

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

**Induktion antitumoraler Immunmechanismen durch Radiotherapie:
In-vitro- und *In-vivo*-Untersuchungen in Modellen des
Mammakarzinoms**

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

vorgelegt von
Julia Maximiliane Krombach
aus München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Kirsten Lauber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Horst Zitzelsberger
Prof. Dr. Simon Rothenfuß
Prof. Dr. Christian Schulz

Mitbetreuung
durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. Roman Hennel

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	1
2	Tabellenverzeichnis	3
3	Abkürzungsverzeichnis	4
4	Einleitung	6
4.1	Brustkrebs und seine Subtypen	6
4.2	Strahlentherapie in der Brustkrebsbehandlung	6
4.4	Anti-Tumor-Immunantwort durch Bestrahlung	8
5	Zielsetzung	13
6	Material	14
6.1	Hersteller	14
6.2	Zelllinien und Kulturmedien	15
6.3	Reagenzien und kommerzielle Kits	16
6.4	Antikörper	17
6.5	Geräte	19
6.6	Software	19
7	Methoden	20
7.1	Primäre Zellen, Zelllinien und Zellkulturüberstände	20
7.1.1	Brustkrebszelllinien.....	20
7.1.1.1	Kultivierung.....	20
7.1.1.2	Bestrahlung und Generierung von Zellkulturüberständen.....	20
7.1.2	Primäre Zellen	21
7.1.2.1	HUVECs.....	21
7.1.2.2	Primäre humane Monozyten und T-Zellen	22
7.1.2.3	Polymorphkernige Leukozyten.....	23
7.1.3	TLR-Reporter-Zelllinien	23
7.1.4	Zellzahl-Bestimmung	23
7.2	<i>Air-Pouch</i>-Modell	24
7.2.1	<i>Air-Pouch</i> -Generierung, -Stimulierung und -Ernte.....	24
7.2.2	HE-Färbung und konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von <i>Air-Pouch</i> - Hautproben.....	25
7.3	Durchflusszytometrie	26
7.3.1	<i>Air-Pouch</i> -infiltrierende Leukozyten-Subpopulationen	26
7.3.2	Oberflächenmarker dendritischer Zellen	28
7.3.3	Phagozytose-Aktivität dendritischer Zellen	28
7.3.4	Allogene gemischte Leukozytenreaktion.....	29

7.4	Immunfluoreszenzmikroskopie	30
7.4.1	Morphologie der Brustkrebszellen unter Bestrahlung.....	30
7.4.2	Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen.....	30
7.5	Quantifizierung der ICAM-1- und E-Selektin-Oberflächenexpression auf Endothelzellen	31
7.6	Flusskammer	31
7.7	Zytokin Multiplex-Assay	32
7.8	HSP70, HMGB1 und S100A8/9 ELISA	32
7.8.1	Bestimmung von HSP70.....	32
7.8.2	Bestimmung von HMGB1	33
7.8.3	Bestimmung von S100A8/A9	34
7.9	Quantitative Echtzeit-PCR	34
7.9.1	RNA-Extraktion und -Quantifizierung	34
7.9.2	Reverse Transkription	35
7.9.3	Quantitative RT-PCR.....	35
7.10	Statistische Analyse	38
8	Ergebnisse	39
8.1	Rekrutierung von Leukozyten <i>in vivo</i>	39
8.2	Endothelzellaktivierung	45
8.3	Differenzierung und Maturierung antigenpräsentierender Zellen	52
8.4	Effektorfunktionen der antigenpräsentierenden Zellen.....	56
9	Diskussion	61
10	Schlussfolgerung	65
11	Zusammenfassung	66
12	Referenzen	67
13	Eigene Publikationen	75
14	Kooperationen und wissenschaftliche Beiträge	76
15	Danksagung	77
16	Lebenslauf	79
17	Eidesstattliche Versicherung	80

1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung einer IORT	7
Abb. 2: Unterschiedliche Zelltodformen nach Bestrahlung	8
Abb. 3: Konzept zur Induktion einer antitumoralen Immunantwort durch ionisierende Bestrahlung	12
Abb. 4: Schematische Darstellung eines <i>Air-Pouch</i> -Experiments	25
Abb. 5: <i>Gating</i> -Strategie für die durchflusszytometrische Identifizierung der Leukozyten-Subpopulationen in der <i>Air-Pouch</i> -Lavage-Flüssigkeit.....	27
Abb. 6: Repräsentative makroskopische Aufnahmen der luminalen Seite von nativen <i>Air-Pouch</i> -Hautproben.....	39
Abb. 7: Paraffinschnitte repräsentativer <i>Air-Pouch</i> -Hautproben	40
Abb. 8: Konfokale Mikroskopiebilder exemplarischer <i>Air-Pouch</i> -Hautproben	41
Abb. 9: Durchflusszytometrische Messung der Dynamik der Leukozytenrekrutierung in das <i>Air-Pouch</i> -Lumen nach Injektion von Überständen bestrahlter HCC1937-Brustkrebszellen	43
Abb. 10: Durchflusszytometrische Messung der Dynamik der Leukozytenrekrutierung in das <i>Air-Pouch</i> -Lumen nach Injektion von Überständen bestrahlter HCC1806-Brustkrebszellen	44
Abb. 11: Messung der mRNA-Expression von Schlüssel-molekülen im <i>Air-Pouch</i> -Mikromilieu mittels <i>realtime</i> qRT-PCR von <i>Air-Pouch</i> -Hautproben.....	45
Abb. 12: Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von Adhäsionsmolekülen auf HUVECs 4 Stunden nach Stimulation mit Überständen bestrahlter HCC1937-, HCC1806- und MDA-MB-436-Brustkrebszellen	46
Abb. 13: Quantifizierung der ICAM-1- und E-Selektin-Oberflächenexpression auf HUVECs nach Stimulation mit Überständen bestrahlter HCC1937-Zellen durch fluorometrische Messung.....	47
Abb. 14: Biochemische Charakterisierung der Moleküle, die die Hochregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selektin beeinflussen	48
Abb. 15: Bestimmung der mRNA-Expressionslevel von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen in HUVECs durch qRT-PCR	49
Abb. 16: Hauptkomponentenanalyse der mRNA-Expressionsdaten von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen in HUVECs	50
Abb. 17: Multiplex-ELISA-Messung der Zytokine und Chemokine, die von HUVECs nach Exposition gegenüber Überständen bestrahlter HCC1937-Zellen freigesetzt wurden	51
Abb. 18: Funktionelle Analyse der Endothelzellaktivierung in einem Flusskammerversuch.....	52
Abb. 19: Differenzierung der aus Monozyten generierten DCs.....	53

Abb. 20: Biochemische Charakterisierung der für die Differenzierung der Monozyten verantwortlichen Moleküle anhand durchflusszytometrischer Messung der CD80-Oberflächenexpression	54
Abb. 21: Maturierung von unreifen DCs unter dem Einfluss der Zellkulturüberstände bestrahlter HCC1937-Zellen	55
Abb. 22: Biochemische Charakterisierung der für die Maturierung der unreifen DCs verantwortlichen Moleküle anhand durchflusszytometrischer Messung der CD80-Oberflächenexpression	55
Abb. 23: Durchflusszytometrische Analyse der Phagozytose von bestrahlten Brustkrebszellen durch DCs	56
Abb. 24: Aktivierung der T-Zell-Proliferation.....	57
Abb. 25: Quantifizierung von Protein-DAMPs in Überständen bestrahlter Brustkrebszellen im ELISA	58
Abb. 26: Hochregulierung der Oberflächenmarkereexpression von Endothelzellen über eine TLR4-Aktivierung durch Überstände bestrahlter Brustkrebszellen.....	59
Abb. 27: Aktivierung von TLR4 (A) und TLR2 (B) durch Überstände bestrahlter Brustkrebszellen in HEK-Blue™-hTLR-Reporter-Zelllinien	60

2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der Hersteller.....	14
Tab. 2: Zelllinien	15
Tab. 3: Medien/ <i>Supplements</i>	15
Tab. 4: Reagenzien und Lösungen	16
Tab. 5: Kommerzielle Kits	17
Tab. 6: Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse humaner Blutzellen.....	17
Tab. 7: Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse muriner Blutzellen.....	18
Tab. 8: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen humaner Zellen	18
Tab. 9: Antikörper für die konfokale Mikroskopie von <i>Air-Pouch</i> -Häuten.....	18
Tab. 10: Geräte	19
Tab. 11: Software	19
Tab. 12: Primersequenzen für murine Zielgene	36
Tab. 13: Primersequenzen für humane Zielgene	37

3 Abkürzungsverzeichnis

APCs	<i>Antigen presenting cells</i> ; antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> ; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
DC	<i>Dendritic cell</i> ; dendritische Zelle
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i> ; Schaden-assoziierte molekulare Muster
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
T:E	<i>Target:effector</i> ; Ziel:Effektor
FCS	<i>Fetal calf serum</i> ; fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> ; Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2/neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i> ; Hitzeschockprotein
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> ; humane Umbilikalvenen-Endothelzellen
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> ; interzelluläres Zelladhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IORT	<i>Intraoperative radiotherapy</i> ; intraoperative Radiotherapie
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6	<i>Lymphocyte antigen 6 complex</i>
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i> ; myeloide Suppressorzelle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex

MLR	<i>Allogeneic mixed leukocyte reaction</i> ; allogene gemischte Leukozytenreaktion
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> ; messenger Ribonukleinsäure
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> ; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphat-buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
PDCA-1	<i>Plasmacytoid dendritic cell antigen-1</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll protein complex</i> ; Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PMNs	<i>Polymorphonuclear leukocytes</i> ; polymorphkernige Leukozyten
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> ; quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation endproducts</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
Siglec	<i>Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin</i>
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
UTP	Uridintriphosphat
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> ; Gefäßzelladhäsionsmolekül 1

4 Einleitung

4.1 Brustkrebs und seine Subtypen

Brustkrebs ist weltweit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen [1]. Jedes Jahr werden in Deutschland über 70.000 neue Fälle gezählt, und ca. 17.000 Patientinnen versterben an dieser Krebserkrankung [2]. Es handelt sich jedoch nicht um eine einheitliche Tumorentität. So können verschiedene Subtypen zum Beispiel nach dem molekularen Status des Tumors eingeteilt werden [1]. Hierbei kann zwischen Hormonrezeptor (Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor)-positivem, *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2/neu)-positivem sowie triple-negativem (histologisch Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor- und HER2/neu-negativ) Brustkrebs unterschieden werden [3]. Unter den invasiven Brustkrebsformen werden um die 15% als triple-negativ eingestuft [4,5]. Dieser Brustkrebstyp wird meist in einem höheren Malignitätsgrad diagnostiziert und tritt vermehrt bei jungen Frauen auf, zudem neigt er zu frühen viszeralen Metastasen [6]. Patientinnen mit triple-negativem Brustkrebs weisen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit distante Rezidive auf und haben eine schlechtere Prognose; das mittlere Überleben einer Patientin mit einem bereits metastasierten Tumor liegt bei nur 13 Monaten [4]. Diese Tumorentität ist wenig bzw. nicht sensitiv für die meisten Therapieoptionen, einschließlich einer HER2-gerichteten Therapie, wie Trastuzumab, oder einer endokrinen Therapie mit Tamoxifen oder Aromatasehemmern [7,8]. Spezifische, molekular zielgerichtete Therapien für den triple-negativen Subtyp sind bisher nicht verfügbar.

4.2 Strahlentherapie in der Brustkrebsbehandlung

Die Strahlentherapie zählt neben der operativen Behandlung und der Chemotherapie zu den Grundpfeilern in der Behandlung von malignen Tumoren. Die Bestrahlung wird dabei in unterschiedlichen Konzepten eingesetzt, z.B. adjuvant, neoadjuvant, kurativ oder palliativ [9].

Generell ist die Strahlentherapie von Brustkrebs von vielen Faktoren abhängig, wie beispielsweise dem *Staging* und *Grading* sowie dem molekularen Status des Tumors [1]. Entsprechend der aktuellen S3-Leitlinie ist eine adjuvante Radiotherapie nach brusterhaltender Operation in Hypo- oder konventioneller Fraktionierung der

strahlentherapeutische Standard bei Brustkrebs [10]. Bei der konventionellen, fraktionierten Bestrahlung werden tägliche Dosen von 1,8 bis 2 Gy in 25 bis 28 Fraktionen über fünf bis sechs Wochen bis zu einer Gesamtdosis von um die 50 Gy appliziert [10,11]. Bei den heutzutage präferierten, hypofraktionierten Behandlungsregimen wird eine Gesamtdosis von um die 40 Gy in ca. 15 bis 16 Fraktionen mit jeweils 2,67 Gy über drei bis fünf Wochen appliziert [10,12]. Demgegenüber gibt es jedoch auch Konzepte mit mehreren Bestrahlungen am Tag (hyperfraktioniert) [13].

Darüber hinaus werden sogenannte ablativ Verfahren angewandt, bei denen hohe Dosierungen von 8 bis 25 Gy bei niedriger kV-Einstellung und mit wenigen Millimeter Eindringtiefe lokal appliziert werden. So können ausgewählte, insbesondere ältere Patientinnen mit einzelnen Tumorherden in frühen Stadien mit der intraoperativen Radiotherapie (engl. *intraoperative radiotherapy*, IORT) behandelt werden. Hierbei wird nach der Tumorresektion das Tumorbett über einen kugelförmigen Applikator mit einer hohen Einmaldosis von um die 20 Gy bestrahlt, wodurch man den Patientinnen die (hypo-) fraktionierte Bestrahlung ersparen kann [14,15] (Abb. 1).

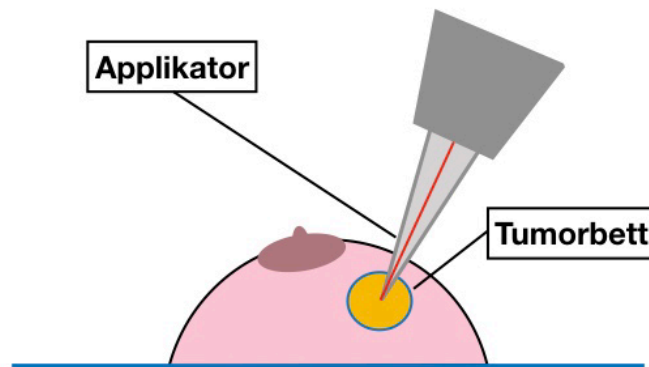


Abb. 1: Schematische Darstellung einer IORT. Bei der IORT werden nach einer Tumorresektion über einen kugelförmigen Applikator, der im Tumorbett eingesetzt wird, die marginalen Resektionsgrenzen bestrahlt.

4.4 Anti-Tumor-Immunantwort durch Bestrahlung

Als Hauptwirkung der Strahlentherapie gilt die direkte Herbeiführung des Tumorzelltodes sowie das Unterbinden des klonogenen Überlebens [16]. Zusätzlich ist es mittlerweile anerkannt, dass komplexe Immunmechanismen zur Tumorkontrolle und damit dem therapeutischen Ergebnis beitragen [17-19]. Diese Immunmechanismen sind essentiell von der Zelltodform abhängig, die durch ionisierende Bestrahlung ausgelöst wird, welche wiederum von der Dosis der Bestrahlung, dem Bestrahlungsregime sowie dem genetischen Repertoire der bestrahlten Zellen bestimmt wird. In der Regel kann davon ausgegangen werden, dass die Nekrose einen immunogeneren Zelltod als andere Zelltodformen (u.a. Apoptose) darstellt [18,20]. In triple-negativen Brustkrebszelllinien (histologisch negativ für den Östrogen-, Progesteron-, sowie HER2/neu-Rezeptor), wie den HCC1937-Zellen, konnte bei höherer Dosierung der Bestrahlung mehr Nekrose beobachtet werden (Abb. 2).

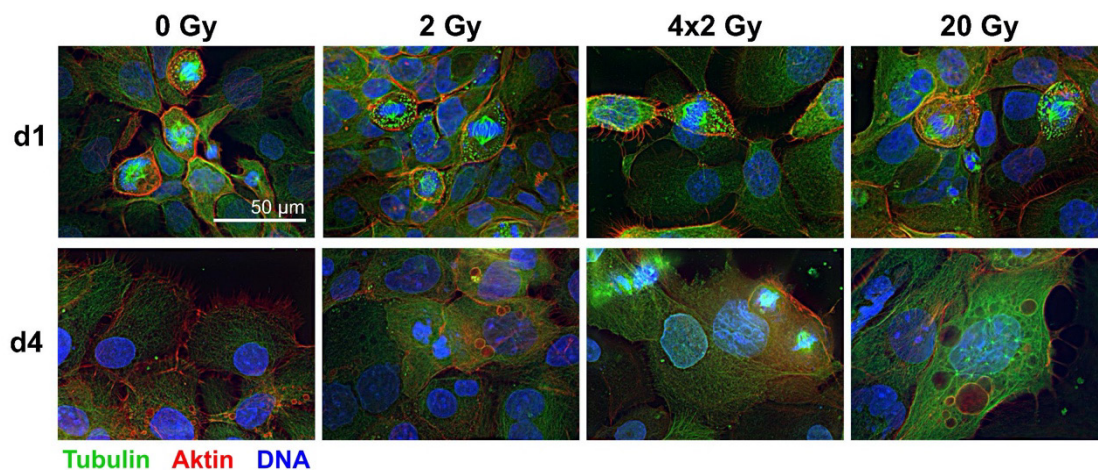


Abb. 2: Unterschiedliche Zelltodformen nach Bestrahlung. Immunfluoreszenzaufnahmen von HCC1937-Zellen an Tag 1 und 4 nach Bestrahlung mit 0, 2, 4x2 oder 20 Gy. Immunfluoreszenzfärbung von Tubulin (grün), Aktin (rot) und DNA (blau), 63-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 50 µm (entnommen und modifiziert aus [21]).

Die Aufnahme von apoptotischen Zellen durch professionelle und nicht-professionelle Phagozyten geschieht meist immunologisch unauffällig oder sogar antiinflammatorisch und induziert bei Monozyten die Produktion von antiinflammatorischen Mediatoren einschließlich Interleukin (IL)-10, *transforming growth factor* β und Prostaglandin E_2 [22]. Diese Zytokine begünstigen die Rekrutierung und Maturierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) sowie von myeloiden

Suppressorzellen (engl. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) und erzeugen dadurch ein immunologisch tolerogenes Milieu. Wird apoptotisches Material von dendritischen Zellen (engl. *dendritic cells*, DCs) aufgenommen und T-Zellen präsentiert, resultiert dies in der Induktion von Immuntoleranz [23].

Im Gegensatz dazu setzen primär und sekundär nekrotische Zellen Gefahrensignale und so genannte Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs) frei, einschließlich *High-Mobility-Group*-Protein B1 (HMGB1), Hitzeschockproteine (engl. *heat shock proteins*, HSPs), S100 Proteine, Nukleotide (Adenosintriphosphat (ATP) und Uridintriphosphat (UTP)) sowie Natriumurat-Kristalle. Diese DAMPs können eine Immunantwort auslösen, indem sie im Tumormikromilieu die Aufnahme von sterbenden Zellen durch aktiv dorthin rekrutierte antigenpräsentierende Zellen (APCs) stimulieren, die Reifung der APCs und deren *Homing* zu den Lymphknoten fördern sowie die Aktivierung von naiven *Cluster of Differentiation* (CD)4⁺ und CD8⁺ T-Zellen über die (Kreuz-) Präsentation von Tumorantigenen durch APCs verstärken [18,24-29]. Somit kann durch den durch lokale Bestrahlung ausgelösten nekrotischen Zelltod und die damit verbundene DAMP-Freisetzung eine systemische Anti-Tumor-Immunantwort ausgelöst werden. In Folge dieser Steigerung der Immunogenität des Tumorgewebes fungiert das bestrahlte Gewebe sozusagen als "In-situ-Vakzin" [30]. Bei diesen sogenannten abskopalen oder *Out-of-field*-Effekten wurden jedoch große Unterschiede je nach Bestrahlungsregime und angewandtem Modell berichtet [27,31-33]. Die konventionellen Bestrahlungsfractionen mit täglichen Dosen von 1,8 bis 2 Gy scheinen allein jedoch keine ausreichende Anti-Tumor-Immunantwort auszulösen [34].

Ein initialer und essentieller Schritt bei der Stimulation einer systemischen Anti-Tumor-Immunantwort ist die intratumorale Rekrutierung von APCs. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ablativ bestrahlte Brustkrebszellen durch die Freisetzung von Nukleotiden effizient Monozyten anlocken können. Die Freisetzung von Nukleotiden korrelierte mit der Induktion von primärer Nekrose und trat insbesondere nach ablativer, nicht nach fraktionierter Bestrahlung auf. Dies lässt vermuten, dass die Zelltodform, die durch Bestrahlung ausgelöst wird, die Monozytenrekrutierung nach Bestrahlung beeinflusst [35]. Auch in *In-vivo*-Studien mit heterotop transplantierten murinen B16-Melanom- und MC38-Kolonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass nur eine ablative Bestrahlung mit hohen

Einzel Dosen die Infiltration von APCs in das bestrahlte Tumorgewebe bewirken kann. Diese APCs stammen von inflammatorischen Monozyten aus dem peripheren Blut ($CD45^+$, $CD11b^+$, $Gr-1^{hi}$) und differenzieren zu verschiedenen Subpopulationen, die Makrophagen und DCs ähneln, wie anhand der unterschiedlichen Expressionslevel von CD11b, CD11c und F4/80 gezeigt werden konnte [36, 37].

Bei der Rekrutierung von APCs spielen Endothelzellen und deren Aktivierung eine entscheidende Rolle, da Leukozyten über die Endothelzellen aus den Blutgefäßen zum Ort der Infektion oder des Zellschadens migrieren müssen. Im Rahmen der Adhäsionskaskade der Leukozyten werden verschiedene Schritte, u.a. das Binden und Rollen der Leukozyten, die feste Adhäsion, das *Crawling* und die Transmigration unterschieden, zu denen jeweils verschiedene Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen und den Leukozyten beitragen. Dazu zählen unter anderem P-Selektin, E-Selektin, die interzellulären Zelladhäsionsmoleküle (engl. *intercellular adhesion molecules*) ICAM-1 und ICAM-2 sowie das Gefäßzelladhäsionsmolekül 1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1) auf den Endothelzellen und L-Selektin, P-Selektin-Glykoprotein 1, E-Selektin-Ligand 1, CD44, Makrophagen-Rezeptor 1 und Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen 1 auf den Leukozyten [38-43]. Neben den Adhäsionsmolekülen benötigt es für die Rekrutierung von Leukozyten bestimmte Chemokine, die von aktivierten Endothelzellen freigesetzt bzw. an ihrer Oberfläche exprimiert werden und einen chemotaktischen Effekt auf Leukozyten ausüben. Hierzu zählen beispielsweise IL-8 und CXCL-1 sowie *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1, MCP-2 und MCP-3 [44,45].

Durch den strahlungsinduzierten Gewebeschaden wird zytosolische Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) freigesetzt, durch die der cGAS/STING-Signalweg stimuliert wird [46,47]. Dieser setzt wiederum eine Typ-I-Interferon-Kaskade in Gang, in deren Folge intratumorale Typ I-Interferone die Aktivierung, Maturierung und das Lymphknoten-*Homing* der APCs unterstützen [36,48-51]. Der Aktivierungs- und Maturierungsprozess von APCs ist durch die Hochregulierung verschiedener Oberflächenmarker charakterisiert. Dazu gehören unter anderem der Maturierungsmarker CD83 und die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 sowie der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) Klasse II Rezeptor [52]. Auf maturierten APCs wird darüber hinaus verstärkt der Rezeptor CCR7 exprimiert. Dieser Rezeptor ist

essentiell daran beteiligt, dass sowohl APCs wie auch T- und B- Lymphozyten zum drainierenden Lymphknoten geleitet werden [44,53].

Die Typ I-Interferone fördern im Anschluss ebenfalls die Antigen-Kreuzpräsentation und führen somit zu einem effizienten *Priming* von CD8⁺ T-Zellen durch APCs in den drainierenden Lymphknoten des Tumors [36,48-51]. Die aktivierten, Typ II-Interferon (IFN- γ) produzierenden CD8⁺ T-Zellen wandern wiederum zum Tumor und töten Tumorzellen ab, während CD4⁺ T-Zellen diesbezüglich von geringerer Relevanz zu sein scheinen [37,48-50,54,55]. Jedoch wird durch Strahlentherapie auch die Proliferation von Tregs stimuliert, einer T-Zell-Subpopulation, die eine Schlüsselrolle in der Toleranzinduktion gegenüber dem Tumor spielt [56]. Insgesamt hat die Interferon-Kaskade einen essentiellen Einfluss auf die angeborenen und adaptiven Anti-Tumor-Immunmechanismen, die wesentlich zu der lokalen und systemischen Tumorkontrolle beitragen. Typ I- und Typ II-Interferone haben hierbei jedoch unterschiedliche Funktionen inne: Während die Typ I-Interferone IFN- α und - β insbesondere Zellen des Immunsystems (DCs, Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen) beeinflussen, wirkt der einzige Vertreter der Typ II-Interferone, INF- γ , vor allem auf Tumorzellen und Zellen des Tumormikromilieus ein. Hierzu zählen die Inhibition der Tumorzellproliferation, die Verstärkung der Tumorimmunogenität durch vermehrte Präsentation von MHC Klasse I-Liganden und die Zunahme der Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Tumorgefäßen [36,37,55,57].

Die Immunogenität von sterbenden Krebszellen zu verstärken ist ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung von malignen Tumoren, da eine adaptive Anti-Tumor-Immunantwort nicht nur die Zellen des bestrahlten Primärtumors bekämpfen könnte, sondern auch Tumorherde und distante Metastasen außerhalb des Bestrahlungsfelds (Abb. 3). Die selektive Herbeiführung einer immunogenen Zelltodform, die von der Präsentation und Freisetzung von DAMPs begleitet wird, ist hierfür ein vielversprechender Ansatz. Präklinische Studien zeigen, dass konventionelle, fraktionierte Bestrahlung diese Zelltodformen nur begrenzt auslösen kann [35]. Untersuchungen in verschiedenen Maus-Tumormodellen haben gezeigt, dass durch Strahlentherapie ausgelöste Immunreaktionen, die wesentlich von Typ I und Typ II Interferonen, APCs und zytotoxischen T-Zellen abhängig sind, präferenziell durch hohe Einzeldosen (10-20 Gy) induziert werden, nicht jedoch durch fraktionierte Bestrahlungsprotokolle [18,36,37,48-50,54,55,58]. Diese

Ergebnisse machen die Suche nach alternativen Bestrahlungsregimen zu einem relevanten Forschungsfeld.

