

Gabriel Johannes Hillebrand

Dr. med.

Therapy induced senescence as a novel target in head and neck carcinoma

Fach/Einrichtung: Hals-Nasen -Ohrenheilkunde

Doktorvater: Professor Dr. rer. nat. Jochen Heß.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte untersucht werden, ob Hinweise dafür bestehen, dass therapieinduzierte Tumorzellseneszenz beim Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) tumorprotektive Auswirkungen haben könnten. Diese Vermutung stützte sich dabei auf Beobachtungen zu progressfördernden und möglicherweise therapierelevanten Auswirkungen seneszenten Zellen im Rahmen anderer solider Krebserkrankungen. Ziele waren die Charakterisierung des Wachstumsmusters in der Umgebung seneszenten Zellen, die Untersuchung der Immunantwort auf Tumorzellkolonien mit erhöhtem Anteil seneszenten Zellen durch Natürliche Killerzellen im Zellkulturversuch und die Spezifizierung einer möglichen Rolle des beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches hochrelevanten Immuncheckpunktproteins programmed cell death ligand (PD-L1) im Kontext therapieinduzierter Seneszenz.

Zunächst wurde ein Zellkulturmodell zur Seneszenzinduktion mittels Etoposid in FaDu HNSCC Zellen etabliert. Zur Analyse des Wachstumsmusters wurde die Bromodesoxyuridin-Inkorporation etoposidbehandelter HNSCC Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht. Diese zeigte eine signifikant häufigere klonale Zellteilung in der Umgebung seneszenten Tumorzellen. Seneszente Krebszellen waren zudem regelhaft im Zentrum sich ausbildender Kolonien anzutreffen. Im nächsten Schritt wurden Ko-Kulturen der Natürliche Killer-Zelllinie NK92MI mit seneszenzinduzierten FaDu Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich der Anteil der überlebenden Tumorzellen nach Seneszenzinduktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen erhöht. Eine Analyse der überlebenden Zellen ergab bereits direkt nach der Ko-Kultur einen höheren Anteil seneszenten Zellen als vor der Ko-Kultur. Wurden unbehandelte FaDu Tumorzellen mit NK92MI Zellen ko-kultiviert bis sich der seneszente Phänotyp nach 7 Tagen voll ausbilden konnte, wurde ein signifikanter Anstieg seneszenten Kolonien registriert. Mittels western blot-Analyse und Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass FaDu Tumorzellen auf NK92MI-Ko-Kultur mit einer Hochregulierung der PD-L1-Expression reagieren, und überlebende Zellen dieses Protein regelhaft auf ihrer Zellmembran exponieren. Zudem war die PD-L1-Expression nach Seneszenzinduktion mittels 10-tägiger fraktionierter Bestrahlung erhöht. Zuvor mit Etoposid seneszenzinduzierte FaDu zeigten ebenfalls nach NK92MI Ko-Kultur eine höhere Zahl PD-L1 positiver Zellen in der Immunfluoreszenz als unbehandelte FaDu, jedoch konnte durch alleinige Etoposidbehandlung kein direkter Einfluss auf PD-L1 genommen werden.

Die präsentierten Ergebnisse in Bezug auf das gesteigerte proliferative Potenzial von HNSCC Zellen in der Umgebung seneszenten Tumorzellen bestätigt entsprechende Beobachtungen bei anderen Tumorerkrankungen. Eine mögliche Immunsuppression seneszenten Zellen durch PD-L1 oder andere Faktoren wurde ebenfalls bereits in mehreren Arbeiten nahegelegt. Die Beobachtung von NK-Zell-vermittelter Seneszenzinduktion in Tumorzellen legen einen sich selbst erhaltenden Kreislauf aus seneszenzvermittelter Immuntoleranz und immunzellvermittelter seneszenzinduktion bei gleichzeitiger verstärkter Proliferation der übrigen Tumorzellen in residuellen Tumorzellnestern nahe. Die in den hier präsentierten Versuchen angedeuteten immunsuppressiven und Tumorstadium-fördernden Eigenschaften seneszenten HNSCC Zellen reihen sich ein in eine bei verschiedensten Tumorentitäten

gewonnene, wachsende Zahl an Hinweisen darauf, dass es sich bei Therapie-induzierter Seneszenz möglicherweise um ein aufgrund von tumorfördernden Langzeiteffekten eher suboptimales Endergebnis genotoxischer Krebstherapien handeln könnte. Diese sind seit Jahren gut dokumentiert, die konkrete klinische Bedeutung und Konsequenz jedoch unklar. Grund dafür ist die Anfälligkeit der vorhandenen Modelle insbesondere bei Untersuchungen außerhalb von Zellkulturen. Dabei spielt der technisch oft mit Unsicherheiten behaftete Nachweis seneszenten Zellen eine wichtige Rolle. Bei der vorliegenden Studie ist die Aussagekraft in Bezug auf die klinische Übertragbarkeit der gezeigten Ergebnisse in Bezug auf die Immunüberwachung der seneszenten Tumorzellen durch die Wahl eines Ko-Kulturmodells und Verwendung der NK92MI Zelllinie eingeschränkt. Eine Überprüfung der postulierten Zusammenhänge *in vivo* oder *in silico* sollte in weiteren Arbeiten erfolgen. In der vorliegenden Studie konnten Hinweise auf bisher bereits im Rahmen anderer Tumorerkrankungen beschriebene tumorprotektive Eigenschaften seneszenten Zellen verdichtet werden. Ein tiefergehendes Verständnis dieses komplexen Zusammenspiels erscheint insbesondere mit Blick auf die möglicherweise in Zukunft verfügbare gezielte „senolytische“ Therapie sinnvoll.