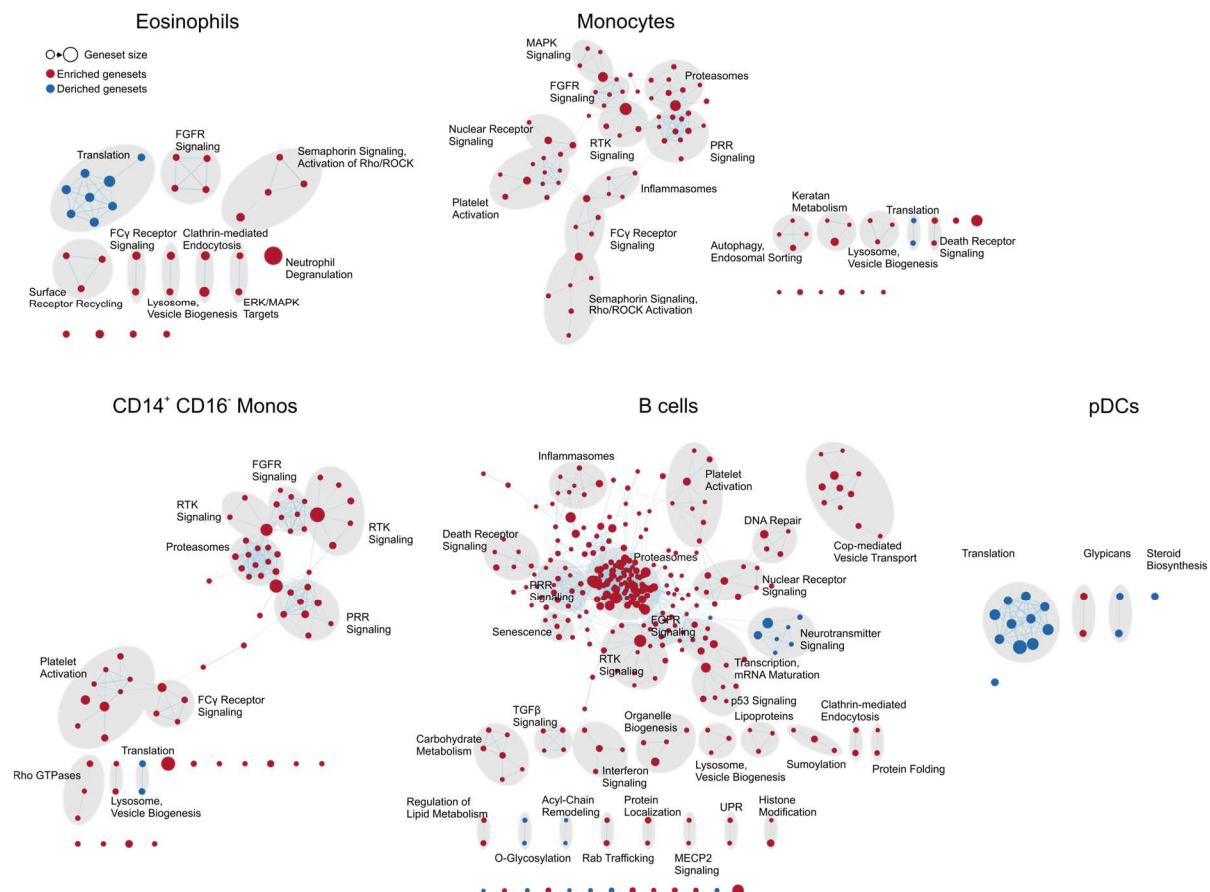


Abb. 13: IORT-Wundflüssigkeits-Leukozyten zeigen eine Anreicherung von inflammatorischen Gensets auf Transkriptom-Ebene.

**Enrichment-Maps** der mit rekrutierten Immunzell-Populationen korrelierenden Transkriptom-Daten (*GSEA auf Basis der MSigDB-Reactome-Sammlung*).

*CD*, Cluster-of-Differentiation; *DC*, Dendritische Zelle; *DNA*, Desoxyribonukleinsäure; *FGFR*, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor; *mRNA*, Messenger-Ribonukleinsäure; *p*, plasmacytoid; *PRR*, Pattern-Recognition-Receptor; *RTK*, Rezeptortyrosinkinase; *TGF*, transformierender Wachstumsfaktorrezeptor; *TNF*, Tumornekrosefaktor.

Die mit den B-Zellen korrelierenden Gensets (Abb. 13) deckten sich teilweise mit denen der Monozyten und enthielten ebenfalls vorrangig Strukturen der Phagozytose, der Antigen-Präsentation und des Proteinabbaus. Eine weitere zentrale Stellung nahmen diverse Zelltodmechanismen wie Seneszenz und Apoptose (deklariert als *Death-Receptor-Signaling*) ein, die sich gemeinsam mit den Mustererkennungsrezeptoren (PRR) um Gensets des Proteasoms scharten. Passend hierzu zeigten sich auch p53-assoziierte Gensets angereichert [97], ebenso wie DNA-Reparatur-Gensets. TNF- $\beta$  und Interferon-Signalwege waren ebenfalls angereichert. In Zusammenschau betrachtet zeigten sich für die B-Zellen, ähnlich wie bei den Monozyten, viele Gensets mit Bezug zur Phagozytose und weniger Gensets mit Bezug zur adaptiven Immunantwort, sodass vermutet werden kann, dass den B-Zellen in diesem Zusammenhang vorrangig eine Antigen-präsentierende Funktion zukommt.

Die Eosinophilen zeigten als Vertreter der Granulozyten korrelierende Gensets der Phagozytose und somit ihres vorrangigen Funktionsrepertoires auf: FGFR, FCy-Rezeptor-Signaling, Clathrin-mediierte Endozytose und Neutrophilen-Degranulation (Abb. 13).

Mit pDCs korrelierende Gensets waren nur wenige zu beobachten. Am ehesten liegt dies darin begründet, dass in einigen Proben keine pDCs detektierbar waren und dadurch die Korrelationsanalysen erschwert wurden (Abb. 13).

Tab. 12: Angereicherte Gensets nach Immunzelltyp

Genset	Anreicherung nach Zelltyp			
FGFR-Signalwege	Eosinophile	Monozyten	B-Zellen	
Lysosom	Eosinophile	Monozyten	B-Zellen	
FC $\gamma$ -Rezeptor-Signalwege	Eosinophile	Monozyten		
Semaphorin-Rho/ROCK-Signalwege	Eosinophile	Monozyten		
MAPK-Signalwege	Eosinophile	Monozyten		
RTK-Signalwege		Monozyten	B-Zellen	
PRR-Signalwege		Monozyten	B-Zellen	
Kernrezeptoren		Monozyten	B-Zellen	
Inflammasom		Monozyten	B-Zellen	
Todesliganden		Monozyten	B-Zellen	
Proteasom		Monozyten	B-Zellen	

In Zusammenschau weisen somit die Genexpressionsmuster der eingewanderten Immunzellen eine Reihe angereicherter Gensets auf. Diese sind in basalen zellbiologischen und zellproliferativen Vorgängen, aber auch in zentralen immunologischen und immunregulatorischen Signalkaskaden involviert und stehen vielfach in engem Zusammenhang mit Tumorentstehung und -kontrolle.

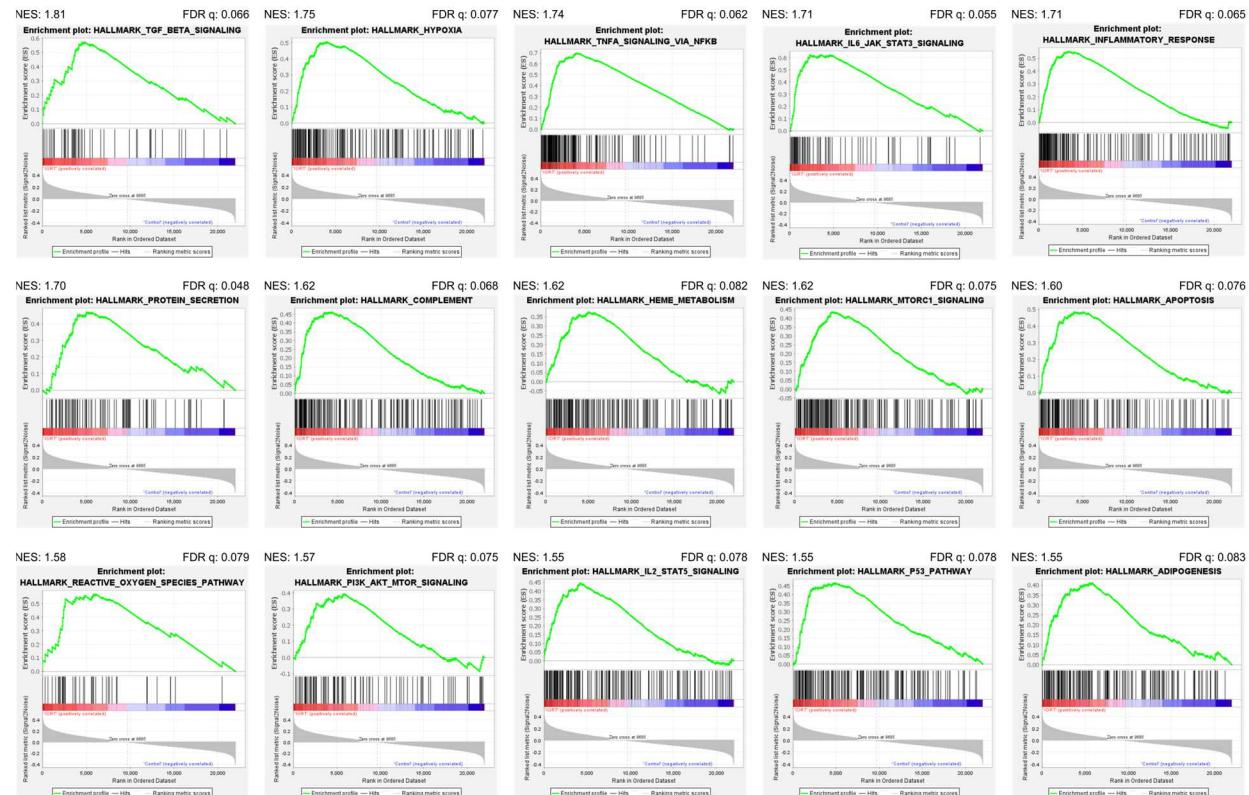


Abb. 14: Detaildarstellung angereicherter Gensets.

Detaildarstellung der signifikant angereicherten Gensets der Genexpressions-Analyse aus Abb. 12B. Jeder schwarze senkrechte Strich entspricht einem einzelnen zum jeweiligen Genset zugehörigen Gen. Positiv korrelierende Gene finden sich im roten, negativ-korrelierende Gene im blauen Bereich der X-Achse. Als Maß der Anreicherung ist der *Enrichment Score* auf der y-Achse aufgetragen. Die Werte für die *Nominal Enrichment Score* (NES) und die *False Discovery Rate* (FDR) als q-Wert sind jeweils über den einzelnen Abbildungsabschnitten angeführt.

FDR, Falscherkennungsrate; IL, Interleukin; NES, Normierte Anreicherungsskala; STAT, Signal-Transducers-and-Activators-of-Transcription; TGF, transformierender Wachstumsfaktorrezeptor; TNF, Tumornekrosefaktor.

## 8. Diskussion

In dieser klinischen Begleitforschungsstudie wurden immunologische Folgen hochdosierter Bestrahlung am Beispiel der IORT untersucht. In Blut- und Wundflüssigkeitsproben brusterhaltend operierter Patientinnen mit oder ohne IORT wurden zelluläre und humorale Analysen auf Protein- sowie RNA-Ebene vorgenommen. Zur näheren Betrachtung strahlenbiologischer Auswirkungen auf Normalgewebe wurden ergänzend In-vitro-Versuche zur Zelltod-Induktion nach Bestrahlung sowie zur Zytokin-Freisetzung durchgeführt, in denen unterschiedliche Zelltodformen nach Bestrahlung charakterisiert wurden.

Für die IORT-Kohorte zeigte sich am zweiten post-operativen Tag eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verstärkte Immunzell-Rekrutierung in die ehemalige Tumorloge, wobei die Einwanderung von Monozyten, eosinophilen Granulozyten, B-Zellen und pDCs signifikant erhöht war (Abb. 8). Erstere beide zeigten dabei in der IORT-Gruppe auch auf systemischer Ebene im peripheren Blut einen passageren Anstieg in diesem Zeitfenster. Für die nach Bestrahlung verstärkt rekrutierten Subpopulationen konnten dabei MIF und IL-3 als humorale Korrelate der Immunzell-Rekrutierung identifiziert werden (Abb. 10).