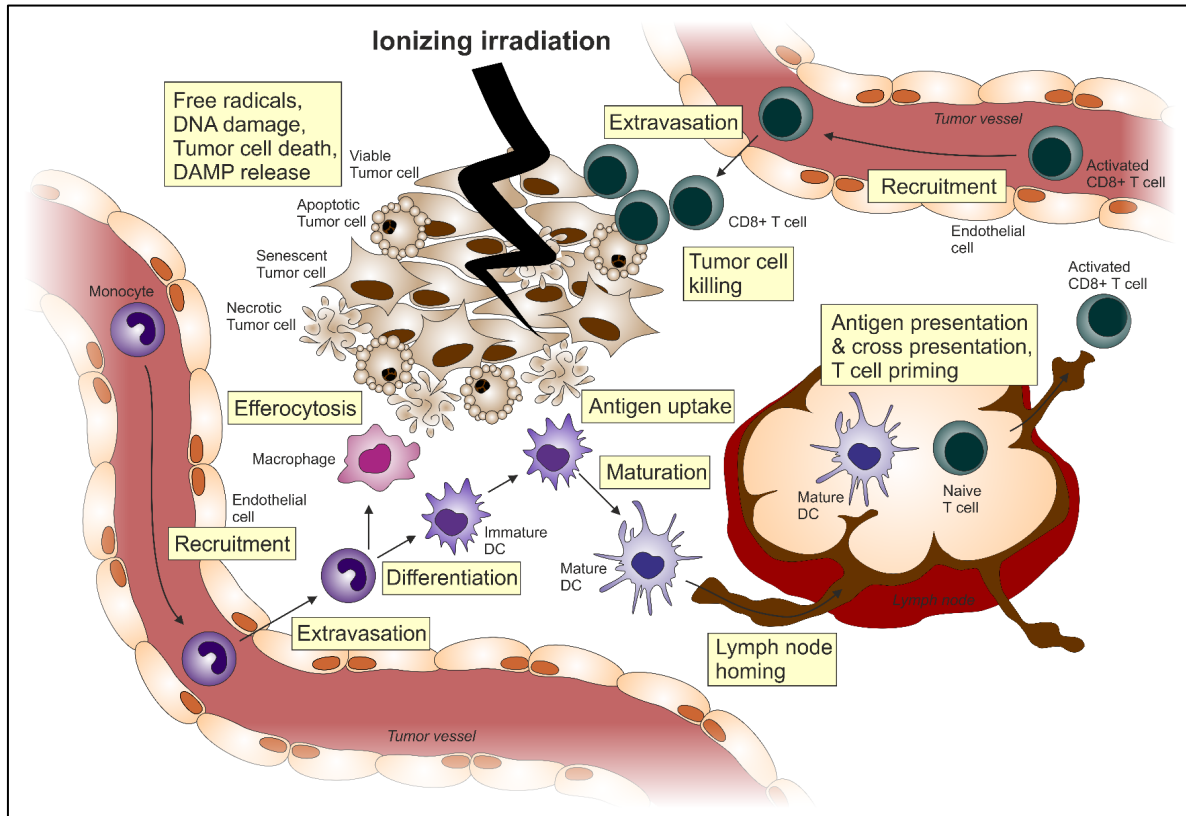


Abb. 3: Konzept zur Induktion einer antitumoralen Immunantwort durch ionisierende Bestrahlung. Um eine Immunantwort auszulösen, muss eine immunogene Form des Zelltodes induziert werden, bei der DAMPs freigesetzt werden. Diese kann insbesondere durch ablative, ionisierende Bestrahlung hervorgerufen werden. Die freigesetzten DAMPs können über eine Aktivierung der nahegelegenen Endothelzellen eine Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut in das Tumorbett anregen. Die rekrutierten Monozyten müssen sich, ebenfalls unter dem Einfluss der DAMPs, zu APCs differenzieren und Tumorantigene aufnehmen. Diese APCs müssen wiederum zu den tumordrainierenden Lymphknoten wandern und dort die Tumorantigene zu Lymphozyten (kreuz-)präsentieren. T-Zellen werden hierdurch aktiviert und proliferieren. Nach der Emigration aus den Lymphknoten können die aktivierten T-Zellen spezifisch Tumorzellen erkennen und abtöten, sowohl im ehemaligen Tumorbett wie auch in Metastasen (entnommen aus [59]).

5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die initialen Schritte einer strahlungsinduzierten Anti-Tumor-Immunantwort zu charakterisieren, mit besonderem Fokus auf der Aktivierung von Endothelzellen sowie der Rekrutierung und Differenzierung von APCs im Kontext von verschiedenen Bestrahlungsregimen.

Als Modellsystem wurden triple-negative Brustkrebszelllinien (histologisch negativ für den Östrogen-, Progesteron-, sowie HER2/neu-Rezeptor) gewählt, da dieser Brustkrebssubtyp mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert ist. Für diesen Subtyp ist derzeit keine gezielte Krebstherapie verfügbar und aufgrund früher und ausgedehnter Metastasierung könnten Patientinnen mit triple-negativem Brustkrebs von einer Anti-Tumor-Immunantwort, die durch Bestrahlung ausgelöst wird, erheblich profitieren [60]. Kulturüberstände von Brustkrebszellen, die mit einer Einzeldosis von 2 Gy, fraktioniert mit täglich 2 Gy, oder einer ablativen Einzeldosis von 20 Gy bestrahlt wurden, wurden auf ihre Effekte auf die Endothelzellaktivierung sowie die Rekrutierung und Differenzierung von APCs in unterschiedlichen *In-vitro*- und *In-vivo*-Ansätzen untersucht.

6 Material

6.1 Hersteller

Tabelle 1. Liste der Hersteller

Hersteller	Standort
ATCC	Manassas, VA, USA
BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Biochrom	Berlin, Deutschland
BioLegend	Koblenz, Deutschland
Bio-Rad	München, Deutschland
BioTek Instruments GmbH	Bad Friedrichshall, Deutschland
CLS	Heidelberg, Deutschland
Corning	München, Deutschland
DSMZ	Braunschweig, Deutschland
eBioscience	San Diego, CA, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fermentas	St. Leon-Roth, Deutschland
Glaswarenfabrik Karl Hecht	Sondheim, Deutschland
Greiner BIO-ONE	Kremsmünster, Österreich
Ibidi	Martinsried, Deutschland
IBL International	Hamburg, Deutschland
InvivoGen	Toulouse, Frankreich
Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
Lonza	Basel, Schweiz
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
MicroCal	Northampton, MA, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
New England Biolabs	Frankfurt, Deutschland
PromoCell	Heidelberg, Deutschland
Ratiopharm	Ulm, Deutschland
R&D Systems	Heidelberg, Deutschland
Roche Applied Science	Penzberg, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Tree Star Inc.	Ashland, OR, USA
Xstrahl	Camberley, Großbritannien
Zeiss	Göttingen, Deutschland

6.2 Zelllinien und Kulturmedien

Tabelle 2. Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Hersteller
HCC1806	Humane Brustkrebszelllinie	ATCC
HCC1937	Humane Brustkrebszelllinie	ATCC
MDA-MB-436	Humane Brustkrebszelllinie	CLS
HEK-Blue™ hTLR2	TLR2-Reporterzelllinie	InvivoGen
HEK-Blue™ hTLR4	TLR4-Reporterzelllinie	InvivoGen
HUVECs	Primäre humane Endothelzellen aus der Nabelschnur	PromoCell

Tabelle 3. Medien/Supplements

Medium/Supplement	Hersteller
DetachKit	PromoCell
DMEM	Thermo Fisher Scientific
DMEM/F12 1:1	Thermo Fisher Scientific
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell
FCS	Thermo Fisher Scientific
HBSS	Thermo Fisher Scientific
HEK-Blue™ detection medium	InvivoGen
HEPES	Thermo Fisher Scientific
Human AB-serum	Sigma-Aldrich
PBS	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific
PermaFluor Eindeckmedium	Thermo Fisher Scientific
RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific
Supplement Mix	PromoCell
Trypsin/EDTA	Thermo Fisher Scientific
X-Vivo-15	Lonza

6.3 Reagenzien und kommerzielle Kits

Tabelle 4. Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller
Biocoll Separating Solution (1.077 g/ml)	Biochrom
BSA	Sigma-Aldrich
Anti-CD3 magnetic beads	Miltenyi
Anti-CD14 magnetic beads	Miltenyi
CFSE	Thermo Fisher Scientific
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich
Diluent C	Sigma-Aldrich
dNTPs	Fermentas
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck
FACS-Färbepuffer	BD Biosciences
Fluoromount	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Merck
FSL-1	InvivoGen
Glycoblue	Thermo Fisher Scientific
GM-CSF	R&D Systems
Heparin-Natrium 5000	Ratiopharm
HEPES	Sigma-Aldrich
Hoechst-33342	Sigma-Aldrich
IL-4	R&D Systems
Isopropanol	Merck
LPS	Sigma-Aldrich
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
Oligo(dT) ₁₈	Fermentas
Phalloidin-Alexa Fluor568	Thermo Fisher Scientific
PKH26	Sigma-Aldrich
PKH67	Sigma-Aldrich
Proteinase K	New England Biolabs
Random hexamers	Fermentas
Revert Aid H Minus M-MuLV reverse transcriptase	Fermentas
Ribolock RNase inhibitor	Fermentas
RS-LPS ultrapure	InvivoGen
TNF	R&D Systems
Triton-X 100	Sigma-Aldrich

Tabelle 5. Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
Bio-Plex Pro Human Chemokine Assay (40-Plex Panel)	Bio-Rad
HSP70 DuoSet® IC ELISA	R&D Systems
HMGB1-ELISA	IBL International
NucleoSpin® RNA kit II	Macherey-Nagel
TMB Peroxidase EIA Substrate Kit	Bio-Rad
MycoAlert™	Lonza

6.4 Antikörper

Tabelle 6. Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse humaner Blutzellen

Antikörper	Farbe	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
CD3	PE-Cy7	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:50
CD4	PE	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:25
CD8	APC	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:25
CD40	PE-Cy5	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:25
CD80	PE	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:25
CD83	PE-Cy7	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:100
CD86	Alexa Fluor700	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:100
HLA-DR	PerCP-Cy5.5	Mouse IgG2a, κ	BD Biosciences	1:25
Isotyp IgG1	Alexa Fluor700	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:25
Isotyp IgG1	APC	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:25
Isotyp IgG1	FITC	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:25
Isotyp IgG1	PE	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:25
Isotyp IgG1	PE-Cy7	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:50/1:100
Isotyp IgG1	PE-Cy5	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:25
Isotyp IgG2	PerCP-Cy5.5	Mouse IgG2a, κ	BD Biosciences	1:25

Tabelle 7. Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse muriner Blutzellen

Antikörper	Farbe	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
CD11b	FITC	Ratte IgG2b, κ	eBioscience	1:100
CD11c	PerCP-Cy5.5	Arm Ham IgG	eBioscience	1:100
CD45	APC-Cy7	Ratte IgG2b, κ	BD Biosciences	1:100
F4/80	eFluor450	Ratte IgG2a, κ	eBioscience	1:100
H-2	Alexa Fluor700	Ratte IgG2b, κ	eBioscience	1:100
Ly6C	PE-Cy7	Ratte IgM	BD Biosciences	1:100
Ly6G	BUV395	Ratte IgG2a, κ	BD Biosciences	1:100
PDCA-1	APC	Ratte IgG2b, κ	eBioscience	1:100
Siglec-H	PE	Ratte IgG2b, κ	eBioscience	1:100
Isotyp IgG	PerCP-Cy5.5	Arm Ham IgG	eBioscience	1:100
Isotyp IgG2a	BUV395	Ratte IgG2a, κ	BD Biosciences	1:100
Isotyp IgG2a	eFluor450	Ratte IgG2a, κ	eBioscience	1:100
Isotyp IgG2b	Alexa Fluor700	Ratte IgG2b, κ	eBioscience	1:100
Isotyp IgG2b	APC	Ratte IgG2b, κ	eBioscience	1:100
Isotyp IgG2b	APC-Cy7	Ratte IgG2b, κ	BD Biosciences	1:100
Isotyp IgG2b	FITC	Ratte IgG2b, κ	eBioscience	1:100
Isotyp IgG2b	PE	Ratte IgG2b, κ	eBioscience	1:100
Isotyp IgM	PE-Cy7	Ratte IgM	BD Biosciences	1:100

Tabelle 8. Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen humaner Zellen

Antikörper	Farbe	Isotyp	Reaktivität	Hersteller	Verdünnung
E-Selektin	PE	Maus IgG1, κ	Human	BD Biosciences	1:25
ICAM-1	PE	Maus IgG1, κ	Human	BD Biosciences	1:25
VCAM-1	PE	Maus IgG1, κ	Human	BD Biosciences	1:25

Tabelle 9. Antikörper für die konfokale Mikroskopie von *Air-Pouch*-Häuten

Antikörper	Farbe	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
CD31 (PECAM-1)	Alexa Fluor647	Ratte IgG2a, κ	BioLegend	1:100
F4/80	Alexa Fluor488	Ratte IgG2a, κ	Thermo Fisher Scientific	1:100
Ly6G	-	Ratte IgG2a, κ	BioLegend	1:100
Anti-Ratte IgG	Alexa Fluor546	Ziege IgG	Thermo Fisher Scientific	1:400

6.5 Geräte

Tabelle 10. Geräte

Gerät	Hersteller
AxioObserver Z1 inverted microscope	Zeiss
Bio-Plex 200	Bio-Rad
LC480 qPCR cycler	Roche Applied Science
Leica TCS SP5 Confocal microscope	Leica Microsystems
LSR II flow cytometer	BD Biosciences
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
RS225 X-Ray research irradiator	Xstrahl
Synergy Mx fluorescence reader	BioTek Instruments GmbH
Thermomix comfort	Eppendorf

6.6 Software

Tabelle 11. Software

Software	Version	Hersteller
FACSDiva	6.1.3	BD Biosciences
FlowJo	7.6.3	Tree Star Inc.
Chemotaxis and Migration Tool	2.0	ibidi
Origin	9.1	MicroCal

7 Methoden

7.1 Primäre Zellen, Zelllinien und Zellkulturüberstände

7.1.1 Brustkrebszelllinien

7.1.1.1 Kultivierung

HCC1806- und HCC1937-Zellen wurden bei 37°C und wasserdampfgesättigter Luft mit 5% CO₂-Gehalt in RPMI-1640 Medium kultiviert, das mit 10% Hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) Puffer versetzt war. MDA-MB-436 Zellen wurden in DMEM/F12 Medium bei 37°C und 7,5% CO₂ kultiviert, das mit 10% FCS, 100 U/ml und 0,1 mg/ml Streptomycin versetzt war. Für die Subkultivierung und das Aussäen für Experimente wurden die Zellen in phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) gewaschen und bei 37°C trypsinisiert, bis eine Einzelzellsuspension erreicht wurde. Der Trypsinierungsprozess wurde durch Zugabe von serumhaltigem Zellkulturmedium im Überschuss zu der Zellsuspension gestoppt. Die Zellen wurden gesammelt und bei 314 g für 5 Minuten pelletiert. Die Überstände wurden entfernt, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen subkultiviert oder für Experimente genutzt. Die Zelllinien-Authentifizierung erfolgte durch Mikrosatelliten-Typisierung (dieser Dienst wurde vom Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig zur Verfügung gestellt). Die Abwesenheit von Mykoplasmen-Kontaminationen wurde regelmäßig mithilfe des MycoAlert™ *Detection Kit* überprüft.

7.1.1.2 Bestrahlung und Generierung von Zellkulturüberständen

HCC1806-, HCC1937- und MDA-MB-436-Zellen wurden in 6-well Platten in RPMI-1640- beziehungsweise DMEM/F12-Medium mit 10% FCS ausgesät (0,5-1x10⁶ Zellen/well) und Zelladhäsion über Nacht ermöglicht. Kurz vor der Bestrahlung wurde das Kulturmedium durch 2,5%-FCS-haltiges Medium ersetzt. Die Bestrahlung wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten mit einem RS225 Röntgenstrahlungskabinett unter Verwendung eines Thoräus-Filters (0,38 mm Zinn, 0,23 mm Kupfer, 0,99 mm Aluminium) bei 200 kV und 10 mA (1 Gy in 63 sec) durchgeführt. Es wurden eine Einzeldosis von 2 Gy, im fraktionierten *Setting* tägliche Dosen von 2 Gy in Abständen

von 24 Stunden für vier Tage, eine ablative Einzeldosis von 20 Gy oder eine Scheinbestrahlung mit 0 Gy appliziert. Vier Tage nach Bestrahlung wurden die Kulturüberstände geerntet, durch Zentrifugation bei 10.000 g für 5 Minuten bei 4°C von Zellen und Zellbruchstücken befreit und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Für Experimente wurden die Überstände in einem Thermoschüttler bei 30°C und 1400 rpm für 10 Minuten aufgetaut.

Für die biochemische Charakterisierung wurde mit Überständen bestrahlter HCC1937-Zellen eine Größenausschlusszentrifugation in VivaSpin2-Röhrchen mit einer Porengröße (*molecular weight cut-off*) von 10 kDa durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurden für die Experimente beide Fraktionen ober- und unterhalb der Membran, d.h. molekulares Gewicht größer bzw. kleiner 10 kDa, wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Alternativ wurden die Überstände für 30 Minuten bei 37°C mit 20 ng/ml Proteinase K verdaut. Als Kontrolle diente Proteinase K, die zuvor bei 95° C für 50 Minuten hitzeinaktiviert wurde.

7.1.2 Primäre Zellen

7.1.2.1 HUVECs

Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (engl. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) wurden in *Full Endothelial Growth Medium*, bestehend aus *Endothelial Cell Growth Medium* und *SupplementMix*, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Subkultivierung und das Aussäen für Experimente wurden wie bei den Brustkrebszelllinien durchgeführt. Allerdings wurde für die Ablösung ein spezieller *DetachKit* verwendet, der HEPES-gepufferte Kochsalzlösung, Trypsin/ Ethylen-diamintetraacetat (EDTA) und Trypsininhibitor-Lösung enthält. Vor der Trypsinierung wurden die HUVECs in HEPES-gepuffertter Kochsalzlösung gewaschen. Der Trypsinierungsprozess wurde durch Zugabe der Trypsininhibitor-Lösung zu der Zellsuspension gestoppt und die HUVECs bei 220 g für 3 Minuten abzentrifugiert.

Die Stimulierung der HUVECs wurde über vier Stunden mit zellfreien, 1:2 in *Full Endothelial Growth Medium* verdünnten Überständen von bestrahlten HCC1937-, HCC1806- oder MDA-MB-436-Zellen durchgeführt. Für die Zytokin-Analysen wurde das Medium nach 4 Stunden Inkubation auf den HUVECs durch reines *Full*

Endothelial Growth Medium ersetzt, um sicherzustellen, dass HUVECs und nicht Brustkrebszellen die Quelle der sezernierten Zytokine sind. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden die HUVEC-Überstände für die Zytokin-Messungen isoliert. *Full Endothelial Growth Medium* mit 50 ng/ml Tumornekrosefaktor (TNF) diente als Positivkontrolle. Zur Blockade der *Toll-like-Rezeptor* (TLR) 4-Aktivierung wurden 10 µg/ml Lipopolysaccharid des *R. sphaeroides* (RS-LPS) in *Full Endothelial Growth Medium* verwendet.

7.1.2.2 Primäre humane Monozyten und T-Zellen

Primäre humane Monozyten und T-Zellen des peripheren Blutes wurden durch Positivselektion von CD14⁺ (Monozyten) bzw. CD3⁺ (T Zellen) Zellen aus heparinisiertem Blut gesunder Spender isoliert. Hierfür wurde zunächst zur Auftrennung der zellulären Blutbestandteile eine Dichtezentrifugation durchgeführt, indem eine Biocoll-Trennlösung (Biocoll-Dichte 1,077 g/ml) mit dem heparinisierten Blut überschichtet und für 20 min bei 787 g ohne Bremse zentrifugiert wurde. Daraufhin wurde die Zellschicht der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) von der Biocoll-Trennlösung abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Die PBMCs wurden auf eine Konzentration von 10⁸ Zellen/ml in eiskaltem MACS-Puffer mit 0,5% bovinem Serumalbumin (BSA) resuspendiert und mit anti-CD14- oder anti-CD3-beschichteten, magnetischen *Beads* (200 µl *Beads* pro 10⁸ Zellen) für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in BSA-MACS-Puffer gewaschen und auf eine vorgespülte MACS-Säule in das magnetische Feld eines MACS-Separators gegeben. Nach drei Waschschritten mit eiskaltem BSA-MACS-Puffer wurde die MACS-Säule aus dem magnetischen Feld entnommen und die CD14⁺ bzw. CD3⁺ Zellen wurden mit BSA-MACS-Puffer in ein Glasröhrchen eluiert. Die eluierten Zellen wurden in X-Vivo-15-Medium gewaschen, gezählt und für weitere Experimente verwendet.

Die CD14⁺ Monozyten wurden mit 40 ng/ml IL-4 und 20 ng/ml Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) in X-Vivo-15-Medium, angereichert mit 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 10% autologem Serum, für mindestens 5 Tage (5-7 Tage) zu DCs differenziert. IL-4 und GM-CSF wurden nach drei Tagen erneuert.

7.1.2.3 Polymorphkernige Leukozyten

Zur Isolierung polymorphkerniger Leukozyten (engl. *polymorphonuclear leukocytes*, PMNs) wurde heparinisiertes Blut gesunder Spender über einen Biocoll-Dichtegradienten bei 1200 g und Raumtemperatur für 20 Minuten zentrifugiert, das resultierende Erythrozyten-PMNs-Pellet abgenommen und zweimal in PBS gewaschen. Die PMNs wurden durch siebenminütige Lyse der Erythrozyten mit einem hypotonen Puffer (0.15 M NH₄Cl, 0.01 M NaHCO₃, 0.001 M EDTA in H₂O) isoliert. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die frisch isolierten PMNs für Flusskammerexperimente verwendet [61].

7.1.3 TLR-Reporter-Zelllinien

HEK-Blue™ hTLR2- und HEK-Blue™ hTLR4-Zellen wurden in *HEK-Blue™ detection medium* in 96-well Platten ausgesät (50.000 Zellen/well), die zuvor mit 20 µl der Kulturüberstände bestrahlter Brustkrebszelllinien befüllt wurden. LPS (10 ng/ml) oder Fibroblasten-stimulierendes-Lipopeptid-1 (FSL-1, 10 ng/ml) dienten als Positivkontrolle für die hTLR4- bzw. hTLR2- Aktivierung. Die TLR-Stimulierung erfolgte für 7 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurde die Aktivität der sezernierten alkalischen Phosphatase an einem Synergy Mx Plate Reader kinetisch über 10 Stunden bei 37°C (Absorption bei 630 nm, Messung alle 2 Minuten) gemessen und anhand der Steigung der korrespondierenden Regressionslinie berechnet. Die relative TLR-Aktivierung wurde auf die Proben normalisiert, die mit Überständen scheinbestrahlter Zellen behandelt wurden.

7.1.4 Zellzahl-Bestimmung

Alle Zellzahlen wurden mit einer Neubauer *improved*-Zählkammer bestimmt. Einzelzellsuspensionen wurden in die Kammer pipettiert und die Zellen in den vier großen Rechtecken gezählt. Die durchschnittliche Zellzahl innerhalb eines großen Rechtecks wurde mit dem Kammer-Faktor 10.000 multipliziert, um die Konzentration der Zellsuspension in Zellen/ml zu erhalten.

7.2 *Air-Pouch-Modell*

Alle Tierversuche wurden entsprechend der Leitlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen (55.2-1-54-2532-203-2015) bewilligt. Die Mäuse wurden während der Experimente unter Standardbedingungen in individuell belüfteten Käfigen bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Futter und Wasser wurden *ad libitum* bereitgestellt. Während der *Air-Pouch*-Generierung waren die Tiere einzeln untergebracht.

7.2.1 *Air-Pouch*-Generierung, -Stimulierung und -Ernte

Die *Air-Pouches* wurden durch subkutane Injektion von 5 ml steriler Luft in den enthaarten Rücken neun bis zehn Wochen alter, weiblicher BALB/c Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld) generiert. Nach drei Tagen wurde die initiale *Pouchgröße* durch Injektion weiterer 2-3 ml steriler Luft aufrechterhalten. Sechs Tage nach *Air-Pouch*-Generierung wurden die Immunzellrekrutierungsexperimente gestartet (Abb. 4). Hierbei wurde 1 ml der sterilen Luft abgesaugt und durch 1 ml der Zellkulturüberstände von HCC1937- bzw. HCC1806-Zellen, des Kontrollmediums (RPMI-1640-Medium mit 2,5% FCS) oder einer TNF-Lösung (50 ng/ml in RPMI-1640-Medium mit 2,5% FCS) ersetzt. Die Mäuse erhielten 3, 6, 12 und 24 h nach der Injektion eine Narkose mit Isofluran sowie intraperitoneal mit Ketamin/Xylazin (100-200 µl/20 g Körpergewicht) und wurden im Anschluss durch Genickbruch getötet. Die *Air-Pouch-Lavage* wurde durch dreimaliges Spülen mit 2 ml einer Kochsalzlösung (0,9%) gewonnen. Bei den Experimenten mit den Überständen der HCC1937-Zellen wurden durch chirurgische Exzision zusätzlich Proben der *Air-Pouch*-Haut gesammelt und für eine Stunde in einer Formaldehydlösung (3,5%) fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die fixierten Hautproben einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) oder einer konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie zugeführt (Abb. 4).

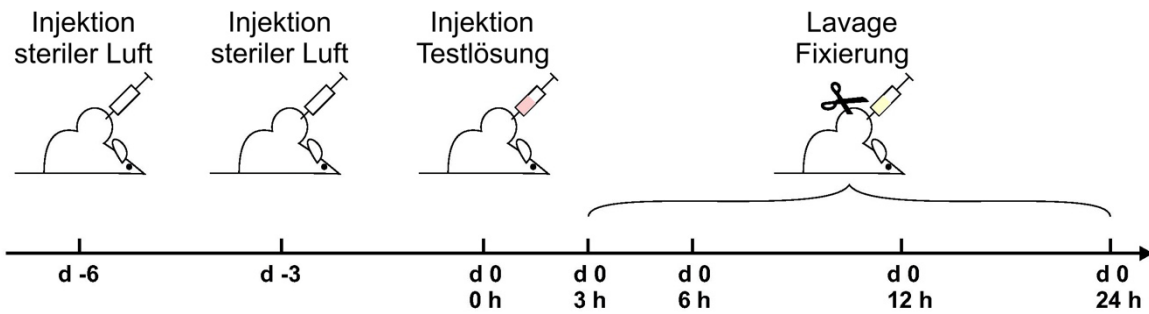


Abb. 4: Schematische Darstellung eines *Air-Pouch*-Experiments (entnommen und modifiziert aus [21]).

