

Philipp Schröter
Dr. med.

Radiogene Immunmodulation von Pankreasadenokarzinomzellen durch *In-vitro*-Photonen- und -Kohlenstoff-Ionenbestrahlung

Fach/Einrichtung: Radiologie

Doktorvater: Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Rieken

Es besteht zunehmende präklinische und klinische Evidenz dafür, dass die Bestrahlung solider Malignome Phänomene der Immunmodulation induzieren kann. Effekte, welche die antitumorale Immunantwort supprimieren, aber auch stimulieren, teilweise in räumlich-zeitlicher Überlappung, werden als Folge einer Tumorbestrahlung beschrieben.

Vor diesem Hintergrund ist es ein vielversprechender therapeutischer Ansatz, Radio- und Immuntherapie zu kombinieren. In einem idealen Modell wirkt die Tumorbestrahlung lokal-inflammatorisch und die Immuntherapie disinhibierend auf die antitumorale Immunantwort, was in Kombination zu einem Synergismus der Wirksamkeiten führen kann. Dieses Konzept verfolgend, wird in präklinischen und klinischen Untersuchungen vermehrt über sogenannte abscopale Effekte berichtet. Diese beschreiben den Regress von außerhalb des Bestrahlungsfeldes liegenden Metastasen und sind Ausdruck einer systemischen antitumoralen Immunantwort durch tumorantigen-spezifische zytotoxische T-Zellen.

Es bestehen jedoch immer noch Unklarheiten darüber, inwiefern Bestrahlungsdosis und -fraktionierung die Qualität radiogener immunmodulatorischer Effekte beeinflussen. Fast gänzlich ungeklärt ist die Frage, ob dichtungisierende Strahlung wie ^{12}C -Ionenstrahlung andersartige immunmodulatorische Charakteristika zu Photonenstrahlung aufweist. Ein unterschiedliches immunmodulatorisches Potential liegt nahe, denn ^{12}C -Ionenstrahlung weist fundamental differierende biophysikalische Eigenschaften zu lockerionisierender Photonenstrahlung auf.

Da das Pankreasadenokarzinom klassischerweise zu den nicht immunogenen Tumorentitäten zählt und aktuell weder Radio- noch Immuntherapie bei der Behandlung des Karzinoms eine klinisch relevante Rolle spielen, sollten in dieser Arbeit für eine murine Pankreasadenokarzinomzelllinie radiogene immunmodulatorische Effekte und deren Dosisabhängigkeit *in vitro* analysiert werden. Gleichmaßen sollten die Effekte von Photonen- und ^{12}C -Ionenstrahlung auf exemplarische, immunologische Endpunkte qualitativ und quantitativ verglichen werden. Dies erfolgte über ein Einzeldosispektrum biologisch äquivalenter Photonen- und ^{12}C -Ionendosen. Biologisch äquivalente Dosen der Bestrahlungsmodalitäten wurden über Koloniebildungstests mit dem Endpunkt der dosisabhängigen Inaktivierung der Tumorzellklonalität bestimmt.

Die untersuchten, p53-mutierten Pankreasadenokarzinomzellen erwiesen sich als typisch radioresistent mit einer durch Koloniebildungstests determinierten Überlebensfraktion von 87,40 % nach Bestrahlung mit 2 Gy Photonen und einem durch das linearquadratische Modell errechneten α/β -Verhältnis von 1,07. In durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen mit Propidiumiodid-Färbung ließ sich ein dosisabhängiger und transients G2/M-Zellzyklusarrest sowie nach Bestrahlung mit Dosen von 10 Gy Photonen bzw. 10 GyE ^{12}C -Ionen die Formation polyploider Tumorzellen detektieren. Die radiogene Induktion polyploider Zellen ist indikativ für das Durchlaufen der mitotischen Katastrophe.

Darüber hinaus wiesen mit ≥ 5 Gy Photonen bestrahlte Zellen Zeichen radiogener Nekroseinduktion auf, wohingegen eine isolierte Apoptoseinduktion nicht feststellbar war. Für p53-mutierte maligne Zellen ist die Nekroseinduktion als dominierender Weg des regulierten Zelltods in Folge der mitotischen Katastrophe vermehrt beschrieben worden.

Effekte radiogener Immunmodulation manifestierten sich nach der Bestrahlung der Pankreasadenokarzinomzellen mit tendenziell höheren Photoneneinzeldosen von ≥ 5 Gy.