Zur näheren Betrachtung des Ursprungs dieser Zytokine erfolgten In-vitro-Versuche mit primären Mamma-Epithelzellen, Endothelzellen sowie Fibroblasten. Hierbei zeigten alle Zelltypen eine ausgeprägte Seneszenz-Antwort nach Bestrahlung, während sowohl nekrotische als auch apoptotische Zelltod-Phänomene eine sehr untergeordnete Rolle spielten. In der ergänzenden Zytokin-Analyse stellten sich primäre Mamma-Epithelzellen als vorrangige Produzenten von MIF heraus, wobei bei einer Strahlendosis von 4 Gy die maximale Zytokin-Freisetzung zu beobachten war. Bei hohen Bestrahlungsdosen von 20 Gy wurden erhöhte MIF-Konzentrationen zusätzlich auch in Fibroblasten erkennbar. IL-3 schien im Normalgewebe vorrangig von Epithel- und Endothelzellen produziert zu werden und eine verstärkte Freisetzung trat bei 4-6 Gy und ca. 12 Gy auf (Abb. 10). Somit ist anzunehmen, dass nicht-maligne Normalgewebszellen an der Immunzell-Rekrutierung nach Bestrahlung beteiligt sind und MIF und IL-3 als wichtige Zytokine in der post-radiogenen Rekrutierung von Immunzellen fungieren.

Transkriptom-Analysen der Immunzellen in Wundflüssigkeits-Proben des zweiten post-operativen Tages zeigten für die IORT-Kohorte angereicherte Gensets der inflammatorischen Immunantwort und jener Signalwege, die eng mit den Transkriptionsfaktoren STAT und NFkB in Verbindung stehen (Abb. 13). In Clusteranalysen war auf Transkriptionsebene keine definitive Separation der beiden Kohorten möglich, eine Tendenz jedoch deutlich erkennbar (Abb. 12A), ähnlich zu den Clusteranalysen der Immunzell-Populationen (Abb. 8I).

Zusammenfassend betrachtet deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die IORT-Bestrahlung eine Immunzell-Rekrutierung ins Tumorbett hervorruft, die möglicherweise durch umliegende, nicht-maligne Normalgewebszellen vermittelt wird und dass in den rekrutierten Immunzellen auf molekularer Ebene vorrangig inflammatorische Gensets und basale zellregulatorische Prozesse, eng verknüpft mit den Transkriptionsfaktoren NFkB und STAT3, angereichert werden.

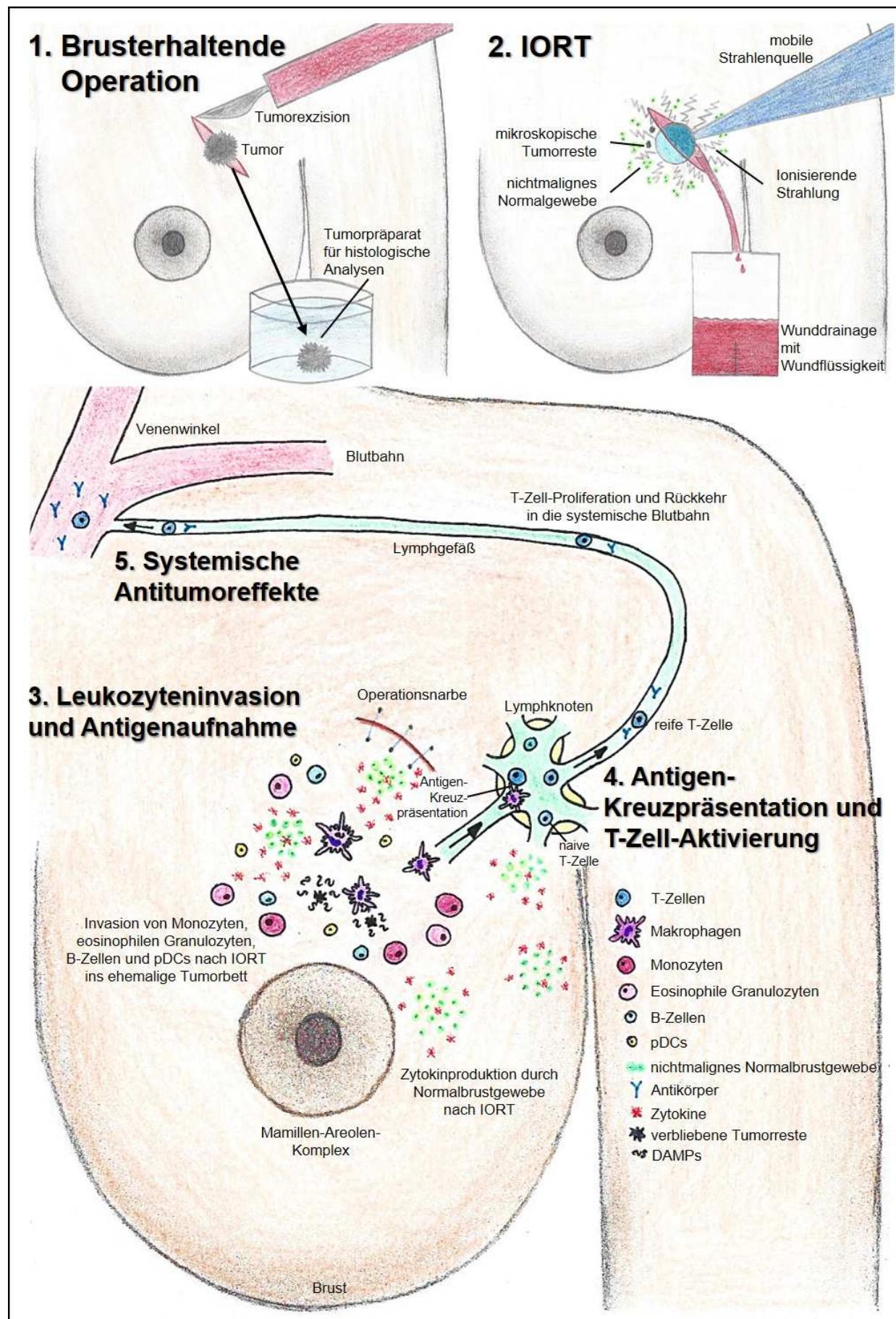


Abb. 15: Immunzell-Rekrutierung und immunologische Effekte nach Strahlentherapie.

Nach brusterhaltender Operation mit Exzision des Tumors erfolgt im Rahmen der IORT eine Bestrahlung der ehemaligen Tumorloge und damit etwaiger verbliebener Tumorrester mit 20 Gy. Durch Bestrahlung von Tumorgewebe kommt es zu überwiegend nekrotischem Zelltod und somit zur Freisetzung von DAMPs, die eine Leukozyten-Invasion ins Tumorbett

induzieren. Einen weiteren maßgeblichen Beitrag zur Immunzell-Rekrutierung ins ehemalige Tumorbett leistet umliegendes, nicht-malignes Normalgewebe, das auf Bestrahlung durch hohe Einzeldosen mit einer ausgeprägten Seneszenz-Antwort und Zytokinsekretion reagiert.

Durch die Gewinnung von Wundflüssigkeit aus Wunddrainagen kann eine gezielte Analyse ihrer zellulären und humoralen Bestandteile erfolgen. Hierbei zeigt sich nach IORT eine signifikante Einwanderung von Monozyten (vorrangig klassischen Monozyten), eosinophilen Granulozyten, B-Zellen und pDCs ins ehemalige Tumorbett. Auf humoraler Ebene ergeben sich MIF und IL-3 unter den führenden Zytokinen in der Wundflüssigkeit, die sich in Analysen auch höchstkorrelierend mit den eingewanderten Immunzell-Populationen zeigen. Ergänzende In-vitro-Versuche zeigen, dass MIF und IL-3 durch nicht-malignes Normalbrustgewebe nach Bestrahlung produziert werden.

Nach Einwanderung Antigen-präsentierender Zellen in die ehemalige Tumorloge kommt es zu deren Differenzierung und Reifung in Makrophagen und DCs, zur Aufnahme und Prozessierung der Antigene nekrotischer Zellen und nach Rückkehr in den Lymphknoten zur Antigenkreuzpräsentation und einem konsekutiven T-Zell-Priming. Diese wiederum können durch diese Stimulation und Proliferation nach ihrer Rückkehr in die Blutbahn zur systemischen Anti-Tumor-Immunantwort beitragen.

*DAMP, Damage-associated-Molecular-Patterns; IORT, intra-operative Strahlentherapie; Gy, Gray; pDC, plasmazytoid dendritische Zelle.*

## **8.1. Eine Vergleichbarkeit der Patientenkohorten ist im Wesentlichen gegeben**

Grundlegend für die Interpretation einer Studie ist eine angemessene Vergleichbarkeit der Kohorten. Zusammenfassend betrachtet ergeben sich in den Kriterien Alter, T- und R-Status sowie in der Tumorgraduierung signifikante Unterschiede, was die Vergleichbarkeit der beiden Kohorten auf den ersten Blick in Frage stellt.

An dieser Stelle ist eine Erläuterung der klinischen Umstände notwendig, die das Design der Studie wesentlich prägten. Die vorliegende Studie wurde als klinische Begleitforschungsstudie konzipiert, um die Immuneffekte der IORT auf lokaler und systemischer Ebene zu beobachten. Die Indikation der IORT wurde unabhängig von einem möglichen späteren Studieneinschluss für jede Patientin individuell gestellt und ist somit nicht randomisiert verteilt worden.

Im klinischen Alltag wird besonders älteren Patientinnen niedriger Tumorstadien eine IORT angeboten, da durch eine sogenannte *Accelerated Partial Breast Irradiation* die Therapiezeit durch den Entfall der mehrwöchigen adjuvanten Bestrahlung wesentlich verkürzt wird. Diese akzelerierte Behandlungsmethode ist je nach Leitlinie und Studie unter anderem an ein Alter von meist mehr als 50 Jahren und ein niedriges Tumorstadium geknüpft [98, 99], weswegen viele Patientinnen der hier angeführten Kontrollgruppe die Kriterien für eine IORT nicht erfüllt hätten. Die höhere Anzahl R1-resizierter Tumoren in der Kontrollgruppe könnte mit den höheren T-Stadien dieser Kohorte zusammenhängen, da große Tumoren die Operation nicht selten erschweren.

Um immunologische Auswirkungen einer IORT zu untersuchen, sind Tumorentitäten mit ausreichender Inzidenz, gutem Zugang zum bestrahlten Organ und möglichst wenigen umgebenden Störfaktoren (ausgedehnte Operationen, regelhaft eingesetzte und daher meist individuell differierende Dauer- oder Einzelfallmedikation, Transfusion von Blutbestandteilen, Intensivtherapien oder neoadjuvante Systemtherapien) voneinander abgrenzbar. Unter den Tumorentitäten, die für eine IORT infrage kommen, bietet sich somit die Brust als oberflächlich zugängliches Organ an. Ein weiterer Vorteil hiervon ist, dass Mammakarzinom-Patientinnen häufig in mittlerem Alter erkranken und daher in der Regel weniger internistische Vorerkrankungen aufweisen als Patient\*innen anderer Tumorentitäten und höheren Alters. Dies bedeutet in der Regel weniger Dauermedikation und ein geringeres Risiko auf intra-operative

Komplikationen mit gegebenenfalls notwendigen zusätzlichen Therapien oder sogar post-operativen Intensivaufenthalten, die immunologische Vorgänge und somit die Studienergebnisse beeinflussen könnten.

Ein weiterer Faktor, dem aufgrund einer potenziellen Limitierung der Aussagekraft der Studie Aufmerksamkeit zukommen muss, ist der Unterschied des Durchschnittsalters der Patientinnen. Dass vor allem das adaptive Immunsystem älterer und insbesondere geriatrischer Patient\*innen eine bemerkenswert schwächere Immunantwort und eine verringerte Absolutzahl diverser Immunzelltypen aufweist, manifestiert sich beispielsweise in einer häufig gesteigerten Infektanfälligkeit oder in einer reduzierten Effektivität von Impfungen [100]. Andererseits bestehen bei geriatrischen Patient\*innen häufig chronische sterile Niedrig-Inflammationszustände, die als sogenanntes *Inflammaging* bezeichnet werden [100]. Zusammenfassend betrachtet würde aus den genannten Immunphänomenen älterer Menschen in Bezug auf die vorliegende Studie resultieren, dass in der IORT-Kohorte mit höherem Altersdurchschnitt eher abgeschwächte Immuneffekte zu erwarten wären. Weil sich aber in der IORT-Kohorte gegenüber der Kontrollgruppe signifikant gesteigerte Immuneffekte zeigen, ist davon auszugehen, dass die tatsächlichen Immuneffekte, wie sie womöglich in jüngeren Menschen auftreten würden, in dieser Studie tendenziell eher unterschätzt werden.