7.2.2 HE-Färbung und konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von *Air-Pouch*-Hautproben

Für die HE-Färbung wurden die fixierten Hautproben in Paraffin eingebettet. Es wurden 3 µm dicke Schnitte senkrecht zu den Muskelfasern angefertigt, in Xylol von Paraffin befreit und in einer abnehmenden Ethanolreihe rehydriert. Die rehydrierten Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Lösung gefärbt und in Wasser gebläut. Daraufhin wurden sie mit einer Eosin-Lösung gefärbt und in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Zuletzt wurden die gefärbten Schnitte in Entellan eingebettet und an einem Zeiss Lab A1 Mikroskop mit 20-facher Vergrößerung mikroskopiert.

Für die konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die fixierten *Air-Pouch*-Hautproben zuerst in Triton X-100 (0,1%) mit 2% BSA bei 4°C über Nacht permeabilisiert. Daraufhin wurden die Hautproben mit *rat* anti-F4/80-Alexa Fluor488-, *rat* anti-CD31-Alexa Fluor647- und *rat* anti-*lymphocyte antigen 6 complex* (Ly6) G-Antikörpern bei 4°C für 72 Stunden gefärbt, im Anschluss dreimal in PBS gewaschen und mit dem anti-*rat* IgG-Alexa Fluor546-Sekundärantikörper für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefärbten Proben wurden nochmals in PBS gewaschen, in PermaFluor Eindeckmedium eingebettet und bei 20-facher Vergrößerung an einem konfokalen Leica TCS SP5 Mikroskop einer Konfokalmikroskopie unterzogen. Diese wurde in Kooperation mit Frau Dr. Gabriele Zuchtriegel aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Reichel am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, Klinikum der Universität München, durchgeführt.

7.3 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden an einem LSR II Zytometer durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit der FACSDiva- oder Flowjo 7.6.5.-Software.

7.3.1 *Air-Pouch*-infiltrierende Leukozyten-Subpopulationen

Die *Air-Pouch*-infiltrierten Zellen wurden durch Zentrifugation (314 g, 5 min) aus der *Air-Pouch*-Lavage-Flüssigkeit gesammelt, in FACS-Färbepuffer resuspendiert und mit anti-CD45-APC-Cy7-, anti-Ly6C-Phycoerythrin (PE)-Cy7-, anti-Ly6G-BUV395-, anti-CD11b-Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-, anti-CD11c- Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex (engl. *peridinin chlorophyll protein complex*, PerCP)-Cy5.5-, anti-F4/80-eFluor450-, anti-H-2-Alexa Fluor700-, anti-*plasmacytoid dendritic cell antigen-1* (PDCA-1)-APC- und anti-*sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin* (*Siglec*)-H-PE-Antikörpern oder den entsprechenden Isotyp-Kontrollen für 20 Minuten auf Eis und im Dunkeln gefärbt. Die Zellen wurden zweimal in FACS-Färbepuffer gewaschen, bevor die durchflusszytometrischen Messungen durchgeführt wurden.

Die *Gating*-Strategie für die Identifizierung der Leukozyten-Subpopulationen ist in Abbildung 5 dargestellt. Unter allen CD45⁺ Leukozyten (nach dem Ausschluss von Doubletten) wurden myeloide Zellen anhand der CD11b-Expression bestimmt. Unter den CD11b⁺ Zellen konnten nacheinander neutrophile Granulozyten (Ly6G⁺F4/80⁻) und Makrophagen (Ly6C⁻F4/80⁺) identifiziert werden. In der verbleibenden Zellpopulation wurden auf Grundlage der CD11c-Expression DCs von Monozyten unterschieden. CD11c⁺ DCs wurden weiter in plasmazytoide (Siglec-H⁺PDCA-1⁺, pDCs) und myeloide DCs (F4/80⁻MHCII⁺, mDCs) unterteilt. Die CD11c⁻ Monozytensubpopulationen konnten anhand ihrer Ly6C-Expression in Ly6C^{hi} und Ly6C^{low} Monozyten eingeteilt werden. Die absoluten Zellzahlen jeder Leukozyten-Subpopulation wurden auf der Basis aller gezählten CD45⁺ Zellen berechnet. Für die absoluten CD45⁺ Zellzahlen wurden die CD45⁺ Zellen jeder Probe auf Singulettten normalisiert und mit den totalen Zellzahlen aus den *Air-Pouch*-Lavage-Flüssigkeiten multipliziert, die über Zählungen an der Neubauer-Zählkammer bestimmt wurden. Die absoluten Zahlen jeder Leukozyten-Subpopulation wurden über den jeweiligen prozentualen Anteil (Verhältnis der Leukozyten-Subpopulations-Ereignisse zu den CD45⁺ Ereignissen jeder Probe) multipliziert mit der absoluten CD45⁺ Zellzahl berechnet.

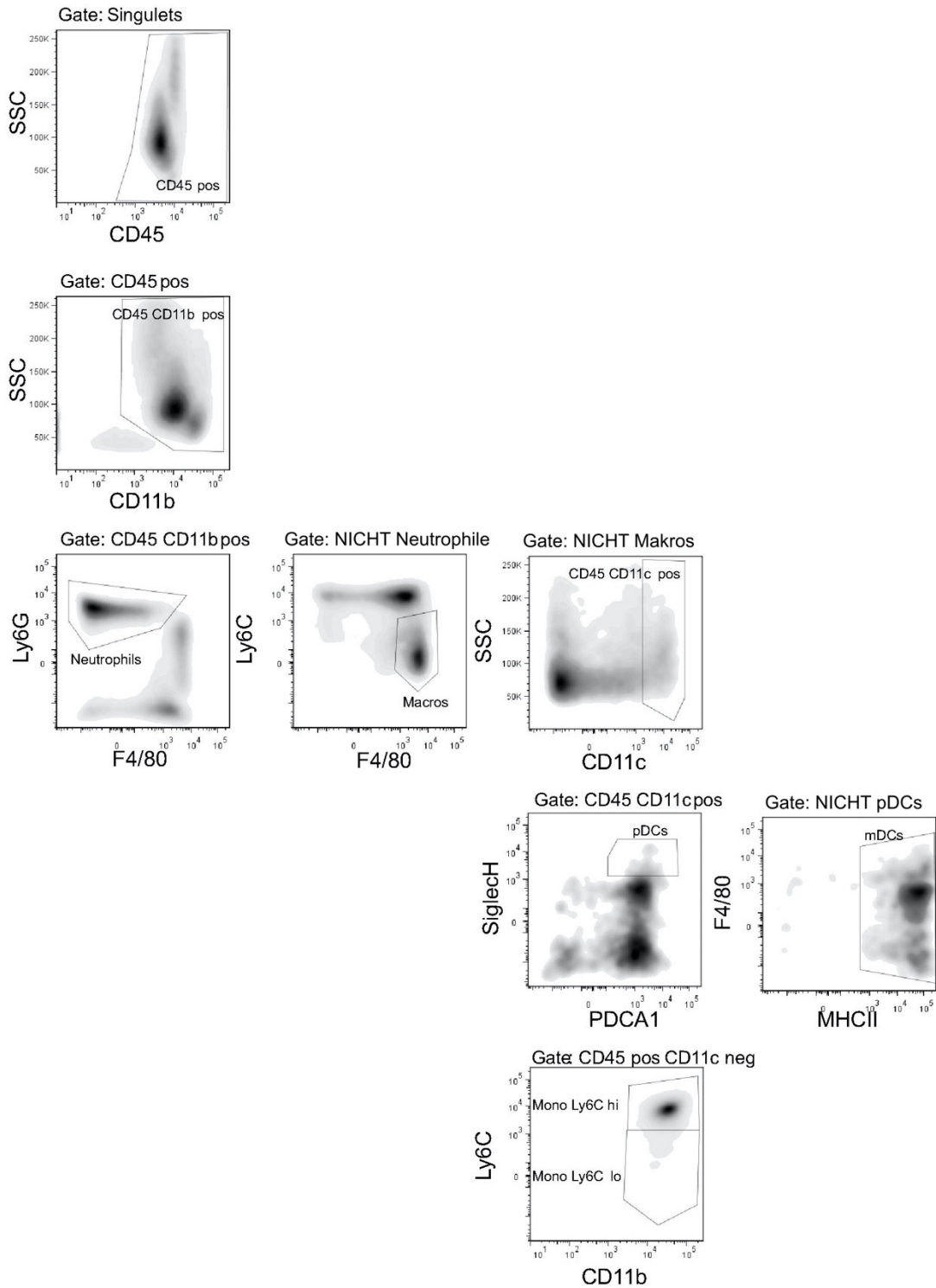


Abb. 5: *Gating*-Strategie für die durchflusszytometrische Identifizierung der Leukozyten-Subpopulationen in der *Air-Pouch*-Lavage-Flüssigkeit (entnommen und modifiziert aus [21]).

7.3.2 Oberflächenmarker dendritischer Zellen

Aus Monozyten differenzierte DCs (siehe Kapitel 7.1.2.2) wurden mit anti-CD40-PE-Cy5-, anti-CD80-PE-, anti-CD83-PE-Cy7-, anti-CD86-Alexa Fluor700-, anti-humanes Leukozyten-Antigen (HLA)-DR-PerCP-Cy5.5-Antikörpern oder den passenden Isotyp-Kontrollen in FACS-Färbepuffer für 30 Minuten in Dunkelheit auf Eis gefärbt. Die relative Expression der Oberflächenmarker wurde aus der medianen Intensität der Fluoreszenz, nach Subtraktion der jeweiligen Isotyp-Kontrolle, berechnet und auf die 0 Gy-Kontrolle normalisiert

7.3.3 Phagozytose-Aktivität dendritischer Zellen

Die Phagozytose bestrahlter HCC1937-Zellen durch DCs wurde untersucht, indem beide Zelllinien mit unterschiedlichen Membranfluoreszenzfarbstoffen gefärbt und koinkubiert wurden. Humane Monozyten des peripheren Blutes wurden, wie in Kapitel 7.1.2.2 beschrieben, isoliert und mit dem grünen, membran-interkalierenden Farbstoff PKH67 gefärbt. Hierfür wurden Monozyten in einem Glasröhrchen mit Diluent C auf eine Konzentration von 4×10^7 Zellen/ml verdünnt, 1 μ M PKH67 in finaler Konzentration hinzugegeben und die Monozyten für 1,5 Minuten gefärbt. Der Färbeprozess wurde durch 1:1 Verdünnung der Reaktionslösung mit 100% FCS gestoppt. Die Monozyten wurden in X-Vivo15-Medium gewaschen und wie zuvor beschrieben (Kapitel 7.1.2.2) zu DCs differenziert.

Am Tag der Monozytenisolierung wurden HCC1937-Zellen analog zu den Monozyten mit dem orangenen Membran-Farbstoff PKH26 gefärbt. Hierbei wurden die HCC1937-Zellen auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml verdünnt, PKH26 in einer finalen Konzentration von 2 μ M zugegeben und die Färbung für 5 Minuten ermöglicht. Die gefärbten HCC1937-Zellen wurden in 24-well Platten in RPMI-1640-Medium mit 10% FCS ausgesät ($3-10 \times 10^4$ Zellen/well) und wie in Kapitel 7.1.1.3 bestrahlt. Fünf Tage nach der Monozytenisolierung und dem Färben der HCC1937-Zellen wurden die DCs gesammelt und mit den bestrahlten HCC1937-Zellen im angegebenen Ziel:Effektor (engl. *target:effector*, T:E) -Verhältnis für zwei Stunden bei 37°C koinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Trypsinierung gesammelt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil an Phagozytose wurde als Anteil an doppelt-positiven (PKH67 und PKH26) DCs basierend auf allen DCs (PKH67-positiv) errechnet. Die aktive Phagozytose der HCC1937-Zellen durch die

DCs konnte durch Behandlung der DCs mit dem Zytoskelett-Inhibitor Cytochalasin D, der die Polymerisation von Aktinfilamenten hemmt, bestätigt werden. Hierfür wurden die DCs eine Stunde vor Koinkubation mit den HCC1937-Zellen mit 20 μ M Cytochalasin D behandelt.

7.3.4 Allogene gemischte Leukozytenreaktion

Für die allogene gemischte Leukozytenreaktion (engl. *allogeneic mixed leukocyte reaction*, MLR) wurden primäre, humane Monozyten mit Überständen bestrahlter HCC1937-Zellen oder TNF (100 ng/ml) stimuliert und, wie in Kapitel 7.1.2.2 beschrieben, zu DCs ausdifferenziert. Nach sieben Tagen wurden die DCs mit eiskaltem 5 mM EDTA in PBS für 5 Minuten abgelöst, in serumfreiem X-Vivo15-Medium gewaschen und in 96-well F-Bodenplatten in 100 μ l serumfreiem X-Vivo15-Medium ausgesät (2×10^4 Zellen/well). An demselben Tag wurden allogene T-Zellen, wie unter Punkt 5.1.2.2 beschrieben, isoliert und 1×10^6 T-Zellen/ml in PBS mit 0,1% BSA für 10 Minuten bei 37°C mit 0,5 μ M Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) gefärbt. Die gefärbten T-Zellen wurden dreimal in serumfreiem X-Vivo15-Medium gewaschen und zu den DCs in X-Vivo15-Medium mit 20% autologem Serum gegeben, sodass ein finales Volumen von 200 μ l mit einer Serumkonzentration von 10% erreicht wurde. Das Verhältnis der DCs zu den T-Zellen betrug 1:5. Nach fünf Tagen Koinkubation wurden die Zellen gesammelt und die T-Zellen mit anti-CD3-PE-Cy7-, anti-CD4-PE- und anti-CD8-APC-Antikörpern oder den entsprechenden Isotypkontrollen in 50 μ l FACS-Färbepuffer für 30 Minuten auf Eis gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden zweimal gewaschen und die Fluoreszenz von CFSE, PE-Cy-7, PE und APC wurde durchflusszytometrisch gemessen. Als Kennzeichen für Zellproliferation diente die Abnahme der CFSE-Intensität, da sich CFSE bei einer Zellteilung gleichermaßen auf beide Tochterzellen aufteilt. Die Proliferation der T-Zellen wurde anhand des Anteils der $CD3^+CD4^+CFSE^{low}$ oder $CD3^+CD8^+CFSE^{low}$ T-Zellen in Bezug auf alle $CD3^+CD4^+$ bzw. $CD3^+CD8^+$ T-Zellen berechnet und auf die 0 Gy Proben normiert.

7.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für Immunfluoreszenzanalysen wurde ein inverses Carl Zeiss AxioObserver Z1 Mikroskop mit einer AxioCam Mr3 Kamera, einem Zeiss Plan-Neofluar 63X/1.3 Glycerol Objektiv, einer Inkubatoreinheit XLmulti S1 verbunden mit einer Heizeinheit XL S mit TempModule S1 und CO₂ Module S1 und das AxioVision 4.8 Software-Paket verwendet.

7.4.1 Morphologie der Brustkrebszellen unter Bestrahlung

4x10⁴ HCC1937-Zellen pro *well* wurden auf sterilen Deckgläsern in 24-*well* Platten ausgesät und über Nacht inkubiert, um ein Anhaften der Zellen zu ermöglichen. Am nächsten Tag wurden die HCC1937-Zellen mit den jeweiligen Dosen bestrahlt und am Tag eins und vier nach Bestrahlung für 10 Minuten in einer isotonischen Lösung mit 3,7% Formaldehyd und 0,1% Triton X-100 fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen für 5 Minuten in isotonischem 0,5%igen Triton X-100 permeabilisiert und anschließend für eine Stunde mit 3% BSA und 0,1% Triton X-100 in PBS geblockt. Danach wurden die Zellen mit Phalloidin-Alexa Fluor568 und anti- β -Tubulin-FITC-Antikörper für eine Stunde im Dunkeln gefärbt. Daraufhin wurden die gefärbten Zellen in 0,1% Triton X-100 in PBS gewaschen und zur Zellkernfärbung mit 2 μ g/ml Hoechst-33342 für 5 Minuten gefärbt. Nach vier zusätzlichen Waschschriften wurden die Deckgläser mit Fluoromount überschichtet, auf die Objektträger aufgebracht und die Mikroskopie durchgeführt. Von jedem Beobachtungsbereich wurden 25 Schnittbilder (Z-Stapel) im Abstand von 250 nm aufgenommen und mit der AxioVision 4.8 Software dekonvuliert.

7.4.2 Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen

HUVECs wurden 48 Stunden nach Aussaat auf sterile Deckgläser für vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ mit 400 μ l 1:2 verdünnter Überstände bestrahlter HCC1937-, HCC1806- oder MDA-MB-436-Zellen bzw. 50 ng/ml TNF stimuliert. Nach der Stimulation wurden die HUVECs mit FACS-Färbepuffer gewaschen und daraufhin für 30 Minuten in Dunkelheit mit anti-ICAM-1-PE-, anti-VCAM-1-PE- oder anti-E-Selektin-PE-Antikörpern in FACS-Färbepuffer gefärbt. 2 μ g/ml Hoechst-33342 wurden für eine DNA-Färbung hinzugegeben und nach zweimaligem Waschen mit FACS-Färbepuffer wurden die Deckgläser mit Fluoromount überschichtet, auf die Objektträger aufgebracht und die Mikroskopie wurde durchgeführt.

7.5 Quantifizierung der ICAM-1- und E-Selektin-Oberflächenexpression auf Endothelzellen

9.000 HUVECs pro well wurden in 96-well Platten in *Full Endothelial Growth Medium* ausgesät und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Stimulierung erfolgte mit 190 µl 1:2 verdünnter Überstände bestrahlter HCC1937-Zellen für vier Stunden. Reines *Full Endothelial Growth Medium* und TNF (50ng/ml) dienten als Kontrollen. Im Anschluss wurden die Zellen mit FACS-Färbepuffer gewaschen und mit anti-ICAM-PE-, anti-E-Selektin-PE-Antikörpern oder den zugehörigen Isotypkontrollen für 30 Minuten auf Eis in Dunkelheit gefärbt. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit FACS-Färbepuffer gewaschen und die PE-Fluoreszenz an einem Synergy Mx *Plate Reader* (Ex. 480 nm, Em. 578 nm) gemessen. Um die relative Oberflächenexpression von ICAM-1 und E-Selektin zu erhalten, wurden die jeweiligen Isotypkontrollen von den gemessenen Fluoreszenzintensitäten subtrahiert und diese auf die 0 Gy Proben normalisiert.

7.6 Flusskammer

Für die Flusskammer-Versuche wurden HUVECs in ibidi Flusskammern (μ -Slide VI^{0.4}) ausgesät und für 48 Stunden bis zur Konfluenz kultiviert. Die Stimulation der HUVECs erfolgte mit 150 µl 1:2 in *Full Endothelial Growth Medium* verdünnter Kulturüberstände von bestrahlten HCC1937-Zellen oder mit TNF für vier Stunden. Nach zweimaligem Waschen der Flusskammern mit HBSS wurden diese mit einem PE 50 Tube (*intramedic polyethylen tubing*, innerer Durchmesser 0,58 mm, äußerer Durchmesser 0,965 mm) verbunden und mit primären, humanen PMNs in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml mit einer Flussrate von 0,11 ml/min (Scherkraft = $0,2 \text{ dyn/cm}^2$) perfundiert. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden adhärenente Zellen als Zellen definiert, die sich nicht über die Distanz eines Zelldurchmessers in einer Minute bewegten. Dies beinhaltete auch sogenannte kriechende (engl. *crawling*) Zellen, die als jene bestimmt wurden, die sich über eine Distanz von unter einem Zelldurchmesser pro Minute bewegt haben [61]. Die Flusskammer-Versuche wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Markus Sperandio am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, Klinikum der Universität München, durchgeführt.

7.7 Zytokin Multiplex-Assay

Die Konzentrationen von Zytokinen und Chemokinen in den Kulturüberständen stimulierter HUVECs wurde mit dem Bio-Plex *Pro Human Chemokine Assay* auf einem Bio-Plex 200 System nach dem Herstellerprotokoll gemessen. Das handelsübliche 1 x 96-*well* Kit enthält Standards, die Detektionsantikörper sowie Reagenzien und Puffer für den Multiplex-Versuch. Zur Probengenerierung wurden 2×10^5 HUVECs pro *well* in 6-*well* Platten mit 2 ml 1:2 verdünnter Überstände bestrahlter HCC1937-Zellen für vier Stunden stimuliert. Anschließend wurden das Medium auf *Full Endothelial Growth Medium* gewechselt und die Zellkulturüberstände nach weiteren zwei Stunden gesammelt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. 50 μl der HUVEC-Überstände wurden mit 2,5 - 5 μl Chemokin-bindender *Beads* für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurden 1,25 - 2,5 μl biotinylierte Detektionsantikörper in 25 μl Verdünnungspuffer hinzugegeben und die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden PE-markiertes Streptavidin an den biotinylierten Detektionsantikörpern (1:10 in Assay-Puffer verdünnt) gebunden und die Proben im Bio-Plex 200 System analysiert.

7.8 HSP70, HMGB1 und S100A8/9 ELISA

7.8.1 Bestimmung von HSP70

HSP70-Level wurden in den Überständen bestrahlter HCC1937-, HCC1806- und MDA-MB-436-Zellen mit dem DuoSet® IC *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Kit nach dem Herstellerprotokoll gemessen. Reagenzien, Puffer und Antikörper für den ELISA waren in dem Kit enthalten. Die Substratlösung für die Farbreaktion bestand aus einer 9:1 Mischung aus *Solution B* und *Solution A* des TMB Peroxidase EIA Substrat Kits. Zellfreie Kulturüberstände von bestrahlten Brustkrebszellen wurden wie in Kapitel 7.1.1.3 beschrieben hergestellt. Jeder Inkubationsschritt des ELISAs wurde, bis auf das Auftragen der Erstantikörper, bei Raumtemperatur durchgeführt und nach jeder Inkubation wurde die 96-*well* Platte dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Einen Tag vor der Analyse wurden die weißen 96-*well* F-Boden-Platten mit 100 μl Erstantikörper (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pro *well* bei 4°C und in Dunkelheit über Nacht beschichtet. Am Tag des ELISAs wurden die beschichteten Platten für zwei Stunden mit 100 μl Blockpuffer pro *well* geblockt. Die

Proben wurden 1:10 in serumfreiem RPMI-1640-Medium verdünnt und jeweils 100 µl pro *well* wurden in die geblockte 96-*well* Platte übertragen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurde die Platte mit 100 µl/*well* biotinylierter Detektions-Antikörper (100 ng/ml) für weitere zwei Stunden inkubiert. Für die Farbreaktion wurden pro *well* 100 µl Streptavidin, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (1:200), hinzugegeben und 20 Minuten inkubiert. Die Substratlösung wurde wie oben beschrieben gemischt und die Substratkonversion wurde über 20 Minuten zugelassen. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl Stopplösung beendet, bevor sie eine Sättigung erreicht hatte, und die Absorption bei 450 nm an einem Synergy Mx Reader gemessen. Die HSP70-Konzentrationen wurden mit einer 8-Punkte Standardkurve berechnet, für die aufgereinigtes, humanes HSP70 (0-10 ng/ml) verwendet wurde.

7.8.2 Bestimmung von HMGB1

Für die Quantifizierung von HMGB1, das von bestrahlten HCC1937-, HCC1806- und MDA-MB-436-Zellen freigesetzt wurde, wurde der HMGB1-ELISA-Kit von IBL International verwendet. Das Kit enthielt eine vorbeschichtete 96-*well* Mikrotiterplatte, sowie alle Reagenzien und Puffer, die für den HMGB1-ELISA notwendig waren. Alle Schritte wurden nach dem Herstellerprotokoll ausgeführt. Die Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die zellfreien Kulturüberstände der Brustkrebszellen wurden, wie in Kapitel 7.1.1.3 beschrieben, produziert. Für den HMGB1-ELISA wurden jeweils 100 µl des Verdünnungspuffers in die *wells* der vorbeschichteten 96-*well* Mikrotiterplatte gegeben und 10 µl der Standards, der Positivkontrolle (porzines HMGB1) bzw. zellfreier Kulturüberstände, die zuvor 1:5 in serumfreiem RPMI-1640- bzw. DMEM/F12-Medium verdünnt wurden, hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Platten fünfmal mit 1x Waschpuffer gewaschen und 100 µl Enzymkonjugat zu jedem *well* gegeben. Zwei Stunden später wurde die Platte erneut fünfmal gewaschen und die Proben wurden für 25 - 30 Minuten der Färbelösung ausgesetzt. Die Farbreaktion wurde mit 100 µl einer Stopplösung beendet und die Absorption bei 450 nm an einem Synergy Mx gemessen. Die Konzentrationen von HMGB1 in den Zellkulturüberständen wurden anhand einer 7-Punkte Standardkurve (0-80 ng/ml) berechnet.

7.8.3 Bestimmung von S100A8/A9

Die Detektion von S100A8/A9 in zellfreien Überständen bestrahlter HCC1937-, HCC1806- und MDA-MB-436-Zellen wurde freundlicherweise von Professor Dr. Thomas Vogl am Institut für Immunologie der Universität Münster nach einem hauseigenem ELISA-Protokoll durchgeführt [62].

7.9 Quantitative Echtzeit-PCR

7.9.1 RNA-Extraktion und -Quantifizierung

Aus den *Air-Pouch*-Hautproben wurde die gesamte Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA) mit TRIzol Reagenz nach dem Herstellerprotokoll extrahiert. Hierfür wurde das Gewebe in 1 ml TRIzol Reagenz aufgenommen und homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und 240 µl RNase-freiem Wasser wurden die Proben 10 Minuten inkubiert und daraufhin 15 Minuten zentrifugiert (4°C, 12.000 g). Die RNA in der entstehenden oberen, wässrigen Phase wurden abgenommen, mit 1,5 µl Glycoblu gefärbt und mit 550 µl Isopropanol versetzt. Nach einem weiteren Inkubations- und Zentrifugationsschritt wurden die Überstände entfernt und das Pellet zweimal mit 75% Ethanol gewaschen. Daraufhin wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Bei den *In-vitro*-HUVEC-Experimenten wurde die Gesamt-RNA mit dem NucleoSpin RNA II-Kit nach Herstellerangaben isoliert. Nach der Inkubation mit den jeweiligen Stimuli wurden die Überstände entfernt und die HUVECs wurden direkt in 350 µl RA1 Puffer, versetzt mit 1 % 2-Mercaptoethanol, lysiert. Nukleinsäuren wurden mit 70% Ethanol ausgefällt und an eine Quarzmembran gebunden. Im Anschluss wurden die Membranen entsalzt und kontaminierende DNA wurde mit rDNase für 15 Minuten bei Raumtemperatur abgebaut. Die Proben wurden dreimal in RNase-freiem H₂O gewaschen und eluiert.