Es ließen sich moderate Oberflächenexpressionssteigerungen sowohl positiv-immunregulierender Moleküle, wie beispielsweise des Haupthistokompatibilitätskomplex I, als auch negativ-immunregulierender Moleküle, wie beispielsweise des Programmed cell Death 1 Ligand 1, feststellen.

In Expressionsanalysen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion ließen sich für einen Teil der expressionsgesteigerten Oberflächenmoleküle korrelierend dosisabhängig gesteigerte mRNA-Niveaus identifizieren, was auf eine radiogen induzierte *De-novo*-Synthese der Moleküle hinweist.

Die Expressionssteigerungen auf mRNA-Ebene waren in den meisten Versuchen jedoch statistisch nicht signifikant.

In einem funktionellen Szenario von Tumorzell- und T-Zell-Co-Kultur mittels impedanzbasiertem Co-Kultur-System zeigten bestrahlte Tumorzellen eine dosisabhängig gesteigerte Suszeptibilität gegenüber T-Zell-vermittelter Zytolyse. Ein synergistischer Effekt von Tumorzellbestrahlung und sequenzieller Immuncheckpoint-Inhibition mit Anti-PD-L1-Antikörper auf die T-Zell-vermittelte Zytolyseeffizienz war jedoch nicht detektierbar, obwohl sich der Ligand auf den Tumorzellen radiogen expressionsgesteigert zeigte. Wirksamkeitssteigerungen der T-Zell-vermittelten Zytolyse durch die Inhibition der PD-1/PD-L1-Achse waren im vorliegenden *In-vitro*-Szenario somit lediglich andeutungsweise und bestrahlungsunabhängig erkennbar.

Für die biologisch äquivalent definierten ^{12}C -Ionendosen wurden relative biologische Wirksamkeiten zwischen 10 (1 GyE) und 3,23 (10 GyE) ermittelt. Die Effekte der ^{12}C -Ionenbestrahlung auf die Zellzyklusverteilung und die Expression immunmodulatorischer Moleküle der Pankreasadenokarzinomzellen sowie auf die Steigerung der T-Zell-vermittelten Tumorzelllyse zeigten ein qualitativ ähnliches Profil, wie es nach Photonenbestrahlung zu beobachten war. Im Vergleich zur Photonenbestrahlung präsentierten sich die immunmodulatorischen Effekte der ^{12}C -Ionenbestrahlung besonders für Dosen $< 3,1$ Gy ^{12}C -Ionen (< 10 GyE) als reduziert oder nicht detektierbar.

Den überwiegend quantitativ abweichenden Effekten der ^{12}C -Ionenstrahlung, auf die hier untersuchten immunologischen Endpunkte, können die differierenden biophysikalischen Eigenschaften der ^{12}C -Ionenstrahlung zugrunde liegen. Die Diskrepanzen der Effekthöhen fanden sich jedoch systematisch für diejenigen Äquivalentdosen, die sehr hohe relative biologische Wirksamkeiten von 10–5 (1–5 GyE) aufwiesen. Für die Äquivalentdosis von 10 GyE näherten sich die immunmodulatorischen Effekte der Photonen- und ^{12}C -Ionenstrahlung auch quantitativ an. Dies legt nahe, dass die Ursache für die in dieser Arbeit detektierten quantitativen Diskrepanzen der immunmodulatorischen Effekte, primär bei der Äquivalentdosendefinition liegt. Möglicherweise ist das linearquadratische Modell und die Definition biologischer Äquivalentdosen anhand des Endpunktes der Tumorzellklonalität suboptimal, um darauf basierend Sekundäreffekte der Immunmodulation direkt quantitativ zu vergleichen. Dem antizipierten und bereits teilweise beschriebenen, größer immunstimulierenden Potenzial der ^{12}C -Ionenstrahlung könnte außerdem überwiegend die vorteilhafte Dosisverteilung im Gewebe, mit Schonung von Immunzellen im Tumormikromilieu, zugrunde liegen. Dies kann jedoch nur durch weiterführende *In-vivo*-Experimente eruiert werden.

Zusammenfassend erfolgte in dieser Arbeit die Charakterisierung einer murinen Pankreasadenokarzinomzelllinie für herkömmliche strahlenbiologische Endpunkte durch die Bestrahlung mit Photonen- und ^{12}C -Ioneneinzeldosen sowie die Analyse und der Vergleich dosisabhängiger Effekte radiogener Immunmodulation.