In Zusammenschau sind damit im Vergleich der Kohorten zwar Unterschiede festzustellen, angesichts der Fragestellung und der klinischen Umstände ist eine Vergleichbarkeit der Kohorten jedoch durchaus gegeben.

## **8.2. IORT induziert die Einwanderung distinkter Immunzell-Populationen mit Antigen-präsentierenden Fähigkeiten ins Wundbett**

Am zweiten Tag nach Operation zeigte sich für die IORT-Kohorte eine signifikant erhöhte Rekrutierung von Monozyten, insbesondere klassischen Monozyten, eosinophilen Granulozyten, B-Zellen und pDCs ins Wundbett, für Monozyten und Eosinophile war transient auch ein Anstieg auf systemischer Ebene im peripheren Blut zu beobachten (Abb. 8, 9).

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass Bestrahlung von Mammakarzinom-Zellen mit hohen Dosen (20 Gy) im Vergleich zu niedrigeren Bestrahlungsdosen zu den höchsten Raten an Nekrose, Apoptose und Seneszenz führte [38]. Im Rahmen eines nekrotischen Zelltodes von Tumorzellen kommt es zur Freisetzung von DAMPs, wie beispielsweise Nukleotiden, die konsekutiv zur Rekrutierung, Differenzierung und Reifung von APCs mit konsekutivem *T-Cell-Priming* führen [21, 34, 38]. Parallel dazu zeigen endotheliale Zellen nach Zugabe von Überständen bestrahlter Tumorzellen einen Expressionsanstieg von Adhäsionsmolekülen, die an der Diapedese von Immunzellen beteiligt sind [34].

Diese Ergebnisse aus Voruntersuchungen stammen aus In-vitro- und In-vivo-Modellen der Maus und fügen sich gut in das mittlerweile mehrfach publizierte Konzept der In-situ-Vakzinierung von Krebs ein, die beispielsweise durch Bestrahlung maligner Zellen hervorgerufen werden kann [10, 15, 34, 70]. Die vorliegende Studie bietet die Möglichkeit, einen Teil dieser Abläufe im klinischen Modell näher zu

betrachten. Ein wichtiger Unterschied zu den vorherigen Untersuchungen ist, dass im murinen und im In-vitro-Modell Tumoren oder Tumorzellen bestrahlt wurden [34, 38], während im Falle einer post-operativen IORT das in der Regel vorrangig benigne Umgebungsgewebe der ehemaligen Tumorloge und wenn überhaupt nur vereinzelt Tumorgewebe bestrahlt wird, da der Tumor bis auf etwaige mikroskopische Reste oder verstreute Tumorzellen bereits chirurgisch entfernt wurde.

Ein Blick auf die Publikationen der eigenen Arbeitsgruppe und der Vergleich der post-radiogenen rekrutierten Zellen zwischen murinem und humanem Modell zeigt, dass die Rekrutierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im murinen Modell [34] bzw. von klassischen Monozyten in der vorliegenden klinischen Studie (d.h. im humanen Modell) nach Bestrahlung eine Gemeinsamkeit darstellt. Diese beiden Monozyten-Populationen entsprechen einander - speziesübergreifend gesehen - weitgehend [81]. Andere sich speziesübergreifend entsprechende Monozyten-Subpopulationen hingegen wiesen in beiden Untersuchungen keine signifikante Rekrutierung auf [34].

In der Studie von Krombach et al. ist eine signifikante Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im *Airpouch*-Modell der Maus zu verzeichnen [34], in der vorliegenden klinischen Studie hingegen zeigte sich eine Invasion von eosinophilen Granulozyten ins ehemalige Tumorbett (Abb. 8C, D). Eosinophile und Monozyten zeigten in der vorliegenden Studie parallel zum lokalen einen transienten systemischen Anstieg im peripheren Blut (Abb. 8D, F, 9A), der sich für andere Subgruppen nicht abzeichnete. Dies wirft die Frage nach dem zugrundeliegenden Rekrutierungsmuster auf, welches im Folgekapitel näher diskutiert wird.

Bei näherer Betrachtung der post-radiogenen rekrutierten Immunzellen stellt sich die Frage, welche Funktionen diese Zellen im ehemaligen Tumorbett einnehmen. Die GSEA der Immunzellen (Abb. 12B, 13) erlauben an dieser Stelle eine nähere Beobachtung ihrer transkriptomischen Profile und geben damit Hinweise auf mögliche funktionale Implikationen:

Eosinophile Granulozyten sind vorrangig aus der Parasitenabwehr bekannt [74, 75] und in den letzten Jahren als prognostische Marker ins Licht gerückt, insbesondere im Zusammenhang mit Immuntherapien [101]. Während sich ihre intra-tumorale Nachweisbarkeit für Kopf-Hals-Tumore, gastrointestinale Tumore, pulmonale Adenokarzinome, Blasen-, Prostatakarzinome und fortgeschrittene Peniskarzinome als eher vorteilhaft im Hinblick auf die Prognose herausstellte, ergaben sich für Cervixkarzinome, gewisse Hodgkin-Lymphome und Plattenepithelkarzinome unvorteilhafte Prognosen [75-80]. Für das maligne Melanom erwies sich eine Eosinophilie im peripheren Blut vor bzw. während der Immuncheckpoint-Therapie als vorteilhaft für das Therapieansprechen sowie für die Überlebenszeit [101]. Auch Rosner et al. konnten zeigen, dass eosinophile Granulozyten zu den positiv prädiktiven hämatologischen Parametern einer Kombinationstherapie aus Nivolumab und Ipilimumab gehörten [102].

Carretero et al. zeigten im Mausmodell, dass eine Tumor-Eosinophilie zu einer besseren Tumorkontrolle führte, da durch bestimmte Zytokinmuster inflammatorische Zustände sowie eine CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration begünstigt wurden und eine Makrophagen-Polarisation in Richtung pro-inflammatorischer M1-

Makrophagen hervorgerufen wurde, während sich die Anzahl an T<sub>regs</sub> verminderte und sich die Tumorgefäßstruktur teilweise normalisierte [74]. Gefäßalterationen durch eosinophile Sekretion wurden als eine mögliche Reaktion auf intra-tumorale Hypoxie während des Wachstums diskutiert [103]. In ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Phagozyten wurde gezeigt, dass Eosinophile via MHC-II Antigen-spezifische T-Zellen aktivieren und deren Proliferation induzieren können [104-106]. In Anwesenheit von CpG-Oligonukleotiden zeigten sich Eosinophile an der Reifung von DCs und somit möglicherweise an der Immunmodulation beteiligt [107]. Die Interaktion mit DAMPs (insbesondere HMGB-1), die chemotaktische Mobilisation Eosinophiler zu nekrotischen Arealen hin sowie Beiträge der Eosinophilen zur Gewebereparatur mittels Degranulation und Sekretion von Wachstumsfaktoren ist mehrfach beschrieben [80, 108]. In Zusammenschau ergeben sich somit multiple Hinweise auf eine mögliche tumorimmunologische Bedeutung eosinophiler Granulozyten. Aufgrund teilweise widersprüchlicher Ergebnisse bleiben aktuell dennoch viele Fragen um ihre Funktion offen [106].

Bei näherer Betrachtung der GSEA der mit den Zahlen von rekrutierten Eosinophilen korrelierenden Gene zeigten sich Gensets der Antigen-Erkennung (wie der FCy-Rezeptor), der Endozytose, lysosomaler Vorgänge und der Degranulation angereichert (Abb. 13). Rezeptoren wie beispielsweise der FCy-Rezeptor sind wesentlich an der Vermittlung der Phagozytose von Antigenen beteiligt, die zuvor durch Antikörper opsonisiert wurden [109]. Nach dem Umfassen des Antigen-Materials wird dieses in Form eines Phagosoms in die Zelle aufgenommen und verschmilzt mit Endosomen und Lysosomen zu einem Phagolysosom, in dem das phagozytierte Material schließlich abgebaut wird [110]. Eosinophile scheinen im Kontext der vorliegenden Studie somit wesentlich in der professionellen Phagozytose und Antigen-Präsentation involviert zu sein, wie anhand der korrelierenden Genexpressions-Muster ersichtlich wird.

Des Weiteren fällt in der GSEA der mit Eosinophilen-Rekrutierung korrelierenden Gene der angereicherte Semaphorin-Signalweg auf, der ein Hinweis auf die Involvierung Eosinophiler in der Immunzell-Rekrutierung sein könnte (Abb. 13C). Semaphorine sind eine Gruppe regulatorischer Proteine in der innaten und zellulären Immunität und werden häufig in entzündlich veränderten Zellen gefunden, wie beispielsweise im Rahmen von Autoimmunerkrankungen oder Krebs [111]. Ihre genaue Rolle in tumoralen Inflammationszuständen ist noch nicht definitiv geklärt [111], dennoch gibt es Hinweise auf eine Akkumulation von M1-Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen in Tumoren bei Überexpression des Semaphorintyps SEMA3A [112]. Da M1-Makrophagen mittels pro-inflammatorischer Zytokinausschüttung eher anti-tumoral wirken, können Semaphorine auf diesem Weg zumindest anti-tumorale Wirkungen unterstützen [112, 113].

Das Dendrogramm aus Abb. 8B stellt Korrelationen der Immunzell-Rekrutierung dar und zeigt Eosinophile als die den Monozyten ähnliche Gruppe. Mit Blick auf die eben genannten Publikationsergebnisse hinsichtlich einer möglichen Involvierung eosinophiler Granulozyten in tumorimmunologischen Prozessen und ihrer möglichen Funktion als APCs [114] erscheint diese Verwandtschaft im Rekrutierungsmuster naheliegend. Die Ähnlichkeit der beiden Subpopulationen wird zudem bei

Betrachtung der GSEA der mit der Monozyten-Rekrutierung korrelierenden Gene unterstrichen, da diese einige überlappende angereicherte Gensets aufweisen wie beispielsweise den Semaphorin-Signalweg, den FCy-Rezeptor- und FGFR-Signalweg (Abb. 13).

Monozyten werden im Falle eines Gewebsschadens durch inflammatorische oder infektiöse Prozesse mittels pro-inflammatorischer Zytokine systemisch aus dem Knochenmark oder aus der Milz, ihrem Reservoir-Ort, rekrutiert und durch Hochregulation lokaler endothelialer Adhäsionsmoleküle zum Ort des Gewebsuntergangs dirigiert [81]. Nach Aktivierung differenzieren sie zu Makrophagen oder DCs und nehmen als solche Antigene auf, die in lymphatischen Geweben T-Zellen kreuzpräsentiert werden [21, 81]. Je nach Stimulus variiert die weitere Polarisierung: In Gegenwart von IFN- $\gamma$  und Lipopolysacchariden erfolgt die Polarisation eher zu M1-Makrophagen, die über pro-inflammatorische Zytokine, den IFN- $\gamma$ -Rezeptor und Folgesignalwege, wie NFkB, AP-1 und STAT1, aktivieren und zu einer effizienten MHC-II-Präsentation und damit einerseits einer anti-infektiven sowie andererseits einer Tumor-inhibitorischen Antwort führen [113]. IL-4, IL-13 und IL-33 hingegen polarisieren zu M2-Makrophagen, welche vorrangig über STAT3 und STAT6 wirken und neben der Kontrolle von Parasiten anti-inflammatoryische und immunregulatorische Prozesse sowie Gewebs- und Gefäßerneuerung und damit eher die Tumorprogression fördern [113]. Auch wenn die Polarisierung der Makrophagen in der vorliegenden Studie nicht untersucht ist, wirft die Verbindung zwischen M1-Makrophagen und NFkB angesichts der zentralen Rolle von NFkB in den vorliegenden Daten Fragen über mögliche Zusammenhänge auf. Nähere Zusammenhänge diesbezüglich können jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden. In der GSEA der mit Monozyten-Rekrutierung korrelierenden Gene zeigten sich neben funktionellen Gensets (Proteasom, Plättchenaktivierung, Autophagie, endosomale Prozesse, Lysosom, Vesikulogenese) viele immunregulatorische Gensets und Transkriptionsfaktoren, wie das Inflammasom, Kernrezeptoren, Todesliganden, MAPK-, Semaphorin-, RTK- und PRR-Signalwege angereichert (Abb. 13).

Monozyten und manche Typen der DCs entstammen einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle [115]. Gemeinsam gehören sie zu den APCs, wobei DCs wesentlich effizienter Antigene präsentieren [115]. Insbesondere die Gruppe der pDCs gehört zu den Hauptproduzenten von Typ-I-Interferonen und kann *in vitro* ein *T-Cell-Priming* zur systemischen Tumorkontrolle vermitteln [116].