Die Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA wurde an einem NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrometer gemessen. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes berechnet, mit der Absorption der RNA-Lösung bei 260 nm und dem spezifischen Extinktionskoeffizienten für reine RNA-Lösung bei einer Konzentration von 40 ng/ml. Die Reinheit der RNA-Lösung wurde anhand des

Verhältnisses der Absorption der Lösung bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) bestimmt, wobei ein A_{260}/A_{280} -Quotient zwischen 1,7 und 2,0 für RNA-Lösungen allgemein als akzeptabel gilt. Die isolierte RNA wurde bei -80°C bis zu weiterem Gebrauch gelagert.

7.9.2 Reverse Transkription

Um komplementäre DNA (engl. *complementary*, cDNA) für die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) zu erlangen, wurde 1 μg der RNA mit 200 U Revert Aid H Minus M-MuLV reverser Transkriptase, 50 μM Random Hexamers, 5 μM Oligo(dT)₁₈, 400 μM Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und 1 U/ μl Ribolock RNase-Inhibitor revers transkribiert. Zuerst wurde die RNA mit Random Hexamers, Oligo(dT)₁₈ und dNTPs gemischt und für 15 Minuten auf 65°C erhitzt. Nachdem die Proben auf Eis abkühlen konnten, wurden die reverse Transkriptase und der RNase-Inhibitor, beide in Reaktionspuffer, zu der RNA hinzugefügt. Für die reverse Transkription wurden die Proben bei 25°C für 10 Minuten inkubiert, gefolgt von einem Erhitzen auf 42°C für 60 Minuten, um die reverse Transkription zu ermöglichen. Zuletzt wurde die Reaktion bei 72°C für 10 Minuten hitzeinaktiviert und die synthetisierte cDNA wurde bis zu weiterem Gebrauch bei -20°C gelagert.

7.9.3 Quantitative RT-PCR

Für die qRT-PCR wurden 20-80 ng der cDNA mit 300 nM *forward* und *reverse* Primer sowie 1x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix auf ein Endvolumen von 20 μl vereinigt. Die Vervielfältigung wurde mit einem Standardprotokoll (10 min 95°C , 45x (15 s 95°C , 30 s 60°C)) an einem LC480 qPCR Cyclyer durchgeführt. Die Primersequenzen für murine und humane Zielgene sind in Tabellen 13 und 14 aufgelistet. Die relative Quantifizierung wurde mittels der Standardkurven-Methode vorgenommen. Die Ergebnisse wurden auf eine Matrix von 3-5 Referenzgenen normalisiert und auf die jeweiligen Kontrollen kalibriert.

Tabelle 12. Primersequenzen für murine Zielgene

Gen	Primer	Sequenz
CXCL1	Forward	CAAACCGAAGTCATAGCCACACT
	Reverse	TACTTGGGGACACCTTTTAGCATC
CXCL2	Forward	GCCACTCTCAAGGGCGGT
	Reverse	TCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTCA
CXCL3	Forward	ATGGTCAAGAAGTTTGCCTCAAC
	Reverse	GGACTTGCCGCTCTTCAGTATC
IL-1 β	Forward	TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC
	Reverse	AGGTTTGGAAAGCAGCCCTTC
IL-6	Forward	GAAATCGTGGAATGAGAAAAGAGTT
	Reverse	GTGCATCATCGTTGTTCATAACAATC
L-Selektin	Forward	CACTGCTCTGTTGTGACTTCCTGA
	Reverse	GGTAAGTCCAACAGTGAGTTCCATG
VCAM-1	Forward	AACTACAAGTCTACATCTCTCCCAGGAA
	Reverse	GTCACAGCACCCACCTCTTGA
18S rRNA	Forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA
	Reverse	AGCTGGAATTACCGCGGC
δ -ALAS	Forward	ATCATCCCTGTGCGGGTTG
	Reverse	TAATTGATGGCCTGGACGTAGATATT
CD31	Forward	GTCACCGTGCAGGAGTCCTT
	Reverse	AATGTGCAGCTGGTCCCCT
β -Aktin	Forward	CGCCACCAGTTCGCCAT
	Reverse	ACGACCAGCGCAGCGATA
α -Tubulin	Forward	AGGATTCGCAAGCTGGCTG
	Reverse	AAAGCTGTGGAAAACCAAGAAGC

Tabelle 13. Primersequenzen für humane Zielgene

Gen	Primer	Sequenz
ICAM-1	Forward	GGAACAACCGGAAGGTGTATGA
	Reverse	GTTCTGGAGTCCAGTACACGGTG
VCAM-1	Forward	ACGCAAACACTTTATGTCAATGTTG
	Reverse	AGCTGCCTGCTCCACAGG
E-Selektin	Forward	CCTACCTGTGAAGCTCCCACTG
	Reverse	AGGAGGGAGAGTCCAGCAGC
P-Selektin	Forward	CCACCAATGTGTGAAGCCATC
	Reverse	TCAGAACAATCCAGGCTGCC
IL-1 α	Forward	GCTTCCTGAGCAATGTGAAATACA
	Reverse	CAAATTTCACTGCTTCATCCAGATT
IL-6	Forward	GGTACATCCTCGACGGCATCT
	Reverse	AGTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC
TNF	Forward	TCTTCTCGAACCCCGAGTGA
	Reverse	GGAGCTGCCCTCAGCTT
CCL1	Forward	GCTTGCTGCTAGCTGGGATGT
	Reverse	CTCCGCAAATGAGAAGCAACA
CCL2	Forward	CAGCAAGTGTCCCAAAGAAGCT
	Reverse	TGGAATCCTGAACCCACTTCTG
CCL5	Forward	CTCTGCGCTCCTGCATCTG
	Reverse	GCGGGCAATGTAGGCAAA
CCL7	Forward	GAGAGCTACAGAAGGACCACCAGT
	Reverse	GGGTCAGCACAGATCTCCTTGT
CCL8	Forward	GCTGGAGAGCTACACAAGAATCAC
	Reverse	GCCCCGTTTGGTCTTGAA
CCL13	Forward	AGGCTGAAGAGCTATGTGATCACC
	Reverse	CCTTGCCCAGTTTGGTTCTG
CCL14&15	Forward	GCGTCAGCGGATTATGGATTAC
	Reverse	ACGGAATGGCCCCTTTTG
CXCL1	Forward	AAGCTTGCCTCAATCCTGCAT
	Reverse	TGGATTTGTCACTGTTTCAATCT
CXCL2	Forward	CGCATCGCCCATGGTTAA
	Reverse	CAGTTGGATTTGCCATTTTTTCA
CXCL3	Forward	CCCATGGTTCAGAAAATCATCG
	Reverse	GTTGGTGCTCCCCTTGTTC
CXCL8	Forward	TGGCAGCCTTCCTGATTTCT
	Reverse	TGCACTGACATCTAAGTTCTTTAGCA
CXCL10	Forward	TGGCATTCAAGGAGTACCTCTCT
	Reverse	GTAGCAATGATCTCAACACGTGG
CXCL11	Forward	TGTTCAAGGCTTCCCATGT
	Reverse	GAGGCTTTCTCAATATCTGCCACT
CXCL12	Forward	TGCTGGTCTCGTGCTGAC
	Reverse	TGGCAACATGGCTTTTCGAA
CX3CL1	Forward	ACAGAACCAGGCATCATGCG
	Reverse	CGGGTCGGCACAGAACAG
18S rRNA	Forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA
	Reverse	AGCTGGAATTACCGCGGC
δ -ALAS	Forward	TCCACTGCAGCAGTACACTACCA
	Reverse	ACGGAAGCTGTGTGCCATCT
β_2 -Mikroglobulin	Forward	ACGGAAGCTGTGTGCCATCT
	Reverse	TCTCTGCTGGATGACGTGAGTAAAC

7.10 Statistische Analyse

Sofern nicht anders angegeben, sind die Daten als unabhängige Datenpunkte aus individuellen Experimenten dargestellt. Für Experimente mit zeitlichem Verlauf werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung (engl. *standard deviation*, SD) oder Standardfehler des Mittelwertes (engl. *standard error of the mean*, SEM) der angegebenen Anzahl an Tieren bzw. unabhängigen Versuche gezeigt. Die Normalverteilung wurde mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests bestätigt und Gruppenvergleiche wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Test bzw. der zweifaktoriellen ANOVA durchgeführt. Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurde der zweiseitige Wilcoxon-Rangsummen-Test angewandt. Die Korrektur multipler Testungen wurde mit dem *post hoc* Bonferroni-Holm-Algorithmus vorgenommen. Die Hauptkomponentenanalyse wurde in OriginPro 9.1 ausgeführt, wie zuvor beschrieben [63].

8 Ergebnisse

8.1 Rekrutierung von Leukozyten *in vivo*

In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, dass in Brustkrebszellen, je nach Bestrahlungsregime und genetischer Ausstattung der bestrahlten Zellen, verschiedene Zelltodformen durch Bestrahlung mit γ -Strahlen ausgelöst werden können [35]. In triple-negativen, schnell proliferierenden Brustkrebszellen, wie den HCC1937- und HCC1806-Zellen, konnte ein verzögerter Typ der primären Nekrose mit chaotischer Morphologie beobachtet werden, der vier Tage nach Bestrahlung mit einer einzelnen Dosis von 20 Gy besonders deutlich war (Abb. 2). Kulturüberstände von diesen sterbenden Zellen konnten *in vitro* eine Nukleotid-abhängige Monozytenmigration anregen, die eher als chemokinetisch (ungerichtet) als chemotaktisch (gerichtet) charakterisiert wurde [35].

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit zunächst die Rekrutierung von myeloiden Zellen durch Kulturüberstände von bestrahlten Brustkrebszellen *in vivo* untersucht. Dafür wurde ein *Air-Pouch*-Modell verwendet, bei dem Zellkulturüberstände von HCC1937- bzw. HCC1806-Zellen (geerntet vier Tage nach Bestrahlung mit 0, 2, 4x2 oder 20 Gy) in durch Injektion steriler Luft generierte *Air-Pouches* der Versuchstiere injiziert wurden. 3, 6, 12 und 24 Stunden nach der Injektion der Zellkulturüberstände bestrahlter Brustkrebszellen wurde die Rekrutierung von myeloiden Immunzellen in das *Air-Pouch*-Lumen sowie in die *Air-Pouch*-Haut analysiert. Nicht-konditioniertes Kulturmedium diente als Negativ- und TNF als Positivkontrolle (Abb. 6).

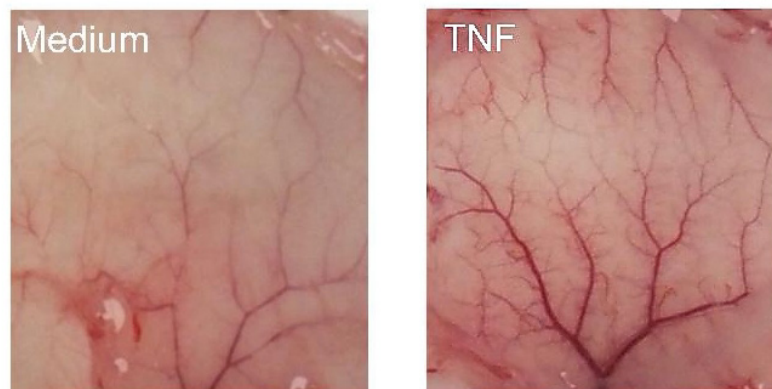


Abb. 6: Repräsentative makroskopische Aufnahmen der luminalen Seite von nativen *Air-Pouch*-Hautproben. 12 Stunden nach Injektion von Kontrollmedium oder Medium mit 50 ng/ml TNF (entnommen und modifiziert aus [21]).

H&E-Färbungen konnten reproduzierbar einen klar definierten Aufbau der *Air-Pouch*-Haut zeigen (Abb. 7). Distal des Lumens lagerte sich eine Schicht mit Muskeln und Fettzellen sowie kleinen Gefäßen loses Bindegewebe auf, welches proximal des *Air-Pouch*-Lumens von mehreren Zellschichten mit der Morphologie von squamösen Epithelzellen bedeckt war. PMNs konnten in unterschiedlichem Ausmaß in den Muskeln, dem Bindegewebe und der squamösen Epithelschicht beobachtet werden, was eine aktive Infiltration von PMNs aus den kleinen Gefäßen in das *Air-Pouch*-Lumen vermuten lässt. Dies war bei den *Pouches*, die mit TNF-, 4x2 Gy- und 20 Gy-Kulturüberständen behandelt wurden, am deutlichsten.

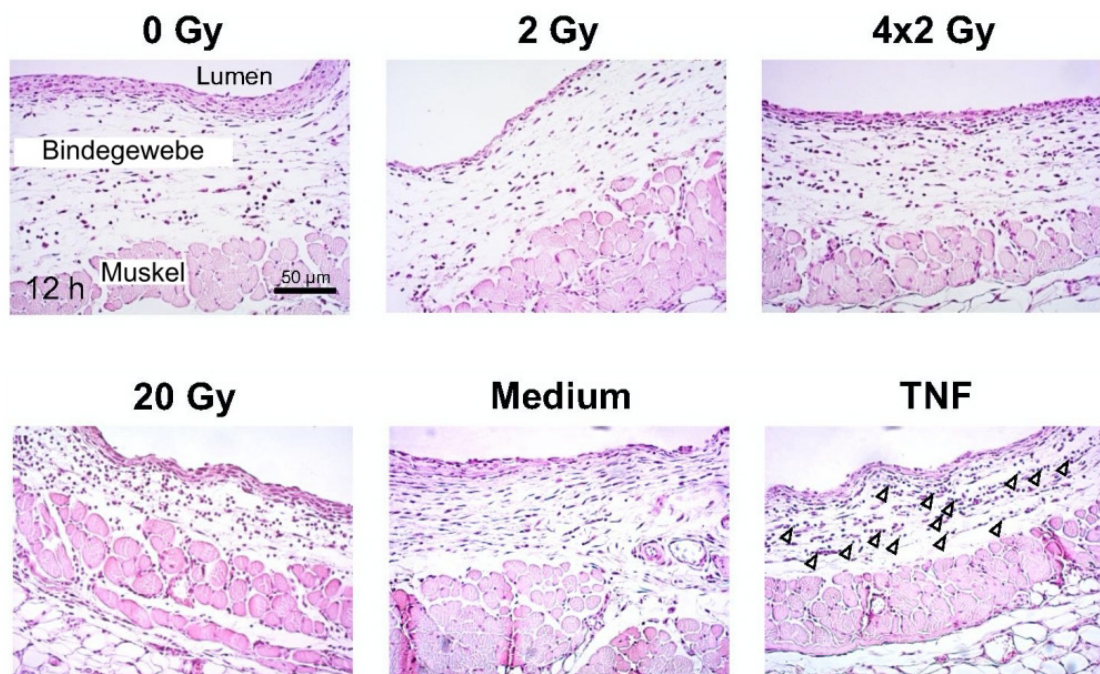


Abb. 7: Paraffinschnitte repräsentativer *Air-Pouch*-Hautproben. H&E-gefärbte, 3 µm dicke Paraffinschnitte repräsentativer *Air-Pouch*-Hautproben 12 Stunden nach Injektion der jeweiligen Kulturüberstände bestrahlter HCC1937-Zellen bzw. der Kontrollstimuli (Medium bzw. 50 ng/ml TNF). 20-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 50 µm. Pfeilspitzen zeigen PMNs in der TNF-Probe (entnommen und modifiziert aus [21]).

Um die Subgruppen der myeloiden Immunzellen sowie den zeitlichen Verlauf ihrer Infiltration zu visualisieren, wurde eine konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie mit den *Air-Pouch*-Hautproben durchgeführt (Abb. 8). Wie zu erkennen ist, akkumulierten Ly6G⁺ neutrophile Granulozyten in der frühen Phase bis zu sechs Stunden nach Injektion. Nach zwölf Stunden verringerte sich der Anteil an Granulozyten, wobei ein Anstieg der F4/80⁺ monozytären/makrophagozytären Zellen beobachtet werden konnte. Die Anzahl der F4/80⁺ Zellen stieg bis vierundzwanzig Stunden nach Injektion der Überstände weiterhin an. Insgesamt gab es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Bestrahlungsregimen, wobei die stärksten Effekte (neben den TNF-Positivkontrollen) mit Überständen von 20 Gy-bestrahlten Zellen beobachtet wurden.

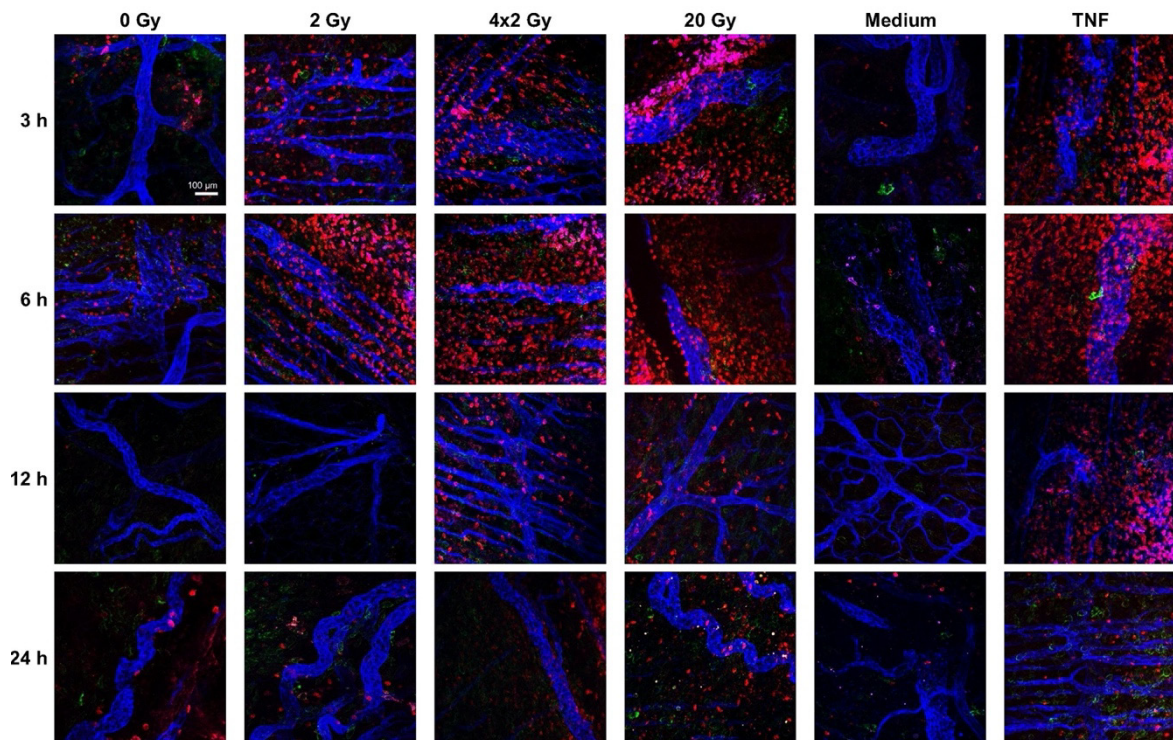


Abb. 8: Konfokale Mikroskopiebilder exemplarischer *Air-Pouch*-Hautproben. Zur Visualisierung von Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen wurde eine Immunfärbung gegen CD31 (blau), Ly6G (rot) und F4/80 (grün) durchgeführt. 20-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm (entnommen und modifiziert aus [21]).

Mittels durchflusszytometrischer Analyse der *Air-Pouch*-Infiltrate konnten die rekrutierten myeloiden Zellen genau charakterisiert und quantifiziert sowie die Dynamik des Infiltrationsprozesses bestimmt werden. Die Anzahl an rekrutierten CD45⁺ Zellen stieg bis zu einem Maximum sechs Stunden nach Injektion von Überständen der HCC1937- (Abb. 9) und HCC1806-Zellen (Abb. 10) an, gefolgt von einem Abfall bis auf das Basisniveau. Unter den CD45⁺ Zellen dominierten Ly6G⁺ Neutrophile, was sich am stärksten zeigte, wenn Überstände von mit 20 Gy bestrahlten Zellen injiziert wurden. Überstände von Zellen, die mit 4x2 Gy und 2 Gy bestrahlt wurden, rekrutierten niedrigere Level von CD45⁺ Zellen, die kaum die Kontrolllevel der Überstände von scheinbestrahlten Zellen überschritten. Neben Neutrophilen konnten Ly6C^{hi} und Ly6C^{low} Monozyten beobachtet werden, jedoch in geringerem Ausmaß. Die Infiltrationskinetik der Ly6C^{hi} und Ly6C^{low} Monozyten war im Vergleich zu den Ly6G⁺ Neutrophilen verzögert und die größte Anzahl an Monozyten wurde zwölf Stunden nach Injektion der Überstände gemessen. Abermals konnten die höchsten Zellzahlen (neben den TNF-Positivkontrollen) mit Überständen von 20 Gy-bestrahlten Zellen detektiert werden, bei Überständen von HCC1806-Zellen zeigten sich diese Unterschiede noch deutlicher.

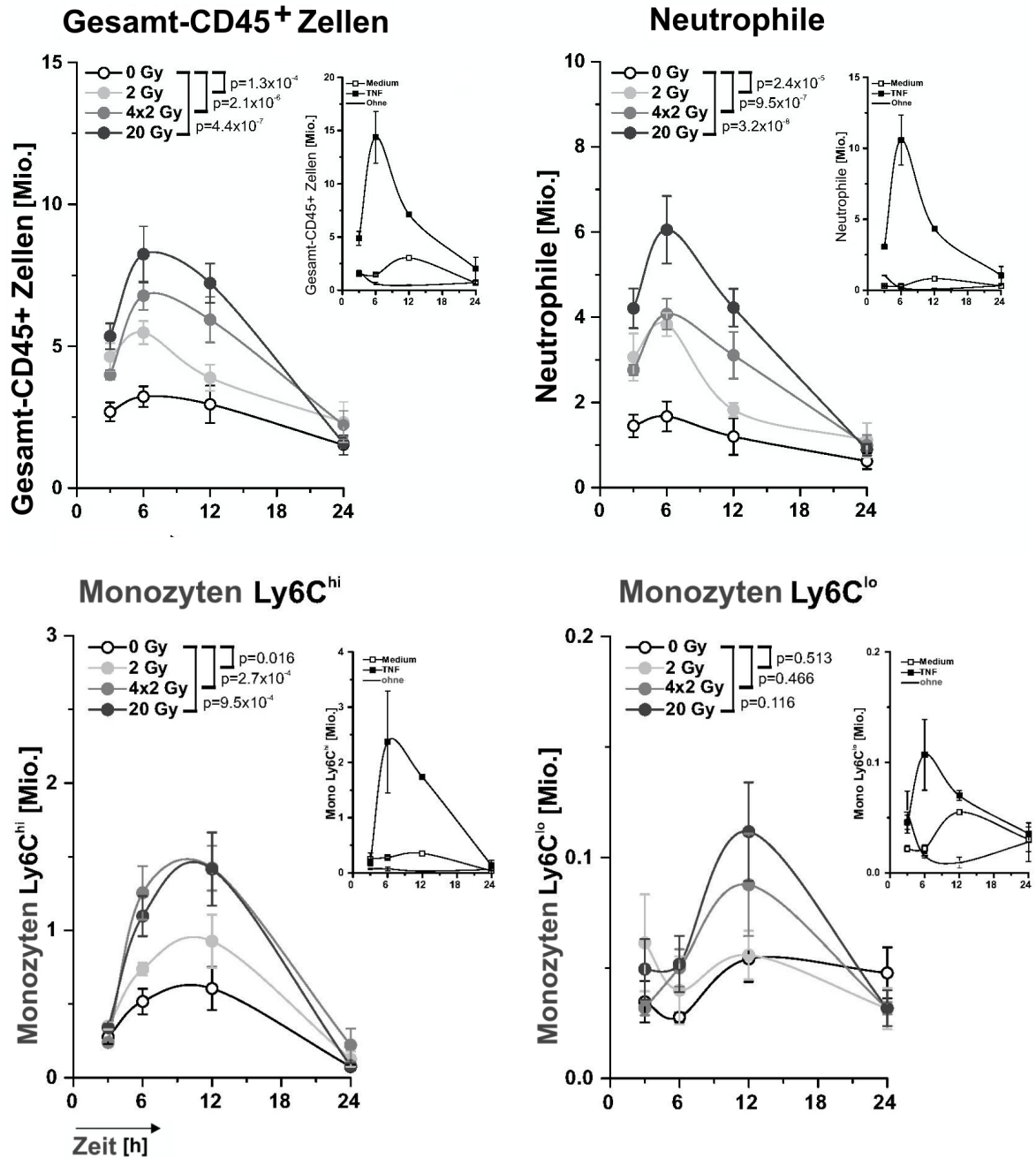


Abb. 9: Durchflusszytometrische Messung der Dynamik der Leukozytenrekretierung in das Air-Pouch-Lumen nach Injektion von Überständen bestrahlter HCC1937-Brustkrebszellen. Gezeigt werden totale Zellzahlen pro Pouch ($n = 4-6$ Tiere für die Überstände, $n = 2$ Tiere für die Kontrollstimuli Medium oder 50 ng/ml TNF). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, p -Werte wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Holm-Korrektur berechnet (entnommen und modifiziert aus [21]).