Im Vergleich zu den GSEA-Netzwerken von Monozyten und Eosinophilen hat das Netzwerk der pDCs kaum Gensets aufzuweisen, die meisten sind zudem signifikant reduziert (Abb. 13). Dies könnte methodisch bedingt sein, da pDCs mit deutlich unter einem Prozent nur einen sehr geringen Anteil der peripheren Blutleukozyten ausmachen [117]. Außerdem gab es in der vorliegenden Studie viele Proben, in denen keinerlei pDCs gefunden wurden (Abb. 8G). Dies erschwert die Korrelationsanalysen und limitiert damit ihre Aussagekraft. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte ein divergierendes Rekrutierungs- und Aktivierungsmuster zu den anderen ins Tumorbett rekrutierten Zellgruppen sein. Hinweise hierfür bietet das Dendrogramm in Abb. 8B, das pDCs hierarchisch als abweichendste Zellgruppe bezogen auf das Immunzell-Rekrutierungsmuster darstellt. Diese Stellung spiegelt sich auch in der Top-5-

Korrelationsanalyse zwischen Zytokinen und Immunzellen wider, in denen sich das führende Zytokinmuster der pDCs von denen der anderen Zellgruppen deutlich unterscheidet, während sich die übrigen Gruppen untereinander ähneln (Abb. 10B).

Neben Monozyten, Eosinophilen und pDCs zeigten auch B-Zellen eine signifikant gesteigerte Invasion in die ehemalige Tumorloge nach IORT (Abb. 9B). B-Zellen sind weitläufig als Hauptverantwortliche der adaptiven Immunantwort und des immunologischen Gedächtnisses bekannt, ihre Funktionen reichen aber weit über diese Gebiete hinaus [118, 119]. So sind sie beispielsweise maßgeblich an immunregulativen Prozessen und damit auch an der Genese von Autoimmunkrankheiten beteiligt und können als APCs v.a. reaktiv auf mikrobielle Stimuli eine starke T-Zell-Antwort hervorrufen (sowohl von CD4<sup>+</sup> als auch von CD8<sup>+</sup> T-Zellen) [120], diese aber, wie im Falle von regulatorischen B-Zellen, auch dämpfen und somit eine Immuntoleranz gegenüber Karzinomen begünstigen [119]. Tumorzellen können jedoch auch selbst über diverse Zytokine und Metaboliten mit B-Zellen interagieren. [119] Zu Orten der Inflammation gelangen B-Zellen über Chemokine [118, 120].

Zusammenfassend betrachtet ist es somit nicht verwunderlich, dass das angereicherte Genrepertoire der B-Zellen dem der Eosinophilen, vor allem aber dem der Monozyten sehr stark ähnelt. Anhand der Parallelen in der GSEA ist somit anzunehmen, dass B-Zellen nach IORT rekrutiert werden und möglicherweise als APCs fungieren. Angesichts der B-Zell-Funktion der Antikörper-Produktion wären Hinweise auf gesteigerte Genexpressionsmuster der Proteinsynthese in der GSEA zu erwarten. Da die untersuchten Proben jedoch am zweiten post-operativen Tag entnommen wurden, ist anzunehmen, dass zu diesem frühen Zeitpunkt noch keine sichtbaren Mengen an Immunglobulinen produziert wurden.

### **8.3. Die Seneszenz-Induktion und Zytokin-Produktion im Normalgewebe stellen potenzielle Mechanismen für die Immunzellrekrutierung nach IORT dar**

Ein wesentlicher Schritt im Rahmen der immunologischen Kontrolle ist die Zugänglichkeit eines zu kontrollierenden Areals für Immunzellen. Die Kommunikation zwischen geschädigtem Gewebe, Botenstoffen, Gefäßstrukturen und Immunzellen ist hier von wesentlicher Bedeutung [59]. Eine Strahlentherapie hat zum Ziel, entweder vor der Operation das Tumorgewebe selbst (wie im Rahmen einer neoadjuvanten Bestrahlung) oder nach einer Operation umliegendes Gewebe des ehemaligen Tumorbetts mit etwaig verbliebenen Tumorresten (adjuvante Bestrahlung) ionisierender Strahlung und damit Zellstress auszusetzen, um maligne Zellen zu eliminieren [1, 3]. Da sich im Falle einer IORT nach brusterhaltender Operation in der Regel allenfalls mikroskopische Tumorreste oder vereinzelte gestreute Tumorzellen im umliegenden Tumorbett befinden und überwiegend nicht-malignes Normalgewebe bestrahlt wird, stellt sich die Frage, welche Zellen und Botenstoffe primär an der Rekrutierung der Immunzellen beteiligt sind.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten Untersuchungen an stellvertretenden Zelltypen des Normalgewebes in vitro – Brustepithelzellen (HMECs), Fibroblasten (NHDF-ADs) und Endothelzellen der Nabelschnur (HUVECs) – zeigten, dass bei gut erhaltener Viabilität mehr als die Hälfte der Zellen mit

einer Seneszenz-Antwort auf Bestrahlung reagieren (Abb. 10A). Seneszenz ist charakterisiert durch einen Zustand erhaltenen, wenn auch veränderten, Metabolismus' unter Zellzyklusarrest [21, 85]. Damit sind senescente Zellen zwar nicht mehr proliferativ, durch ihre Zytokinsekretion – den sogenannten SASP – sind sie jedoch sehr wohl in grundlegende Zellkommunikations-Abläufe eingebunden [85].

In den vorliegenden Untersuchungen zeigten sich MIF und IL-3 in der Wundflüssigkeit der IORT-Kohorte am zweiten post-operativen Tag signifikant erhöht (Abb. 10C) und unter den fünf führenden Zytokinen in Korrelation mit den nach IORT eingewanderten Immunzellen (Abb. 10B). Analog dazu ergab sich im In-vitro-Zellmodell ein signifikanter, dosisabhängiger Verlauf der MIF-Produktion durch Brustepithelzellen, der biphasisch verlief und Maxima bei 4 Gy und 20 Gy aufwies (Abb. 10D). Ähnlich dazu zeigten Fibroblasten bei einem wesentlich niedrigerem Zytokin-Niveau Peaks bei 2 Gy und 20 Gy (Abb. 10D). Brustepithelzellen könnten somit, gefolgt von Fibroblasten, plausible Kandidaten für die in den klinischen Proben beobachtete Produktion von MIF zu sein. Passend dazu zeichnete sich in vitro die Produktion von IL-3 reaktiv auf Bestrahlung ab, vorrangig bei Endothel- und Mamma-Epithelzellen mit Maxima bei 4-6 Gy und ca. 12 Gy. Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass die Ausprägung des SASP im Detail von Zelltyp und Art des Zellschadens abhängt sich dieser über eine bestimmte Zeit entwickelt [85]. So dauert es bis zum Wachstumsstopp von Zellen nach Schadensinduktion etwa 24 Stunden und bis zur Ausbildung eines vollständigen SASP in vitro mindestens fünf Tage [85]. In der vorliegenden Studie wurden die Zytokin-Analysen mittels ELISA am zweiten Tag nach Bestrahlung vorgenommen. Damit ist anzunehmen, dass zu diesem Zeitpunkt der SASP noch nicht vollständig ausgebildet war.

In Zusammenschau der vorliegenden Daten könnte somit vermutet werden, dass relevant erhöhte Zytokine in der Wundflüssigkeit aus dem umliegenden, nicht-malignen bestrahlten Brustgewebe stammen und dass somit nicht-malignes Brustgewebe dosisabhängig und nach Bestrahlung – insbesondere mit hohen Einzeldosen – auf humoraler Ebene wesentlich an der Immunzell-Rekrutierung beteiligt sein könnte. In diesem Zusammenhang treten u.a. die Zytokine MIF und IL-3 in den Vordergrund. Die Dosisabhängigkeit der Zytokin-Produktion ist insofern von Bedeutung, als im Rahmen einer IORT die maximale Strahlendosis nur das unmittelbar die ehemalige Tumorloge umgebende Gewebe erreicht, während die Dosis im Applikator-fernen Gewebe bereits nach wenigen Millimetern steil abfällt, was bedeutet, dass durch die Dosisverteilung im umliegenden nicht-malignen Brustgewebe alle Strahlendosen unterhalb der Maximaldosis vertreten sind [5]. Eine Limitation der vorliegenden Studie war in diesem Zusammenhang sicherlich, dass das Normalgewebe mittels In-vitro-Versuchen untersucht wurde, wodurch die abfallenden Strahlendosen im Normalgewebe nur stufenweise abgebildet wurden und sämtliche Zell-Zell-Interaktionen in einem Gewebe nicht berücksichtigt werden konnten.

Mit Blick auf die beteiligten Zytokine stellt sich die Frage nach dem Rekrutierungsmuster. Nach IORT zeigten sich MIF und IL-3 in der Wundflüssigkeit am zweiten Tag nach IORT erhöht, HGF und IL-1ra tendenziell, aber statistisch nicht signifikant erhöht (Abb. 10C). Alle vier genannten Zytokine zeigten sich unter den Top-5-Korrelationsanalysen zwischen zellulärer und humoraler Ebene führend (Abb. 10B).

Auf zellulärer Ebene zeigten nach IORT Gesamt-Monozyten und v.a. klassische Monozyten, Eosinophile, B-Zellen und pDCs eine signifikant gesteigerte Rekrutierung ins ehemalige Tumorbett, wobei Monozyten und Eosinophile auch einen parallelen transienten systemischen Anstieg im peripheren Blut aufwiesen (Abb. 8). Ein Blick auf das Dendrogramm (Abb. 8B) und damit auf eine Abbildung ähnlicher Rekrutierungsmuster zeigt, dass Eosinophile und Monozyten diesbezüglich den höchsten Verwandtschaftsgrad der vier eingewanderten Zellgruppen bilden. Angesichts der Ergebnisse des Dendrogramms und der Gemeinsamkeit des passageren systemischen Anstieges stellt sich die Frage, ob ein gemeinsamer Mediator für diese systemische Rekrutierung verantwortlich sein könnte.

Aus der Literatur ist bekannt, dass MIF eine wesentliche Rolle in der Leukozyten-Rekrutierung zukommt [86]. Diese Funktion der Immunzell-Rekrutierung basiert nicht zuletzt auf einer Regulation von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1, deren MIF-induzierte Expression über Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B und die PI3K vermittelt wird [86, 121, 122]. Überdies ist MIF in akuten und chronischen Inflammations-Zuständen (Sepsis, Rheumatoide Arthritis, Atherosklerose) sowie in Angiogenese-Prozessen involviert, welche wiederum über Zelladhäsions-Moleküle, Hypoxie-Signale und Signalkaskaden, wie jene der MAPK und PI3K, gesteuert werden [122, 123]. MIF wird u.a. durch DAMPs stimuliert und induziert wiederum die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine [123].

IL-3 ist in der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen und der Produktion von Typ-I-Interferonen involviert, neben GM-CSF und anderen Zytokinen führt es zudem zur Aktivierung von Eosinophilen [88, 124]. Im Mausmodell ist IL-3 maßgeblich an inflammatorischen bis hin zu lebensbedrohlichen septischen Zustandsbildern beteiligt [125]. Neben der Induktion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine bis hin zur Auslösung eines Zytokinsturms zeigen sich im Mausmodell bereits einen Tag nach der Schaffung eines Inflammationsherdes eine Monozytose und Neutrophilie sowie ein Anstieg an myeloiden Vorläuferzellen, der bei IL-3-Knock-out-Mäusen ausbleibt [125]. IL-3 ist des Weiteren an der Aktivierung von pDCs beteiligt, die durchflusszytometrisch auch über den hoch exprimierten IL-3-Rezeptor- $\alpha$  (CD123) gekennzeichnet sind [73, 88, 126]. Zusammenfassend betrachtet ist IL-3 ein zentrales Zytokin in der Differenzierung von Monozyten und Granulozyten aus myeloiden Vorläuferzellen, welches durch eine rasche myeloide Rekrutierung den passageren systemischen Anstieg von Monozyten und Eosinophilen erklären könnte. Auf lokaler Ebene könnte es die Rekrutierung bzw. Aktivierung von pDCs induzieren. MIF könnte – möglicherweise gemeinsam mit IL-3 – an der lokalen Rekrutierung von Monozyten beteiligt sein. MIF und IL-3 erscheinen somit als plausible Kandidaten, die die in der vorliegenden Studie beobachtete Immunzell-Rekrutierung vermitteln könnten. Wie in den vorliegenden Zellkultur-Versuchen ersichtlich wurde, könnten sie aus dem beststrahlten Normalbrustgewebe zu stammen. Passend zu den genannten Daten aus der Literatur zeigte sich MIF unter den bestkorrelierenden Zytokinen mit den ins ehemalige Tumorbett eingewanderten Immunzellen und das transkriptomische Profil der Immunzellen nach IORT zeigte klare Signaturen des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und weiterer pro-inflammatorischer Signalkaskaden, wie PI3K (Abb. 13). Die Korrelationsanalyse von Zytokinen und Transkriptom zeigte

parallel dazu in allen Clustern Mitglieder der NF $\kappa$ B-Familie als Komponenten höchster Nähe- und Zwischenzentralität (Abb. 11). Zusammenfassend betrachtet erscheinen die vorliegenden Daten der Beobachtungsstudie zur Immunzell-Rekrutierung somit plausibel und auch in Zusammenschau mit der Literatur stimmig. Dennoch ist es wichtig zu bedenken, dass die exakten Rekrutierungsabläufe im humanen Gewebe anhand dieser Untersuchungen nicht kausal eruierbar sind, da die inter-zellulären Kommunikationsabläufe in Geweben und gewebeähnlichen Zellverbänden in dieser Studie nicht berücksichtigt und dargestellt werden konnten. Hierzu werden weitere In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen vonnöten sein.