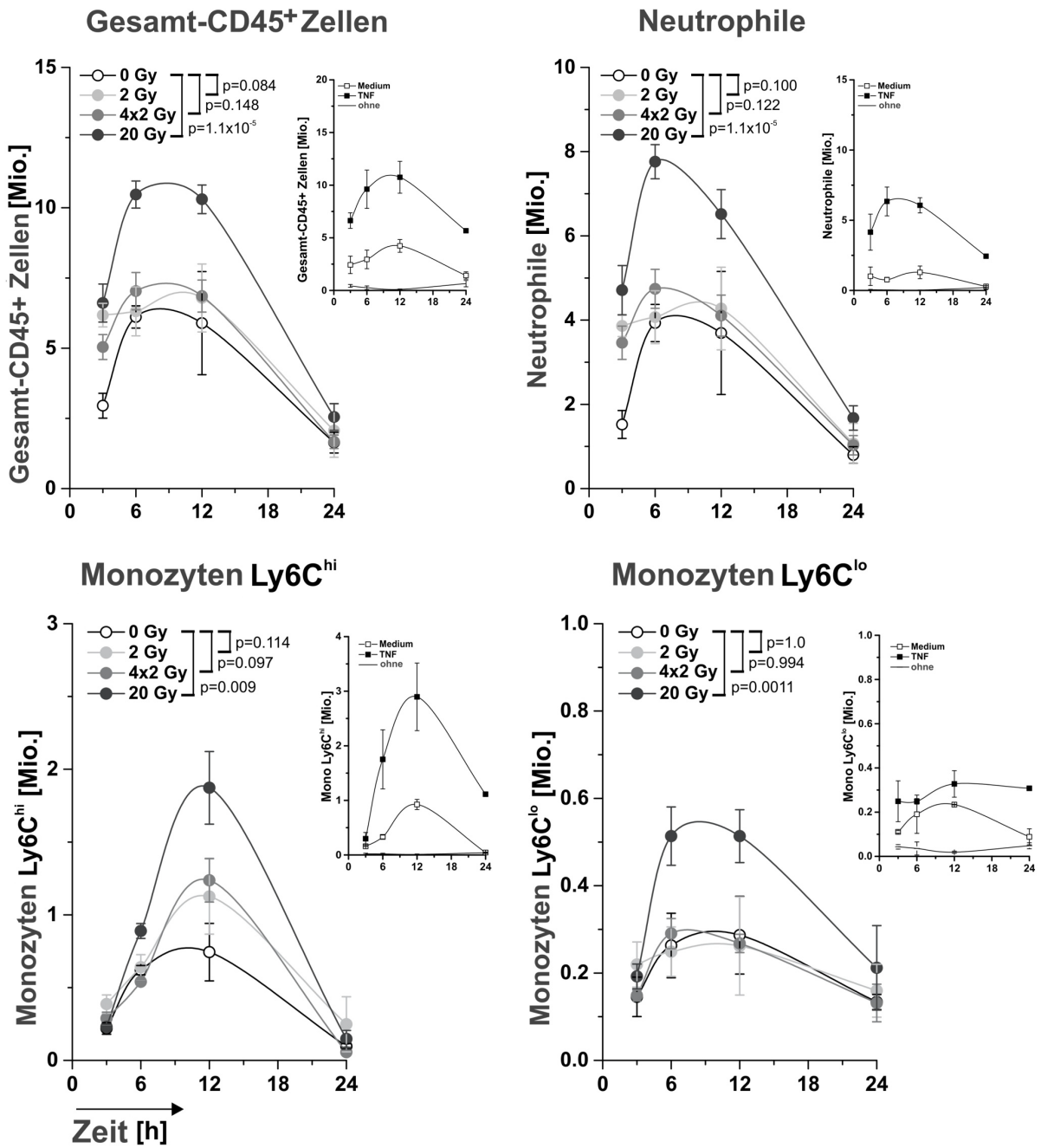


Abb. 10: Durchflusszytometrische Messung der Dynamik der Leukozytenrekretierung in das Air-Pouch-Lumen nach Injektion von Überständen bestrahlter HCC1806-Brustkrebszellen. Gezeigt werden totale Zellzahlen pro Pouch (n = 4-6 Tiere für die Überstände, n = 2 Tiere für die Kontrollstimuli Medium oder 50 ng/ml TNF). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *p*-Werte wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Holm-Korrektur berechnet (entnommen und modifiziert aus [21]).

Quantitative RT-PCR-Analysen der *Air-Pouch*-Hautproben bestätigten die Rekrutierung von myeloiden Zellen durch Überstände sterbender Brustkrebszellen. Die Kinetik der L-Selektin-messenger RNA (mRNA)-Level, einem Leukozytenmarker, entsprach dem Infiltrationsmuster, das mithilfe der Durchflusszytometrie und konfokalen Mikroskopie bereits bestimmt werden konnte. Diesem ging ein früher Anstieg der mRNA-Expression von IL-6 und IL-1 β sowie Chemokinen einschließlich CXCL1, -2 und -3 voraus (Abb. 11). Offenbar wurden Zellen in der *Air-Pouch*-Haut dazu angeregt, diese Mediatoren zu produzieren, wenn sie Überständen von sterbenden Brustkrebszellen ausgesetzt waren, und dadurch die gerichtete Rekrutierung der myeloiden Zellen *in vivo* zu gestalten.

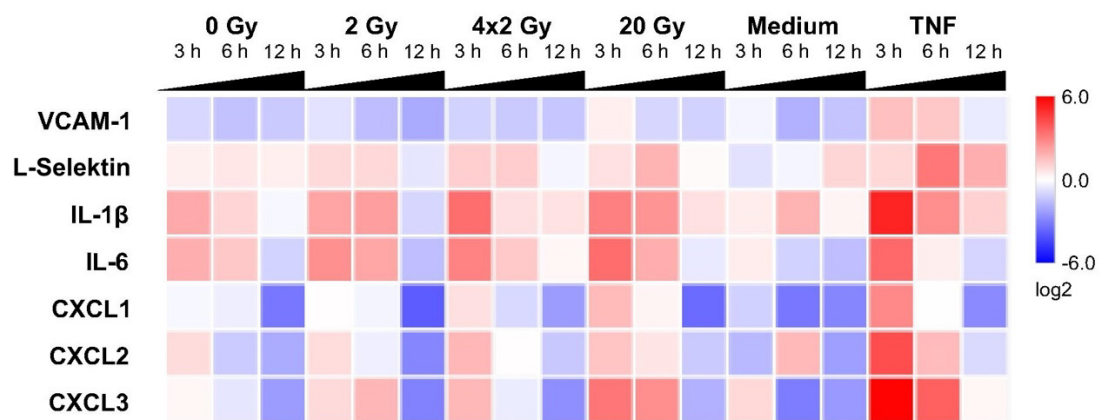


Abb. 11: Messung der mRNA-Expression von Schlüsselmolekülen im *Air-Pouch*-Mikromilieu mittels *realtime* qRT-PCR von *Air-Pouch*-Hautproben (n = 6 Tiere für die Überstände, n = 2 Tiere für die Kontrollstimuli Medium oder 50 ng/ml TNF). Ergebnisse wurden auf eine Matrix der Referenzgene 18S ribosomale RNA, δ -ALAS, β -Aktin, α -Tubulin und CD31 normalisiert und auf die Mediumkontrolle kalibriert. Dargestellt sind Mittelwerte von log₂-Expressionswerten (entnommen und modifiziert aus [21]).

8.2 Endothelzellaktivierung

Die Rekrutierung von Leukozyten zu dem Ort des Gewebeschadens oder der Infektion ist in hohem Maße von der Aktivierung der Endothelzellen abhängig. Aktivierte Endothelzellen exprimieren Adhäsionsmoleküle und setzen Chemokine frei, oder tragen diese an ihrer Oberfläche, um Leukozyten anzulocken und deren Extravasation zu erleichtern bzw. zu ermöglichen [38]. Basierend auf unseren Beobachtungen im *Air-Pouch*-Modell wurde der Einfluss der bestrahlten Brustkrebszellen auf die Endothelzellaktivierung untersucht. Dafür wurden HUVECs mit Überständen von bestrahlten Zellen verschiedener Brustkrebszelllinien

(HCC1937, HCC1806 sowie MDA-MB-436) behandelt und die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin wurde durch Immunfluoreszenz bei nativen, nicht-fixierten Zellen untersucht (Abb. 12). Es konnten deutliche Unterschiede zwischen den Bestrahlungsregimen beobachtet werden: Während bei HUVECs, die mit Überständen von scheinbestrahlten Zellen stimuliert wurden, keine Expression von Adhäsionsmolekülen beobachtet werden konnte, lösten Überstände von 2- und 4x2-Gy-bestrahlten Zellen einen moderaten Anstieg der Oberflächenexpression der untersuchten Adhäsionsmoleküle aus. Die Stimulation mit Überständen von 20 Gy-bestrahlten Zellen bewirkte eine starke Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle auf den HUVECs, nahezu vergleichbar mit den TNF-Positivkontrollen.

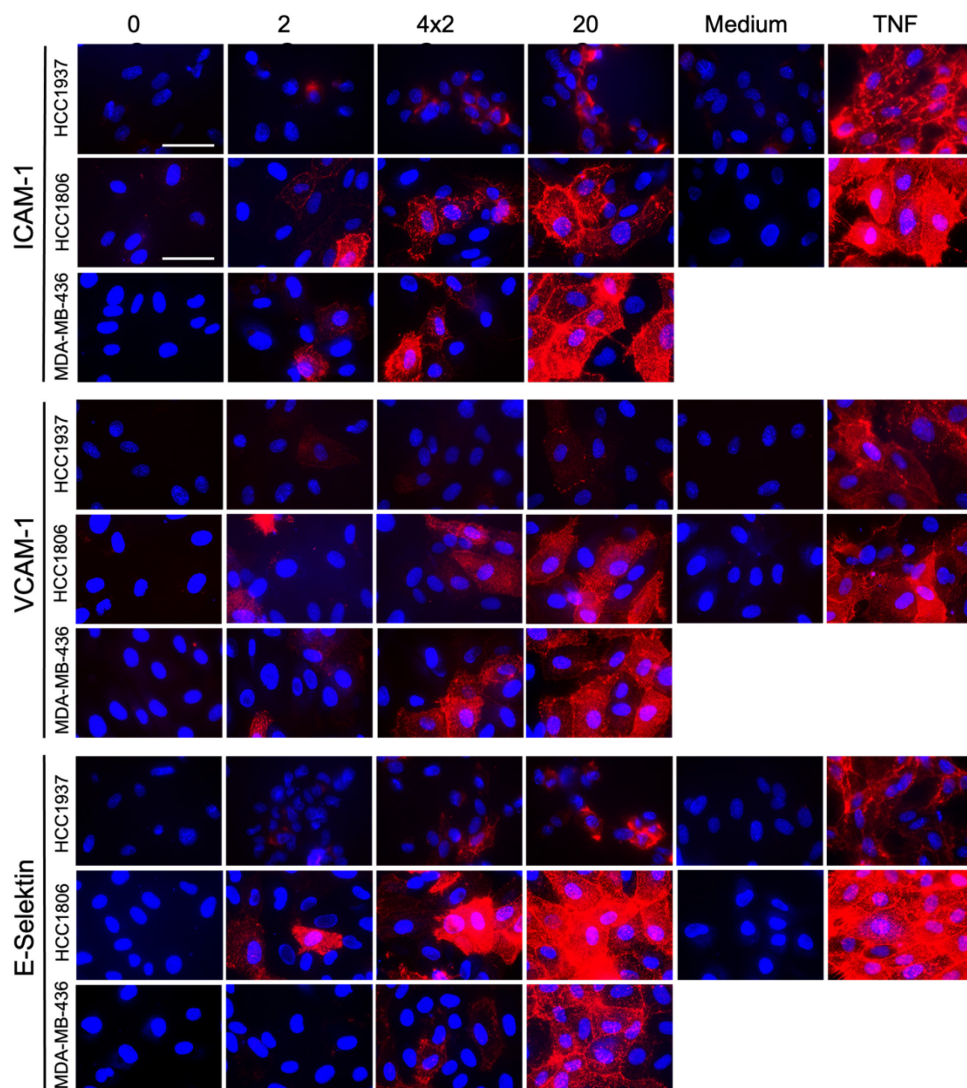


Abb. 12: Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von Adhäsionsmolekülen auf HUVECs 4 Stunden nach Stimulation mit Überständen bestrahlter HCC1937-, HCC1806- und MDA-MB-436-Brustkrebszellen. Visualisierung der Oberflächenexpression nativer, nicht-fixierter HUVECs; Medium und TNF (50 ng/ml) dienen als Kontrollen; 63-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 50 μ m (entnommen und modifiziert aus [21]).

Das Ausmaß der Oberflächenexpression von ICAM-1 und E-Selektin wurde durch fluorometrische Messungen quantifiziert. Diese bestätigten die Beobachtungen der Immunfluoreszenzmikroskopie, da die stärksten Effekte nach Stimulation mit Überständen von Brustkrebszellen beobachtet werden konnten, die mit 20 Gy bestrahlt worden waren (Abb. 13).

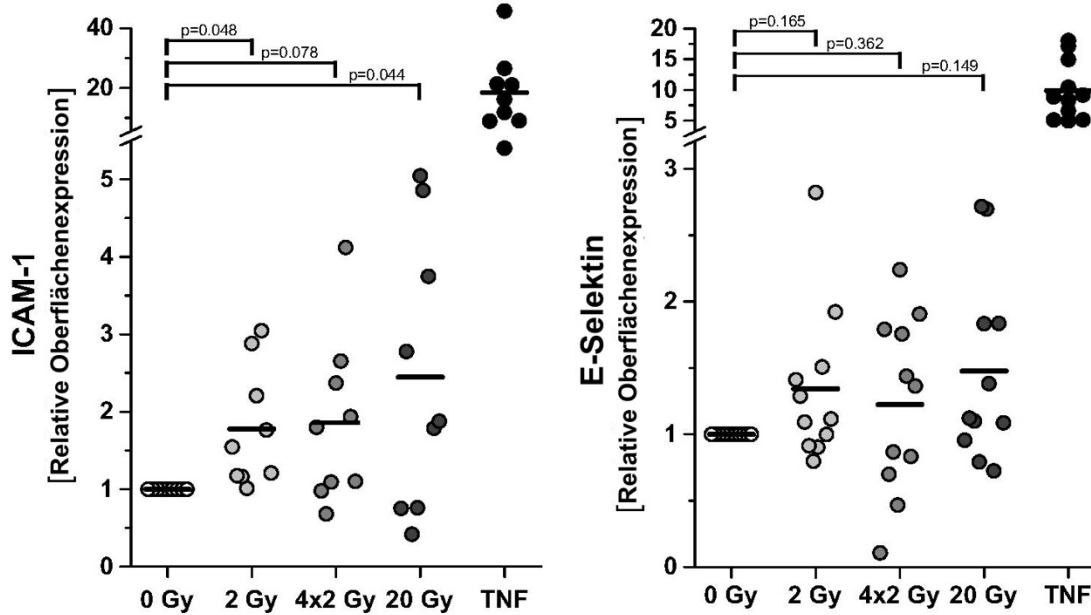


Abb. 13: Quantifizierung der ICAM-1- und E-Selektin-Oberflächenexpression auf HUVECs nach Stimulation mit Überständen bestrahlter HCC1937-Zellen durch fluorometrische Messung. Die relative Oberflächenexpression wurde aus den Mittelwerten der Fluoreszenzintensitäten durch Subtraktion der Isotypkontrollen berechnet und auf die 0 Gy-Proben normalisiert (n = 9 unabhängige Versuche für ICAM-1, n = 11 unabhängige Versuche für E-Selektin); *p*-Werte wurden durch einen ungepaarten Student's *t*-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur berechnet (entnommen und modifiziert aus [21]).

Eine biochemische Charakterisierung zeigte, dass die molekularen Faktoren, die die Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle auf HUVECs anregen, sensitiv für den Verdau durch Proteinase K sind und ein molekulares Gewicht von über 10 kDa aufweisen. Dies lässt vermuten, dass es sich dabei um hochmolekulare Protein-DAMPs und weniger um niedermolekulare DAMPS, wie Nukleotide oder Urat-Salze, handelt (Abb. 14).

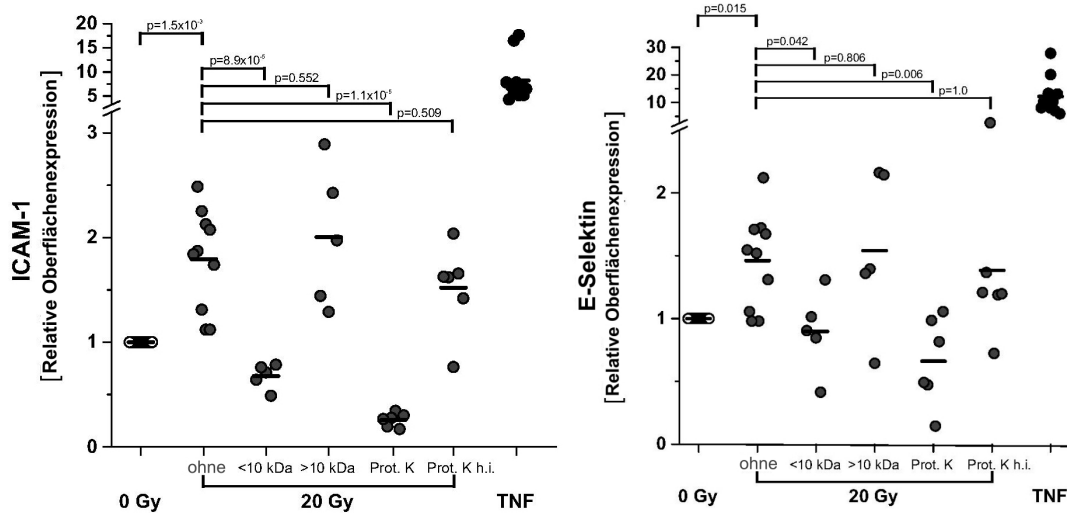


Abb. 14: Biochemische Charakterisierung der Moleküle, die die Hochregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selektin beeinflussen. Membranzenrifugation (Grenzwert bei 10 kDa Molekulargewicht), Behandlung mit Proteinase K oder hitzeinaktivierter Proteinase K der Zellkulturüberstände von bestrahlten HCC1937-Zellen vor der HUVEC Stimulation, Oberflächenexpression wie in Abb. 12 gemessen (n = 5-10 unabhängige Versuche), Gruppenvergleiche mit ungepaartem Student's *t*-Test und Bonferroni-Holm-Korrektur (entnommen und modifiziert aus [21]).

Die Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle konnte durch qRT-PCR-Analysen auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden (Abb. 15). Diese war verbunden mit der Hochregulierung von zahlreichen Chemokinen und Zytokinen, die in die Leukozytenrekrutierung involviert sind und deren Expression ein weiteres Kennzeichen für eine Endothelzellaktivierung darstellt. Bemerkenswerterweise unterschieden sich, trotz einiger Überschneidungen, die Aktivierungsmuster von Endothelzellen, die mit Überständen von bestrahlten Zellen stimuliert wurden, deutlich von den TNF-Positivkontrollen.

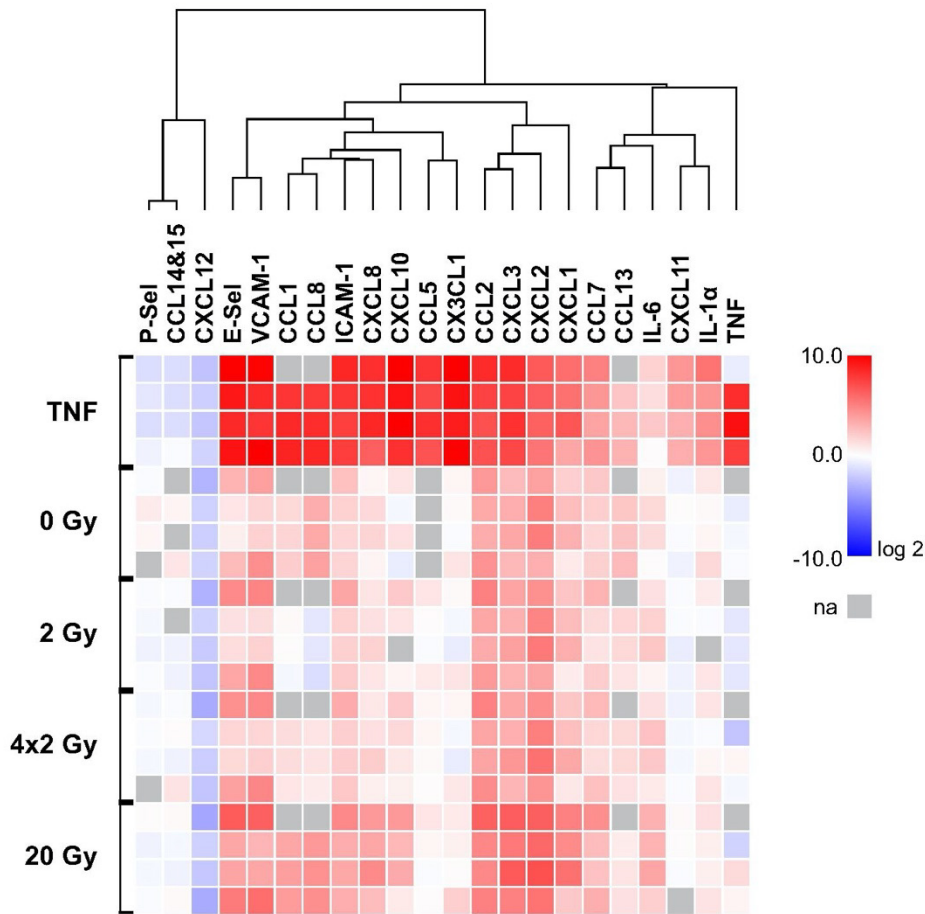


Abb. 15: Bestimmung der mRNA-Expressionslevel von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen in HUVECs durch qRT-PCR. HUVECs wurden mit Überständen bestrahlter HCC1937-Zellen behandelt. Normalisierung auf eine Referenzgen-Matrix aus 18S rRNA, β_2 -Mikroglobulin und δ -ALAS, Kalibrierung auf die jeweiligen Mediumkontrollen, TNF (50 ng/ml) als Positivkontrolle, unüberwachtes, hierarchisches Clustering der \log_2 -Expressionswerte von 4 unabhängigen Versuchen dargestellt, na steht für "nicht analysiert" (entnommen und modifiziert aus [21]).

Mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse konnten schließlich drei Aktivierungscluster identifiziert werden: (i) die Proben der TNF-Positivkontrolle, (ii) die Proben der mit 20 Gy bestrahlten Brustkrebszellen und (iii) die übrigen Proben, einschließlich der anderen Bestrahlungsregime und der Mediumkontrolle. IL-6, CXCL1 und -2 sowie in geringerem Ausmaß CXCL3 und CCL7 schienen die wichtigsten Determinanten der HUVEC-Antwort auf Überstände von 20 Gy-bestrahlten Brustkrebszellen zu sein (Abb. 16).

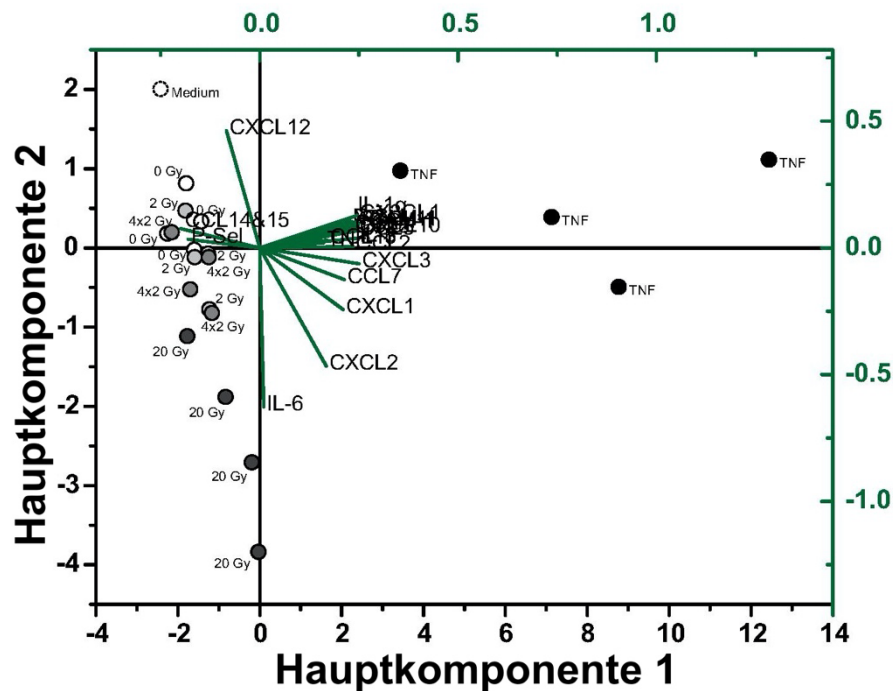


Abb. 16: Hauptkomponentenanalyse der mRNA-Expressionsdaten von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen in HUVECs. Der Biplot zeigt die Eigenwerte der Proben (schwarzes Koordinatensystem) und die Ladungen der Eingangsvariablen (grünes Koordinatensystem) im Teilraum der ersten beiden Hauptkomponenten (entnommen und modifiziert aus [21]).

Multiplex-ELISA-Messungen aus Kulturüberständen der HUVECs bestätigten den Anstieg dieser Zytokine und Chemokine auf Sekretom-Ebene (Abb. 17). Im Vergleich zu scheinbestrahlten Kontrollen und unkonditioniertem Medium wurden von den HUVECs nach Inkubation mit konditioniertem Medium von bestrahlten Brustkrebszellen vermehrt IL-6, CXCL1, CXCL2 und CCL7 sezerniert. Ähnliches wurde auch für CXCL8, CCL2 und IL-1 β beobachtet. Die Proteinlevel der sezernierten Zytokine und Chemokine zeigten ein den mRNA-Level entsprechendes Muster. Der stärkste Anstieg konnte als Reaktion der HUVECs auf Überstände von mit 20 Gy bestrahlten Brustkrebszellen (neben den TNF-Positivkontrollen) gemessen werden, schwächere Effekte zeigten sich mit Überständen von 4x2 und 2 Gy-bestrahlten Zellen.