Eine weitere wichtige Fragestellung in der Mobilisierung von Immunzellen aus dem systemischen Blutkreislauf ist die Passage der Gefäßwand und damit die Aktivierung von Endothelzellen, die einen Austritt aus dem Blutkreislauf ins geschädigte Gewebe erlauben [59]. Bei Betrachtung der In-vitro-Versuche mit Bestrahlung des nicht-malignen Normal-Brustgewebes fällt auf, dass sich die Endothelzellen analog zu Mamma-Epithelzellen und Fibroblasten verhalten und starke Seneszenz-Antwort bei kaum verminderter Viabilität aufweisen (Abb. 10A). Zudem scheinen sie maßgeblich an der IL-3-Produktion beteiligt zu sein (Abb. 10D). Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass Endothelzellen mit einer Zytokin-Produktion und Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf die Inkubation mit Überständen bestrahlter Tumorzellen reagieren und dies im Bereich höherer Strahlendosen das größte Ausmaß zeigt [34]. Weitere Untersuchungen von Endothelzellen und ihrem Verhalten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlendosen könnten hier weitere Erklärungen für mögliche Rekrutierungsmechanismen von Immunzellen geben.

#### **8.4. IORT aktiviert inflammatorische Gensets in den rekrutierten Immunzellen**

Auf zellulärer Ebene ergaben sich in der hierarchischen Clusteranalyse der Immunzell-Populationen enge Verwandtschaftsgrade zwischen Monozyten, eosinophilen Granulozyten und B-Zellen, während sich die Gruppe der pDCs etwas abgrenzte (Abb. 8B). Dieser Bezug war auch auf Transkriptionsebene zu beobachten: Transkriptomische Muster, die mit der Zahl rekrutierter Monozyten, Eosinophiler und B-Zellen korrelierten, zeichneten sich vorwiegend durch angereicherte Motive von Antigen-Präsentation und konsekutiver pro-inflammatorischer Signalkaskaden wie FGFR-Rezeptor-Signaling (Eosinophile, Monozyten, B-Zellen), FCy-Rezeptor-Signaling (Eosinophile, Monozyten), Semaphorin-Rho/ROCK-Signaling (Eosinophile, Monozyten), RTK-Signaling (Monozyten, B-Zellen), PRR-Signaling (Monozyten, B-Zellen), nukleäre Rezeptoren (Monozyten, B-Zellen), Signalwege des Inflammasoms (Monozyten, B-Zellen), der Todesliganden (Monozyten, B-Zellen), MAPK-Signalwege (Eosinophile, Monozyten), Proteasom (Monozyten, B-Zellen) und Lysosom (Eosinophile, Monozyten, B-Zellen) aus, während dies für pDCs nicht zu beobachten war (Abb. 13).

Diese Analysen gaben einen kohorten-unabhängigen Überblick über das Transkriptom der Immunzellen. Erst die Gegenüberstellung der Kohorten auf Transkriptom-Ebene (Abb. 12B) zeigte die Anreicherung der entsprechenden Gensets in der IORT-Gruppe und dass diese vorwiegend inflammatorischer Natur sind.

Die Zytokin-zu-Zytokin-Korrelationsmatrix lieferte nach einer hierarchischen Clusteranalyse drei Hauptcluster, wobei der dritte Cluster alle vier der mit den rekrutierten Immunzellen best-korrelierenden Zytokine enthielt. Die *Linker-Genes* der drei Hauptcluster identifizierten Transkriptionsfaktoren mit den Netzwerken, die allesamt Proteine der NF $\kappa$ B-Familie, sowie STAT3, CEBPB und FOS als Elemente höchster Zwischen- und Nähezentralität darstellten (Abb. 11). Die GSEAs stellten ergänzend dazu die angereicherten Gensets der mit den jeweiligen Immunzell-Populationen korrelierenden Transkriptom-Daten dar und im Vergleich der beiden Kohorten zeigten sich in der IORT-Kohorte vor allem angereicherte Gensets mit Bezug zu immunologischen Mechanismen (Abb. 13). Unter den signifikant angereicherten Gensets fanden sich an führender Position die Gruppen *IL-6-JAK-STAT3-Signaling*, *TNF $\alpha$ -Signaling-via-NF $\kappa$ B*, *Inflammatory-Response*, *TGF- $\beta$ -Signaling* und *Hypoxia* (Abb. 12C). Eine detailliertere Analyse der *Leading-Edge-Genes* zeigte wiederum die Beteiligung verschiedener Transkriptionsfaktoren in diesem Zusammenhang. Mit Ausnahme des TGF- $\beta$ -Gensets wiesen die übrigen genannten jeweils einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren, wie die Mitglieder der NF $\kappa$ B-Familie, STAT3, STAT1, JUN und FOS auf (Abb. 12C) – in Analogie zu den als *Linker-Genes* identifizierten Transkriptionsfaktoren der drei genannten Hauptcluster der Zytokin-Korrelationsmatrix (Abb. 11).

Die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und jene der STAT-Familie sind zentrale Regulatoren immunologischer Prozesse und stellen eine wichtige Verbindung zwischen Inflammation und Krebs dar [91]. NF $\kappa$ B ist ein schneller Modulator der innaten und adaptiven Immunantwort sowie der Proliferation und Differenzierung von Immunzellen und wird u.a. durch TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ROS und Lipopolysaccharide aktiviert [91]. Eine konstitutive Expression von NF $\kappa$ B ist mit manchen Karzinomen assoziiert und resultiert wiederum in der Sekretion inflammatorischer Zytokine [91, 127]. Eine ausgeprägte Zytokinproduktion und -sekretion erfolgt häufig durch senescente Zellen, hierbei dient NF $\kappa$ B als regulatorisches Element des SASP [127].

Die genauen Rollen der einzelnen STAT-Proteine und ihre Verbindungen untereinander und zu anderen Signalwegen sind teilweise noch lückenhaft erforscht, sie nehmen jedoch wichtige Rollen in diversen Entwicklungsstadien und der Proliferation und Differenzierung einzelner Immunzell-Populationen ein und stehen in enger Interaktion mit NF $\kappa$ B [128-130]. Knock-out-Versuche führten u.a. zu erheblichen immunologischen Defekten bis hin zu embryonaler Letalität im Falle eines STAT3-Knock-outs [91]. STAT3 wird u.a. durch IL-2 und IL-6 induziert und spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Modulation von DCs und v.a. pDCs [91, 129, 130]. Die Produktion von cDCs wird des Weiteren maßgeblich durch STAT5 reguliert [129-131].

IL-2 aktiviert sowohl STAT3 als auch STAT5 und ist maßgeblich in T-Zell-Entwicklung, -Proliferation und -Metabolismus involviert: Neben der Bildung von T<sub>regs</sub> bewirkt IL-2 beispielsweise ihre Differenzierung

und Homöostase [91, 132]. Über den mTOR-Signalweg wird die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Differenzierung angeregt, über u.a. HIF1α erfolgt die Regulation des Metabolismus der T-Zellen [132]. Auch zytotoxische T-Zellen werden über IL-2-Kaskaden zur Proliferation und Differenzierung angeregt [132].

Ein weiterer wichtiger Signalweg in der basalen Regulation physiologischer wie pathologischer zellulärer Überlebensvorgänge ist der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg [133, 134]. In enger Verbindung mit RAS und STAT reguliert er Zellproliferation, -metabolismus, Angiogenese und Wachstum [133, 134]. PI3K ist zusammen mit AKT vorrangig in Überlebensvorgängen bei Zellstress aktiv und mTOR in der Signalverarbeitung und -weitergabe bis hin zur ribosomalen Translation [133, 134]. PI3K-Untereinheiten weisen im Mammakarzinom und weiteren Tumorentitäten häufig Mutationen auf und stellen somit interessante Therapieangriffspunkte dar [135].

Pro-inflammatorische Zytokine wie TNF können über Signalwege wie MAPK und NFκB zelluläre und v.a. Entzündungsreaktionen maßgeblich beeinflussen [136]. TNF beeinträchtigt die Tumorgefäßversorgung bis hin zu den namengebenden intra-tumoralen hämorrhagischen Nekrosen und fördert die Elimination immunogen gewordener Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen [137]. Gleichzeitig sind auch protumorale Eigenschaften von TNF bekannt, die insbesondere durch die Modifikation des Tumor-Mikromilieus entstehen [137].

Ein weiteres Zytokin mit vielseitigen Eigenschaften ist TGF-β. Während TGF-β – verallgemeinert dargestellt – in anfänglichen Tumorstadien eher anti-tumorale Wirkungen zeigt, überwiegen in späteren Phasen eher die pro-tumoralen [138, 139]. Die *downstream* von TGF-β liegenden Proteine und Signalkaskaden wie Smad, MAPK, PI3K und Rho, um nur einige zu nennen, zeigen hierbei die Diversität und Komplexität der Wirkungen von TGF-β auf [138, 139].

In der vorliegenden Studie unterschied sich das Genset um TGF-β von den Gemeinsamkeiten der anderen Gensets insofern, als es nicht Gene der STAT- und NFκB- Familie, sondern TGF-β und SMAD als Gene höchster Zwischenzentralität aufwies. TGF-β ist bekanntlich maßgeblich an der Wundheilung und an Gewebe-Regenerationsprozessen beteiligt und fungiert vorrangig über die als SMAD-Proteine bezeichneten Signaltransduktoren [140, 141]. Mit Blick auf die post-operative Situation, aus der das Untersuchungsmaterial gewonnen wurde, ist anzunehmen, dass das TGF-β-Genset vorrangig die Wundheilungsprozesse nach Operation repräsentiert und sich damit von den anderen Gensets unterscheidet, deren führende Transkriptionsfaktoren sich stark überschneiden. Eine detaillierte Interpretation der genauen Funktionen und Folgen dieser Transkriptionsfaktor-Aktivität bezogen auf einzelne Immunzellgruppen oder Gensets ist – nicht zuletzt aufgrund der Komplexität des Zusammenspiels diverser Transkriptionsfaktoren, Zytokine und regulatorischer Proteine – an dieser Stelle nicht möglich. Auch wenn inflammatorische Transkriptionsfaktoren wie NFκB und jene der STAT-Familie vielfach erforscht und publiziert sind, ist eine definitive Aussage über definierte Funktionen in dieser Situation nicht zu formulieren, da sich ihre Funktion und die Folgen ihrer Aktivierung aus einem komplexen Zusammenspiel an genetischen Faktoren, humoralen Einflüssen, Gewebsbedingungen wie

Hypoxie, Tumorentitäten, der untersuchten Spezies und nicht zuletzt auch äußereren Einflussfaktoren wie onkologischen Therapien ergeben [91, 127, 142-146].

Die Analysen der vorliegenden Studie zeigen, dass nach IORT im Vergleich zur unbestrahlten Kohorte bestimmte Immunzelltypen vermehrt ins ehemalige Tumorbett rekrutiert und in diesen Immunzellen v.a. inflammatorische Signalwege verstärkt exprimiert wurden. Vorrangig sind hierbei Transkriptionsfaktoren wie NFkB, jene der STAT-Gruppe und die JUN/FOS zu nennen. Da diese Transkriptionsfaktoren und v.a. NFkB in zentralen lebensnotwendigen zellulären und immunologischen Abläufen und Regulations-Mechanismen involviert sind, treten sie damit für weitere Untersuchungen und gar mögliche künftige Therapieangriffspunkte in den Fokus näherer Betrachtungen.