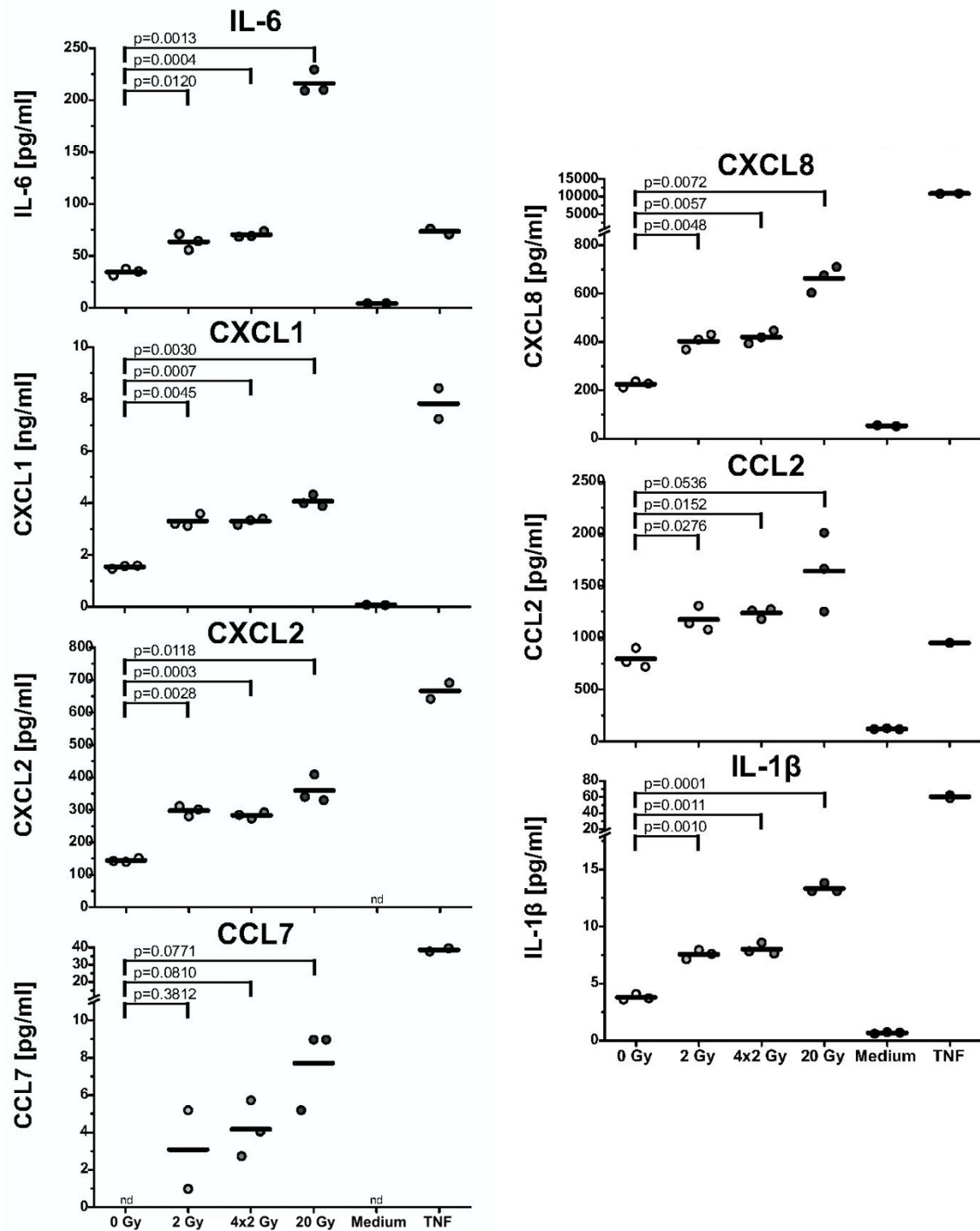


Abb. 17: Multiplex-ELISA-Messung der Zytokine und Chemokine, die von HUVECs nach Exposition gegenüber Überständen bestrahlter HCC1937-Zellen freigesetzt wurden. Konzentrationen wurden auf Grundlage von Standardkurven berechnet, n = 3 unabhängige Versuche dargestellt, p-Werte durch ungepaarten Student's t-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur bestimmt (entnommen und modifiziert aus [21]).

Die Aktivierung der HUVECs zeigte sich auch in tendenziell verstärkter Adhäsion und erhöhtem *Crawlen* der PMNs in *In-vitro*-Flusskammer-Experimenten (Abb. 18), ohne jedoch eine statistische Signifikanz zu erreichen.

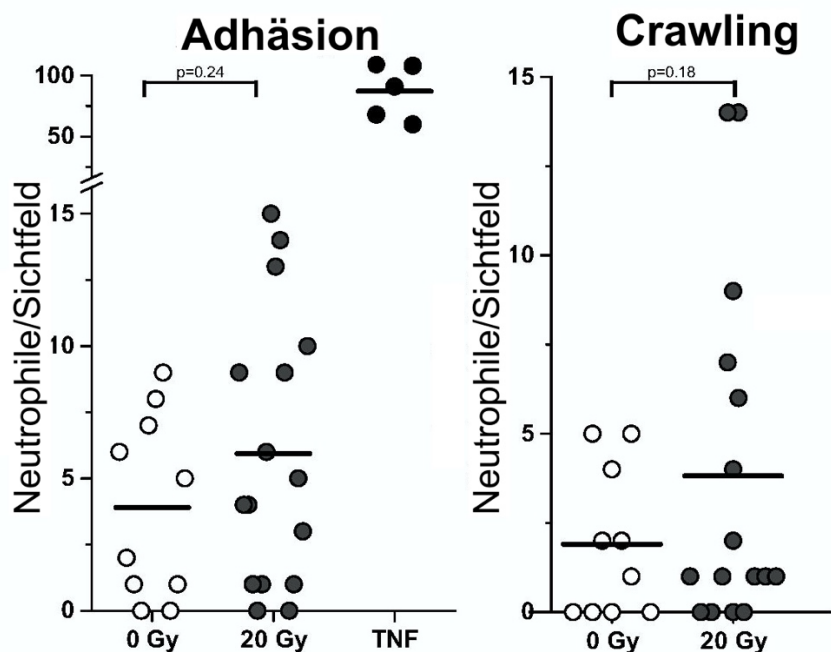


Abb. 18: Funktionelle Analyse der Endothelzellaktivierung in einem Flusskammerversuch. Ergebnisse von $n = 10-16$ unabhängigen Experimenten, Gruppenvergleiche durch ungepaarten Student's t -Test (entnommen und modifiziert aus [21]).

8.3 Differenzierung und Maturierung antigenpräsentierender Zellen

In den *Air-Pouch*-Versuchen konnte keine signifikant erhöhte Rekrutierung von APCs, wie DCs, festgestellt werden. Nichtsdestotrotz besitzen $Ly6C^{hi}$ monozytäre Zellen das Potential, in verschiedene Subgruppen mit antigenpräsentierenden Eigenschaften zu differenzieren [64]. Darauf aufbauend legen weitere Studien in Maus-Tumormodellen nahe, dass monozytäre Zellen zu einer APC-Population differenzieren können, die eine zentrale Rolle für die Induktion von Anti-Tumor-Immunmechanismen in der Krebstherapie spielen [29,65,66]. Für Anthrazyklin-basierte Chemotherapie konnte gezeigt werden, dass sterbende Krebszellen die Differenzierung von rekrutierten Monozyten in APCs stimulieren können [29]. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass ähnliche Effekte auf die Differenzierung und Maturierung von DCs durch bestrahlte, sterbende Krebszellen ausgelöst werden können.

In Differenzierungsexperimenten wurden daher primäre humane Monozyten mit Überständen bestrahlter Brustkrebszellen stimuliert mit anschließender Differenzierung zu DCs durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF für fünf Tage.

Charakteristische Marker der immunologischen Synapse, wurden anschließend auf den monozytären Zellen anhand durchflusszytometrischer Messungen analysiert. Es wurde eine verstärkte Expression der kostimulatorischen Liganden CD80 und CD86, des DC-Maturierungsmarkers CD83, des koaktivierenden Rezeptors CD40 sowie von HLA-DR der MHC-Klasse-II gemessen, nachdem die Monozyten den Überständen bestrahlter Brustkrebszellen ausgesetzt waren. Die auffälligsten Effekte konnten bei der CD80-Oberflächenexpression beobachtet werden. Kulturüberstände von Zellen, die mit 20 Gy bestrahlt wurden, induzierten (neben den LPS-Positivkontrollen) den stärksten Anstieg, während dieser mit Überständen von 4x2 und 2 Gy-bestrahlten Zellen geringer ausfiel (Abb. 19).

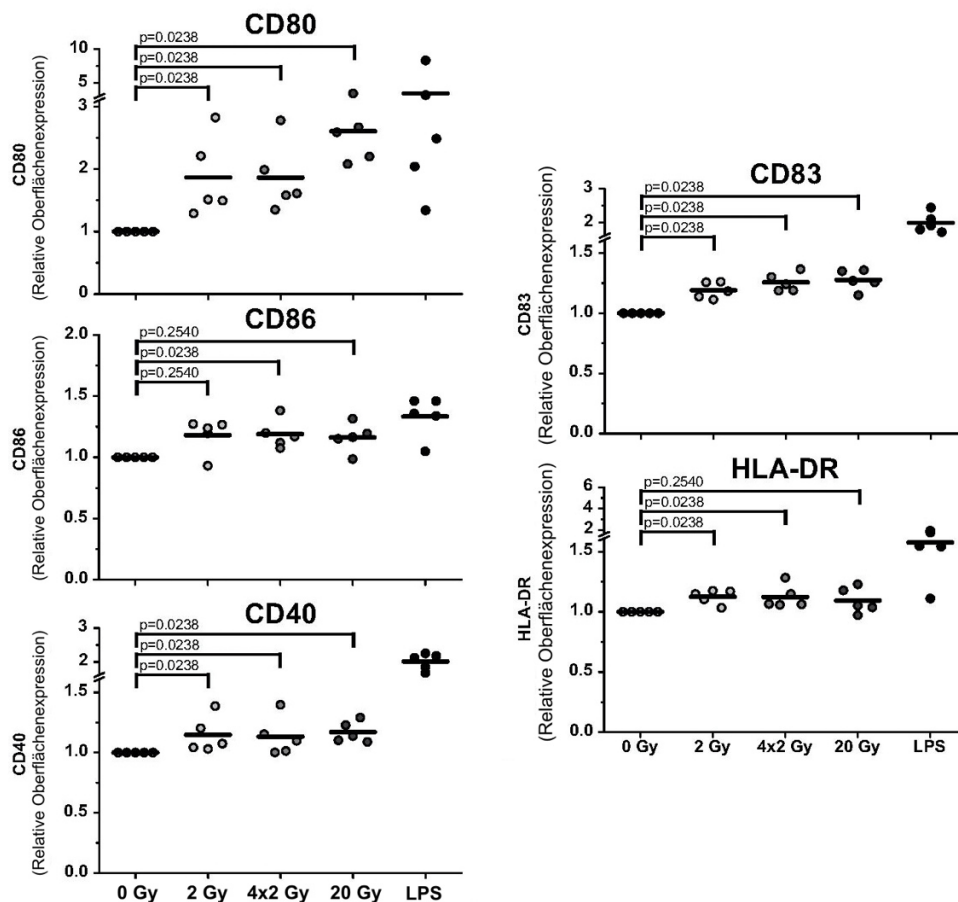


Abb. 19: Differenzierung der aus Monozyten generierten DCs. Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenmarkerexpression. Ein Anstieg wurde als mittlere Fluoreszenzintensität nach Subtraktion der Isotypkontrollen berechnet und auf die jeweiligen 0 Gy Proben normalisiert. Ergebnisse von n = 5 unabhängigen Versuchen, Gruppenvergleiche wurden mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummen-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur durchgeführt (entnommen und modifiziert aus [21]).

Die biochemische Charakterisierung der verantwortlichen DAMPs wurde entsprechend der Versuche zur Endothelzellaktivierung (siehe Abb. 14) durchgeführt und anhand der CD80-Oberflächenexpression gemessen. Abermals wurden Proteine größer 10 kDa als maßgebliche Mediatoren identifiziert (Abb. 20).

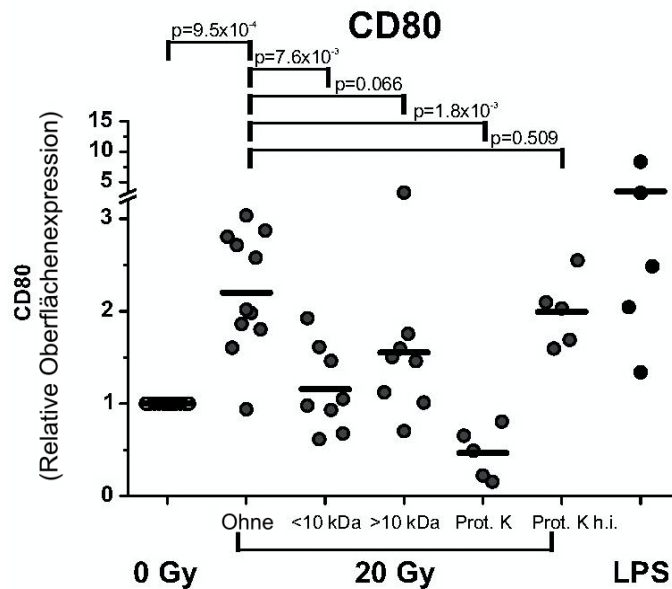


Abb. 20: Biochemische Charakterisierung der für die Differenzierung der Monozyten verantwortlichen Moleküle anhand durchflusszytometrischer Messung der CD80-Oberflächenexpression. Membran-zentrifugation (Porengröße bei 10 kDa) oder Behandlung der Zellkulturüberstände von bestrahlten HCC1937-Zellen mit Proteinase K oder hitzeinaktivierter Proteinase K vor der Inkubation mit den Monozyten. Daten von n = 5-10 unabhängigen Versuchen, Gruppenvergleiche durch zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummen-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur (entnommen und modifiziert aus [21])

Als nächstes wurde der Einfluss von DAMPs, die aus bestrahlten Brustkrebszellen freigesetzt wurden, auf die Reifung von DCs untersucht. Dazu wurden unreife DCs, die über fünf Tage aus primären humanen Monozyten mittels IL-4 und GM-CSF differenziert wurden, für zwei Tage den Überständen der bestrahlten Brustkrebszellen ausgesetzt. Die Veränderungen in dem Expressionsmuster der Marker für DCs waren denen ähnlich, die bei der Monozyten-Differenzierung beobachtet werden konnten. Die stärkste Hochregulierung konnte wiederum bei CD80 gemessen werden. Überstände von 20 Gy-bestrahlten Zellen lösten (neben den TNF-Positivkontrollen) den höchsten Anstieg der CD80-Expression aus (Abb. 21). Die biochemische Charakterisierung zeigte erneut, dass Protein-DAMPs, die größer als 10 kDa waren, für die Hochregulierung verantwortlich waren (Abb. 22).

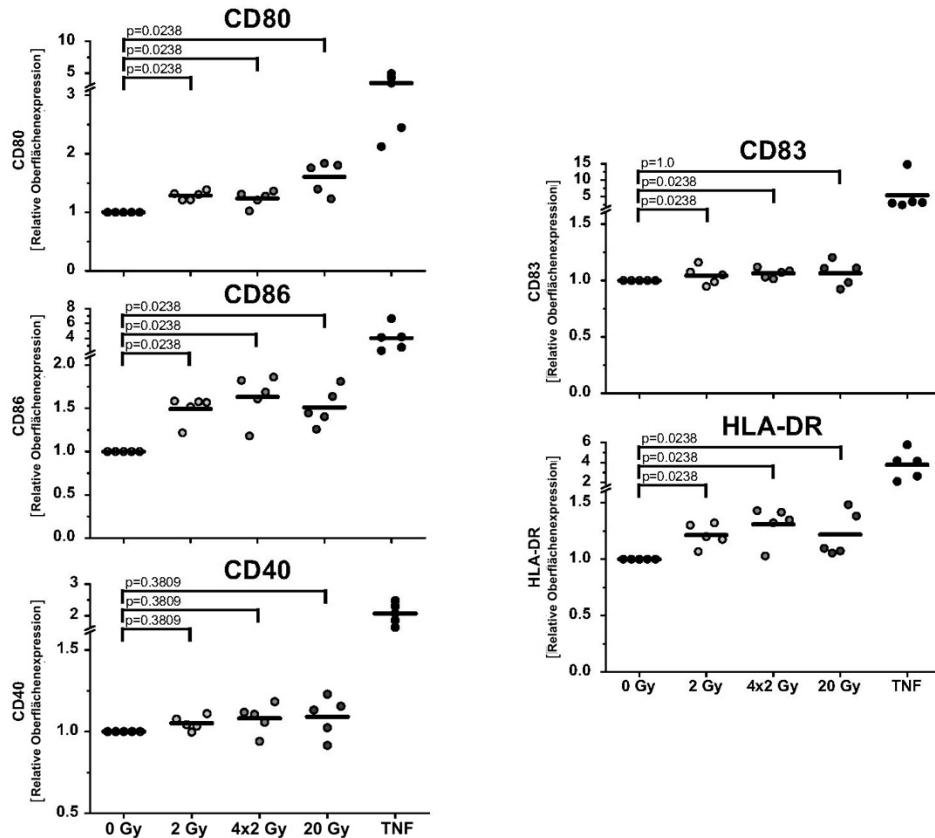


Abb. 21: Maturierung von unreifen DCs unter dem Einfluss der Zellkulturüberstände bestrahlter HCC1937-Zellen. Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenmarker CD80, CD86, CD40, CD83 und HLA-DR, Anstieg der Oberflächenexpression berechnet durch Subtraktion der Isotypkontrollen von den mittleren Fluoreszenzintensitäten, normalisiert auf die jeweiligen 0 Gy Proben, Ergebnisse von n = 5 unabhängigen Experimenten, *p*-Werte mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummen-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur berechnet (entnommen und modifiziert aus [21]).

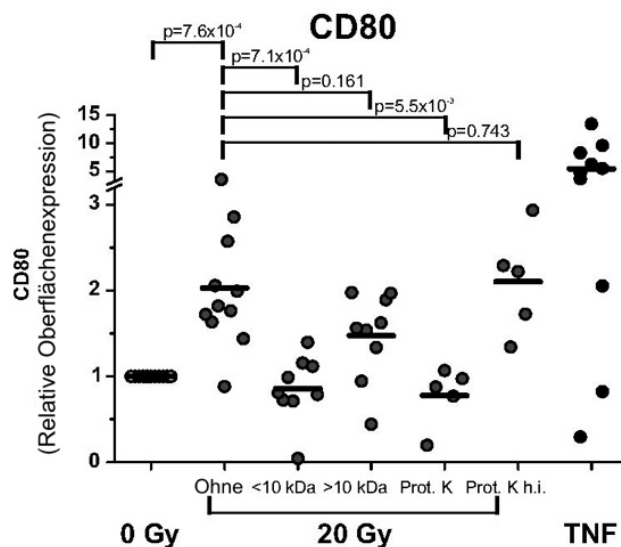


Abb. 22: Biochemische Charakterisierung der für die Maturierung der unreifen DCs verantwortlichen Moleküle anhand durchflusszytometrischer Messung der CD80-Oberflächenexpression. Membran-zentrifugation (Porengröße bei 10 kDa) oder Behandlung der Zellkulturüberstände bestrahlter HCC1937-Zellen mit Proteinase K oder hitzeinaktivierter Proteinase K vor Inkubation mit unreifen DCs, Ergebnisse von 5-10 unabhängigen Versuchen, Gruppenvergleiche durch zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummen-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur (entnommen und modifiziert aus [21]).

8.4 Effektorfunktionen der antigenpräsentierenden Zellen

Nach der Rekrutierung und Differenzierung der APCs ist die Aufnahme von Antigenmaterial sterbender Brustkrebszellen der nächste Schritt, um eine Anti-Tumor-Immunantwort zu erzeugen [26]. Die Aufnahme von Tumor-Antigenen wurde durch die Koinkubation von bestrahlten HCC1937-Zellen mit DCs in steigendem T:E-Verhältnis mittels Durchflusszytometrie untersucht. Wie zu erwarten, stieg der Anteil phagozytischer DCs mit dem Anstieg des T:E-Verhältnisses. Dabei wurden bestrahlte HCC1937-Zellen signifikant besser durch DCs aufgenommen als scheinbestrahlte Kontrollen. Die Zugabe des Aktin-Polymerisations-Inhibitors Cytochalasin D zu den DCs vor dem Versuch konnte die aktive Internalisierung von Tumorzellmaterial bestätigen, da die Behandlung mit dem Zytoskelett-Inhibitor die Phagozytose verhinderte (Abb. 23).

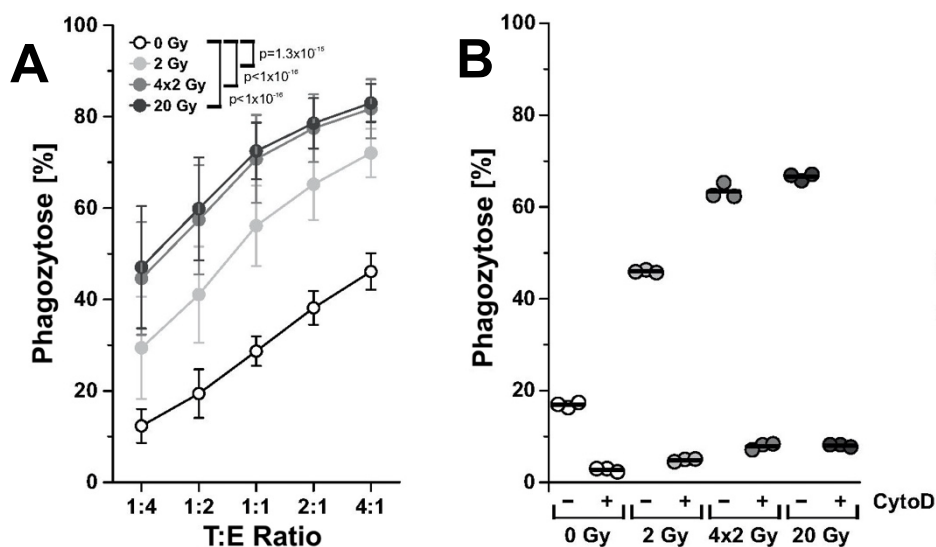


Abb. 23: Durchflusszytometrische Analyse der Phagozytose von bestrahlten Brustkrebszellen durch DCs. (A) Der Anteil an doppelt-positiven DCs (PKH67-gefärbt) mit aufgenommenen HCC1937-Zellen (PKH26-gefärbt) wird als Mittelwerte \pm SD von $n = 5$ unabhängigen Versuchen gezeigt; Gruppenvergleiche mithilfe zweifaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Holm-Korrektur. (B) Behandlung der DCs mit 20 μ M Cytochalasin D für eine Stunde vor dem Phagozytoseexperiment wie in (A) mit einem T:E-Verhältnis von 1:4 (entnommen und modifiziert aus [21]).

Zuletzt wurde die Aktivierung von T-Zellen durch APCs unter dem Einfluss der Überstände bestrahlter HCC1937-Zellen untersucht. Dafür wurde eine MLR mit DCs, welche in Gegenwart von Überständen bestrahlter HCC1937-Zellen aus primären Monozyten differenziert wurden, und allogenen T-Zellen durchgeführt und die Proliferation von CFSE-gelabelten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen mittels

Durchflusszytometrie gemessen. Während die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen nicht signifikant beeinflusst wurde, wurde die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen signifikant gesteigert, wenn die DCs in der Anwesenheit von Überständen mit 20 Gy bestrahlter HCC1937-Zellen differenziert wurden (Abb. 24).

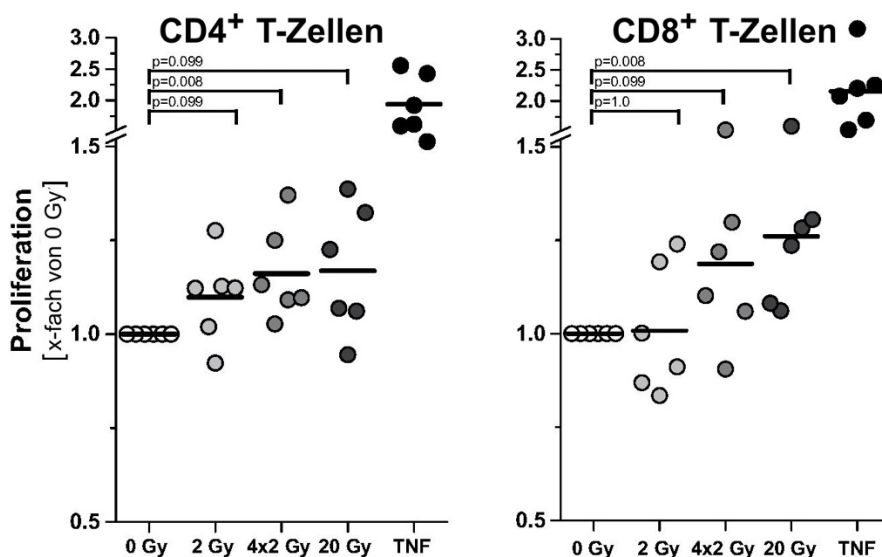


Abb. 24: Aktivierung der T-Zell-Proliferation. Durchflusszytometrische Messung der Proliferation mit CFSE gefärbter T-Zellen nach Koinkubation mit DCs eines allogenen Spenders in einem Verhältnis von 1:5 (DCs : T-Zellen). Der Anteil proliferierter T-Zellen wurde als Anteil der CD3⁺CFSE^{low}CD4⁺ bzw. CD3⁺CFSE^{low}CD8⁺ auf Grundlage aller CD3⁺CD4⁺ bzw. CD3⁺CD8⁺ Zellen errechnet. Ergebnisse wurden auf die zugehörige 0 Gy Probe normalisiert und sind aus Daten von 6 unabhängigen Experimenten angegeben. Gruppenvergleiche wurden mithilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummen-Tests mit Bonferroni-Holm-Korrektur ausgeführt (entnommen und modifiziert aus [21]).

6.5 Protein-DAMPs bestrahlter Brustkrebszellen und beteiligte Rezeptoren

Sowohl bei der Endothelzellaktivierung als auch bei der Differenzierung und Maturierung von APCs konnten Proteine, die größer als 10 kDa waren, als maßgeblich beteiligte DAMPs identifiziert werden. Potenzielle Kandidaten für diese Protein-DAMPs sind HSP70, HMGB1 und das S100A8/A9-Heterodimer, da diese zeit- und dosisabhängig von bestrahlten HCC1937-Zellen freigesetzt wurden, wie durch ELISA-Messungen gezeigt werden konnte. Während die niedrigsten Konzentrationen bei den scheinbestrahlten Kontrollen gemessen wurden, führte eine Bestrahlung mit 2 oder 4x2 Gy zu einem deutlichen Anstieg der DAMP-Konzentration in den Tumorzellüberständen. Die höchsten Konzentrationen wurden nach Bestrahlung der Brustkrebszellen mit 20 Gy gemessen (Abb. 25A), was dem

Muster der Endothelzellaktivierung sowie der Differenzierung und Maturierung der DCs entspricht. Die Freisetzung von HSP70 und HMGB1 konnte ebenfalls in Überständen weiterer triple-negativer Brustkrebszelllinien (HCC1806, MDA-MB-436) nachgewiesen werden, vor allem nach Bestrahlung mit 20 Gy (Abb. 25B).

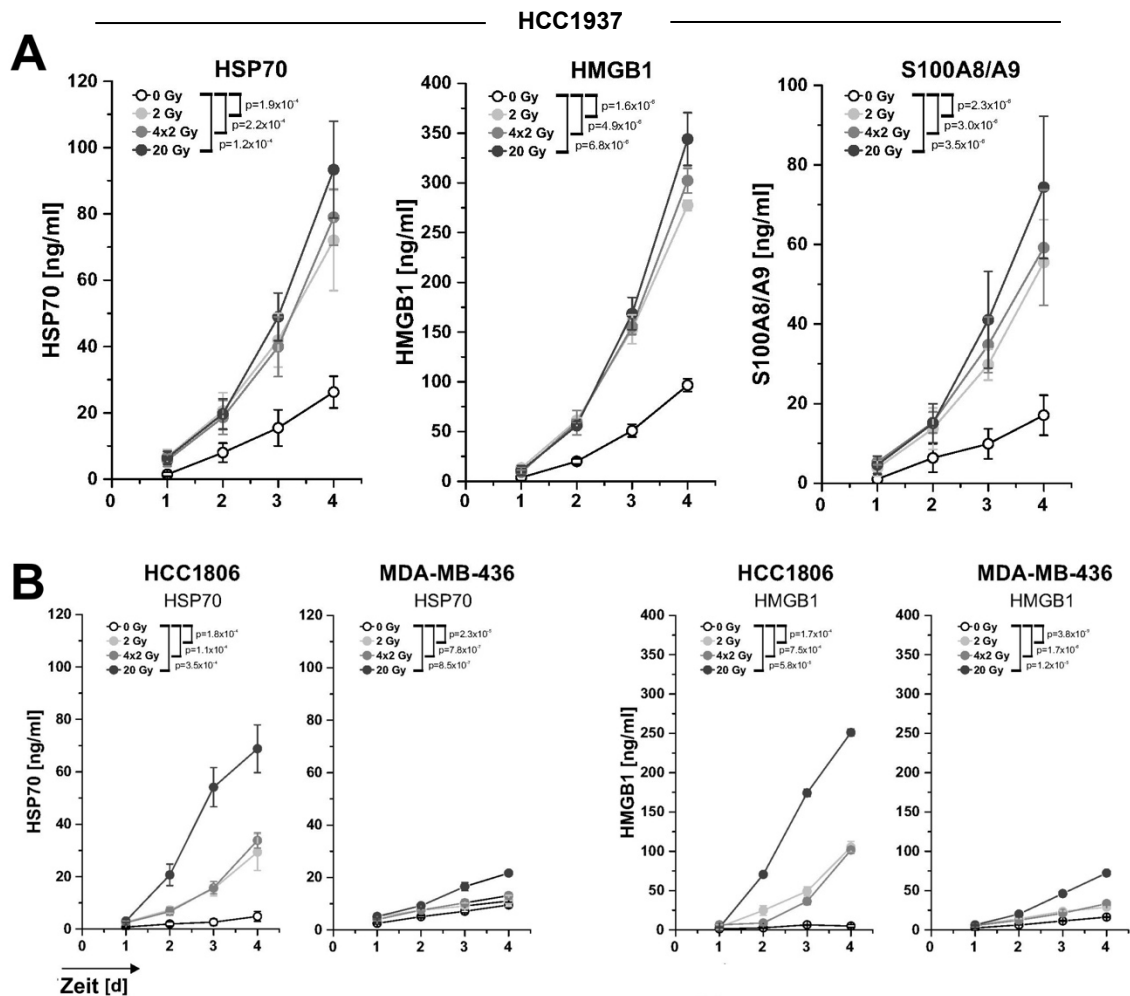


Abb. 25: Quantifizierung von Protein-DAMPs in Überständen bestrahlter Brustkrebszellen im ELISA. (A) HSP70, HMGB1 und S100A8/A9 in den Überständen bestrahlter HCC1937-Zellen. (B) HSP70 und HMGB1 in den Überständen bestrahlter HCC1806- und MDA-MB-436-Zellen. Konzentrationen auf Grundlage von Standardkurven berechnet, Mittelwerte \pm SD von drei (HSP), fünf (S100A8/A9), bzw. vier (HMGB1, HCC1937) unabhängigen Versuchen oder ein repräsentatives Experiment in Triplikaten (HMGB1, HCC1806 und MDA-MB-436), Gruppenvergleiche mittels zweifaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Holm-Korrektur (entnommen und modifiziert aus [21]).

Für die DAMPs HMGB1, HSP70 und S100A8/A9 sind der TLR4 und/oder das TLR2/TLR4-Heterodimer bekannte Rezeptoren [67-69]. Daher untersuchten wir, ob TLR4 und TLR2 an der Endothelzellaktivierung durch die Überstände bestrahlter Brustkrebszellen beteiligt sind. Durch Verwendung des TLR4-Antagonisten RS-LPS, wurde die HUVEC-Aktivierung, gemessen anhand der ICAM-1-Oberflächenexpression, deutlich aber nicht vollständig inhibiert (Abb. 26). In HEK-Blue™-hTLR-Reporter-Zelllinien konnte die Aktivierung von TLR4 und TLR2 durch Überstände bestrahlter Brustkrebszellen bestätigt werden (Abb. 27A und 27B). Daraus lässt sich schließen, dass TLR4 und/oder das TLR2/TLR4-Heterodimer durch Protein-DAMPs aktiviert werden, die von bestrahlten Brustkrebszellen freigesetzt werden, und dadurch an der Regulierung der Endothelzellaktivierung beteiligt sind. Darüber hinaus können weitere Rezeptoren zur HUVEC-Aktivierung beitragen, z.B. der Rezeptor für *advanced glycation endproducts* (RAGE), oder Mitglieder der Scavenger-Rezeptor-Familie, die ebenfalls als DAMP-Rezeptoren beschrieben sind [70].

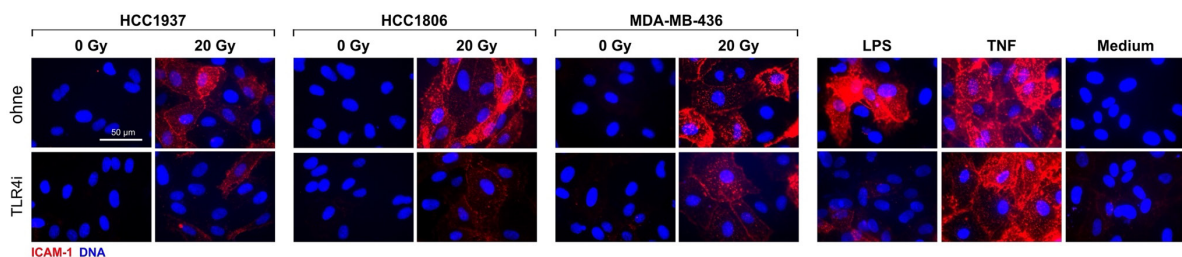


Abb. 26: Hochregulierung der Oberflächenmarkerexpression von Endothelzellen über eine TLR4-Aktivierung durch Überstände bestrahlter Brustkrebszellen. HUVECs wurden für 4 Stunden mit Überständen bestrahlter Brustkrebszellen in An-/Abwesenheit des TLR4-Antagonisten RS-LPS (TLR4i, 10 µg/ml) inkubiert. Medium, LPS (100 ng/ml) und TNF (50 ng/ml) dienen als Kontrollen. Die ICAM-1-Oberflächenexpression wurde durch native Immunfluoreszenzfärbung gemessen. 63fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 50 µm (entnommen und modifiziert aus [21]).

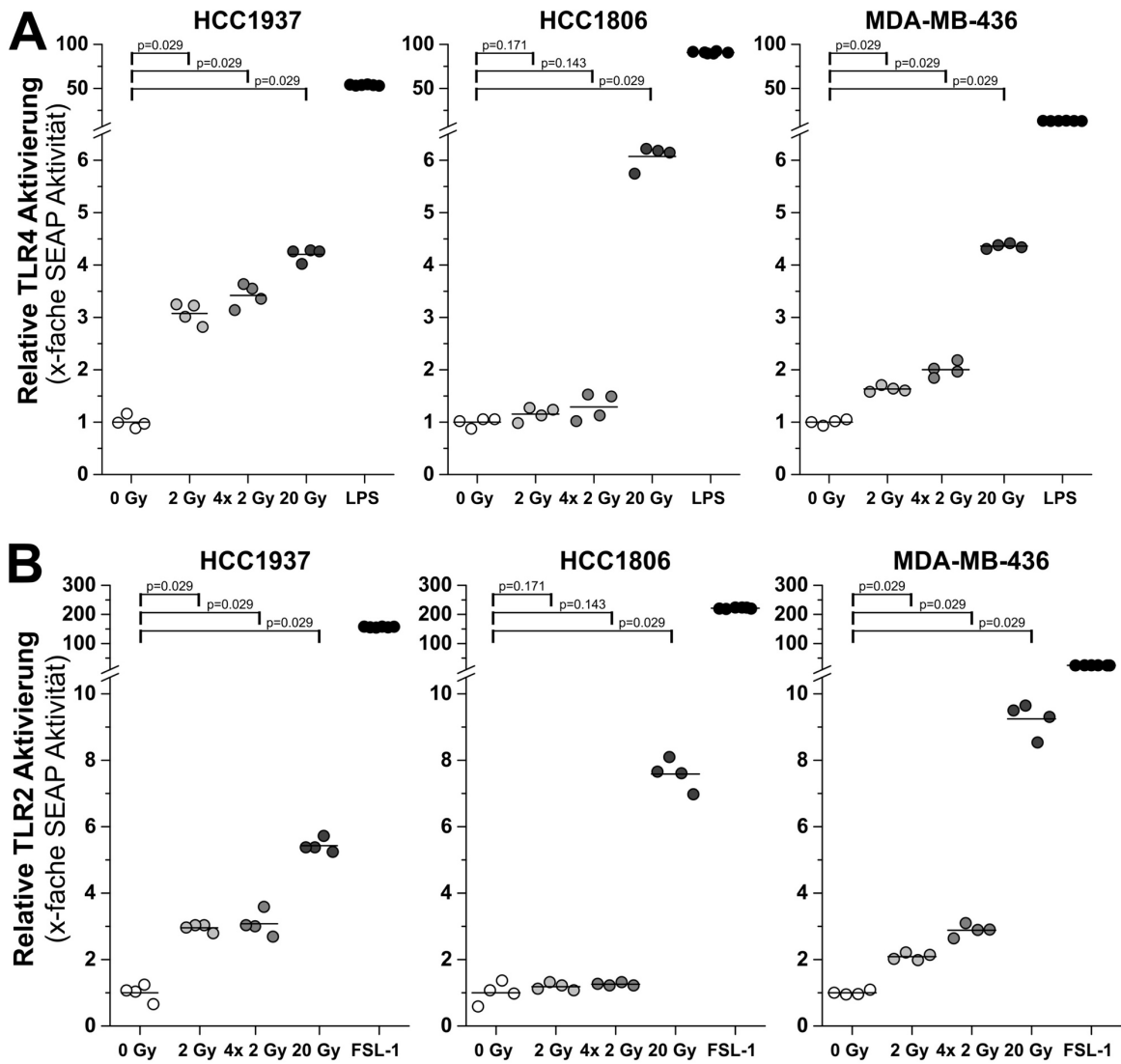


Abb. 27: Aktivierung von TLR4 (A) und TLR2 (B) durch Überstände bestrahlter Brustkrebszellen in HEK-Blue™-hTLR-Reporter-Zelllinien. Exposition von HEK-Blue™ hTLR-Reporter-Zelllinien gegenüber Überständen bestrahlter Brustkrebszellen für 7 Stunden. LPS (10 ng/ml) und FSL-1 (10 ng/ml) dienen als Positivkontrollen. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments, das vierfach ausgeführt wurde. Gruppenvergleiche wurden mithilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummen-Tests durchgeführt (entnommen und modifiziert aus [21]).

9 Diskussion

Die Strahlentherapie ist ein Grundpfeiler der Krebstherapie, der nicht nur bei Brustkrebs die Gesamtüberlebensdauer signifikant verlängern kann [71]. Zusätzlich zu ihren direkten, tumoriziden Effekten verursacht die Strahlentherapie erhebliche Veränderungen im Tumor-Mikromilieu [72] und die durch Strahlentherapie vermittelte Induktion von Anti-Tumor-Immunmechanismen im Sinne einer *In-situ*-Vakzinierung gilt mittlerweile als etabliert [19,27]. Umstritten bleiben jedoch die optimale Strahlendosis als auch die wirksamste Fraktionierung, um durch ionisierende Strahlung eine Anti-Tumor-Immunantwort hervorzurufen [49,73-75].

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden die initialen Schritte bei der Induktion einer Anti-Tumor-Immunantwort durch Strahlentherapie systematisch in sich ergänzenden *In-vivo*- und *In-vitro*-Modellen analysiert. Mit dem Fokus auf triple-negativen Brustkrebs als Modelltumorentität wurde untersucht, welche Effekte DAMPs, die von sterbenden Brustkrebszellen freigesetzt werden, auf die Aktivierung von Endothelzellen, die Rekrutierung und Differenzierung von APCs und die Stimulation von T-Zell-Antworten im Rahmen von verschiedenen Bestrahlungsdosen und Fraktionierungs-Regimen haben.

Die Aktivierung von Endothelzellen ist eine Voraussetzung für die Rekrutierung der Immunzellen aus dem Blutstrom zum Ort der Entzündung oder des Gewebeschadens. Aktivierte Endothelzellen exprimieren verstärkt Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1, setzen Chemokine frei und/oder präsentieren diese auf ihrer Oberfläche, um die Extravasation von Leukozyten aus der Blutbahn in das Gewebe zu ermöglichen [38]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke Hochregulierung von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen beobachtet werden, die von Protein-DAMPs ausgelöst wurde, die aus bestrahlten, sterbenden Brustkrebszellen freigesetzt wurden. Dies war Teil eines Aktivierungszustands, der sich klar von dem durch den (patho)physiologischen Endothelzellstimulus TNF ausgelösten unterschied und durch die Induktion und Freisetzung der Zytokine/Chemokine IL-6, CXCL1, CXCL2 und CCL7 gekennzeichnet war.

Am deutlichsten war dieser Effekt bei Stimulation der Endothelzellen mit Überständen 20 Gy-bestrahlter Brustkrebszellen, die zu dem Zeitpunkt, als die Überstände gesammelt wurden, eine spät einsetzenden Form der primären Nekrose

unterlaufen hatten [35]. Ähnliche Formen der Endothelzell- oder Perizytenaktivierung wurden auf dem Gebiet der sterilen Entzündung mithilfe anderer experimenteller Modelle (*laser injury*- und *hot needle injury*-induziert) bereits beschrieben [76-78].

Ganz offensichtlich ähneln sich die Nekroseformen, die durch eine einmalige Hochdosisbestrahlung, *laser injury*, oder *hot needle injury* ausgelöst werden, unabhängig davon, ob es sich um maligne Zellen handelt oder nicht. Dies gilt auch für das Repertoire an freigesetzten DAMPs. Anhand der Kaskade-Dynamik der Rekrutierung myeloider Zellen kann dies weiter hervorgehoben werden: Anfangs werden neutrophile Granulozyten rekrutiert, gefolgt von monozytären Zellen [79]. Dies scheint sich von der intratumoralen Leukozytenrekrutierung zu unterscheiden, die im Kontext der Anthrazyklin-basierten Chemotherapie beschrieben ist. Hier wurden ATP, CCL2 und CCL7, die sterbenden Tumorzellen entstammten, als die maßgeblichen Faktoren für die Monozytenrekrutierung identifiziert und es ist keine initiale Neutrophilenphase beschrieben [29,65].

Obwohl Nukleotide wie ATP von bestrahlten Tumorzellen freigesetzt werden und eine chemokinetische Monozytenmigration *in vitro* stimulieren können, scheinen sie weder eine gerichtete Monozytenmigration auszulösen, noch zu einer Endothelzellaktivierung beizutragen [35]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Nukleotide als lokale Verstärker von Rekrutierungssignalen wirken können [80,81].

Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch sterbende Tumorzellen konnte vor kurzem in einem Mausmodell beschrieben werden, bei dem Kulturüberstände von Tumorzellen, behandelt mit Tunicamycin oder Mitoxantron, in die Ohrmuscheln von Mäusen injiziert wurden, sowie bei verschiedenen Maus-Flankentumormodellen, die mit hohen Einzeldosen von 15 Gy bestrahlt wurden [82,83]. Dies bestätigt unsere Ergebnisse des *Air-Pouch*-Versuches. Die Autoren dieser Studien konnten zudem beobachten, dass CXCL1 zusammen mit CCL2, CXCL10 und G-CSF bei der beschriebenen Neutrophilenrekrutierung einen erheblichen Beitrag leistete.

Welche Rolle die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten durch sterbende Tumorzellen bei Strahlen- und Chemotherapie spielt, ist noch weitestgehend unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass neutrophile Granulozyten sterbende Tumorzellen aufnehmen sowie eine zytotoxische Aktivität gegen

verbleibende, Therapie-resistente Tumorzellen aufweisen und dadurch zur Therapie-induzierten Tumorkontrolle beitragen können [82,83]. Darüber hinaus können neutrophile Granulozyten ein günstiges Chemokin-Milieu für die Invasion von monozytären Zellen und Tumor-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen schaffen [79,83].

Die Rolle der intratumoral rekrutierten, monozytären Zellen in therapeutischen Settings ist klar vom Subtyp dieser Zellen abhängig. Für Anthrazyklin-basierte Chemotherapie konnte gezeigt werden, dass eine intratumorale Infiltration von Ly6C^{hi} monozytären Zellen ausgelöst wurde, welche im Verlauf zu potenten APCs differenzierten [29,65]. Zudem scheinen Ly6C^{hi} Monozyten *per se* zur Efferozytose sterbender Tumorzellen fähig zu sein sowie zur Kreuzpräsentation von Tumorantigenen zu CD8⁺ T-Zellen [84]. Inflammatorische, Ly6C^{hi} Monozyten weisen jedoch auch phenotypische Eigenschaften von tumorprogressionsfördernden, monozytären MDSCs auf [85].

Eine neuere Studie konnte den Nachweis erbringen, dass sich antigen-präsentierende Ly6C^{hi}CD103⁺ monozytäre Zellen, die unter Chemotherapie mit dem Vanadiumkomplex VO-OHpic und Cyclophosphamid intratumoral akkumulieren und entscheidende Funktionen als "Ersthelfer" bei der Initiierung einer antitumoralen Immunantwort innehaben, sowohl aus Tumor-residenten MDSCs wie auch aus monozytären Vorläuferzellen des Knochenmarks bilden können [66]. Daher wäre es interessant, die Differenzierung und Funktionalität der Ly6C^{hi} Monozyten, die in unserem Modell durch Kulturüberstände von bestrahlten Brustkrebszellen rekrutiert wurden, näher zu untersuchen, insbesondere ob sich aus ihnen im Hinblick auf die Differenzierung die Ly6C^{low} monozytäre Population bildet, die in den *Air-Pouches* zu finden war, oder ob diese Zellen eher Tumor-residenten Ursprungs sind [86].

Was die Differenzierung und Funktionalität betrifft, konnte gezeigt werden, dass frisch rekrutierte, monozytäre Zellen mit dem CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{hi} Phänotyp die Expression kostimulatorischer Marker hochregulieren und wirksam eine antitumorale Immunantwort auszulösen scheinen [29,66]. Dies stimmt mit unseren *In-vitro*-Beobachtungen humaner Monozyten überein, deren Differenzierung zu DCs, die Maturierung dieser und insbesondere die Hochregulierung von CD80 und CD86 unter dem Einfluss von Überständen bestrahlter Brustkrebszellen angeregt wurden. Funktionell wurde dies von einer verbesserten Stimulierung allogener CD8⁺

und in geringerem Ausmaß CD4⁺ T-Zellen begleitet. Die stärksten Effekte zeigten sich hierbei mit Überständen von Brustkrebszellen, die mit 20 Gy bestrahlt wurden. Diese Beobachtungen passen zu früheren Berichten, dass eine lokale und systemische antitumorale Immunität durch Strahlentherapie auf CD8⁺ T-Zellen beruht [49,54].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass Protein-DAMPs mit einem molekularen Gewicht von über 10 kDa für die Endothelzellaktivierung, sowie für die Differenzierung und Maturierung von APCs verantwortlich sind, während die migratorische Aktivität der monozytären Zellen, wie in früheren Studien gezeigt, hauptsächlich durch Apyrase-sensitive Nukleotide mit niedrigem molekularem Gewicht beeinflusst wurde [35]. Da verschiedene Klassen von DAMPs offenbar sich ergänzende Funktionen aufweisen, benötigt es weitere Untersuchungen, um die Details ihrer Beteiligung an dieser Immunaktivierung zu charakterisieren.

Innerhalb der Klasse der Protein-DAMPs wurden in den Überständen bestrahlter Brustkrebszellen hohe Level von HMGB1, HSP70 und S100A8/A9 gemessen. Diese DAMPs sind dafür bekannt, wirksame Mediatoren der Endothelzellaktivierung sowie der Rekrutierung und Differenzierung von APCs zu sein [87-89] und ihre Funktionen über gängige Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, einschließlich RAGE, TLR4 bzw. das TLR2/TLR4-Heterodimer und Teile der Scavenger-Rezeptor-Familie, auszuüben [90-92]. Dementsprechend konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass eine durch Protein-DAMPs stimulierte TLR4-Signaltransduktion für eine antitumorale Immunaktivierung durch Strahlen- bzw. Chemotherapie essentiell ist [93,94]. Unsere Ergebnisse zur TLR4- und TLR2- Aktivierung und ihre Beteiligung an der Endothelzellaktivierung konnten diese Arbeiten bestätigen. Ob und in welchem Ausmaß diese Rezeptor-Liganden-Interaktionen für zielgerichtete, therapeutische Interventionen in der Krebsbehandlung mit kombinierten, strahlentherapeutischen Ansätzen zugänglich sein könnten, bedarf weiterer Untersuchungen.

10 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein Beitrag zum Verständnis der frühen Schritte einer antitumoralen Immunaktivierung im Kontext der Strahlentherapie geleistet werden.

Die Daten zeigen, dass vor allem eine einzelne Hochdosisbestrahlung (ablative Bestrahlung) zur Freisetzung von Protein-DAMPs führt, was einen Aktivierungszustand in den Endothelzellen hervorruft. Dieser ist durch die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen sowie einem spezifischen Zytokin- und Chemokinprofil, dominiert von IL-6, CXCL-1, -2, -3 und CCL7, charakterisiert. Die aktivierten Endothelzellen sind in der Lage, sequentiell neutrophile Granulozyten und monozytäre Zellen *in vivo* zu rekrutieren. *In vitro* tragen die von sterbenden Brustkrebszellen freigesetzten DAMPs maßgeblich zur Differenzierung und Maturierung von humanen, sich aus Monozyten entwickelnden DCs bei, was wiederum zu einer verbesserten CD8⁺ T-Zell-Aktivierung führt.

Damit unterstützen und erweitern die Ergebnisse dieser Arbeit das Konzept zur Induktion antitumoraler Immunmechanismen durch Radiotherapie.

11 Zusammenfassung

Es ist das wichtigste Ziel der Strahlentherapie, Tumorzellen abzutöten. Darüber hinaus kann Strahlentherapie auch als eine Art Tumor-*In-situ*-Vakzinierung fungieren, indem sie dem Immunsystem Tumorantigene zugänglich macht und Adjuvantien in Form von Gefahrensignalen (DAMPs) zur Verfügung stellt, die eine erfolgreiche Immunantwort gegen den Tumor stimulieren. Hierbei sind sowohl die Form des Tumorzelltodes als auch die Zusammensetzung der freigesetzten DAMPs von großer Bedeutung, da sie die anfängliche Phase der Immunaktivierung, das *Priming*, bestimmen. Das Ausmaß der stimulierten Immunantwort kann jedoch stark variieren und die optimale Dosierung und Fraktionierung der Bestrahlung bleiben weiterhin zu großen Teilen umstritten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Fokus auf triple-negativen Brustkrebs die initialen Schritte einer antitumoralen Immunantwort durch Strahlentherapie anhand von verschiedenen Bestrahlungsregimen (20 Gy, 4x2 Gy, 2 Gy, 0 Gy) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. In Vorarbeiten hatte unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass besonders eine einmalige Hochdosisbestrahlung mit 20 Gy eine verzögerte Form der primären Nekrose, mit den Charakteristika der mitotischen Katastrophe und Desintegration der Plasmamembran, in triple-negativen Brustkrebszellen induzieren kann.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass Protein-DAMPs, die von bestrahlten, sterbenden Brustkrebszellen freigesetzt werden, die sequentielle Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten *in vivo* stimulieren können. Hierbei scheinen Endothelzellen eine Schlüsselfunktion innezuhaben, da sie unter Einwirkung der Überstände bestrahlter Brustkrebszellen in einen Aktivierungszustand übertreten, der durch eine hohe Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen sowie die Produktion und Freisetzung eines spezifischen Zytokin- und Chemokinprofils gekennzeichnet ist. Darüber hinaus haben diese von bestrahlten Brustkrebszellen freigesetzten Protein-DAMPs die Differenzierung und Maturierung von DCs verstärkt, was anhand einer erhöhten Expression von kostimulatorischen Molekülen ersichtlich war. Dies führte wiederum zu einer besseren T-Zell-Aktivierung, insbesondere für CD8⁺ T-Zellen.

Die untersuchten immunologischen Prozesse folgten durchwegs einem wiederkehrenden Muster: Die stärksten Effekte konnten mit Überständen von Brustkrebszellen beobachtet werden, die mit 20 Gy bestrahlt wurden. Das *Priming* einer antitumoralen Immunantwort durch Strahlentherapie wird, zumindest bei der Betrachtung von triple-negativen Brustkrebszellen, offensichtlich besonders durch eine einmalige Hochdosis-Bestrahlung stimuliert.