## **9. Zusammenfassung**

In Zusammenschau der Untersuchungsdaten ergeben sich analog zu den genannten vorausgegangenen In-vitro- und In-vivo-Ergebnissen Hinweise, dass höhere lokale Bestrahlungsintensität zur Rekrutierung von Immunzellen und v.a. zur Rekrutierung von Antigen-präsentierenden Zellen beitragen und somit einen wichtigen Beitrag zur immunologischen Tumorkontrolle leisten könnte.

Vorrangig zeigten sich nach IORT eosinophile Granulozyten, klassische und Gesamt-Monozyten, B-Zellen und pDCs ins ehemalige Tumorbett rekrutiert. Auf Zytokinebene ergaben sich für erstere drei Zellpopulationen ähnliche Korrelationen, wobei sich MIF und IL-3 unter den Zytokinen als führend erwiesen. Im Rahmen der In-vitro-Untersuchung von nicht-malignen Normalgewebszellen der Brust ergab sich eine starke Seneszenz-Antwort nach Bestrahlung mit hohen Einzeldosen, des Weiteren erwiesen sich epitheliale Zellen der Brust als mögliche Produzenten von MIF und epitheliale und endotheliale Zellen als vorrangige Produzenten von IL-3. Es kann vermutet werden, dass nicht-malignes Normalgewebe einen wesentlichen Beitrag zur Immunzell-Rekrutierung nach Strahlentherapie leistet und die Rekrutierung maßgeblich über Zytokine wie MIF und IL-3 gesteuert werden könnte. Auf Transkriptom-Ebene der ins ehemalige Tumorbett rekrutierten Immunzellen zeigte sich nach IORT eine Hochregulation inflammatorischer Signalwege, insbesondere jener um die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und STAT3, was in Zusammenschau mit der Funktion dieser Transkriptionsfaktoren auf eine relevante Einflussnahme der IORT auf grundlegende Mechanismen der immunologischen Kontrolle, zellulärer Regenerationsvorgänge und damit letztendlich auch der Tumorkontrolle deuten könnte.

Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass eine alleinig auf den Tumor fokussierte Betrachtung der durch eine Radiotherapie induzierten Effekte zu kurz greift und insbesondere der Beitrag des im Bestrahlungsfeld liegenden Normalgewebes näher untersucht werden sollte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Begleitforschungsstudie sind selbstverständlich nur ein Baustein in der Untersuchung von Effekten intra-operativer Strahlentherapie beim Mammakarzinom auf lokale und systemische immunologische Abläufe. Weitere Analysen und klinische Studien sind notwendig, um die Mechanismen der Immunzell-Rekrutierung genauer zu verstehen und damit Grundlagen zu definieren, die wegweisend für die Optimierung klinischer Therapieansätze sind.

## 10. Literaturverzeichnis

1. Orth, M., et al., *Current concepts in clinical radiation oncology*. Radiat Environ Biophys, 2014. **53**(1): p. 1-29.
2. Darby, S., et al., *Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials*. Lancet, 2011. **378**(9804): p. 1707-16.
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, 2021, AWMF Registernummer: 032-045OL*, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 24.05.2022). 2021.
4. Vaidya, J.S., et al., *Intraoperative radiotherapy for breast cancer*. Lancet Oncol, 2004. **5**(3): p. 165-73.
5. Wannenmacher, M., Wenz, F., Debus, J. (Hrsg.), *Strahlentherapie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013: p. S. 4-6., 159, 199ff., 1065.
6. Sedlmayer, F., et al., *Intraoperative radiotherapy (IORT) as boost in breast cancer*. Radiat Oncol, 2017. **12**(1): p. 23.
7. Withers, H.R., *The Four R's of Radiotherapy*. John TL, Howard A, eds. Advances in radiation biology. Elsevier, 1975. **Volume 5**: p. p. 241-271.
8. Herskind, C., et al., *Biology of high single doses of IORT: RBE, 5 R's, and other biological aspects*. Radiat Oncol, 2017. **12**(1): p. 24.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
10. Brix, N., et al., *Abscopal, immunological effects of radiotherapy: Narrowing the gap between clinical and preclinical experiences*. Immunol Rev, 2017. **280**(1): p. 249-279.
11. Postow, M.A., et al., *Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma*. N Engl J Med, 2012. **366**(10): p. 925-31.
12. Mole, R.H., *Whole Body Irradiation—Radiobiology or Medicine?* The British Journal of Radiology, 1953. **26**(305): p. 234-241.
13. Demaria, S., et al., *Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(3): p. 862-70.
14. Inthagard, J., J. Edwards, and A.K. Roseweir, *Immunotherapy: enhancing the efficacy of this promising therapeutic in multiple cancers*. Clin Sci (Lond), 2019. **133**(2): p. 181-193.
15. Demaria, S. and S.C. Formenti, *The abscopal effect 67 years later: from a side story to center stage*. Br J Radiol, 2020. **93**(1109): p. 20200042.

16. Lauber, K., et al., *Targeting the heat shock response in combination with radiotherapy: Sensitizing cancer cells to irradiation-induced cell death and heating up their immunogenicity*. Cancer Lett, 2015. **368**(2): p. 209-29.
17. Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber, *Interferons, immunity and cancer immunoediting*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 836-48.
18. del Regato, J.A., *Albert Soiland and the early development of therapeutic radiology in the United States*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1983. **9**(2): p. 243-53.
19. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, *Neoantigens in cancer immunotherapy*. Science, 2015. **348**(6230): p. 69-74.
20. Alexandrov, L.B., et al., *Signatures of mutational processes in human cancer*. Nature, 2013. **500**(7463): p. 415-21.
21. Lauber, K., et al., *Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 116.
22. Hiniker, S.M., et al., *A systemic complete response of metastatic melanoma to local radiation and immunotherapy*. Transl Oncol, 2012. **5**(6): p. 404-7.
23. Stamell, E.F., et al., *The abscopal effect associated with a systemic anti-melanoma immune response*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013. **85**(2): p. 293-5.
24. Okwan-Duodu, D., et al., *Role of radiation therapy as immune activator in the era of modern immunotherapy for metastatic malignant melanoma*. Am J Clin Oncol, 2015. **38**(1): p. 119-25.
25. Thallinger, C., et al., *[Abscopal effect in the treatment of malignant melanoma]*. Hautarzt, 2015. **66**(7): p. 545-8.
26. Barker, C.A. and M.A. Postow, *Combinations of radiation therapy and immunotherapy for melanoma: a review of clinical outcomes*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2014. **88**(5): p. 986-97.
27. Michot, J.M., et al., *Abscopal effect in a Hodgkin lymphoma patient treated by an anti-programmed death 1 antibody*. Eur J Cancer, 2016. **66**: p. 91-4.
28. Golden, E.B., et al., *An abscopal response to radiation and ipilimumab in a patient with metastatic non-small cell lung cancer*. Cancer Immunol Res, 2013. **1**(6): p. 365-72.
29. Lugade, A.A., et al., *Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7516-23.
30. Tang, D., et al., *The molecular machinery of regulated cell death*. Cell Res, 2019. **29**(5): p. 347-364.
31. Galluzzi, L., et al., *Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death*. J Immunother Cancer, 2020. **8**(1).
32. Munoz, L.E., et al., *The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity*. Nat Rev Rheumatol, 2010. **6**(5): p. 280-9.

33. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell Death Differ, 2018. **25**(3): p. 486-541.
34. Krombach, J., et al., *Priming anti-tumor immunity by radiotherapy: Dying tumor cell-derived DAMPs trigger endothelial cell activation and recruitment of myeloid cells*. Oncoimmunology, 2019. **8**(1): p. e1523097.
35. Larson, S.R., et al., *Ly6C(+) monocyte efferocytosis and cross-presentation of cell-associated antigens*. Cell Death Differ, 2016. **23**(6): p. 997-1003.
36. Munoz, L.E., et al., *Apoptotic cell clearance and its role in the origin and resolution of chronic inflammation*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 139.
37. Lee, Y., et al., *Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment*. Blood, 2009. **114**(3): p. 589-95.
38. Hennel, R., et al., *Release of monocyte migration signals by breast cancer cell lines after ablative and fractionated gamma-irradiation*. Radiat Oncol, 2014. **9**(1): p. 85.
39. Golden, E.B., et al., *Local radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to generate abscopal responses in patients with metastatic solid tumours: a proof-of-principle trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(7): p. 795-803.
40. Demaria, S., C.N. Coleman, and S.C. Formenti, *Radiotherapy: Changing the Game in Immunotherapy*. Trends Cancer, 2016. **2**(6): p. 286-294.
41. Ehrlich, P., *Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung*. Ned Tijdschr Geneeskd, 1909. **53**: p. 273-290.
42. Coley, W.B., *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases*. 1893. Clin Orthop Relat Res, 1991(262): p. 3-11.
43. Lugade, A.A., et al., *Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3132-9.
44. Gupta, A., et al., *Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8+ T cells via dendritic cell activation*. J Immunol, 2012. **189**(2): p. 558-66.
45. Lim, J.Y., et al., *Type I interferons induced by radiation therapy mediate recruitment and effector function of CD8(+) T cells*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(3): p. 259-71.
46. Diamond, M.S., et al., *Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors*. J Exp Med, 2011. **208**(10): p. 1989-2003.
47. Fuertes, M.B., et al., *Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells*. J Exp Med, 2011. **208**(10): p. 2005-16.
48. Burnette, B.C., et al., *The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type i interferon-dependent innate and adaptive immunity*. Cancer Res, 2011. **71**(7): p. 2488-96.
49. Gerber, S.A., et al., *IFN- $\gamma$  mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor*. Am J Pathol, 2013. **182**(6): p. 2345-54.

50. Barker, H.E., et al., *The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(7): p. 409-25.
51. Filatenkov, A., et al., *Ablative Tumor Radiation Can Change the Tumor Immune Cell Microenvironment to Induce Durable Complete Remissions*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(16): p. 3727-39.
52. Gao, D., et al., *Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses*. Science, 2013. **341**(6148): p. 903-6.
53. Deng, L., et al., *STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 843-52.
54. Vanpouille-Box, C., et al., *DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15618.
55. Cai, X., Y.H. Chiu, and Z.J. Chen, *The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling*. Mol Cell, 2014. **54**(2): p. 289-96.
56. Ablasser, A., et al., *Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP*. Nature, 2013. **503**(7477): p. 530-4.
57. Kroemer, G., et al., *Immunogenic cell death in cancer therapy*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 51-72.
58. Foell, D., H. Wittkowski, and J. Roth, *Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. **3**(7): p. 382-90.
59. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
60. Elliott, M.R., et al., *Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance*. Nature, 2009. **461**(7261): p. 282-6.
61. Kepp, O., et al., *Extracellular nucleosides and nucleotides as immunomodulators*. Immunol Rev, 2017. **280**(1): p. 83-92.
62. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
63. Ganss, R., et al., *Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication*. Cancer Res, 2002. **62**(5): p. 1462-70.
64. Kaur, P. and A. Asea, *Radiation-induced effects and the immune system in cancer*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 191.
65. Heckmann, M., et al., *Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation*. Exp Cell Res, 1998. **238**(1): p. 148-54.
66. Förster, R., A.C. Dávalos-Misslitz, and A. Rot, *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 362-71.

67. Muntjewerff, E.M., L.D. Meesters, and G. van den Bogaart, *Antigen Cross-Presentation by Macrophages*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1276.
68. Dustin, M.L., *The immunological synapse*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(11): p. 1023-33.
69. Demaria, S. and S.C. Formenti, *Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 95.
70. Formenti, S.C. and S. Demaria, *Radiation therapy to convert the tumor into an in situ vaccine*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012. **84**(4): p. 879-80.
71. Pietkiewicz, S., J.H. Schmidt, and I.N. Lavrik, *Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining*. J Immunol Methods, 2015. **423**: p. 99-103.
72. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. Nat Protoc, 2009. **4**(12): p. 1798-806.
73. Rühle, P.F., et al., *Development of a Modular Assay for Detailed Immunophenotyping of Peripheral Human Whole Blood Samples by Multicolor Flow Cytometry*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(8).
74. Carretero, R., et al., *Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8(+) T cells*. Nat Immunol, 2015. **16**(6): p. 609-17.
75. Davis, B.P. and M.E. Rothenberg, *Eosinophils and cancer*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(1): p. 1-8.
76. Lotfi, R., J.J. Lee, and M.T. Lotze, *Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors*. J Immunother, 2007. **30**(1): p. 16-28.
77. Gatault, S., et al., *Involvement of eosinophils in the anti-tumor response*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(9): p. 1527-34.
78. Luna-Moré, S., et al., *Neutral and acid mucins and eosinophil and argyrophil crystalloids in carcinoma and atypical adenomatous hyperplasia of the prostate*. Pathol Res Pract, 1997. **193**(4): p. 291-8.
79. von Wasielewski, R., et al., *Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors*. Blood, 2000. **95**(4): p. 1207-13.
80. Stenfeldt, A.L. and C. Wennerås, *Danger signals derived from stressed and necrotic epithelial cells activate human eosinophils*. Immunology, 2004. **112**(4): p. 605-14.
81. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762-74.
82. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
83. Tiberio, L., et al., *Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration*. Cell Mol Immunol, 2018. **15**(4): p. 346-352.

84. Weisel, F. and M. Shlomchik, *Memory B Cells of Mice and Humans*. Annu Rev Immunol, 2017. **35**: p. 255-284.
85. Coppé, J.P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 99-118.
86. Stark, K., et al., *Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs*. Nat Immunol, 2013. **14**(1): p. 41-51.
87. Trusolino, L., A. Bertotti, and P.M. Comoglio, *MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(12): p. 834-48.
88. Dougan, M., G. Dranoff, and S.K. Dougan, *GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation*. Immunity, 2019. **50**(4): p. 796-811.
89. Mantovani, A., I. Barajon, and C. Garlanda, *IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy*. Immunol Rev, 2018. **281**(1): p. 57-61.
90. Hevey, D., *Network analysis: a brief overview and tutorial*. Health Psychology and Behavioral Medicine. **6**(1): p. 301-328.
91. Fan, Y., R. Mao, and J. Yang, *NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer*. Protein Cell, 2013. **4**(3): p. 176-85.
92. Nabel, G.J. and I.M. Verma, *Proposed NF-kappa B/I kappa B family nomenclature*. Genes Dev, 1993. **7**(11): p. 2063.
93. Ruffell, D., et al., *A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(41): p. 17475-80.
94. Chen, X., et al., *Impaired generation of bone marrow B lymphocytes in mice deficient in C/EBPbeta*. Blood, 1997. **90**(1): p. 156-64.
95. Hirai, H., et al., *C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis*. Nat Immunol, 2006. **7**(7): p. 732-9.
96. Milde-Langosch, K., *The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2449-61.
97. Lahalle, A., et al., *The p53 Pathway and Metabolism: The Tree That Hides the Forest*. Cancers (Basel), 2021. **13**(1).
98. Wenz, F., et al., *Accelerated Partial Breast Irradiation in Clinical Practice*. Breast Care (Basel), 2015. **10**(4): p. 247-52.
99. Sperk, E., et al., *A cohort analysis to identify eligible patients for intraoperative radiotherapy (IORT) of early breast cancer*. Radiat Oncol, 2014. **9**: p. 154.
100. Ciabattini, A., et al., *Vaccination in the elderly: The challenge of immune changes with aging*. Semin Immunol, 2018. **40**: p. 83-94.

101. Buder-Bakhaya, K. and J.C. Hassel, *Biomarkers for Clinical Benefit of Immune Checkpoint Inhibitor Treatment-A Review From the Melanoma Perspective and Beyond*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1474.
102. Rosner, S., et al., *Peripheral blood clinical laboratory variables associated with outcomes following combination nivolumab and ipilimumab immunotherapy in melanoma*. Cancer Med, 2018. **7**(3): p. 690-697.
103. Cormier, S.A., et al., *Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(6): p. 1131-9.
104. Wen, T. and M.E. Rothenberg, *The Regulatory Function of Eosinophils*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(5).
105. Del Pozo, V., et al., *Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing*. Eur J Immunol, 1992. **22**(7): p. 1919-25.
106. Simon, S.C.S., J. Utikal, and V. Umansky, *Opposing roles of eosinophils in cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2019. **68**(5): p. 823-833.
107. Lotfi, R. and M.T. Lotze, *Eosinophils induce DC maturation, regulating immunity*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(3): p. 456-60.
108. Lotfi, R., et al., *Eosinophils oxidize damage-associated molecular pattern molecules derived from stressed cells*. J Immunol, 2009. **183**(8): p. 5023-31.
109. Underhill, D.M. and H.S. Goodridge, *Information processing during phagocytosis*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 492-502.
110. Inpanathan, S. and R.J. Botelho, *The Lysosome Signaling Platform: Adapting With the Times*. Front Cell Dev Biol, 2019. **7**: p. 113.
111. Franzolin, G. and L. Tamagnone, *Semaphorin Signaling in Cancer-Associated Inflammation*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2).
112. Wallerius, M., et al., *Guidance Molecule SEMA3A Restricts Tumor Growth by Differentially Regulating the Proliferation of Tumor-Associated Macrophages*. Cancer Res, 2016. **76**(11): p. 3166-78.
113. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
114. Lin, A. and K. Loré, *Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1781.
115. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
116. Woo, S.R., L. Corrales, and T.F. Gajewski, *Innate immune recognition of cancer*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**: p. 445-74.
117. Kitcharoenakkul, M., et al., *Temporal biological variability in dendritic cells and regulatory T cells in peripheral blood of healthy adults*. J Immunol Methods, 2016. **431**: p. 63-5.

118. Yuseff, M.I., et al., *How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(7): p. 475-86.
119. Largeot, A., et al., *The B-side of Cancer Immunity: The Underrated Tune*. Cells, 2019. **8**(5).
120. Shimabukuro-Vornhagen, A., et al., *Antigen-presenting human B cells are expanded in inflammatory conditions*. J Leukoc Biol, 2017. **101**(2): p. 577-587.
121. Amin, M.A., et al., *Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NF $\kappa$ B*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2252-61.
122. Asare, Y., M. Schmitt, and J. Bernhagen, *The vascular biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF). Expression and effects in inflammation, atherogenesis and angiogenesis*. Thromb Haemost, 2013. **109**(3): p. 391-8.
123. Noe, J.T. and R.A. Mitchell, *MIF-Dependent Control of Tumor Immunity*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 609948.
124. Broughton, S.E., et al., *The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling*. Immunol Rev, 2012. **250**(1): p. 277-302.
125. Weber, G.F., et al., *Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis*. Science, 2015. **347**(6227): p. 1260-5.
126. Lantz, C.S., et al., *Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 90-3.
127. Taniguchi, K. and M. Karin, *NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(5): p. 309-324.
128. Li, F., et al., *NF- $\kappa$ B in cancer therapy*. Arch Toxicol, 2015. **89**(5): p. 711-31.
129. Li, H.S. and S.S. Watowich, *A STATus report on DC development*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(3): p. 445-59.
130. Platanitis, E. and T. Decker, *Regulatory Networks Involving STATs, IRFs, and NF $\kappa$ B in Inflammation*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2542.
131. Collin, M. and V. Bigley, *Human dendritic cell subsets: an update*. Immunology, 2018. **154**(1): p. 3-20.
132. Ross, S.H. and D.A. Cantrell, *Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 2018. **36**: p. 411-433.
133. Keppler-Noreuil, K.M., et al., *Somatic overgrowth disorders of the PI3K/AKT/mTOR pathway & therapeutic strategies*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2016. **172**(4): p. 402-421.
134. Porta, C., C. Paglino, and A. Mosca, *Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 64.
135. LoRusso, P.M., *Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Solid Tumors*. J Clin Oncol, 2016. **34**(31): p. 3803-3815.

136. Newton, K. and V.M. Dixit, *Signaling in innate immunity and inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(3).
137. Balkwill, F., *Tumour necrosis factor and cancer*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(5): p. 361-71.
138. Landskron, G., et al., *Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 149185.
139. Seoane, J. and R.R. Gomis, *TGF- $\beta$  Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(12).
140. Lichtman, M.K., M. Otero-Vinas, and V. Falanga, *Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) isoforms in wound healing and fibrosis*. Wound Repair Regen, 2016. **24**(2): p. 215-22.
141. Santibañez, J.F., M. Quintanilla, and C. Bernabeu, *TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions*. Clin Sci (Lond), 2011. **121**(6): p. 233-51.
142. Mitchell, S., J. Vargas, and A. Hoffmann, *Signaling via the NF $\kappa$ B system*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016. **8**(3): p. 227-41.
143. Hagemann, T., et al., *Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NF- $\kappa$ B*. Blood, 2009. **113**(14): p. 3139-46.
144. DiDonato, J.A., F. Mercurio, and M. Karin, *NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 379-400.
145. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove, *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(11): p. 798-809.
146. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.

## 11. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Prinzip der In-situ-Vakzinierung durch Strahlentherapie.....	18
Abb. 2: Studiendesign.....	25
Abb. 3: FACS-Gating-Strategie.....	29
Abb. 4: Detaildarstellung der Vergleichsparameter .....	33
Abb. 5: Die Kohorten sind hinsichtlich klinischer und histologischer Eigen-schaften vergleichbar. ....	34
Abb. 6: Die Kohorten zeigen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Tumorgröße und tumorbiologischer Eigenschaften. ....	34
Abb. 7: Einblutungsgrad, Volumen und Zellzahl sind in den Wundflüssigkeitsproben beider Kohorten vergleichbar. ....	35
Abb. 8: IORT (1x20 Gy) induziert einen Anstieg an Monozyten, eosinophilen Granulozyten, pDCs und B-Zellen im ehemaligen Tumorbett.....	36
Abb. 9: Lokale Bestrahlung mit hohen Einzeldosen induziert am zweiten Tag nach Therapie einen signifikanten Monozyten-Anstieg im peripheren Blut. ....	38
Abb. 10: In nicht-malignem Brustgewebe erfolgt durch Bestrahlung mit hohen Einzeldosen eine Seneszenz-Induktion und Seneszenz-assoziierte Zytokinveränderungen entsprechen rekrutierten Immunzell-Populationen in der Wundflüssigkeit. ....	40
Abb. 11: Zytokin-zu-Zytokin-Korrelationsanalysen identifizieren drei Zytokin-Cluster, die über verschiedene Transkriptionsfaktor-Netzwerke gesteuert werden. ....	42
Abb. 12: RNA-Sequenzierungsdaten zeigen in Immunzellen aus IORT-Wundflüssigkeiten eine Anreicherung von Gensets, die mit NFkB, JAK-STAT- und TGF- $\beta$ -Signalwegen assoziiert sind, sowie mit Hypoxie. ....	44
Abb. 13: IORT-Wundflüssigkeits-Leukozyten zeigen eine Anreicherung von inflammatorischen Gensets auf Transkriptom-Ebene. ....	45
Abb. 14: Detaildarstellung angereicherter Gensets. ....	46
Abb. 15: Immunzell-Rekrutierung und immunologische Effekte nach Strahlentherapie.....	48
Tab. 1: Hersteller .....	20
Tab. 2: Primäre Zellen.....	21
Tab. 3: Kommerziell verfügbare Reagenzien und Kulturmedien.....	21
Tab. 4: Zusammensetzung hergestellter Reagenzien.....	22
Tab. 5: Multicolor-FACS-Panel, Antikörper und Isotypen.....	22
Tab. 6: Kommerziell verfügbare Kits.....	23
Tab. 7: Verbrauchsmaterialien .....	23
Tab. 8: Geräte .....	24
Tab. 9: Software .....	24
Tab. 10: Bio-Plex Pro Human Chemokine Panel (40-Plex).....	31
Tab. 11: Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel (48-Plex) .....	31
Tab. 12: Angereicherte Gensets nach Immunzelltyp.....	46
Tab. 13: Details zur Datenerhebung und Studiendurchführung .....	73

## **12. Angaben zur Studiendurchführung**

Folgend soll dargestellt werden, welche Personen bei der Durchführung der Studie involviert waren:

Die Durchführung der Studie erfolgte in Zusammenarbeit der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie mit der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des LMU Klinikums unter der Studienleitung von Prof. Dr. Claus Belka, Prof. Dr. Kirsten Lauber und Prof. Dr. Nadia Harbeck.

Der Ethikantrag wurde durch Prof. Dr. Kirsten Lauber mit Unterstützung durch MSc. Nikko Brix und Anna-Maria Tiefenthaller verfasst und mit Hilfe von Ulrike Pflugradt und Claudia Baur vom Studienbüro der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie eingereicht.

Die Indikationsstellung der Therapien erfolgte unabhängig von einem möglichen späteren Studieneinschluss. Zwischen Juli 2015 und Dezember 2016 wurden 49 Patientinnen mit den genannten Kriterien in die Studie eingeschlossen. Die Koordination, Rekrutierung und Studienaufklärung von Patientinnen der Kontrollgruppe erfolgten im Rahmen der prä-operativen Vorbereitungen durch PD Dr. Bernd Kost, Patientinnen der IORT-Gruppe wurden im Rahmen der Vorgespräche in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie durch OÄ Dr. Heike Scheithauer und OÄ Dr. Montserrat Pazos Escudero aufgeklärt.

Die Operation und Anlage der Wunddrainagen erfolgte nach Standard der Klinik durch den bzw. die Operateur\*in, die Entfernung im Rahmen der klinischen Routine durch Ärzt\*innen der jeweiligen Stationen. Die IORT wurde in Zusammenarbeit zwischen Operateur\*innen und OÄ Dr. Heike Scheithauer sowie OÄ Dr. Montserrat Pazos Escudero seitens der Radioonkologie durchgeführt. Das medizinische Follow-Up nach ca. 28 Tagen erfolgte durch die Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe für Patientinnen der Kontrollgruppe, durch die ÄrztInnen der Strahlentherapie für IORT-Patientinnen. Die Blutentnahmen erfolgten durch medizinisches Personal der jeweiligen Stationen und Ambulanzen.

Die Planung der einzelnen Arbeitsschritte erfolgte durch Anna-Maria Tiefenthaller in enger Zusammenarbeit mit den an der Studie beteiligten Ärzt\*innen und Pflegemitarbeiter\*innen, maßgeblich wurde die Planung und Koordination durch die *Breast-Care-Nurse* Brigitte Ehrl unterstützt. Die Abholung des Probenmaterials, der Transport ins Labor der Molekularen Onkologie im Klinikum Großhadern und die Aufarbeitung der Patientinnenproben (Erfassung von Volumen, Zellzahl, Hämoglobinbestimmung, FACS-Analyse, ELISA (teilweise) und Konservierung des Biomaterials) erfolgten durch Anna-Maria Tiefenthaller. Methodische Unterstützung bei der Durchführung der Analysen boten Dr. Roman Hennel, MSc. Nikko Brix und MSc. Heike Anders. Die Durchführung weiterer ELISAs und aller Multiplex-ELISAs erfolgte teils in Zusammenarbeit mit, teils alleinig durch die drei genannten Kolleg\*innen. Prof. Dr. Udo Gaipl und Dr. Paul Rühle unterstützten bei der methodischen Planung der FACS-Analysen. Die In-vitro-Zellkultur-Versuche sowie die Vorbereitungen für die RNA-Sequenzierung erfolgten gänzlich durch MSc. Nikko Brix, die *Library-Preparation* der RNA-Sequenzierungsproben durch Dr. Julia Hess und Steffen Heuer aus der Arbeitsgruppe Strahlenzytogenetik (HMGU Neuherberg) unter der Leitung von

Prof. Dr. Horst Zitzelsberger. Die RNA-Sequenzierung wurde durch die Firma *Novogene* vorgenommen, die Weiterverarbeitung des Datensatzes durch PD Dr. Kristian Unger (HMGU Neuherberg). Die Darstellung der Daten erfolgte mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Kristian Unger, Dr. Roman Hennel, MSc. Nikko Brix und MSc. Heike Anders.

Die Daten wurden jeweils durch die Versuchsdurchführenden ausgewertet, Prof. Dr. Kirsten Lauber nahm weitere statistische Testungen und Analysen vor und erstellte die Abbildungen der Versuchsergebnisse. PD Dr. Steffen Unkel unterstützte die Studie durch statistische Beratungen.

*Tab. 13: Details zur Datenerhebung und Studiendurchführung*

Abbildung	Details zur Datenerhebung
Abb. 1: Prinzip der In-situ-Vakzinierung durch Strahlentherapie	Die Darstellung erfolgte durch Anna-Maria Tiefenthaller.
Abb. 2: Studiendesign	Das Studiendesign wurde erarbeitet durch Prof. Dr. Claus Belka, Prof. Dr. Kirsten Lauber, OÄ Dr. Heike Scheithauer, Prof. Dr. Nadia Harbeck, PD Dr. Bernd Kost, PD Dr. Rachel Würstlein und Prof. Dr. Tobias Weißenbacher. Studieneinschluss und Aufklärung der Patientinnen erfolgten durch o.g. Personen bzw. Mitarbeiter*innen der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie sowie der Frauenklinik des LMU Klinikums.
Abb. 3: FACS-Gating-Strategie	Die Details der Multicolor-FACS-Analyse sowie die FACS-Gating-Strategie wurden in Zusammenarbeit von Prof. Dr. Udo Gaipl, Dr. Paul Rühle und Prof. Dr. Kirsten Lauber erstellt.
Abb. 4: Detaildarstellung der Vergleichsparameter.	
Abb. 5: Die Kohorten sind hinsichtlich klinischer und histologischer Eigenschaften vergleichbar	Die Erhebung der Details aus den Patientinnenakten erfolgte durch Anna-Maria Tiefenthaller, die statistischen Analysen durch Prof. Dr. Kirsten Lauber und die statistische Beratung durch PD Dr. Steffen Unkel.
Abb. 6: Die Kohorten zeigen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Tumorgröße und tumorbiologischer Eigenschaften	
Abb. 7: Einblutungsgrad, Volumen und Zellzahl sind in den Wundflüssigkeitsproben beider Kohorten vergleichbar	Die Sammlung und laborchemische Aufbereitung von Wundflüssigkeit und peripherem Blut erfolgte durch Anna-Maria Tiefenthaller unter Betreuung durch Prof. Dr. Kirsten Lauber.
Abb. 8: IORT (1x20 Gy) induziert einen Anstieg an Monozyten, eosinophilen Granulozyten, pDCs und B-Zellen im ehemaligen Tumorbett	Die FACS-Analyse erfolgte durch Anna-Maria Tiefenthaller unter Betreuung durch Prof. Dr. Kirsten Lauber und unter methodischer Beratung durch Prof. Dr. Udo Gaipl und Paul Rühle. Die statistische Analyse wurde von Prof. Dr. Kirsten Lauber unter statistischer Beratung durch PD Dr. Steffen Unkel durchgeführt.
Abb. 9: Lokale Bestrahlung mit hohen Einzeldosen induziert am zweiten Tag nach Therapie einen signifikanten Monozyten-Anstieg im peripheren Blut	

Abb. 10: In nicht-malignem Brustgewebe erfolgt durch Bestrahlung mit hohen Einzeldosen eine Seneszenz-Induktion und Seneszenz-assoziierte Zytokinveränderungen entsprechen rekrutierten Immunzell-Populationen in der Wundflüssigkeit	
Abb. 11: Zytokin-zu-Zytokin-Korrelationsanalysen identifizieren drei Zytokin-Cluster, die über verschiedene Transkriptionsfaktor-Netzwerke gesteuert werden	Kultivierung und Bestrahlung der primären Zellen sowie die FACS-Analyse erfolgten durch MSc. Nikko Brix. Multiplex-ELISA aus primären Zellen und Wundflüssigkeitsproben erfolgten in Zusammenarbeit von Dr. Roman Hennel, MSc. Nikko Brix, MSc. Heike Anders und Anna-Maria Tiefenthaller, die statistische Analyse von Prof. Dr. Kirsten Lauber unter Beratung durch PD Dr. Steffen Unkel.
Abb. 12: RNA-Sequenzierungsdaten zeigen in Immunzellen aus IORT-Wundflüssigkeiten eine Anreicherung von Gensets, die mit NFkB, JAK-STAT- und TGF-β-Signalwegen assoziiert sind, sowie mit Hypoxie	
Abb. 13: IORT-Wundflüssigkeits-Leukozyten zeigen eine Anreicherung von inflammatorischen Gensets auf Transkriptom-Ebene	Die Vorbereitung des Biomaterials und die Immunzellpräparationen wurden von Anna-Maria Tiefenthaller durchgeführt, die RNA-Extraktion durch MSc. Nikko Brix. Die Sequenzierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe für Zytogenetik am HMGU Neuherberg unter der Leitung von Prof. Dr. Horst Zitzelsberger ( <i>Library-Preparation</i> ) und der Firma Novogene (Sequenzierung), die Prozessierung der Daten erfolgte durch PD Dr. Kristian Unger (HMGU Neuherberg).
Abb. 14: Detaildarstellung angereicherter Gensets	
Abb. 15: Immunzell-Rekrutierung und immunologische Effekte nach Strahlentherapie.	Die Darstellung erfolgte durch Anna-Maria Tiefenthaller.

## **13. Danksagung**

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. Kirsten Lauber, für die herausragende wissenschaftliche Betreuung, die interessanten Diskussionen, ihr stets offenes Ohr und nicht zuletzt für die Motivation und Freude, die sie mir durch ihre Faszination an der Wissenschaft weitergeben konnte, bedanken.

Zudem gilt mein großer Dank Herrn Prof. Dr. Claus Belka für die Möglichkeit, die Dissertation in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie durchführen zu dürfen und für die wertschätzende Unterstützung im Rahmen des Projekts.

Ein außerordentlicher Dank gilt meinen klinischen Betreuerinnen, Frau OÄ Dr. Heike Scheithauer und Frau OÄ Dr. Montserrat Pazos Escudero für ihr großes Engagement um dieses Projekt und ihre verlässliche Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und in klinischen sowie organisatorischen Fragen. Auf Seiten der Gynäkologie möchte ich mich stellvertretend für das in die Studie involvierte ärztliche Team ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Nadia Harbeck und PD Dr. Bernd Kost bedanken. Ein großes Danke gilt überdies allen Mitarbeiter\*innen der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie sowie der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des LMU Klinikums für ihre Mithilfe bei der Rekrutierung der Patientinnen und der Gewinnung des Patientenmaterials. Ganz besonderer Dank gilt hierbei der *Breast-Care-Nurse* Brigitte Ehrl, die mit größtem Engagement und höchster Verlässlichkeit ganz wesentlich zum Gelingen dieser Studie beigetragen hat.

Bei der Heuer-Stiftung möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bedanken, beim Graduiertenprogramm *iTarget* für die Weiterbildungsmöglichkeiten und den wissenschaftlichen Austausch im Rahmen diverser Seminare.

Meinen Kolleg\*innen aus der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie möchte ich für die Demonstration von Methoden und der wissenschaftlichen Arbeit, für die verlässliche und unkomplizierte Mit- und Zusammenarbeit, ihre Unterstützung bei Fragen aller Art und die vielen schönen und humorvollen gemeinsamen Stunden danken. Vorrangig möchte ich Nikko, Roman und Heike für die unkomplizierte und wertvolle Zusammenarbeit und die freundliche Genehmigung der Darstellung von Daten in dieser Arbeit danken. Ein herzlicher Dank gilt weiters den Kolleginnen des Studienbüros, Ulrike Pflugradt und Claudia Baur, für die Mitbetreuung der Studie. Dem Team der Abteilung für Zytogenetik des HMGU Neuherberg unter der Leitung von Prof. Dr. Horst Zitzelsberger danke ich für die gute Zusammenarbeit, Prof. Dr. Udo Gaapl und Dr. Paul Rühle für die methodische und PD Dr. Steffen Unkel für die statistische Beratung.

Nicht zuletzt möchte ich mich aufrichtig bei allen Patientinnen bedanken, die mit ihrer freiwilligen Teilnahme diese Studie überhaupt erst ermöglicht haben und ihnen alles Gute und rasche Genesung wünschen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und Konstantin für ihre außerordentlich wertvolle Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion.

## **14. Affidavit**

Tiefenthaller, Anna-Maria

Ich, Anna-Maria Tiefenthaller, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

*Charakterisierung lokaler und systemischer immunologischer Effekte nach intra-operativer Strahlentherapie des Mammakarzinoms*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, am 27.01.2023

Anna-Maria Tiefenthaller

## 15. Publikationsliste

Nussbaum C, Haberer A, **Tiefenthaller A**, Januszewska K, Chappell D, Brettner F, Mayer P, Dalla Pozza R, Genzel-Boroviczény O. Perturbation of the microvascular glycocalyx and perfusion in infants after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015.

Brix N, **Tiefenthaller A**, Lauber K (2017) Efferocytosis. In: Schwab M (Ed.) *Encyclopedia of Cancer*, 4<sup>th</sup> edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Brix N, **Tiefenthaller A**, Anders H, Belka C, Lauber K. Abscopal, immunological effects of radiotherapy: Narrowing the gap between clinical and preclinical experiences. *Immunol Rev.* 2017.

Munich Medical Student Science Conference, Vortrag, 2017

Conference on Small Animal Precision Image-guided Radiotherapy, Vortrag, 2022 (Coautor)

Immunofest 2.0, Immunologie-Konferenz der Graduiertenprogramme *iTarget* und *Immutrain*, Poster, 2016

DEGRO, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Abstract, 2017

DeGBS, Tagung der Deutschen Gesellschaft für Strahlenforschung, Poster, 2019

Munich Cancer Retreat, Poster, 2019

DEGRO, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Abstract, 2020