12 Referenzen

1. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Sep 23;5(1):66.
2. Holleczer B, Brenner H. Provision of breast cancer care and survival in Germany - results from a population-based high-resolution study from Saarland. *BMC Cancer*. 2014 Oct 10;14(1):757–12.
3. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. 2011. pp. 1736–47.
4. Mayer IA, Abramson VG, Lehmann BD, Pietenpol JA. New strategies for triple-negative breast cancer--deciphering the heterogeneity. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb 15;20(4):782–90.
5. Andreopoulou E, Schweber SJ, Sparano JA, McDaid HM. Therapies for triple negative breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2015 May;16(7):983–98.
6. Jitariu A-A, Cîmpean AM, Ribatti D, Raica M. Triple negative breast cancer: the kiss of death. *Oncotarget*. 2017 Jul 11;8(28):46652–62.
7. Nagini S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17(2):152–63.
8. Damaskos C, Garmpi A, Nikolettos K, Vavourakis M, Diamantis E, Patsouras A, Farmaki P, Nonni A, Dimitroulis D, Mantas D, Antoniou EA, Nikolettos N, Kontzoglou K, Garmpis N. Triple-Negative Breast Cancer: The Progress of Targeted Therapies and Future Tendencies. *Anticancer Res*. 2019 Oct;39(10):5285–96.
9. Hoppe R, Phillips TL, Roach M. *Leibel and Phillips Textbook of Radiation Oncology - E-Book*. Elsevier Health Sciences; 2010. 1 p.
10. Leitlinienprogramm Onkologie. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. 2021 Jun 22;:1–467.
11. Castaneda SA, Strasser J. Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. *Surg Oncol Clin N Am*. 2017 Jul;26(3):371–82.
12. Pazos M, Schönecker S, Reitz D, Rogowski P, Niyazi M, Alongi F, Matuschek C, Braun M, Harbeck N, Belka C, Corradini S. Recent Developments in Radiation Oncology: An Overview of Individualised Treatment Strategies in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*. Karger Publishers; 2018 Aug;13(4):285–91.
13. Asna N, Livoff A, Batash R, Debbi R, Schaffer P, Rivkind T, Schaffer M. Radiation therapy and immunotherapy-a potential combination in cancer treatment. *Curr Oncol*. 2018 Oct;25(5):e454–60.

14. Vaidya JS, Tobias J, Baum M, Keshtgar M, Houghton J, Wenz F, Corica T, Joseph D. Intraoperative radiotherapy: the debate continues. *The Lancet Oncology*. 2004 Jun;5(6):339–40.
15. Welzel G, Boch A, Sperk E, Hofmann F, Kraus-Tiefenbacher U, Gerhardt A, Suetterlin M, Wenz F. Radiation-related quality of life parameters after targeted intraoperative radiotherapy versus whole breast radiotherapy in patients with breast cancer: results from the randomized phase III trial TARGIT-A. *Radiat Oncol*. 2013 Jan 7;8(1):9–8.
16. Orth M, Lauber K, Niyazi M, Friedl AA, Li M, Maihöfer C, Schüttrumpf L, Ernst A, Niemöller OM, Belka C. Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiat Environ Biophys*. 2014 Mar;53(1):1–29.
17. Garg AD, Romano E, Rufo N, Agostinis P. Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy: mechanisms and clinical translation. *Cell Death Differ*. 2016 Jun;23(6):938–51.
18. Lauber K, Ernst A, Orth M, Herrmann M, Belka C. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Front Oncol*. *Frontiers*; 2012;2:116.
19. Demaria S, Formenti SC. Radiation as an immunological adjuvant: current evidence on dose and fractionation. *Front Oncol*. *Frontiers*; 2012;2:153.
20. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol*. 2010 Aug;31(4):363–72.
21. Krombach J, Hennel R, Brix N, Orth M, Schoetz U, Ernst A, Schuster J, Zuchtriegel G, Reichel CA, Bierschenk S, Sperandio M, Vogl T, Unkel S, Belka C, Lauber K. Priming anti-tumor immunity by radiotherapy: Dying tumor cell-derived DAMPs trigger endothelial cell activation and recruitment of myeloid cells. *Oncoimmunology*. 2019;8(1):e1523097.
22. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997 Nov 27;390(6658):350–1.
23. McGaha TL, Chen Y, Ravishankar B, van Rooijen N, Karlsson MCI. Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. *Blood*. 2011 May 19;117(20):5403–12.
24. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2017 Feb;17(2):97–111.
25. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol*. 2013;31(1):51–72.
26. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013 Jul 25;39(1):1–10.
27. Brix N, Tiefenthaler A, Anders H, Belka C, Lauber K. Abscopal, immunological effects of radiotherapy: Narrowing the gap between clinical and preclinical experiences. *Immunol Rev*. 2017 Nov;280(1):249–79.

28. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Feb 3;11(3):215–33.
29. Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, Yamazaki T, Aymeric L, Yang H, Portela Catani JP, Hannani D, Duret H, Steegh K, Martins I, Schlemmer F, Michaud M, Kepp O, Sukkurwala AQ, Menger L, Vacchelli E, Droin N, Galluzzi L, Krzysiek R, Gordon S, Taylor PR, Van Endert P, Solary E, Smyth MJ, Zitvogel L, Kroemer G. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 2013 Apr 18;38(4):729–41.
30. Formenti SC, Demaria S. Radiation therapy to convert the tumor into an in situ vaccine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Nov 15;84(4):879–80.
31. Mole RH. Whole body irradiation; radiobiology or medicine? *Br J Radiol.* 1953 May;26(305):234–41.
32. Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, Formenti SC. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Mar 1;58(3):862–70.
33. Golden EB, Frances D, Pellicciotta I, Demaria S, Helen Barcellos-Hoff M, Formenti SC. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. *Oncoimmunology.* 2014;3(4):e28518.
34. Frey B, Rubner Y, Kulzer L, Werthmüller N, Weiss E-M, Fietkau R, Gaipl US. Antitumor immune responses induced by ionizing irradiation and further immune stimulation. *Cancer Immunol Immunother.* 2014 Jan;63(1):29–36.
35. Hennel R, Brix N, Seidl K, Ernst A, Scheithauer H, Belka C, Lauber K. Release of monocyte migration signals by breast cancer cell lines after ablative and fractionated γ -irradiation. *Radiat Oncol. BioMed Central;* 2014 Mar 26;9(1):85–15.
36. Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, Fu Y-X, Auh SL. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res.* 2011 Apr 1;71(7):2488–96.
37. Lim JYH, Gerber SA, Murphy SP, Lord EM. Type I interferons induced by radiation therapy mediate recruitment and effector function of CD8(+) T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2014 Mar;63(3):259–71.
38. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007 Sep;7(9):678–89.
39. Zuchtriegel G, Uhl B, Hessenauer MET, Kurz ARM, Rehberg M, Lauber K, Krombach F, Reichel CA. Spatiotemporal expression dynamics of selectins govern the sequential extravasation of neutrophils and monocytes in the acute inflammatory response. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2015 Apr;35(4):899–910.
40. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 May;11(5):366–78.

41. Hidalgo A, Frenette PS. Leukocyte podosomes sense their way through the endothelium. *Immunity*. 2007 Jun;26(6):753–5.
42. Herter J, Zarbock A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *J Immunol*. 2013 May 1;190(9):4451–7.
43. Voisin M-B, Nourshargh S. Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J Innate Immun*. 2013;5(4):336–47.
44. Rot A, Andrian von UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22(1):891–928.
45. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48(1):171–97.
46. Kho VM, Mekers VE, Span PN, Bussink J, Adema GJ. Radiotherapy and cGAS/STING signaling: Impact on MDSCs in the tumor microenvironment. *Cell Immunol*. 2021 Apr;362:104298.
47. Craig DJ, Nanavaty NS, Devanaboyina M, Stanbery L, Hamouda D, Edelman G, Dworkin L, Nemunaitis JJ. The abscopal effect of radiation therapy. *Future Oncol*. 2021 Mar 17.
48. Gerber SA, Sedlacek AL, Cron KR, Murphy SP, Frelinger JG, Lord EM. IFN- γ mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor. *Am J Pathol*. 2013 Jun;182(6):2345–54.
49. Lee Y, Auh SL, Wang Y, Burnette B, Wang Y, Meng Y, Beckett M, Sharma R, Chin R, Tu T, Weichselbaum RR, Fu Y-X. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8⁺ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood*. 2009 Jul 16;114(3):589–95.
50. Lugade AA, Moran JP, Gerber SA, Rose RC, Frelinger JG, Lord EM. Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. *J Immunol*. 2005 Jun 15;174(12):7516–23.
51. Takeshima T, Chamoto K, Wakita D, Ohkuri T, Togashi Y, Shirato H, Kitamura H, Nishimura T. Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with Th1 cell therapy. *Cancer Res*. 2010 Apr 1;70(7):2697–706.
52. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):227–42.
53. Seth S, Oberdörfer L, Hyde R, Hoff K, Thies V, Worbs T, Schmitz S, Förster R. CCR7 essentially contributes to the homing of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state as well as inflammatory conditions. *J Immunol*. 2011 Mar 15;186(6):3364–72.
54. Gupta A, Probst HC, Vuong V, Landshammer A, Muth S, Yagita H, Schwendener R, Pruschy M, Knuth A, van den Broek M. Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8⁺ T cells via dendritic cell activation. *J Immunol*. 2012 Jul 15;189(2):558–66.

55. Lugade AA, Sorensen EW, Gerber SA, Moran JP, Frelinger JG, Lord EM. Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. *J Immunol*. 2008 Mar 1;180(5):3132–9.
56. Schaeue D, Xie MW, Ratican JA, McBride WH. Regulatory T cells in radiotherapeutic responses. *Front Oncol*. 2012;2:90.
57. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006 Nov;6(11):836–48.
58. Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, Adam J, Vitale I, Goubar A, Baracco EE, Remédios C, Fend L, Hannani D, Aymeric L, Ma Y, Niso-Santano M, Kepp O, Schultze JL, Tüting T, Belardelli F, Bracci L, La Sorsa V, Ziccheddu G, Sestili P, Urbani F, Delorenzi M, Lacroix-Triki M, Quidville V, Conforti R, Spano J-P, Puzsai L, Poirier-Colame V, Delalogue S, Penault-Llorca F, Ladoire S, Arnould L, Cyrta J, Dessoliers M-C, Eggermont A, Bianchi ME, Pittet M, Engblom C, Pfirschke C, Prévile X, Uzè G, Schreiber RD, Chow MT, Smyth MJ, Proietti E, André F, Kroemer G, Zitvogel L. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med*. 2014 Nov;20(11):1301–9.
59. Lauber K, Brix N, Ernst A, Hennel R, Krombach J, Anders H, Belka C. 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 Mar 10;368(2):209-29.
60. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010 Nov 11;363(20):1938–48.
61. Nussbaum C, Gloning A, Pruenster M, Frommhold D, Bierschenk S, Genzel-Boroviczeny O, Andrian von UH, Quackenbush E, Sperandio M. Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013 Feb;93(2):175–84.
62. Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkötter C, Harms E, Sorg C, Roth J. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000 Mar;43(3):628–37.
63. Ernst A, Anders H, Kapfhammer H, Orth M, Hennel R, Seidl K, Winssinger N, Belka C, Unkel S, Lauber K. HSP90 inhibition as a means of radiosensitizing resistant, aggressive soft tissue sarcomas. *Cancer Lett*. 2015 Sep 1;365(2):211–22.
64. Menezes S, Melandri D, Anselmi G, Perchet T, Loschko J, Dubrot J, Patel R, Gautier EL, Hugues S, Longhi MP, Henry JY, Quezada SA, Lauvau G, Lennon-Duménil A-M, Gutiérrez-Martínez E, Bessis A, Gomez-Perdiguerro E, Jacome-Galarza CE, Garner H, Geissmann F, Golub R, Nussenzweig MC, Guermonprez P. The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS+ Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity*. 2016 Dec 20;45(6):1205–18.

65. Ma Y, Mattarollo SR, Adjemian S, Yang H, Aymeric L, Hannani D, Portela Catani JP, Duret H, Teng MWL, Kepp O, Wang Y, Sistigu A, Schultze JL, Stoll G, Galluzzi L, Zitvogel L, Smyth MJ, Kroemer G. CCL2/CCR2-dependent recruitment of functional antigen-presenting cells into tumors upon chemotherapy. *Cancer Res.* 2014 Jan 15;74(2):436–45.
66. Sharma MD, Rodriguez PC, Koehn BH, Baban B, Cui Y, Guo G, Shimoda M, Pacholczyk R, Shi H, Lee E-J, Xu H, Johnson TS, He Y, Mergoub T, Venable C, Bronte V, Wolchok JD, Blazar BR, Munn DH. Activation of p53 in Immature Myeloid Precursor Cells Controls Differentiation into Ly6c+CD103+ Monocytic Antigen-Presenting Cells in Tumors. *Immunity.* 2018 Jan 16;48(1):91–6.
67. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2007 Dec;220(1):35–46.
68. Eue I, Pietz B, Storck J, Klempt M, Sorg C. Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes. *Int Immunol.* 2000 Nov;12(11):1593–604.
69. Tsan M-F, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *Journal of Leukocyte Biology.* 2009 Jun;85(6):905–10.
70. Peter C, Wesselborg S, Herrmann M, Lauber K. Dangerous attraction: phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells. *Apoptosis.* 2010 Sep;15(9):1007–28.
71. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R. 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 Nov 12;378(9804):1707–16.
72. Barker HE, Paget JTE, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer.* 2015 Jul;15(7):409–25.
73. Dewan MZ, Galloway AE, Kawashima N, Dewyngaert JK, Babb JS, Formenti SC, Demaria S. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin Cancer Res.* 2009 Sep 1;15(17):5379–88.
74. Filatenkov A, Baker J, Mueller AMS, Kenkel J, Ahn G-O, Dutt S, Zhang N, Kohrt H, Jensen K, Dejbakhsh-Jones S, Shizuru JA, Negrin RN, Engleman EG, Strober S. Ablative Tumor Radiation Can Change the Tumor Immune Cell Microenvironment to Induce Durable Complete Remissions. *Clin Cancer Res.* 2015 Aug 15;21(16):3727–39.
75. Schaeue D, Ratikan JA, Iwamoto KS, McBride WH. Maximizing tumor immunity with fractionated radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Jul 15;83(4):1306–10.
76. Pittman K, Kubes P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J Innate Immun.* 2013;5(4):315–23.

77. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CCM, Beck PL, Muruve DA, Kuberski P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 2010 Oct 15;330(6002):362–6.
78. Stark K, Eckart A, Haidari S, Tirniceriu A, Lorenz M, Brühl von M-L, Gärtner F, Khandoga AG, Legate KR, Pless R, Hepper I, Lauber K, Walzog B, Massberg S. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and “instruct” them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol*. 2013 Jan;14(1):41–51.
79. Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood*. 2009 Nov 19;114(21):4613–23.
80. Isfort K, Ebert F, Bornhorst J, Sargin S, Kardakaris R, Pasparakis M, Bähler M, Schwerdtle T, Schwab A, Hanley PJ. Real-time imaging reveals that P2Y2 and P2Y12 receptor agonists are not chemoattractants and macrophage chemotaxis to complement C5a is phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)- and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-independent. *J Biol Chem*. 2011 Dec 30;286(52):44776–87.
81. Kronlage M, Song J, Sorokin L, Isfort K, Schwerdtle T, Leipziger J, Robaye B, Conley PB, Kim H-C, Sargin S, Schön P, Schwab A, Hanley PJ. Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal*. 2010 Jul 27;3(132):ra55–5.
82. Garg AD, Vandenberg L, Fang S, Fasche T, Van Eygen S, Maes J, Van Woensel M, Koks C, Vanthillo N, Graf N, de Witte P, Van Gool S, Salven P, Agostinis P. Pathogen response-like recruitment and activation of neutrophils by sterile immunogenic dying cells drives neutrophil-mediated residual cell killing. *Cell Death Differ*. 2017 May;24(5):832–43.
83. Takeshima T, Pop LM, Laine A, Iyengar P, Vitetta ES, Hannan R. Key role for neutrophils in radiation-induced antitumor immune responses: Potentiation with G-CSF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Oct 4;113(40):11300–5.
84. Larson SR, Atif SM, Gibbings SL, Thomas SM, Prabagar MG, Danhorn T, Leach SM, Henson PM, Jakubzick CV. Ly6C(+) monocyte efferocytosis and cross-presentation of cell-associated antigens. *Cell Death Differ*. 2016 Jun;23(6):997–1003.
85. Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008 Oct 15;181(8):5791–802.
86. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31(1):563–604.
87. Bianchi ME, Crippa MP, Manfredi AA, Mezzapelle R, Rovere Querini P, Venereau E. High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair. *Immunol Rev*. 2017 Nov;280(1):74–82.

88. Joly A-L, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun.* 2010;2(3):238–47.
89. Viemann D, Strey A, Janning A, Jurk K, Klimmek K, Vogl T, Hirono K, Ichida F, Foell D, Kehrel B, Gerke V, Sorg C, Roth J. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2955–62.
90. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, Suffredini AF. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood.* 2003 Apr 1;101(7):2652–60.
91. Vogel S, Börger V, Peters C, Förster M, Liebfried P, Metzger K, Meisel R, Däubener W, Trapp T, Fischer JC, Gawaz M, Sorg RV. Necrotic cell-derived high mobility group box 1 attracts antigen-presenting cells but inhibits hepatocyte growth factor-mediated tropism of mesenchymal stem cells for apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 2015 Jul;22(7):1219–30.
92. Chakraborty D, Zenker S, Rossaint J, Hölscher A, Pohlen M, Zarbock A, Roth J, Vogl T. Alarmin S100A8 Activates Alveolar Epithelial Cells in the Context of Acute Lung Injury in a TLR4-Dependent Manner. *Front Immunol.* 2017;8:1493.
93. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira J-P, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007 Sep;13(9):1050–9.
94. Chen T, Guo J, Han C, Yang M, Cao X. Heat shock protein 70, released from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway. *J Immunol.* 2009 Feb 1;182(3):1449–59.

13 Eigene Publikationen

Originalarbeiten

Frank A, Hörmann S, **Krombach J**, Fatke B, Holzhüter F, Frank W, Sondergeld R, Förstl H, Hölzle P. Psychisch krank in Krisenzeiten: Subjektive Belastungen durch COVID-19. *Psychiatr Prax.* 2020;47:267-272.

Ernst A, Hennel R, **Krombach J**, Kapfhammer H, Brix N, Zuchtriegel G, Uhl B, Reichel CA, Frey B, Gaipf US, Winssinger N, Shirasawa S, Sasazuki T, Sperandio M, Belka C, Lauber K. Priming of anti-tumor immune mechanisms by radiotherapy is augmented by inhibition of heat shock protein 90. *Front Oncol.* 2020;10:1668.

Krombach J, Hennel R, Brix N, Orth M, Schoetz U, Ernst A, Schuster J, Zuchtriegel G, Reichel CA, Bierschenk S, Sperandio M, Vogl T, Unkel S, Belka C, Lauber K. Priming anti-tumor immunity by radiotherapy: Dying tumor cell-derived DAMPs trigger endothelial cell activation and recruitment of myeloid cells. *Oncoimmunology.* 2019;8:e1523097.

Buchartikel

Hölzle P, **Krombach J**, Lee A, Förstl H. Altersbedingte Besonderheiten der Symptomatik: Höheres Lebensalter. In: *Praxishandbuch Depression*, Hrsg.: Adli M, Hautzinger M, Elsevier, 2021.

Reviews

Krombach J, Hörmann S, Huber C, Hölzle P, Förstl H. Alt und depressiv oder dement? – Pseudodepression vs. Pseudodemenz. *Dtsch Med Wochenschr.* 2021 Apr; 146(7):487-492.

Lauber K, Brix N, Ernst A, Hennel R, **Krombach J**, Anders H, Belka C. 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;368:209-229.

Abstracts

Krombach J, Hennel R, Brix N, Orth M, Schuster J, Zuchtriegel G; Vogl T; Belka C, Lauber K. Modulation of the immunological microenvironment in breast cancer by different irradiation regimes. *Strahlenther Onkol.* 2018;194:S165-S166.

Krombach J, Hennel R, Brix N, Orth, M, Zuchtriegel G, Vogl, T, Belka C, Lauber, K. Stimulation of the immune system by irradiation of breast cancer cells. *Strahlenther Onkol.* 2017;193:S60.

Hennel R, **Krombach J**, Brix N, Ernst A, Seidl K, Scheithauer H, Belka C, Lauber K. Immunostimulatory effects induced by radiotherapy of breast cancer cells. *Strahlenther Onkol.* 2016;192:S91.

Hennel R, Brix N, **Krombach J**, Seidl K, Ernst A, Scheithauer H, Belka C, Lauber, K. Ablative gamma-irradiation induces the release of monocytic attraction signals from dying breast cancer cells. *Strahlenther Onkol.* 2015;191:S89-S90.

Krombach J, Hennel R, Belka C, Lauber K. Immunostimulatory effects induced by ablative irradiation of breast cancer cells in vitro. *Strahlenther Onkol.* 2015;191:S83-S84.

14 Kooperationen und wissenschaftliche Beiträge

Unterstützt wurde diese Arbeit durch folgende Kooperationen:

- Messung der S100A8/A9 Proteine (Herr Prof. Dr. Thomas Vogl, Institut für Immunologie der Universität Münster)
- Konfokal-Mikroskopie (Frau Dr. Gabriele Zuchtriegel aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Reichel, Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, Klinikum der Universität München)
- Flusskammer-Versuch (Herr Prof. Dr. Markus Sperandio, Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, Klinikum der Universität München)

An der Durchführung von folgenden Experimenten war im Rahmen der Betreuung durch einen promovierten Mitarbeiter Herr Dr. Roman Hennel, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Klinikum der Universität München, beteiligt:

- *Air-Pouch*-Experiment
- Endothelzellaktivierung
- Monozytendifferenzierung
- Phagozytose und *Mixed-Leukocyte-Reaction*

15 Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Claus Belka für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie am Klinikum der Universität München anfertigen zu können, und für die Gesamtleitung der vorliegenden Arbeit.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Kirsten Lauber, die mir dieses Thema überlassen und mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Mit viel Geduld und Genauigkeit lehrte sie mich die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens. Bei Fragen und Sorgen stand ihre Tür jederzeit für ein klärendes Gespräch oder hilfreiche Anregungen offen und sie unterstützte mich mit ihrer beispiellosen Energie und ihrem hervorragenden Erfahrungs- und Wissensschatz in jeder Phase dieses Promotionsprozesses. Neben ihrer fachlichen Kompetenz und ihren Führungsqualitäten haben mich ihre Begeisterungsfähigkeit, ihr endloses Engagement für die Wissenschaft und ihr hoher Anspruch an die eigene Arbeit sowie ihre herausragenden menschlichen Qualitäten und ihr Humor tief beeindruckt.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Roman Hennel bedanken, der mich während meiner Zeit als Doktorandin ausgezeichnet und aufopferungsvoll betreut hat. Ich danke ihm für die unermüdliche und professionelle Einführung in sämtliche Methoden der Arbeitsgruppe und für die Unterstützung sowohl bei der Planung und Durchführung der Experimente wie auch der Interpretation und Diskussion der Ergebnisse. Seine konstruktiven Ideen, seine umfassenden Fachkenntnisse, seine Besonnenheit ebenso wie sein humorvoller Beistand bei den Anstrengungen der täglichen Laborarbeit haben entscheidend zum Gelingen dieser Dissertationsarbeit beigetragen. Auch für seine Loyalität und Freundschaft danke ich ihm von Herzen.

Darüber hinaus möchte ich Nikko Brix danken, der mich ebenfalls ab meinem ersten Tag in der Arbeitsgruppe begleitet hat. Sein scharfer Verstand, seine Gewissenhaftigkeit und seine Kreativität waren sowohl für mich persönlich als auch für die Entwicklung dieser Doktorarbeit eine enorme Bereicherung. Nicht zuletzt dank ihm wird mir dieser Lebensabschnitt als eine besondere Zeit in Erinnerung bleiben.

Meinen Dank schulde ich auch den weiteren Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, Frau Heike Anders, Frau Dr. Jessica Maas, Frau Dr. Anne Ernst, Frau Dr. Ulrike Schötz, Frau Dr. Valerie Albrecht, Herrn Dr. Michael Orth, Frau Anna Tiefenthaller, Herrn Alexander Nieto, Herrn Dr. Steffen Spörl, Herrn Dr. Benjamin Stegen, Frau Karin Seidl, Herrn Martin Felbermeier, Frau Dr. Olena Klymenko, Herrn Dr. Roland Wunderlich, Frau Dr. Linda Kinzel, Frau Dr. Heidi Kapfhammer und Frau Viola Blockus für ihre tatkräftige Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Markus Sperandio, Frau Susanne Bierschenk, Herrn Prof. Dr. Thomas Vogl, Herrn Prof. Dr. Christoph Reichel und Frau Dr. Gabriele Zuchtriegel für die hervorragende und unkomplizierte Kooperation

bedanken. Herrn Dr. Steffen Unkel danke ich für die fachkundige und engagierte Beratung in allen statistischen Fragen.

Den Verantwortlichen der Integrated Research Training Group des Sonderforschungsbereiches (SFB) 914 „*Trafficking of Immune Cells in Inflammation, Development and Disease*“ (IRTG 919) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), insbesondere der Sprecherin des SFB 914 Frau Prof. Dr. Barbara Walzog, dem Sprecher der IRTG 914 Herrn Prof. Dr. Markus Sperandio und der Koordinatorin der IRTG 914 Frau Dr. Verena Kochan, danke ich für die freundliche Aufnahme in das Graduiertenkolleg und die Förderung und Finanzierung der Arbeit im Rahmen des Stipendiums „*Medical Doctoral Fellowship*“. Die ausgezeichneten Vorträge und anschließenden Diskurse im Rahmen der regelmäßig abgehaltenen Seminare und Kurse waren eine Bereicherung meiner Ausbildung.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie und meinen Freund*innen, die mich durchweg unterstützt, motiviert und in Phasen der Entmutigung wieder aufgebaut haben. Insbesondere ohne meine Eltern wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Sie haben mir mein Leben lang und so auch während der Arbeit an dieser Dissertationsschrift bedingungslos und hundertprozentig beigestanden und mich bestärkt, sind für mich Rückzugsort, Inspiration und wahre Freunde. Dafür bin ich ihnen auf ewig dankbar.

16 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

17 Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Krombach, Julia Maximiliane

Name, Vorname

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

Induktion antitumoraler Immunmechanismen durch Radiotherapie: *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen in Modellen des Mammakarzinoms

selbständig 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, 01.11.2023

Ort, Datum

Julia Maximiliane Krombach

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand