

Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik  
Tübingen

Einfluss von Interferon- $\gamma$  auf das Zellüberleben nach  
Bestrahlung

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

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

**vorgelegt von**

**Jelas, Ivan**

**2017**

Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik  
Tübingen

Einfluss von Interferon- $\gamma$  auf das Zellüberleben nach  
Bestrahlung

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

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

**vorgelegt von**

**Jelas, Ivan**

**2017**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. M. Huber

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Weigert

Tag der Disputation: 19.12.2016



# Inhaltsverzeichnis

Abbilungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Rhabdomyosarkom .....	1
1.2 Therapie des RMS .....	1
1.3 Strahlentherapie und Immunsystem .....	2
1.4 Interferon- $\gamma$ .....	7
1.5 Immuntherapie und die Kombination aus Strahlen- und Immuntherapie.....	8
1.6 Ziel dieser Arbeit .....	12
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Materialien .....</b>	<b>13</b>
2.1.1 Geräte .....	13
2.1.2 Materialien und Chemikalien.....	14
2.1.3 Zellsystem .....	14
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Der Einfluss von Bestrahlung und IFN-<math>\gamma</math> auf das klonogene Überleben ...</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Abundanz des IFN-<math>\gamma</math>-Rezeptors .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Induktion von pSTAT1 durch IFN-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 IRF-1 Abundanz auf RNA-Ebene.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5 Veränderungen im Zellzyklus .....</b>	<b>34</b>
<b>3.6 DNA-Reparatur .....</b>	<b>35</b>
<b>3.7 Seneszenz Induktion.....</b>	<b>36</b>
<b>3.8 TNF-<math>\alpha</math> ELISA .....</b>	<b>38</b>
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>39</b>
<b>5 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>44</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>7 Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>XXI</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>XXII</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>XXVII</b>

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Strahleninduzierter Zelltod: die prominentesten Vertreter .....	3
<b>Abbildung 2:</b> Überblick - Interaktion zwischen Tumor, Immunsystem und Bestrahlung. .....	6
<b>Abbildung 3:</b> Überblick über den Behandlungsablauf der Experimente .....	16
<b>Abbildung 4:</b> Systematischer Überblick über den Behandlungsablauf des Koloniebildungstest .....	17
<b>Abbildung 5:</b> Systematische Darstellung des Aufbaus eines „blot sandwich“ in der Blotting-Kassette .....	19
<b>Abbildung 6:</b> Systematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Durchflusszytometrie Experimente .....	21
<b>Abbildung 7:</b> Systematische Darstellung des Versuchsaufbaus der $\gamma$ H2AX Experimente.....	22
<b>Abbildung 8:</b> Systematische Darstellung des Versuchsaufbaus der $\beta$ -Galactosidase Assay Experimente .....	25
<b>Abbildung 9:</b> Überlebensfraktion von A204 Zellen nach Bestrahlung und Bestrahlung + IFN- $\gamma$ .....	27
<b>Abbildung 10:</b> Überlebensfraktion nach Bestrahlung und IFN- $\gamma$ + Bestrahlung.....	28
<b>Abbildung 11:</b> Abundanz des IFN- $\gamma$ -Rezeptor 1.....	29
<b>Abbildung 12:</b> Relative Abundanz des IFN- $\gamma$ -Rezeptor 1 in der A204 Zelllinie.....	29
<b>Abbildung 13:</b> Abundanz von STAT1 und pSTAT1 in A204 Zellen im Western Blot (30 min, 120 min und 240 min nach Bestrahlung bzw. Bestrahlung + IFN- $\gamma$ Behandlung).....	31
<b>Abbildung 14:</b> Abundanz von STAT1 und pSTAT1 in A204 Zellen im Western Blot (30 min, 120 min und 240 min nach IFN- $\gamma$ Behandlung bzw. IFN- $\gamma$ + Bestrahlung)....	32
<b>Abbildung 15:</b> Relative IRF-1 Expression in der A204 Zellen.....	33
<b>Abbildung 16:</b> FACS-Analyse der A204 Zellen in unterschiedlichen Behandlungssettings .....	34
<b>Abbildung 17:</b> Residuale $\gamma$ H2AX Foci pro Nukleus 36 h nach Bestrahlung. Bildaufnahme gefärbter A204 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. ....	35
<b>Abbildung 18:</b> Expression der SA- $\beta$ -Gal in behandelten A204 Zellen.....	36

<b>Abbildung 19:</b> SA- $\beta$ -Gal Positivität von A204 Zellen 96 h nach Behandlung.....	37
<b>Abbildung 20:</b> TNF- $\alpha$ ELISA .....	38

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Geräte.....	13
<b>Tabelle 2:</b> Mikroskope und optische Geräte.....	13
<b>Tabelle 3:</b> Zellkulturzubehör. ....	14
<b>Tabelle 4:</b> Zellsystem.....	14
<b>Tabelle 5:</b> Primärantikörper.....	20
<b>Tabelle 6:</b> Sekundärantikörper.....	20
<b>Tabelle 7:</b> Materialien.....	XXII
<b>Tabelle 8:</b> Puffer und Lösungen .....	XXIII
<b>Tabelle 9:</b> Mastermix für die cDNA-Synthese.....	XXIV
<b>Tabelle 10:</b> Mastermix für die Real-Time PCR.....	XXIV
<b>Tabelle 11:</b> Verwendete QuantiTect® Primer Assays.....	XXIV
<b>Tabelle 12:</b> Programm der Real-Time PCR.....	XXV
<b>Tabelle 13:</b> Lysepuffer.....	XXVI

# Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
ca.	circa
CDS	Zelldissoziationslösung (engl. cell dissociation solution)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
EtOH	Ethanol
FBS	Fötales Kälberserum (engl. Fetal Bovine Serum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
insb.	insbesondere
L	Liter
min	Minute
MW	Mediumwechsel
NK	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphate Buffered Saline



PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RMS	Rhadomyosarkom
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA- $\beta$ -Gal	Senescence-associated beta-galactosidase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
T <sub>H</sub> 1	T-Helferzelle Typ 1
Tris	Tris-aminomethan
vgl.	vergleiche
V	Volt

# 1 Einleitung

## 1.1 Rhabdomyosarkom

Nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellen Tumorerkrankungen eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen dar. Im Überblick betrachtet, gehören Tumore der Weichteile zu den seltenen Tumorentitäten. Das Rhabdomyosarkom (RMS) gehört zu dieser Gruppe der Weichteiltumore und ist mesenchymalen Ursprungs. Es ist mit über 50 % der häufigste Weichteiltumor in der Altersgruppe zwischen 0 - 15 Jahren in Deutschland (Kaatsch P, 2013; Wannemacher *et al.*, 2013). Hierbei zeigt sich insbesondere ein Häufigkeitsgipfel zwischen dem 2. bis 6. Lebensjahr (Reinhardt *et al.*, 2014). Bei Kindern und Jugendlichen kommen Rhabdomyosarkome überwiegend im Kopf-Hals-Bereich, den Extremitäten und im Urogenitaltrakt vor (Amann *et al.*, 2016; Böcker, 2012). Histologisch zeigen sich unregelmäßig große, spindelförmige Zellen mit gelegentlicher Querstreifung (Klöppel *et al.*, 2013). Pathologisch kann das Rhabdomyosarkom weiter subtypisiert werden, wobei die beiden Haupttypen das embryonale und das alveoläre RMS darstellen (Hinson *et al.*, 2013). Im Vergleich zeigten embryonale RMS in retrospektiven Untersuchungen ein besseres Langzeitüberleben und sind mit einer besseren Prognose verbunden (Ognjanovic *et al.*, 2009).

Die Ätiologie des Rhabdomyosarkoms ist letztendlich unklar. Es gibt allerdings einige bekannte Risikofaktoren. So treten bei bestimmten genetischen Prädispositionen, wie beispielsweise dem Li Fraumeni Syndrom oder der Neurofibromatose Typ 1 vermehrt RMS auf (Li *et al.*, 1988; Sung *et al.*, 2004). Festzuhalten ist jedoch, dass die größere Anzahl der Rhabdomyosarkome sporadisch auftreten.

## 1.2 Therapie des RMS

Meist erfolgt die Therapie kindlicher Tumorerkrankungen in multizentrischen Studienprotokollen. Die operative Resektion und risikostratifizierte

Chemotherapieprotokolle stellen nach wie vor die Methode der ersten Wahl beim Rhabdomyosarkom dar (siehe CWS-Leitlinie). Aber auch die Strahlentherapie und in ausgewählten Fällen Hyperthermie haben ihren Stellenwert bei der Therapie von Rhabdomyosarkomen. Insbesondere bei ungünstiger chirurgischer Lage des Tumors oder in der postoperativen Therapie kommen diese Therapieoptionen verstärkt zum Einsatz (Bamberg *et al.*, 2009). Vor allem im Kindesalter hat die Bestrahlung von RMS in der Lokalkontrolle und bei Metastasierung ihre Wertigkeit (Skamene *et al.*, 2015). In den letzten Jahren konnten speziell bei den fortgeschrittenen RMS keine wesentlichen Behandlungsfortschritte durch neue Therapieoptionen erzielt werden (Hosoi, 2016). Das Überleben bei Metastasierung und bei Rezidiven des RMS ist mit 10 bis 30% immer noch gering (Pappo *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wird weiterhin intensiv nach neuen und innovativen Therapieoptionen geforscht.

### **1.3 Strahlentherapie und Immunsystem**

Die Strahlentherapie ist ein wichtiger Bestandteil der multimodalen Behandlung bei vielen unterschiedlichen Tumorentitäten. So erhalten über 50% aller Tumorpatienten im Laufe ihrer Behandlung eine Strahlentherapie (Delaney *et al.*, 2005). Ein primäres Ziel der Strahlentherapie ist eine lokale Zerstörung des Tumors. Dabei wird versucht die notwendige Bestrahlungsdosis (in Gray = Gy) im Tumor zu erreichen unter bestmöglicher Schonung des gesunden umliegenden Normalgewebes (Wannenmacher *et al.*, 2013). Die Strahlentherapie hat sich bezüglich technischer Möglichkeiten in den letzten Jahrzehnten extrem weiterentwickelt. Unter anderem können heutzutage unterschiedliche Arten an ionisierender Strahlung für Therapie Zwecke verwendet werden. Am gängigsten und am weitesten verbreitet ist trotz neuer Errungenschaften der Einsatz von Photonen- und Elektronenstrahlung im klinischen Alltag. Bei beiden Bestrahlungsarten handelt es sich um hochenergetische, ionisierende Strahlung, welche im Wesentlichen über folgende physikalische Effekte wirkt: Photoeffekt, Compton-Effekt und Paarbildung (Herrmann *et al.*, 2006). Die Strahlung interagiert im Verlauf ihres Weges mit der Materie, die sie durchdringt. Dabei kommt es auf atomarer Ebene zu Veränderungen. Diese können im weiteren Verlauf physikalische, chemische und biologische Folgen haben. Somit kann ionisierende Strahlung zu vielfältigen

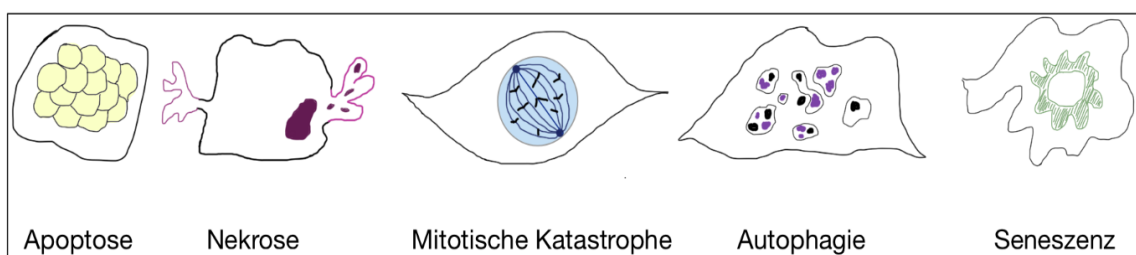
zellbiologischen Effekten führen. Unter anderem kommt es zu einer Induktion von DNA-Schäden. Pro Gray applizierter Dosis entstehen ca. 4000-5000 DNA-Schäden pro Zelle (Karstens, 2010). Aufgeteilt ergeben sich ca. 3000 Basenschäden, 1000 Einzelstrangbrüche (engl. single-strand-breaks - SSB) und ca. 40-50 Doppelstrangbrüche (engl. double-strand-breaks - DSB) (Herrmann *et al.*, 2006). Strahlenschäden an der DNA können von gesunden Zellen und Tumorzellen durch unterschiedliche Reparaturmechanismen behoben werden.

Die wichtigsten Reparaturmechanismen sind:

- Non-homologes Endjoining (NHEJ)
- Homologes Endjoining (HE)
- Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)
- Basen-Exzisions-Reparatur (BER)
- Mismatch-Repair (MMR)

Bei der Reparatur von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen ist das Non-homologe Endjoining (NHEJ) beim Menschen von großer Bedeutung (Kriegs *et al.*, 2010; Mahaney *et al.*, 2009). Wird ein Doppelstrangbruch nur unzureichend repariert (engl. misrepair), kann es zu Mutationen und Zelltod kommen. Dementsprechend zeigt sich, dass trotz raffinierten zellbiologischen Reparaturmechanismen Strahlung dosisabhängig zum Zelltod führen kann.

Aus strahlenbiologischer Sicht beinhaltet die folgende Abbildung die bedeutendsten Formen strahleninduzierten Zelltodes:



**Abbildung 1: Strahleninduzierter Zelltod: die prominentesten Vertreter.** Programmierter Zelltod (Apoptose), Nekrose, mitotische Katastrophe, Autophagie und irreversibler Zellzyklusarrest (Seneszenz) repräsentieren die möglichen Folgen einer Bestrahlung von Zellen. Modifiziert nach Haikerwal *et al.*, 2015.

Dennoch zeigt eine Strahlentherapie bei einigen Tumorentitäten nur eine begrenzte therapeutische Wirksamkeit (bspw. Glioblastom multiforme, Chondrosarkom). Die Gründe hierfür sind mannigfaltig und teilweise noch nicht verstanden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der für die Tumorstörung der ionisierenden Strahlung entscheidend ist, ist die Fraktionierung. Die Fraktionierung beschreibt die Aufteilung der gesamten Strahlendosis auf mehrere Therapiesitzungen. Nach Karstens (Karstens, 2010) kann hier grundsätzlich unterschieden werden in:

- Konventionelle Fraktionierung (1,8 Gy – 2 Gy / Tag, 5 Fraktionen / Woche)
- Hypofraktionierung (> 2 Gy / Tag, 5 Fraktionen / Woche oder weniger, moderate Hypofraktionierung: Einzeldosis 2 - 3 Gy)
- Hyperfraktionierung (< 1,8 Gy / Fraktion, typischerweise mehr als 5 Fraktionen / Woche, gleichbleibende oder erhöhte Gesamtdosis)

Die unterschiedlichen Fraktionierungsprotokolle haben Vor- und Nachteile, sodass sie für verschiedene Tumorentitäten individuell ausgewählt werden. Für tiefere Informationen soll an dieser Stelle auf radioonkologische Lehrbücher verwiesen werden (Herrmann *et al.*, 2006; Wannemacher *et al.*, 2013).

Während einer Strahlentherapie kommt es zu einer Interaktion zwischen Strahlung und Körper. Auch das Immunsystem interagiert und reagiert auf die Bestrahlung. Eine Strahlentherapie besitzt neben immunsuppressiven auch immunstimulierende Eigenschaften (Friedman, 2002). Die immunsuppressiven Eigenschaften werden bspw. bei einer Ganzkörperbestrahlung vor einer Stammzelltransplantation genutzt. Andererseits kann eine Strahlentherapie auch durch unterschiedliche zellbiologische Mechanismen Tumore immunogener machen (Haikerwal *et al.*, 2015). Wie das im Einzelnen geschieht, kann nicht pauschalisiert werden und muss individuell betrachtet werden. Nichtsdestotrotz gibt es einige grundlegende Erkenntnisse, die im Folgenden erwähnt werden. Vorab ist festzuhalten, dass es sich nur um einige ausgewählte Beobachtungen handelt wie Strahlung, Immunsystem und Tumor miteinander interagieren.

Es wurde gezeigt, dass eine Bestrahlung zu immunogenem Zelltod führen kann (Lauber *et al.*, 2012; Scheithauer *et al.*, 2014). Insbesondere pro-inflammatorische Zelluntergänge scheinen hierbei in der Lage zu sein, das Immunsystem zu stimulieren (Hagemann *et al.*, 2007). Bei einem pro-inflammatorischen Zelluntergang kommt es zu

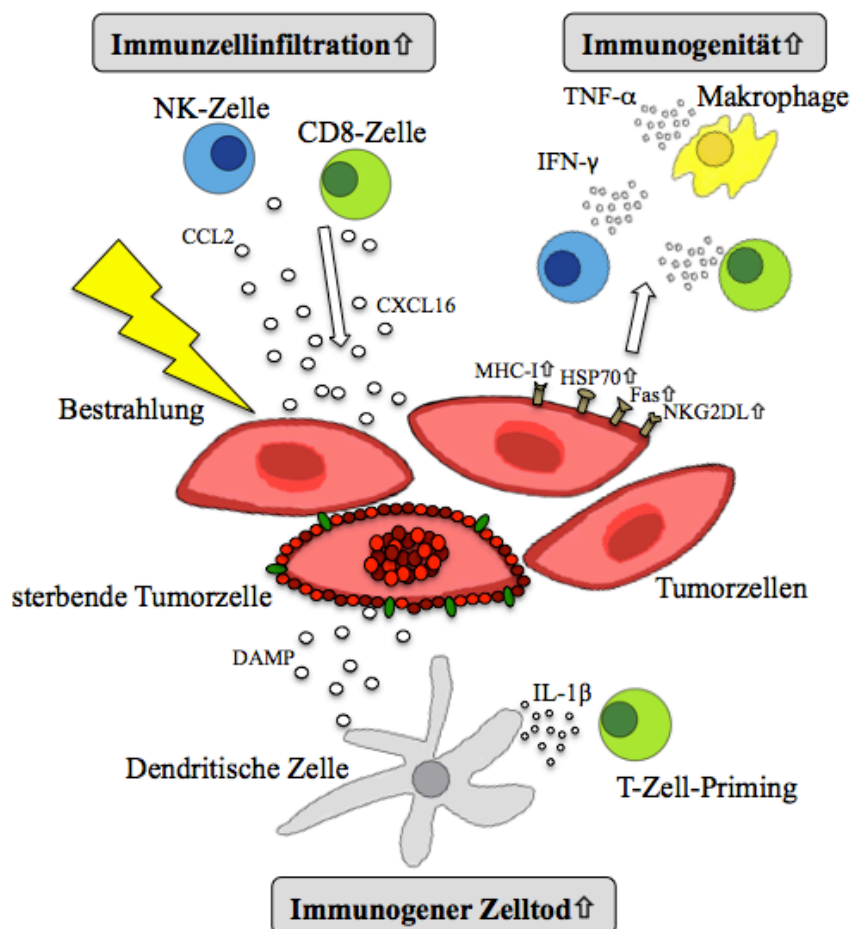
einer Freisetzung von so genannten DAMPs (engl. damage-associated molecular patterns). Diese fungieren als Mediatoren und aktivieren wiederum Zellen des unspezifischen und spezifischen Immunsystems (Krysko *et al.*, 2012). Außerdem wurde beschrieben, dass eine Bestrahlung von Tumorzellen zu einer erhöhten Abundanz des Todesrezeptors CD95 (Fas), Hitzeschockproteinen (bspw. Hsp70) und zu einer Aktivierung von NKG2D führt (Chakraborty *et al.*, 2004; Gasser *et al.*, 2005; Gehrman *et al.*, 2005). Diese Modulationen können an Tumorzellen zu einer erhöhten Immunogenität führen.

Ferner führt eine Bestrahlung von Tumoren zu einer besseren Antigen Präsentation über die Oberflächenproteine MHC (engl. Major Histocompatibility Complex) Klasse I und II (Chiriva-Internati *et al.*, 2006). Diese Kreuzpräsentation führt im Weiteren dazu, dass Tumorzellen besser durch Zellen des adaptiven Immunsystems (insb. zytotoxische T-Lymphozyten) erkannt und eliminiert werden können (Lugade *et al.*, 2008; Reits *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde beobachtet, dass Bestrahlung die Infiltration von Immunzellen in den Tumor unterstützt (Kaur & Asea, 2012; Lugade *et al.*, 2005). Dieser Effekt kann ebenfalls zu einer verbesserten lokalen und systemischen Tumorkontrolle beitragen. Nobler beschrieb bereits 1969, dass eine lokale Bestrahlung zu einer Reduktion von Tumormetastasen in anderen Körperregionen führen kann (Nobler, 1969). Dieses Phänomen wird auch als abkopaler Effekt bezeichnet. Ergebnisse aus Tierexperimenten stützen die Beobachtungen von Nobler (Derer, Frey, *et al.*, 2015). Es kann somit festgehalten werden, dass eine lokale Bestrahlung auch eine systemische Antitumorwirkung haben kann. Die genauen Mechanismen, die hierfür verantwortlich sind, sind allerdings noch nicht erforscht. Aktuell wird angenommen, dass durch eine lokale Bestrahlung eine Aktivierung des Immunsystems erfolgt. Insbesondere zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), Natürliche Killerzellen (NK) und Dendritische Zellen (DC) können durch Strahlung aktiviert werden (Demaria *et al.*, 2004; Derer, Deloch, *et al.*, 2015; Formenti & Demaria, 2013). Diese Immunzellen können in weiteren Schritten zu einer effektiven systemischen Antitumorantwort führen.

Außerdem zeigen Zellen unterschiedlicher Tumorentitäten nach Bestrahlung Veränderungen in ihrem Zytokinprofil (Desai *et al.*, 2013). Einige Zytokine, wie bspw. IFN- $\gamma$ , werden verstärkt sezerniert. Insbesondere die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die bei

einer  $T_H1$  polarisierten Immunantwort eine zentrale Rolle einnehmen, können die Tumorproliferation hemmen und zu einer verbesserten Tumorkontrolle beitragen (Mantovani *et al.*, 2003). Die genauen Wirkmechanismen sind noch nicht geklärt und derzeit Gegenstand der Forschung.

Die folgende Abbildung soll einen groben Überblick über die Interaktionen zwischen Strahlentherapie, Immunsystem und Tumor geben.



**Abbildung 2: Überblick - Interaktionen zwischen Tumor, Immunsystem und Bestrahlung.** In der Abbildung sind einige ausgewählte Interaktionen zwischen Tumorzellen, Immunsystem und Bestrahlung dargestellt. Eine Bestrahlung kann dazu führen, dass auf der Oberfläche von Tumorzellen vermehrt MHC-I, HSP70, Fas, NKG2DL präsentiert werden. Dies führt zu einer besseren Erkennung dieser Tumorzellen durch Immunzellen und zu einer Aktivierung der Immunzellen. Diese können im Verlauf weitere Immunantworten auslösen (z.B. Sezernierung von Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ). Des Weiteren kann eine Bestrahlung dazu führen, dass Tumorzellen Chemokine freisetzen (z.B. CCL2, CXCL16). Diese Botenstoffe sorgen dafür, dass vermehrt Immunzellen (z.B. NK-Zellen und CTL) in den Tumor migrieren. Sterbende Tumorzellen können zudem DAMPs (danger-associated molecular pattern) freisetzen. Diese werden unter anderem von DC aufgenommen, prozessiert und Zellen des Immunsystems präsentiert. Hierdurch werden weitere Zellen aktiviert, speziell CTL.

## 1.4 Interferon- $\gamma$

Zytokine sind Proteine und Glykoproteine mit regulierender Wirkung auf das Wachstum und die Differenzierung von Zellen (Herold, 2014). Interferone gehören zu der Gruppe der Zytokine. Grundsätzlich kann in Typ I Interferone und Typ II Interferone unterteilt werden. Zu den Typ I Interferonen gehören als bekannteste Vertreter das Interferon- $\alpha$  und das Interferon- $\beta$ . Das Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ist der einzige Vertreter der Typ II Interferone (Gray & Goeddel, 1982). Eine Vielzahl von Zellen ist in der Lage IFN- $\gamma$  zu produzieren, unter anderem T<sub>H</sub>1-Zellen, zytotoxische T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (Flaishon *et al.*, 2000; Frucht *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2000). Die IFN- $\gamma$  Produktion wird gesteigert durch die Regulatorproteine Interleukin-12 und 18 (IL-12 und IL-18). Einen negativen Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Produktion haben das Interleukin-4 (IL-4) und das Interleukin-10 (IL-10).

Die Wirkungen von IFN- $\gamma$  sind vielfältig. Im Folgenden sind exemplarisch einige immunologische und Antitumorwirkungen aufgelistet:

- gesteigerte Antigen Präsentation über die Oberflächenproteine MHC Klasse I und II (Boehm *et al.*, 1997; Muhlethaler-Mottet *et al.*, 1998)
- Inhibition von Zyklin-abhängigen Kinasen (engl. cyclin-dependent kinases, CDKs), wodurch ein Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase induziert wird (Harvat & Jetten, 1996; Kim *et al.*, 2012)
- Induktion von unterschiedlichen Arten von Zelltod (Rakshit *et al.*, 2014)
- Produktion von reaktiven Sauerstoffspezien (engl. reactive oxygen species, ROS) (Watanabe *et al.*, 2003)

Dieser Überblick zeigt bereits, dass IFN- $\gamma$  bei einer Vielzahl an immunologischen Reaktionen im Tumormikromilieu beteiligt ist (Schroder *et al.*, 2004). Insbesondere die Kombination von IFN- $\gamma$  mit dem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) zeigte vielversprechende Ergebnisse in *in vitro* und *in vivo* Tumorexperimenten (Braumüller *et al.*, 2013; Hunder *et al.*, 2008). In einigen Tumoren führte eine Kombination dieser beiden T<sub>H</sub>1-Zytokine zu einer verminderten Tumorphiliferation durch die Induktion von Seneszenz (Braumüller *et al.*, 2013; Müller-Hermelink *et al.*, 2008). Seneszenz stellt ein Stadium des permanenten Wachstumsarrests dar (Collado *et al.*, 2007). Ferner findet IFN- $\gamma$  bei der Tumorthherapie innerhalb klinischer Studien Verwendung. Der Einsatz



von IFN- $\gamma$  in einer randomisierten Phase III Studie bei Frauen mit Ovarialkarzinom zeigte ein verbessertes progressionfreies Überleben (Windbichler *et al.*, 2000). Das Gesamtüberleben konnte ebenfalls gesteigert werden. Die Ergebnisse hierfür waren jedoch statistisch nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. In der Literatur liegen ebenfalls Daten vor, die zeigen, dass IFN- $\gamma$  auch tumorfördernde Eigenschaften besitzt. Zaidi und Merlino beobachteten, dass die Wirkung von IFN- $\gamma$  auf den Tumor von der Tumorentität, dem Tumormikromilieu und der Signalintensität abhängt (Zaidi & Merlino, 2011).

## **1.5 Immuntherapie und die Kombination aus Strahlen- und Immuntherapie**

In den letzten Jahren rückte die Immuntherapie verstärkt in den Fokus bei der Behandlung von Tumoren, unter anderem auch beim Rhabdomyosarkom (Pedrazzoli *et al.*, 2011; Pollack *et al.*, 2011). Die Grundidee dieser Therapieansätze ist es, dem angeborenen und adaptiven Immunsystem die Möglichkeit zu geben, effektiver gegen Tumore vorzugehen. Die Art und Weise der einzelnen Behandlungsstrategien ist jedoch in den angewendeten Immuntherapien vielfältig. So beschäftigen sich einige Therapieansätze mit einer Tumorstimmulierung (Palena & Schlom, 2010). Bei anderen Therapiestrategien liegt das Augenmerk verstärkt auf einer Tumorbehandlung mit spezifischen immunstimulierenden Antikörpern (Wilky & Goldberg, 2014). Weitere Ansätze versuchen mit Hilfe eines adoptiven T-Lymphozyten Zelltransfers eine Aktivierung des Immunsystems zu induzieren (Dudley & Rosenberg, 2003; Rosenberg *et al.*, 2011). Wieder andere eruiieren das Tumorsprechen nach einer Behandlung mit Zytokinen und Chemokinderivaten (Tagawa, 2000). Eines der zentralen Probleme besteht darin, dass viele dieser Therapiestrategien keine ausreichend starke Aktivierung des Immunsystems herbeiführen (Rosenberg, 2001). Trotz aktiviertem Immunsystem kommt es zu einer insuffizienten Antitumorwirkung, wobei maligne Zellen wenig bis gar nicht in ihrer weiteren Ausbreitung gestört werden und somit weiter proliferieren, umliegendes Gewebe infiltrieren und gegebenenfalls metastasieren können. Dennoch konnten einige Immuntherapien bemerkenswerte Ergebnisse in *in vitro* und *in vivo* Experimenten erzielen. Einige dieser Therapiestrategien konnten bereits in

klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit hin getestet werden und zeigten überzeugende Ergebnisse. Allen voran die sogenannten Check-Point-Inhibitoren anti-CTLA-4-, anti-PD-1- und anti-PD-L1-Antikörper sind hier zu nennen. Diese zeigten bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen, wie beispielweise dem metastasierten Melanom, Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) und bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen ihr klinisches Potential (Brahmer *et al.*, 2012; Hodi *et al.*, 2010). Sie stellen erfolgsversprechende Therapieoptionen für die zukünftige Tumorbehandlung dar.

Nichtsdestotrotz zeigen Immuntherapien bei einer Vielzahl von Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten nur eine geringe bis keine Antitumorwirkung. Ein Hauptproblem, welches bereits aufgeführt wurde, ist die Tatsache, dass Tumore sich durch raffinierte Mechanismen einer Immunantwort bzw. dem Immunsystem und damit auch einer Immuntherapie entziehen können (Fuchs & Matzinger, 1996; Ochsenbein *et al.*, 1999). Im Folgenden sind exemplarisch einige dieser Mechanismen genannt:

- Generierung eines günstigen Tumormikromilieus durch Sekretion von immunsuppressiven Faktoren wie zum Beispiel TGF-beta und Interleukin-10 (Youn & Gabilovich, 2010)
- reduzierte Abundanz von MHC-I bei gleichzeitiger Produktion eines MHC-Ersatzes, verringerte Expression von Adhäsionsmolekülen und dezimierte kostimulierende Moleküle, die für eine Immunantwort benötigt werden (Hicklin *et al.*, 1999; Staveley-O'Carroll *et al.*, 1998)
- Modulation von tumorassoziierten Antigenen, Antigen-Shedding (Abstoßen von Antigenen von der Tumorzellmembran) oder Antigen-Masking (Maskieren von Tumorantigenen auf der Zelloberfläche) (Mohanty & Sai Leela, 2014)
- Entwicklung einer Apoptose-Resistenz durch Synthese anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 (Campos *et al.*, 1993; Weller *et al.*, 1995)
- ausbleibende Migration von Tumorzellen in die Lymphknoten und somit eine ausbleibende Aktivierung von T-Lymphozyten (Ochsenbein *et al.*, 2001)
- Ansiedlung von malignen Zellen in physiologisch und anatomisch ungünstigen Regionen (bspw. Gehirn, Auge) (Rocha *et al.*, 1998)

Diese Mechanismen und weitere sind in der Literatur hinreichend beschrieben (Akasaki *et al.*, 2004; Foss, 2002; Hanahan & Weinberg, 2011; Hartmann *et al.*, 2003; Natali *et*

*al.*, 1989; Peng, 2010; Scheithauer *et al.*, 2014). Um diese Problematik zu umgehen und Tumore immunogener zu machen, kann es sinnvoll sein, weitere Therapien und Behandlungsformen heranzuziehen oder/und zu kombinieren. Ein potentieller Kombinationspartner für eine Immuntherapie könnte die Strahlentherapie darstellen (Chakraborty *et al.*, 2004; Kriegs *et al.*, 2010; Rizvi *et al.*, 2015). Schon seit geraumer Zeit ist bekannt, dass die Strahlentherapie ein immunmodulatorisches Potential besitzt (Tochner & Slavin, 1988). In dem Abschnitt Strahlentherapie und Immunsystem sind bereits einige dieser immunmodulatorischen Komponenten der Strahlentherapie erwähnt worden (siehe 1.3). Welcher dieser Mechanismen entscheidend für einen synergistischen Effekt zwischen Strahlen- und Immuntherapie ist, kann nach dem aktuellen wissenschaftlichen Informationsstand nicht eindeutig benannt werden. Es ist davon auszugehen, dass hier multimodale Interaktionen (zwischen Immunsystem, Tumor und Strahlentherapie) ausschlagend für einen Antitumoreffekt sind.

Insbesondere Tumorentitäten, die sich als therapie- und strahlenresistent präsentieren oder Tumoren in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien stellen ausgesprochene Probleme in der Klinik dar. Hier stoßen konventionelle Tumorthapieformen wie die Chirurgie, Chemotherapie oder Strahlentherapie nicht selten an ihre Grenzen. Insbesondere Patienten mit diesen klinischen Konstellationen könnten von modifizierten Therapieansätzen durch ein verbessertes Tumoransprechen und damit einer günstigeren Prognose profitieren. Neben den bereits oben erwähnten Patientengruppen mit malignen Melanomen und Lungenkarzinomen, könnten überdies auch Patienten mit kolorektalen Karzinomen von einer kombinierten Strahlen- und Immuntherapie profitieren. Bei dieser Tumorentität gibt es Untergruppen, die ein hohes somatisches Mutationsvorkommen aufweisen. Diese scheinen sensibler für den Einsatz einer kombinierten Strahlen- und Immuntherapie zu sein (Alexandrov *et al.*, 2013; Rizvi *et al.*, 2015).

Eine Strahlentherapie kann grundsätzlich mit unterschiedlichen Arten einer Immuntherapie verknüpft werden. Eine Kombination aus Strahlen- und Immuntherapie mit Ipilimumab (anti-CTLA-4 spezifischer monoklonaler Antikörper) zeigte eine verbesserte Tumorkontrolle bei unterschiedlichen Tumorentitäten. Der Zuwachs in der Antitumorwirkung zeigte sich vor allem bei Tumoren, die initial schlecht auf eine Mono-Immuntherapie ansprachen (Vanpouille-Box *et al.*, 2015). Vanpouille-Box und

Kollegen erklären den synergistischen Effekt dadurch, dass eine Strahlentherapie einen ähnlichen Effekt wie eine Vakzinierung besitzt (Vanpouille-Box *et al.*, 2015). Eine Bestrahlung von malignen Zellen führe somit zu einem „Priming“ des Immunsystems (Shahabi *et al.*, 2015). Unter dem Begriff „Priming“ (aus dem engl. = vorbereiten) kann eine Konditionierung des Immunsystems zur erhöhten Aktivität verstanden werden. Des Weiteren zeigte eine Kombination von Strahlentherapie mit einem adoptiven T-Lymphozyten Zelltransfer eine gute Antitumorwirkung im Mausmodell (Nikitina & Gabrilovich, 2001; Wei *et al.*, 2013). Die Kombination von Strahlentherapie mit Zytokinen und Chemokinderivaten zeigte *in vitro* und *in vivo* ebenfalls einen vielversprechenden Antitumoreffekt (Demaria *et al.*, 2014).

Welche Kombination von Radio- und Immuntherapie bei welchen Tumorentitäten die überzeugendsten Ergebnisse liefert, muss in zukünftigen wissenschaftlichen Projekten vertiefend erforscht werden.

## 1.6 Ziel dieser Arbeit

Es konnte im humanisierten Mausmodell für A204 Rhabdomyosarkom Xenografts gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem Immunzytokin NHS-IL12 zu einer Tumorkontrolle führen kann. Dabei wurde beobachtet, dass einige der Tumorzellen in eine terminale Seneszenz überführt werden (Schilbach *et al.*, 2015). Das Immunzytokin NHS-IL12 induziert eine Immunantwort am Tumor. Bei dieser Immunantwort spielen unter anderem die  $T_H1$ -Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  eine wesentliche Rolle. Braumüller und Kollegen zeigen, dass eine kombinierte Behandlung mit den  $T_H1$ -Zytokinen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in einigen ausgewählten Tumorzelllinien zu einer verminderten Proliferation und zur Induktion von Seneszenz führt (Braumüller *et al.*, 2013). Ob eine Kombination von Bestrahlung und Zytokinbehandlung einen ähnlichen Effekt vermittelt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Die grundlegende Fragestellung dieser Arbeit war, welchen Einfluss eine Behandlung mit dem  $T_H1$ -Zytokin IFN- $\gamma$  auf die Strahlenantwort in der A204 Rhabdomyosarkom-Tumorzelllinie hat. Insbesondere das klonogene Überleben, Zellzyklusveränderungen und ausgewählte zelluläre Mechanismen der Interaktion zwischen Tumorzellen, IFN- $\gamma$  und Bestrahlung waren hierbei von Interesse. Dies wurde durch entsprechende Experimente *in vitro* untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 1: Geräte**

Name	Typ	Hersteller
Elektrophorese		Biometra
ELISA-Reader	2010	Anthos
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf
Inkubator	CO <sub>2</sub> -Inkubator Serie CB	Binder
Inkubator	HERA cell 240	Heraeus
Light Cycler	LightCycler® 480 System	Roche
Linearbeschleuniger	LINAC	Elekta
Pipettierhilfe	PIPETBOY comfort	Integra Bioscience
Powersupply	Power Pac 300	BIO-RAD
Powersupply	Power Pac HC	BIO-RAD
Sterilbank	Typ UVF	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf
Transfertank	TRANS-BLOT CELL	BIO-RAD
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf

**Tabelle 2: Mikroskope und optische Geräte**

Name	Hersteller	Beschreibung
anthos 2010	Biochrom	Microplate Reader
NanoDrop 1000	Thermo Scientific	Spectrophotometer
Stemi 2000	Zeiss	Binokular
Wilovert S	Hund	inverses Mikroskop
Leica TCS	Leica	Fluoreszenzmikroskop

EOS 1000d	Canon	Digitale Spiegelreflexkamera
AxioVert 25	Zeiss	Inverses Mikroskop

## 2.1.2 Materialien und Chemikalien

**Tabelle 3: Zellkulturzubehör**

Name	Durchmesser/Fläche	Hersteller	Cat.No.
Millicell® EZ SLIDES	0.7 cm <sup>2</sup>	Merck Millipore	PEZGS0816
Multiwell 6 Well Tissue Culture Treated	9.6 cm <sup>2</sup>	BD FALCON®	353224
Multiwell 96 Well Tissue Culture Treated	0.36 cm <sup>2</sup>	BD FALCON®	353072
TC-Flasche T25 Stand., Bel. Kappe	25 cm <sup>2</sup>	SARSTEDT	83.3910.002
TC-Flasche T75 Stand., Bel. Kappe	75 cm <sup>2</sup>	SARSTEDT	83.3911.002
TC-Flasche T175 Stand., Bel. Kappe	175 cm <sup>2</sup>	SARSTEDT	83.3912.002
Zellschaber 25 cm	Klinge: 17 mm	SARSTEDT	83.1830

## 2.1.3 Zellsystem

**Tabelle 4: Zellsystem**

Linie	Zelltyp	Medium	Informationen
A204	humane Rhabdomyosarkomzellen	RPMI 1640 + 10% FBS	ATCC®, Manassas, VA, USA, ATCC®-number: HTB-82

## 2.2 Methoden

Die im folgenden Kapitel aufgeführten Informationen wurden den Standardprotokollen der Abteilung Experimentelle Radioonkologie (Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen), der Masterarbeit von L. Klumpp und den jeweiligen Herstellerprotokollen entnommen.

### 2.2.1 *Subkultivierung von Zellen*

Für die Experimente wurde die Rhabdomyosarkom-Zelllinie A204 verwendet (siehe Tabelle 4, Zellsystem). Die Zelllinie wurde bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank in Kultur gehalten. Bei 80 - 90% konfluentem Wachstum wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Nährmedium (RPMI 1640 + 10% FBS) abgenommen und die Zellen mit 3 mL, 6 mL oder 10 mL PBS gewaschen, je nach Größe der Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup>). Nach Abnahme des PBS wurden 1 mL, 3 mL oder 6 mL CDS zugegeben und die Flaschen für 10 - 15 min in den Brutschrank gestellt. Danach hatten sich die Zellen zum größten Teil abgelöst. Mit Hilfe des Nährmediums (3 - 5 mL) wurden die restlichen noch adhärenen Zellen via pipettieren abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Falcon Tube überführt und bei 1200 rpm für 6 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und frisches Medium auf das Zellpellet pipettiert und anschließend resuspendiert. Die Zellzahl wurde danach durch eine „C-Chip Neubauer improved“ Zählkammer bestimmt. Um die Lebendzellzahl der Probe zu bestimmen, wurde die Zellsuspension mit einer 10%-Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 verdünnt. Zugrunde gegangene Zellen nehmen aufgrund ihrer defekten Zellmembran den Farbstoff auf und erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau. Die Zellen wurden über acht Großquadrate ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Dieser wurde mit dem Kammerfaktor 10<sup>4</sup>, sowie der Trypanblau Verdünnung (x 2) multipliziert und damit die Zellzahl berechnet.



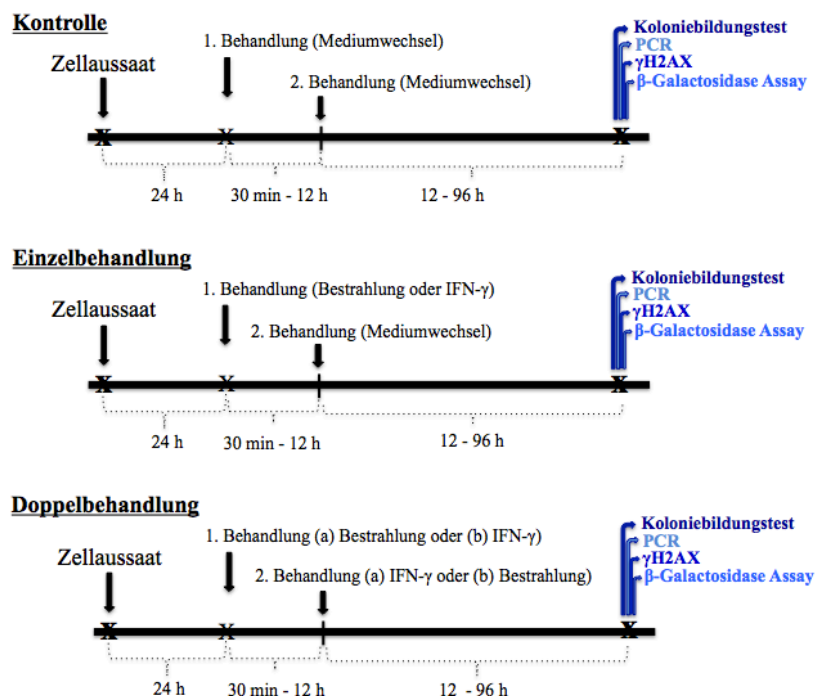
## 2.2.2 Behandlung der Zellen

Die Zelllinie A204 (Rhabdomyosarkom-Zelllinie) wurde abhängig von der jeweiligen Versuchsmethode unterschiedlich behandelt. Die Behandlungen können folgendermaßen aufgeteilt werden:

- keine Behandlung, es wurde lediglich ein Mediumwechsel (MW) durchgeführt (= Kontrolle)
- Einzelbehandlung (Bestrahlung oder IFN- $\gamma$ )
- Doppelbehandlung (Bestrahlung und IFN- $\gamma$ )

Bei der Bestrahlung der Tumorzellen variierte die applizierte Dosis von 2 bis 6 Gy abhängig vom durchgeführten Versuch. Für die Behandlung mit IFN- $\gamma$  wurde eine Konzentration von 10 ng/mL verwendet. Bei zwei Methoden ( $\beta$ -Galactosidase Assay,  $\gamma$ H2AX) wurden zusätzlich Konzentrationen von 100 ng/mL eingesetzt. Weitere wichtige Komponenten bei den Versuchen waren der Zeitpunkt und die Reihenfolge der Behandlungen (z.B. bei den Doppelbehandlungen).

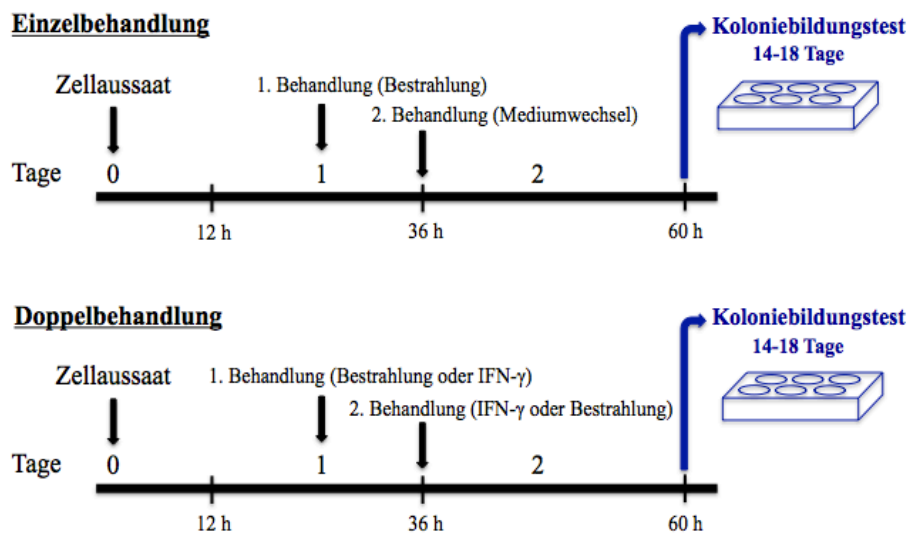
Systematisch soll die Abbildung 3 einen groben Überblick hierfür geben.



**Abbildung 3: Überblick über den Behandlungsablauf der Experimente.** Es können 3 Behandlungsansätze (Kontrolle, Einzelbehandlung und Doppelbehandlung) unterschieden werden. Die Inkubationsschritte variierten je nach Experiment zwischen 30 min und 12 h nach der 1. Behandlung und 12 - 96 h nach der 2. Behandlung. Die Zellen wurden anschließend für die unterschiedlichen Experimente (Koloniebildungstest, PCR etc.) verwendet.

### 2.2.3 Koloniebildungstest

Durch den Einsatz von Koloniebildungstests kann der Effekt auf die Klonogenität von Zellen nach Behandlung (siehe Abbildung 4) ermittelt werden. Dabei werden zwei Varianten unterschieden. Beim „Pre-Plating“ werden die Zellen in 6-Well Platten ausplattiert und anschließend behandelt. Bei der Variante „Delayed-Plating“ werden die Zellen zunächst in Zellkulturflaschen behandelt und im Anschluss in 6-Well Platten ausplattiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des Delayed-Plating angewendet. Die Zellen wurden für die Koloniebildungstests in T25-Zellkulturflaschen ausgesät (120.000 Zellen in 5 mL RPMI-Medium pro Flasche) und für 24 h kultiviert. Bei der Einzelbehandlung folgte eine Bestrahlung (0, 2, 4 und 6 Gy) und nach 12 h ein Mediumwechsel. Bei der Doppelbehandlung erfolgte zuerst eine Primärbehandlung: Bestrahlung (0, 2, 4 und 6 Gy) bzw. eine Behandlung mit IFN- $\gamma$  (Konzentration 10 ng/mL). Nach einer Inkubationszeit von 12 h folgte die Sekundärbehandlung (IFN- $\gamma$  bzw. Bestrahlung). Die Zellen wurden im Anschluss (36 h post Primärbehandlung) geerntet, gezählt und auf 150 Zellen / mL bzw. 300 Zellen / mL RPMI-Medium verdünnt. Es wurden pro Well 2 mL ausplattiert. Die Platten wurden bei Standardbedingungen für 14 - 18 Tage inkubiert.



**Abbildung 4: Systematischer Überblick über den Behandlungsablauf des Koloniebildungstest.** Es wurde „Delayed-Plating“ durchgeführt. Die Tumorzellen wurden zum Zeitpunkt 0 in kleine Zellkulturflaschen ausgesät und für 24 h kultiviert. Es folgte eine Einzelbehandlung (Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 6 Gy) und ein anschließender Mediumwechsel (nach 12 h) oder eine Doppelbehandlung (Bestrahlung + IFN- $\gamma$  oder IFN- $\gamma$  + Bestrahlung). 24 h nach der 2. Behandlung wurden die Tumorzellen in 6-Well Platten ausgesät.

Die Platten des Koloniebildungstests wurden bei ausreichender Größe der Kolonien in den Kontrollen abgestoppt. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 3.7% Formaldehyd in PBS für 10 min fixiert. Ein weiterer Fixierungsschritt (für 10 min) wurde in 70%igem EtOH durchgeführt. Es folgte ein Waschschrift mit destilliertem H<sub>2</sub>O. Die Färbung der fixierten Kolonien wurde mit Hilfe einer 0.05% Coomassie Lösung (20% Methanol, 7.5% Essigsäure, 0.05% (w/v) Coomassie Brillant Blue R in destillierten H<sub>2</sub>O) durchgeführt. Die Wells wurden mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend getrocknet.

## ***2.2.4 Proteinbasierte Methoden***

### ***Proteinisolation***

Für die Isolation der Proteine wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. In Abhängigkeit von der Zelldichte wurden 100 - 450 µL eines Protease-Inhibitoren Mix (Zusammensetzung siehe Tabelle 13) in die Flasche gegeben. Danach wurde die Flasche leicht geschwenkt und auf Eis gestellt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Flasche abgelöst und in ein 1.5 mL Eppendorf Tube überführt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min. Die lysierten Zellen wurden bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Dadurch werden die Proteine von größeren Zellfragmenten getrennt. Das Lysat wurde ohne Zellfragmente in ein frisches Eppendorf Tube (1.5 mL) überführt. Für die Bestimmung des Proteingehalts im Lysat wurde mithilfe des Bio-Rad Protein Assay eine Eichgerade bestimmt. Die Messung wurde in einer 96-Well flat-bottom Platte durchgeführt. Eine Eichgerade wurde mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µg BSA angesetzt.

### ***SDS-Page***

Für die Herstellung des Gels wurden die Glasplatten vorbereitet. Innerhalb dieser wurde das angesetzte Trenngel (siehe Tabelle 8) bis circa 1.5 cm unter den Rand pipettiert und dann mit 100% EtOH beschichtet. Nach circa 45 min und erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das EtOH abgenommen und das Sammelgel angesetzt und gemischt.

Das Sammelgel wurde bis zum oberen Rand in die Glasplatten pipettiert und der Kamm vorsichtig hinein gesteckt. Es folgte eine Polymerisationszeit von 15 min.

Das auspolymerisierte Gel wurde in einer vertikalen Elektrophoresekammer befestigt und der Kamm herausgezogen. Der untere und obere Bereich der Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer gefüllt. Luftblasen in dem Gel wurden entfernt und das Gel beladen. Es wurde eine Spannung von 60 V eingestellt, welche nach 30 min auf 160 V erhöht wurde. Der Lauf wurde in Abhängigkeit von der gewünschten Proteinauftrennung gestoppt.

### ***Western Blot***

Nach erfolgter SDS-Page wurden die Glasplatten aus der Elektrophoresekammer genommen. Die Platten wurden mithilfe eines Skalpell von voneinander getrennt. Das Gel wurde markiert und in eine vorbereitete Schale mit Transferpuffer (ohne Isopropanol) überführt. Zudem wurden Fasermatten und Filterpapier in eine Schale mit Transferpuffer (ohne Isopropanol) gelegt. Beides sollte ausreichend Pufferflüssigkeit aufnehmen. Um die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran zu aktivieren, wurde diese kurz in 100% Isopropanol gelegt. Anschließend wurde das „blot sandwich“ in der Blotting-Kassette aufgebaut (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Systematische Darstellung des Aufbaus eines „blot sandwich“ in der Blotting-Kassette.** Innerhalb der Blotting-Kassette wandern die Proteine vom negativen Pol (obere Kassettenplatte) zum positiven Pol (untere Kassettenplatte). Dadurch werden die Proteine von dem Gel auf die darunterliegende PVDF-Membran übertragen.

Die Blotting-Kassette wurde in den Transfertank (Gel Richtung Kathode, Membran zur Anode) gestellt. Der Transfer (120 mV, 90 min, 4 °C) wurde gestartet, wobei auf eine ausreichende Menge an Transferpuffer im Tank geachtet wurde.

Nach erfolgreichem Transfer wurde die Blotting-Kassette abgebaut und die PVDF-Membran auf dem Schüttler für 1 h bei RT geblockt (5% (w/v) Milchpulver in TBS-T). Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 5) in 5% Milchpulver / TBS-T bei 4 °C auf dem Schüttler über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 4 x 10 min mit TBS-T gewaschen und danach mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (siehe Tabelle 6), ebenfalls in 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T, für 1 h bei RT inkubiert. Bevor mit ECL (1:1 Mischung aus Peroxidsalz und Luminol) detektiert wurde, erfolgte ein Waschschrift (4 x 10 min in TBS-T).

**Tabelle 5: Primärantikörper/Antikörper**

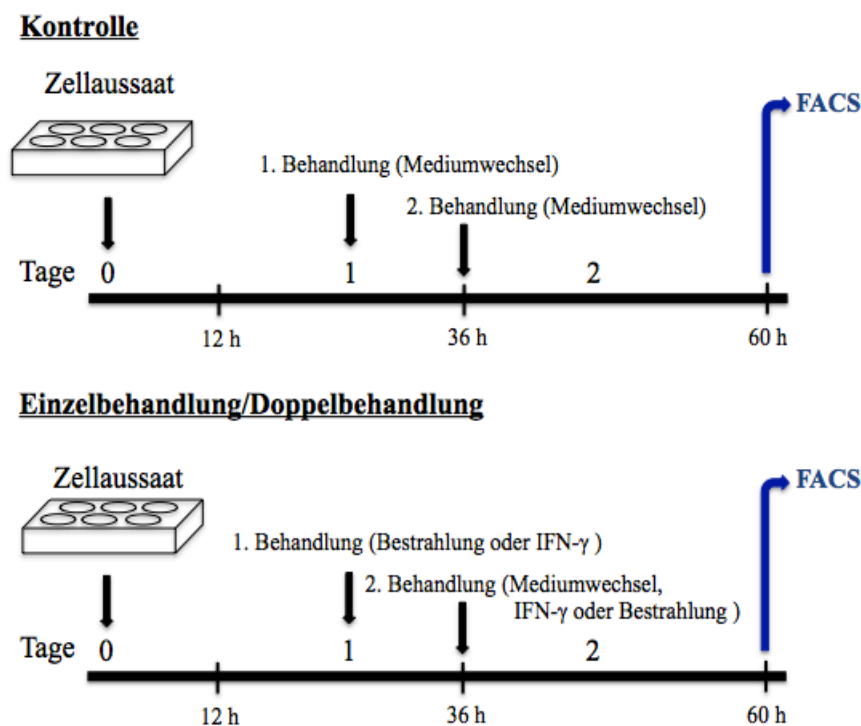
Antigen	Antikörper- Typ	Hersteller	Verdünnung
β-actin	mouse mAb	Sigma-Aldrich®	1:30000
IFN-gamma-Receptor 1	mouse mAb	abcam®	1:5000
STAT1	rabbit mAb	Cell Signaling Technology®	1:2500
pSTAT1	rabbit mAb	Cell Signaling Technology®	1:2500
Human TNF-α Neutralizing	rabbit mAb	Cell Signaling Technology®	1:10000

**Tabelle 6: Sekundärantikörper**

Antigen	Antikörper- Typ	Hersteller	Verdünnung
mouse IgG	HRP	GE Healthcare®	1:2000
rabbit IgG	HRP	GE Healthcare®	1:2000

### 2.2.5 Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence-activated cell sorting)

Um den Einfluss der Einzel- und Doppelbehandlung (Bestrahlung, IFN- $\gamma$  und Bestrahlung + IFN- $\gamma$ ) auf den Zellzyklus der Zellen zu detektieren, wurden FACS-Messungen durchgeführt. In der Durchflusszytometrie können Zellen durch Vorwärts- und Seitwärtsstreuung von Licht in Größe und Grad der Granularität eingeteilt werden. Nach Färbung mit Propidiumiodid kann der DNA-Gehalt in einzelnen Zellen bestimmt werden und die Zellen können somit unterschiedlichen Zellzyklusphasen zugeordnet werden. Für die Analyse wurden die Zellen in einer definierten Zellzahl (50.000 Zellen pro 2 mL Medium/Well bzw. 100.000 Zellen pro 2 mL Medium/Well) in 6-Well Platten ausgesät. Nach 24 h bzw. 36 h wurden die Zellen unterschiedlichen Behandlungen unterzogen (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Systematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Durchflusszytometrie Experimente.** Bei den Kontrollen wurde an zwei Zeitpunkten ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei der Versuchsreihe wurden Einzel- und Doppelbehandlungen in unterschiedlichen Kombinationen vorgenommen. Nach Abschluss der Behandlungen wurde für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden mithilfe einer Propidiumiodid Lösung gefärbt.

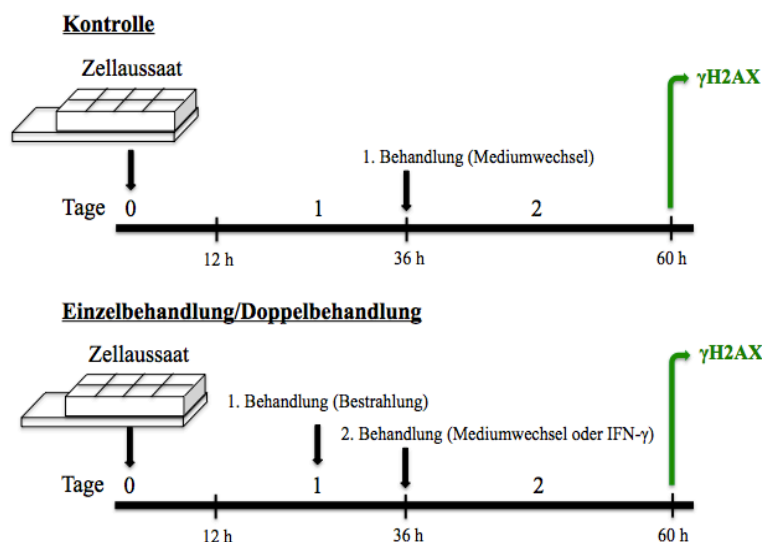
Nach dem Ernten der Zellen wurden diese zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in einer Propidiumiodid Lösung resuspendiert (abhängig vom Zellpellet in 200 bis

300  $\mu$ L). Es folgte ein Inkubationsschritt von 30 - 40 min bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden die Proben im FACS Calibur gemessen.

## 2.2.6 Detektieren von DNA-Schäden

### $\gamma$ H2AX-Foci Detektion

Für die Erfassung der DNA-Schadensreparaturkapazität einer Zelle nach Strahlenexposition wurden  $\gamma$ H2AX Focus Assays verwendet. Das Histonprotein H2AX wird in der anliegenden Umgebung von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in einer ATM-Kinase-abhängigen Reaktion phosphoryliert. Diese Doppelstrangbrüche können durch den Einsatz von Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen das phosphorylierte  $\gamma$ H2AX visualisiert werden. Der Schaden stellt sich als ein  $\gamma$ H2AX-positiver Focus im Zellkern dar. Über die Anzahl der Foci lässt sich der zeitliche Verlauf der DNA-Reparatur verfolgen. Die Anzahl der Foci kurz nach Bestrahlung ist von den induzierten DNA-Schäden abhängig. Die Anzahl residueller Foci > 24 h nach Bestrahlung ist von der DNA-Reparaturkapazität der Zellen abhängig. Die Zellen wurden in Millicell® EZ SLIDES ausgesät (Kontrolle: 2500 Zellen / Well, Behandlung: 5000 Zellen / Well). Nach 24 h wurden die Zellen behandelt (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Systematische Darstellung des Versuchsaufbaus der  $\gamma$ H2AX Experimente.** Die Tumorzellen wurden zum Zeitpunkt 0 ausgesät und für 24 - 36 h kultiviert. Bei der Kontrolle wurde nach 36 h eine Mediumwechsel durchgeführt. Bei der Versuchsreihe wurden die Zellen nach 24 h bestrahlt (2 bzw. 4 Gy) und nach weiteren 12 h erfolgte wahlweise ein Mediumwechsel - / + IFN- $\gamma$ . Nach 24 h erfolgte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Nach einer Inkubation von 24 h erfolgte die Fixierung der Zellen mit 70%igem EtOH. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen (PBS) und mit einer angesetzten Lösung (kaltes PBS, 3% BSA + Triton X100) für 10 min bei RT inkubiert. Dadurch wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht. Danach wurde der  $\gamma$ H2AX Poly-Antikörper in einem PBS/BSA/Tween-Gemisch 1:500 angesetzt und zu den Zellen gegeben (Inkubation bei 4 °C über Nacht). Am folgenden Tag wurde zweimal mit PBS gewaschen und der Sekundärantikörper auf die Zellen gegeben (Inkubation bei RT für 30 min). Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und ein Fluorescence Mounting Medium zugesetzt. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und fotografiert.

### ***2.2.7 Molekularbiologische Methoden (PCR)***

#### ***RNA Isolierung***

Für die Isolation der RNA wurde mit einem RNeasy Mini Kit von QIAGEN gearbeitet. Die Zellen wurden geerntet und pelletiert. Nach vollständiger Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 350  $\mu$ L RLT-Puffer (1:100 mit 2-Mercaptoethanol versetzt) resuspendiert. Dies wurde auf den QIAshredder überführt und zentrifugiert (14000 rpm, 2 min, bei RT). Anschließend wurde der QIAshredder verworfen. 350  $\mu$ L 70% (v/v) EtOH wurden zu dem Durchfluss pipettiert und in Mini Spin Columns überführt. Im folgenden Zentrifugationsschritt (10000 rpm, 20 sek, bei RT) wurde die RNA an die Silica-Säule gebunden. Es folgten drei Schritte für die Aufreinigung der RNA. Für diese wurde der Durchfluss verworfen und 700  $\mu$ L RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (10000 rpm, 20 sek, bei RT). Der Durchfluss wurde ein weiteres Mal verworfen und es folgten zwei Waschschriffe (mit jeweils 500  $\mu$ L RPE-Puffer). Nach der zweiten Zentrifugation (10000 rpm, 2 min, bei RT) mit RPE-Puffer wurde die Säule in einem neuen 2 mL Collection Tube trocken zentrifugiert (10000 rpm, 1 min, bei RT). Für die Elution der RNA wurde die Säule auf ein 1.5 mL Collection Tube gegeben und je nach Größe des lysierten Zellpellets 20 - 40  $\mu$ L RNase-freies Wasser dazu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 sek wurde für 1 min bei RT zentrifugiert (10000 rpm). Die eluierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.



## ***cDNA Herstellung***

Die Synthese der cDNA wurde mit dem „Transcriptor cDNA First Strand Synthesis Kit“ von Roche durchgeführt. Hierfür wurde der RNA-Gehalt der eluierten Proben bestimmt. Für die Messungen im Mikrovolumen Spektralphotometer (NanoDrop 1000) wurden 11 µL Nuklease-freies Wasser mit 1 µg RNA angesetzt.

Für die Synthese der cDNA wurde ein 20 µL Ansatz (11 µL RNA-Lösung + 9 µL Mastermix) auf Eis vorbereitet. Die RNA-Proben wurden für 10 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert. Dadurch sollten Sekundärstrukturen innerhalb der RNA denaturiert werden. Anschließend wurden die Proben im Thermocycler auf 4 °C herunter gekühlt. 9 µL Mastermix wurden auf die abgekühlten Proben pipettiert und das Cyclerprogramm gestartet (25 °C, 10 min; 55 °C, 30 min; 85 °C, 5 min). Nach Synthese der cDNA wurden die Proben auf 4° C gekühlt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

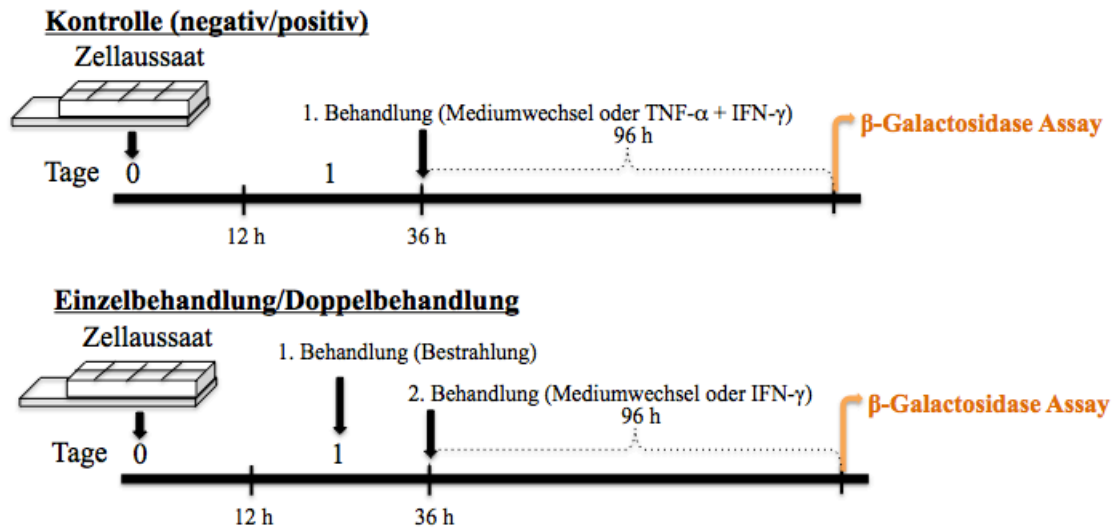
## ***Real-Time PCR***

Für die Real-Time PCR wurde das „QuantiFast™ SYBR® Green PCR Kit“ verwendet. Vorab wurde der Mastermix vorbereitet. Da es sich bei dem Versuch um keine Multiplex-PCR handelt, musste pro verwendetem Primer (siehe Tabelle 11) ein eigener Mastermix (siehe Tabelle 10) angesetzt werden. In eine im Kühlblock befindliche LightCycler® 480 Multiwell Plate (Roche) wurden 2 µL der zuvor synthetisierten cDNA pipettiert. Es wurden 18 µL des angesetzten Mastermix hinzugefügt. Die Platte wurde mit einer LightCycler® 480 Multiwell Sealing Foil (Roche) verschlossen. Um eine Vermischung der cDNA und des Mastermix zu gewährleisten, wurde für 30 sek bei 3000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde die Platte in den LightCycler gesetzt und das qPCR-Programm (siehe Tabelle 12) gestartet.

### ***2.2.8 β-Galactosidase Assay***

Für den Nachweis von seneszenten Zellen wurde ein β-Galactosidase Assay verwendet. Seneszente Zellen zeigen eine gesteigerte Aktivität der SA-β-Gal bei pH 6,0. Dabei hydrolysieren β-Galactosidasen ihr Substrat X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-3-

hydroxyindol. Durch die Ausbildungen von Dimeren (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) und eine anschließende Oxidation entsteht ein Farbstoff, der als Nachweis dient. Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen in einer gewünschten Dichte in 8-Well Monolayer-Slides EZ (Millipore) ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen unterschiedlich behandelt (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Systematische Darstellung des Versuchsaufbaus der  $\beta$ -Galactosidase Assay Experimente.** Bei der Negativkontrolle wurde 36 h nach Zellaussaat ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei der Positivkontrolle wurden die Zellen nach 36 h mit TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) und IFN- $\gamma$  (100 ng/mL) behandelt. Es wurden Einzel- und Doppelbehandlungen in unterschiedlichen Kombinationen vorgenommen. Die Inkubationsdauer betrug für alle Behandlungsvarianten 96 h. Nach Abschluss der Inkubationsdauer erfolgten weitere Arbeitsschritte (gemäß dem  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit, BioAssay Protokoll von US biological).

Nach Ablauf der Inkubationsdauer von 96 h wurde das Nährmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit 350  $\mu$ L/Well PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einer Fixierlösung (250  $\mu$ L/Well) für 15 min bei RT fixiert. Währenddessen wurde die Färbelösung vorbereitet (dem Herstellerprotokoll zu entnehmen). Nach dem Ablauf der Inkubationsdauer wurde die Fixierlösung verworfen und die Zellen zweimal mit PBS (350  $\mu$ L/Well) gewaschen. Folgend wurde die Färbelösung (250  $\mu$ L/Well) auf die Zellen pipettiert. Die 8-Well Monolayer-Slides wurden in Alufolie gewickelt und über Nacht im Brutschrank (37 °C ohne CO<sub>2</sub>) inkubiert. Am folgenden Morgen (nach 12 - 16 h) wurde die Färbelösung verworfen und die Zellen zweimal mit PBS (350  $\mu$ L/Well) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend unter dem Mikroskop untersucht.

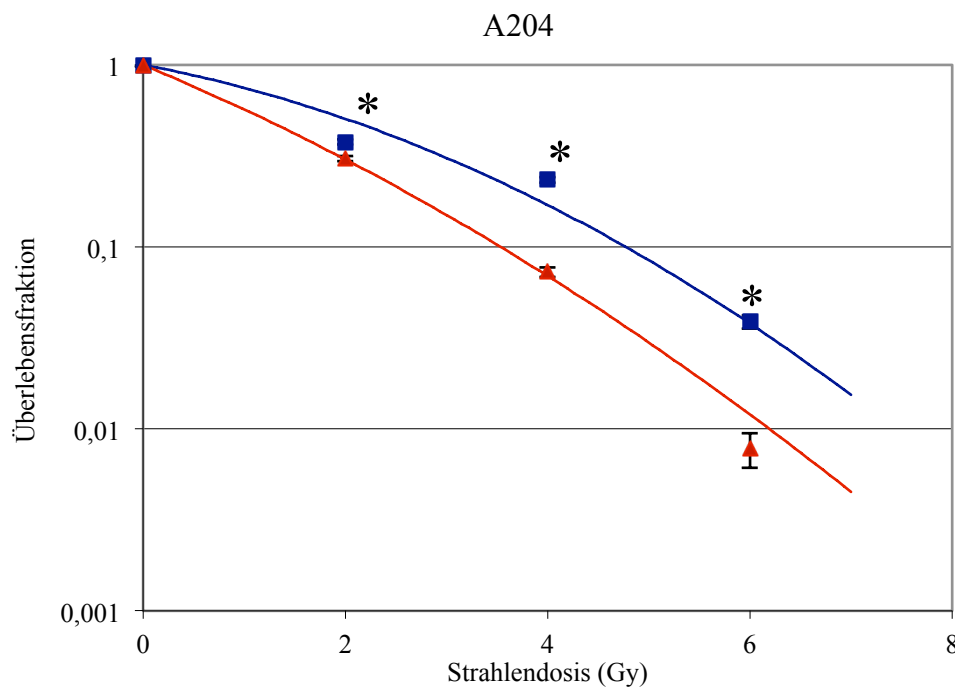
### **2.2.9 TNF- $\alpha$ ELISA**

Mithilfe eines TNF- $\alpha$  ELISA Kits wurde untersucht, ob Bestrahlung eine Zytokinfreisetzung (TNF- $\alpha$ ) bei der Tumorzelllinie A204 induziert. In eine 96-Well flat-bottom Platte wurden pro Well 100  $\mu$ L des angesetzten Fänger- (engl. Capture) Antikörpers pipettiert und für 24 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Fänger-Antikörper entfernt und ein Blockpuffer (300  $\mu$ L/Well) hinzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde der Blockpuffer abgenommen. Zum Erstellen einer Eichgeraden wurde eine Standardlösung (human TNF- $\alpha$  standard) verwendet. Die Proben (Kontrollwerte 30 min, 12 h und 24 h und 30 min, 12 h und 24 h nach Bestrahlung mit 4 Gy) wurden in Wells pipettiert (100  $\mu$ L/Well). Es erfolgte eine Inkubation bei RT für 2 h. Danach wurden die Wells 5-mal mit einem angesetzten Waschpuffer gewaschen (150  $\mu$ L/Well). Anschließend wurde der passende Detektor-Antikörper hinzugefügt (100  $\mu$ L/Well) und für 2 h bei RT inkubiert. Es folgte wieder ein Waschschrift (5-mal mit Waschpuffer). Darauf wurde das HRP-Streptavidin für 20 bis 30 min den Wells zugesetzt. Es wurde wieder 5-mal gewaschen. Im letzten Schritt wurden 100  $\mu$ L Substratmischung (1:1, TMB Peroxidase Substrat: Peroxidase Substrat B) pro Well für maximal 60 min hinzugefügt. Die optische Dichte (OD) wurde bei 450 nm mit einem ELISA-Plattenlesegerät gemessen.

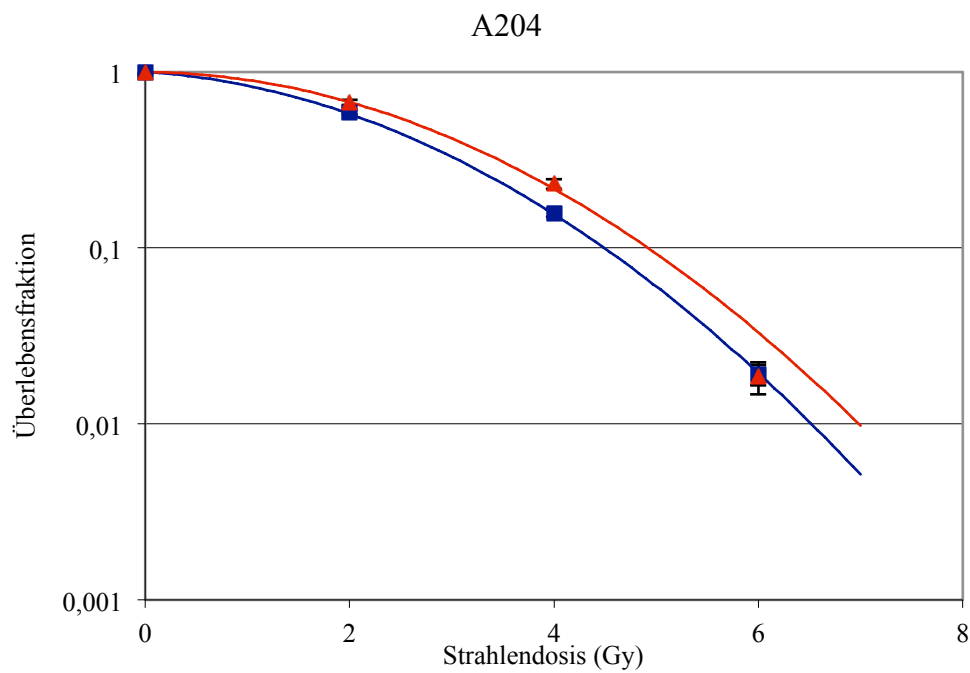
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss von Bestrahlung und IFN- $\gamma$ auf das klonogene Überleben

Der Einfluss von IFN- $\gamma$  auf das klonogene Überleben der Tumorzellen wurde mithilfe von Koloniebildungstests für den Dosisbereich von 0 bis 6 Gy untersucht. Die Zelllinie A204 zeigt eine signifikant verminderte Klonogenität (D37.5 von 3.4 vs. 1.9) nach einer Doppelbehandlung (1. Bestrahlung, 12 h Inkubationsdauer, 2. IFN- $\gamma$ ) (Abbildung 9). Bei der Doppelbehandlung (1. IFN- $\gamma$ , 12 h Inkubationsdauer, 2. Bestrahlung) wurde keine signifikante Verminderung des klonogenen Überlebens beobachtet (Abbildung 10).



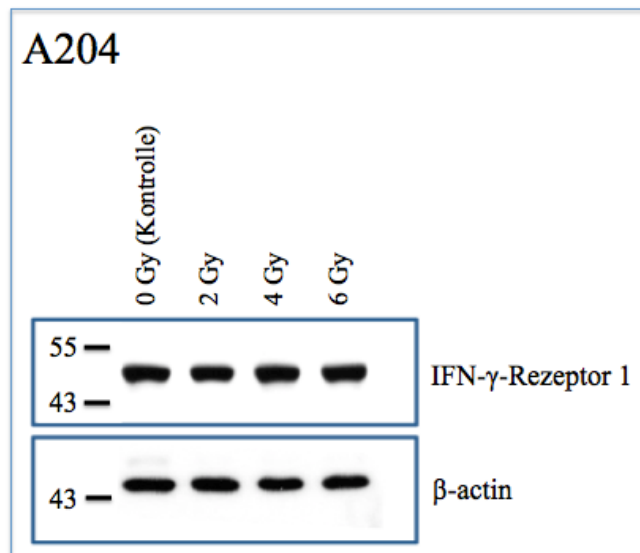
**Abbildung 9: Überlebensfraktion von A204 Zellen nach Bestrahlung (blau) und Bestrahlung + IFN- $\gamma$  (rot).** Nach Bestrahlung folgte eine Inkubation für 12 h. Bei der Einzelbehandlung (Bestrahlung) wurde nach einer Inkubationsdauer von 12 h ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei der Doppelbehandlung (Bestrahlung + IFN- $\gamma$ ) wurde mit IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) behandelt. Dargestellt sind die Verteilungen mit dem jeweiligen Mittelwert und der Standardabweichung. Die Plating efficiency (PE) der A204 Triplikate waren PE(RT) = 0,34 und PE(RT+IFN- $\gamma$ ) = 0,27. n = 3.



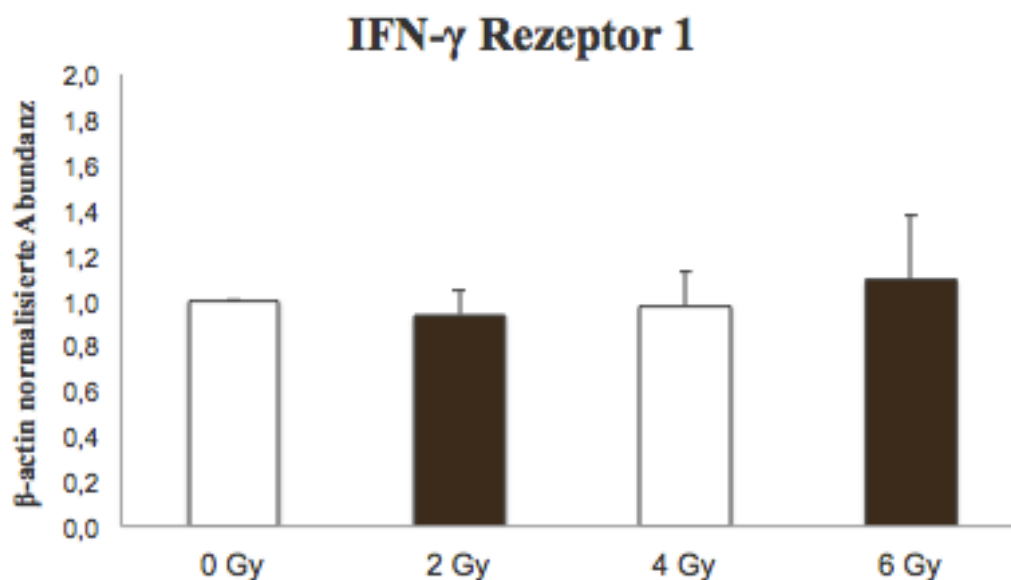
**Abbildung 10: Überlebensfraktion nach Bestrahlung (blau) und IFN- $\gamma$  + Bestrahlung (rot).** Es folgte nach dem Mediumwechsel bzw. der Behandlung mit IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) eine Inkubation für 12 h. Danach wurde bestrahlt (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy). Dargestellt sind die Verteilungen mit dem jeweiligen Mittelwert und der Standardabweichung. Die PE der A204 Triplikate waren PE(RT) = 0,13 und PE(IFN- $\gamma$ +RT) = 0,13. n = 3.

### 3.2 Abundanz des IFN- $\gamma$ -Rezeptors

Die Abundanz des IFN- $\gamma$ -Rezeptors wurde durch den Einsatz von Western Blot Experimenten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie A204 den IFN- $\gamma$ -Rezeptor 1 exprimiert. Bestrahlung modulierte die Abundanz des Rezeptors nicht (Abbildung 11).



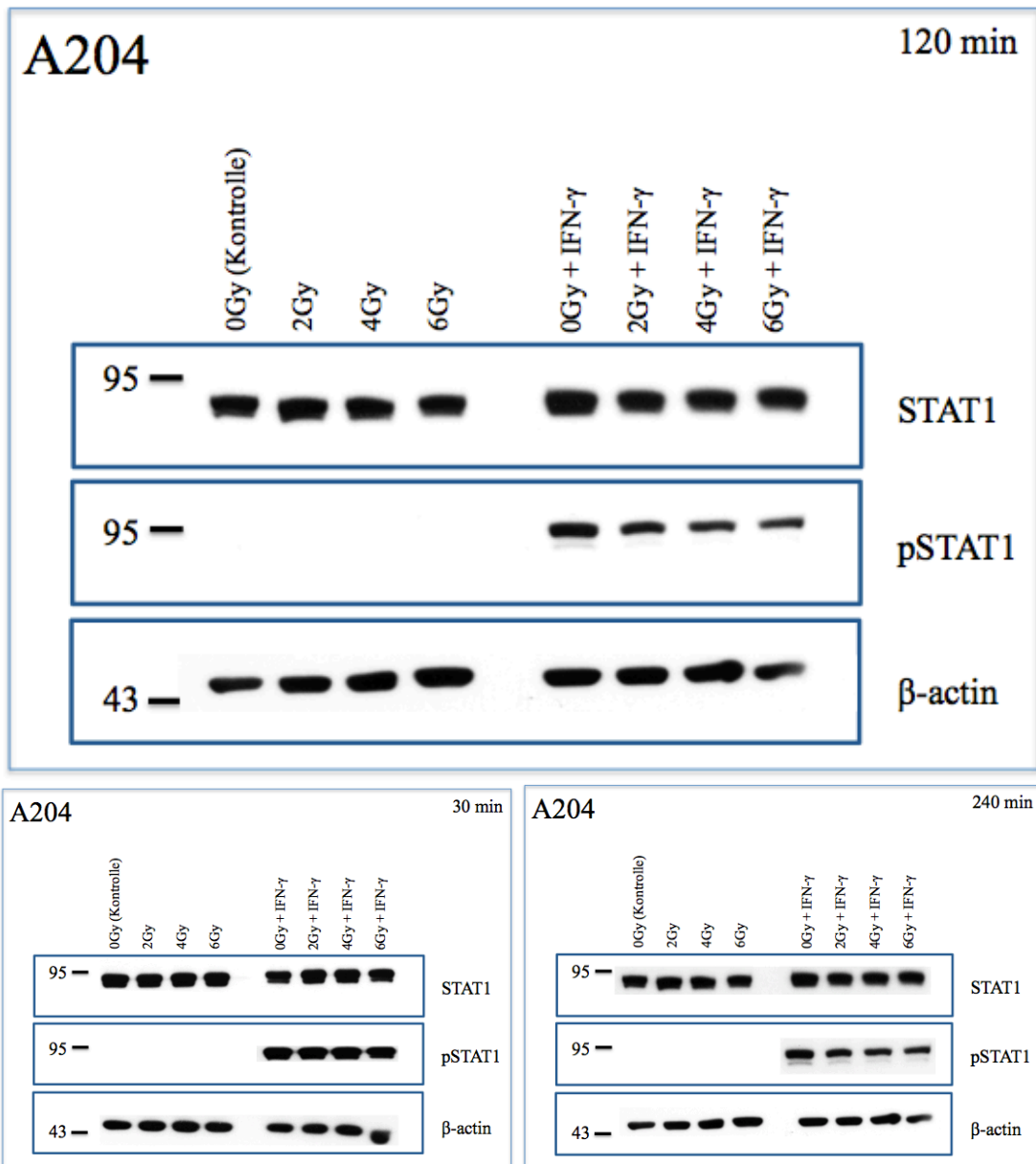
**Abbildung 11: Abundanz des IFN- $\gamma$ -Rezeptor 1.** Die Rhabdomyosarkom-Zelllinie A204 zeigt eine sichtbare Abundanz des IFN- $\gamma$ -Rezeptor 1. Die Detektion von  $\beta$ -actin wurde als Ladekontrolle durchgeführt. n = 3.



**Abbildung 12: Relative Abundanz des IFN- $\gamma$ -Rezeptor 1 in der A204 Zelllinie.** Die relative Abundanz des IFN- $\gamma$ -Rezeptor 1 ist nach Bestrahlung (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy) dargestellt. Die unbehandelte Mediumkontrolle entspricht 1,0 (100%). Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen der Abundanz des IFN- $\gamma$ -Rezeptor 1 durch unterschiedliche Strahlendosen. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Western Blot Experimenten.

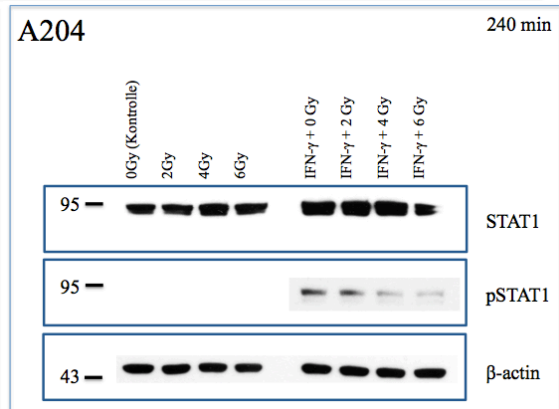
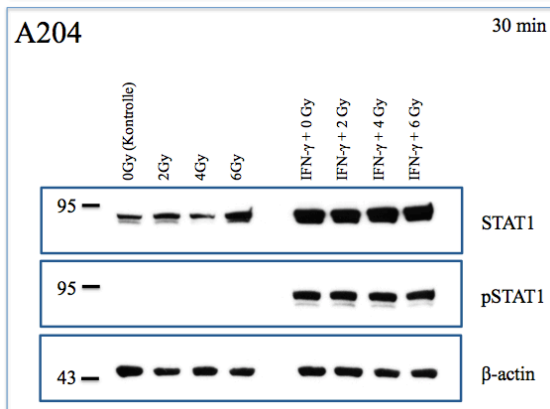
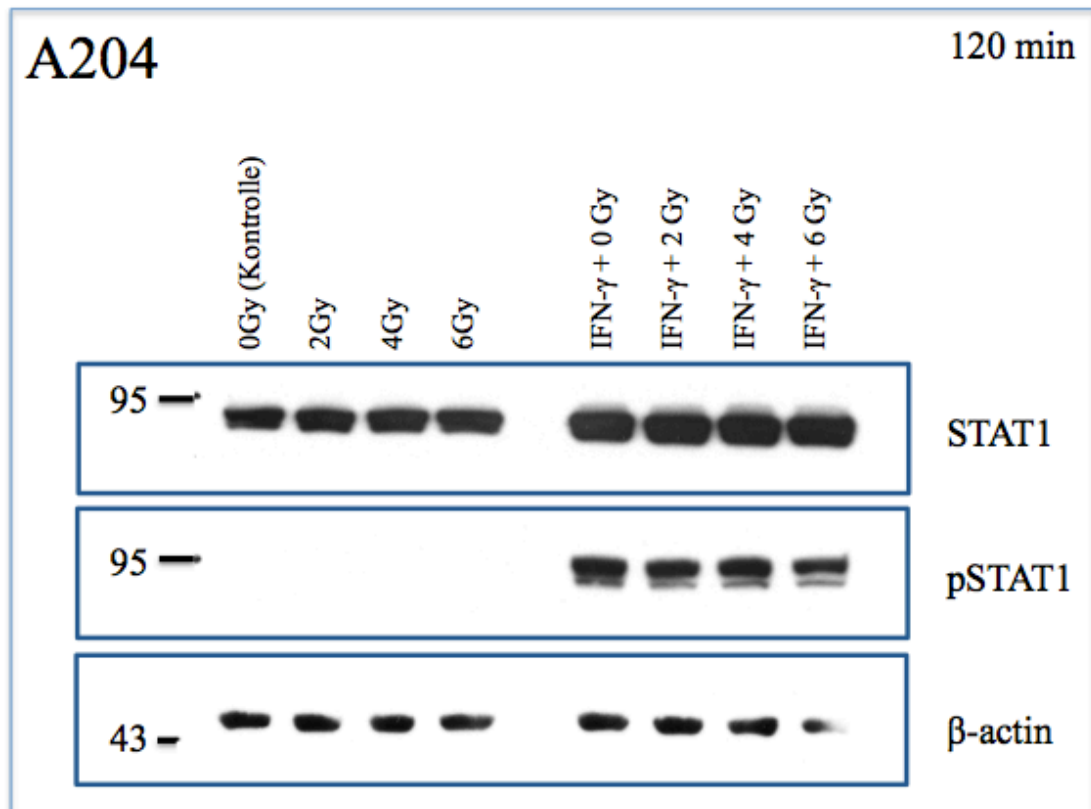
### **3.3 Induktion von pSTAT1 durch IFN- $\gamma$**

Die Rezeptoraktivität wurde auf funktionellem Level über phosphoryliertes STAT1 evaluiert. Die A204 Zelllinie zeigte eine deutliche Induktion von STAT1 zu pSTAT1 durch den Einsatz von IFN- $\gamma$  (0, 2, 4 und 6 Gy + IFN- $\gamma$ ). Bestrahlung alleine führte zu keiner gesteigerten Abundanz von STAT1 bzw. pSTAT1 (siehe Abbildung 13 + Abbildung 14). Eine Veränderung in der Reihenfolge der Behandlung (1. IFN- $\gamma$  + 2. Bestrahlung) führte zu keiner Modulation in der Abundanz von STAT1 und pSTAT1. Für die Zeitwerte 30 min, 120 min und 240 min (nach Behandlung) wurden keine Veränderungen in der Abundanz von STAT1 bzw. pSTAT1 beobachtet. Somit kann festgehalten werden, dass die Behandlung mit IFN- $\gamma$  (Einzelbehandlung mit IFN- $\gamma$  bzw. die Doppelbehandlung Bestrahlung + IFN- $\gamma$ ) zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors STAT1 zu pSTAT1 führt. Eine Bestrahlung, singulär oder additiv, zeigte keinen Einfluss auf die Abundanz von STAT1 und pSTAT1.



**Abbildung 13: Abundanz von STAT1 und pSTAT1 in A204 Zellen im Western Blot (30 min, 120 min und 240 min nach Bestrahlung bzw. Bestrahlung + IFN- $\gamma$  Behandlung).** Unter alleiniger Bestrahlung (0, 2, 4, 6 Gy) ist keine Induktion von pSTAT1 zu beobachten, während unter Zusatz von IFN- $\gamma$  Banden des pSTAT1 im Western Blot zu erkennen sind. Diese zeigen unabhängig von der Bestrahlungsdosis eine vergleichbare Intensität. Die Detektion von  $\beta$ -actin wurde als Ladekontrolle durchgeführt.

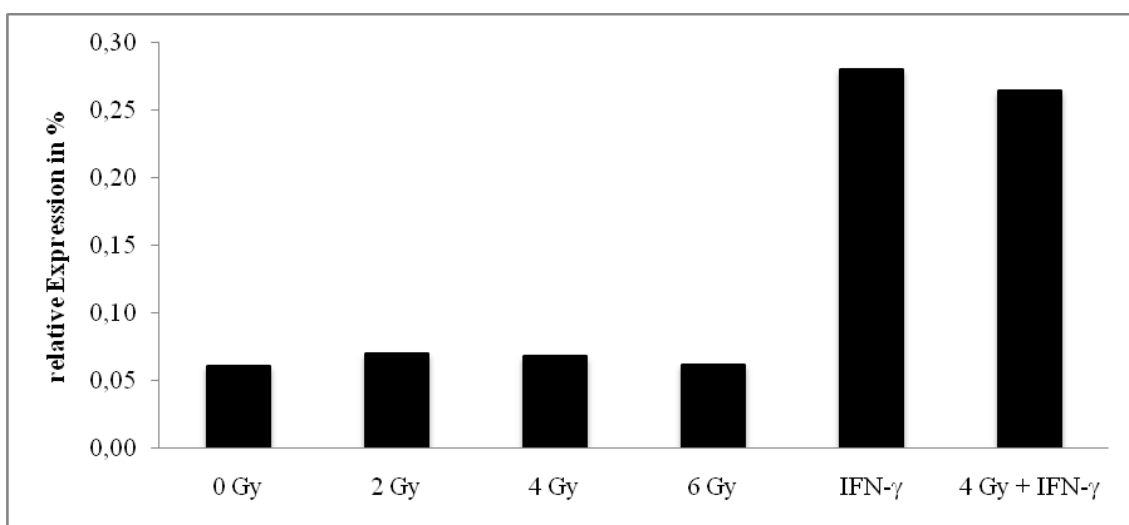




**Abbildung 14: Abundanz von STAT1 und pSTAT1 in A204 Zellen im Western Blot (30 min, 120 min und 240 min nach IFN- $\gamma$  Behandlung bzw. IFN- $\gamma$  + Bestrahlung).** Nach alleiniger Bestrahlung ist kein phosphoryliertes STAT1 im Western Blot zu beobachten. Die Doppelbehandlung mit IFN- $\gamma$  zeigt eine Induktion von pSTAT1. Eine zusätzliche Bestrahlung zeigt in diesen Western Blot Experimenten keinen Einfluss auf die STAT1 bzw. pSTAT1 Abundanz. Die Detektion von  $\beta$ -actin wurde als Ladekontrolle durchgeführt.

### 3.4 IRF-1 Abundanz auf RNA-Ebene

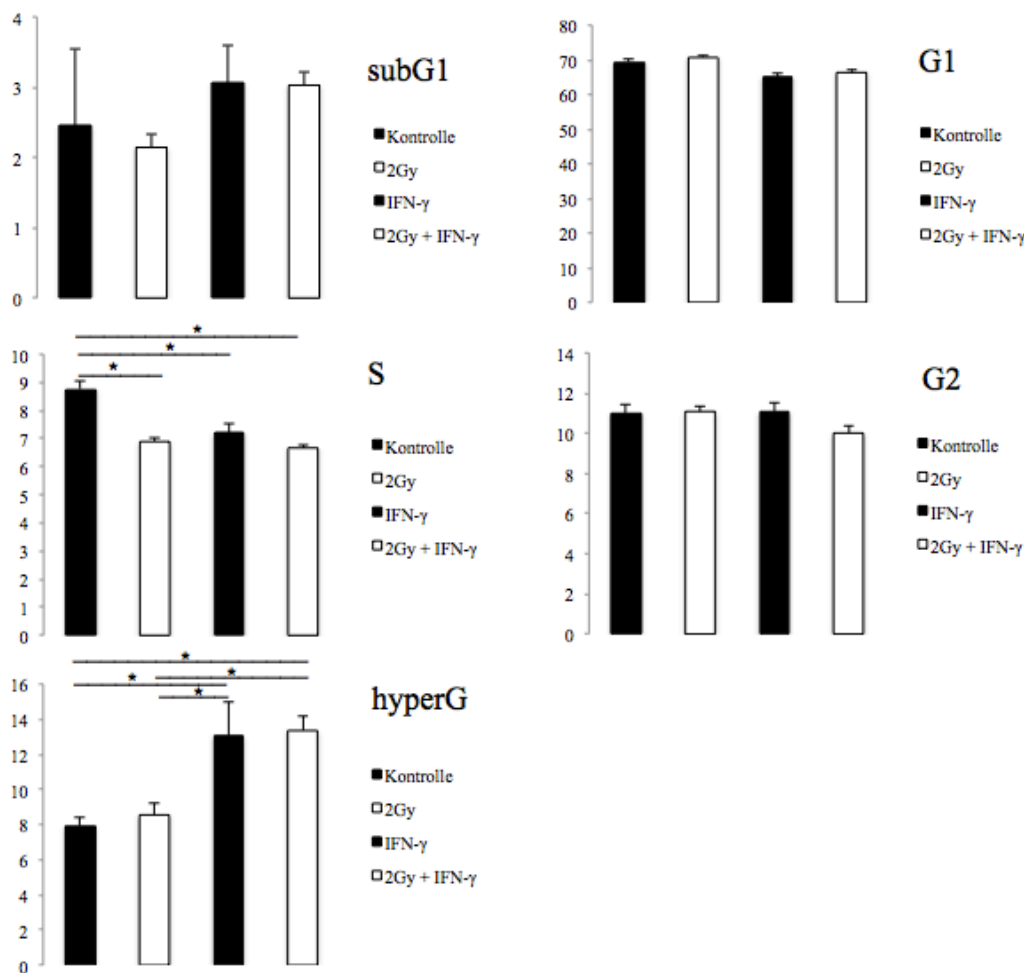
Durch PCR-Analysen wurde der Einfluss von Bestrahlung, IFN- $\gamma$  und Bestrahlung + IFN- $\gamma$  auf die mRNA Abundanz von IRF-1 untersucht. Eine Steigerung der IRF-1 mRNA Abundanz durch die Kombination von Bestrahlung und IFN- $\gamma$  wurde gegenüber der Einzelbehandlung mit IFN- $\gamma$  in der A204 Zelllinie nicht beobachtet (Abbildung 15). Die Applikation unterschiedlicher Strahlendosen (2 Gy, 4 Gy und 6 Gy) zeigte keine signifikante Veränderung in der IRF-1 mRNA Abundanz.



**Abbildung 15: Relative IRF-1 Expression in A204 Zellen.** Die Behandlung der Zellen mit IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) zeigt eine deutliche Steigerung der IRF-1 mRNA Abundanz. Eine kombinierte Behandlung von IFN- $\gamma$  und Bestrahlung zeigt keinen additiven Effekt. n = 2.

### 3.5 Veränderungen im Zellzyklus

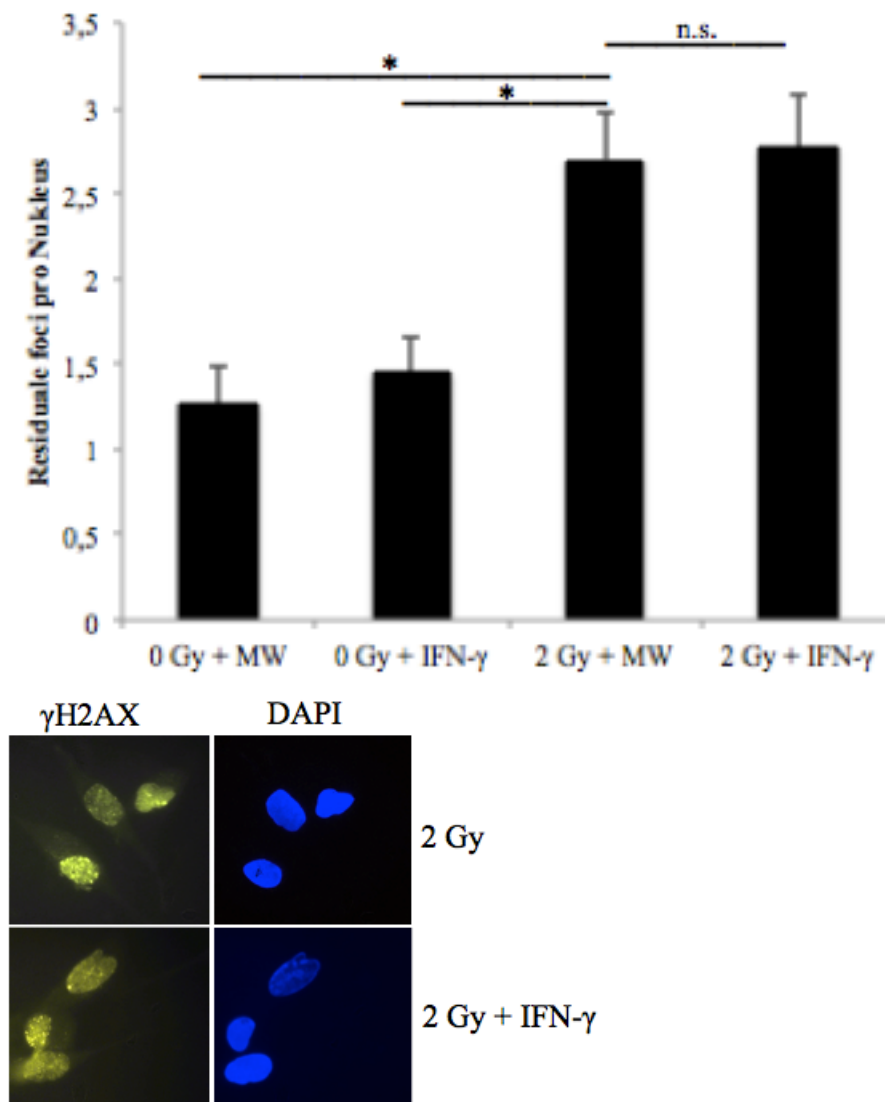
Der Effekt von IFN- $\gamma$ , Bestrahlung und der Kombinationsbehandlung auf den Zellzyklus wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es wurden keine signifikanten Veränderungen zwischen der unbehandelten Kontrolle, Einzelbehandlung und Doppelbehandlung in der subG1-, G1- und G2-Phase beobachtet. Eine Bestrahlung mit 2 Gy, IFN- $\gamma$  Behandlung, sowie die Doppelbehandlung 2 Gy + IFN- $\gamma$  zeigten eine signifikante Reduktion der A204 Zellen in der S-Phase. In der hyperG-Phase zeigten nur die IFN- $\gamma$  Behandlung und die Doppelbehandlung signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle bzw. der Bestrahlung mit 2 Gy.



**Abbildung 16: FACS-Analyse der A204 Zellen unter unterschiedlichen Behandlungssettings.** Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler. Bestrahlung, die Behandlung mit IFN- $\gamma$  und die kombinierte Behandlung führen zu einer signifikanten Modulation im Zellzyklus in der S-Phase und hyperG-Phase. Die Phasen G1, G2 und subG1 zeigen keine signifikanten Veränderungen. n = 3-6.

### 3.6 DNA-Reparatur

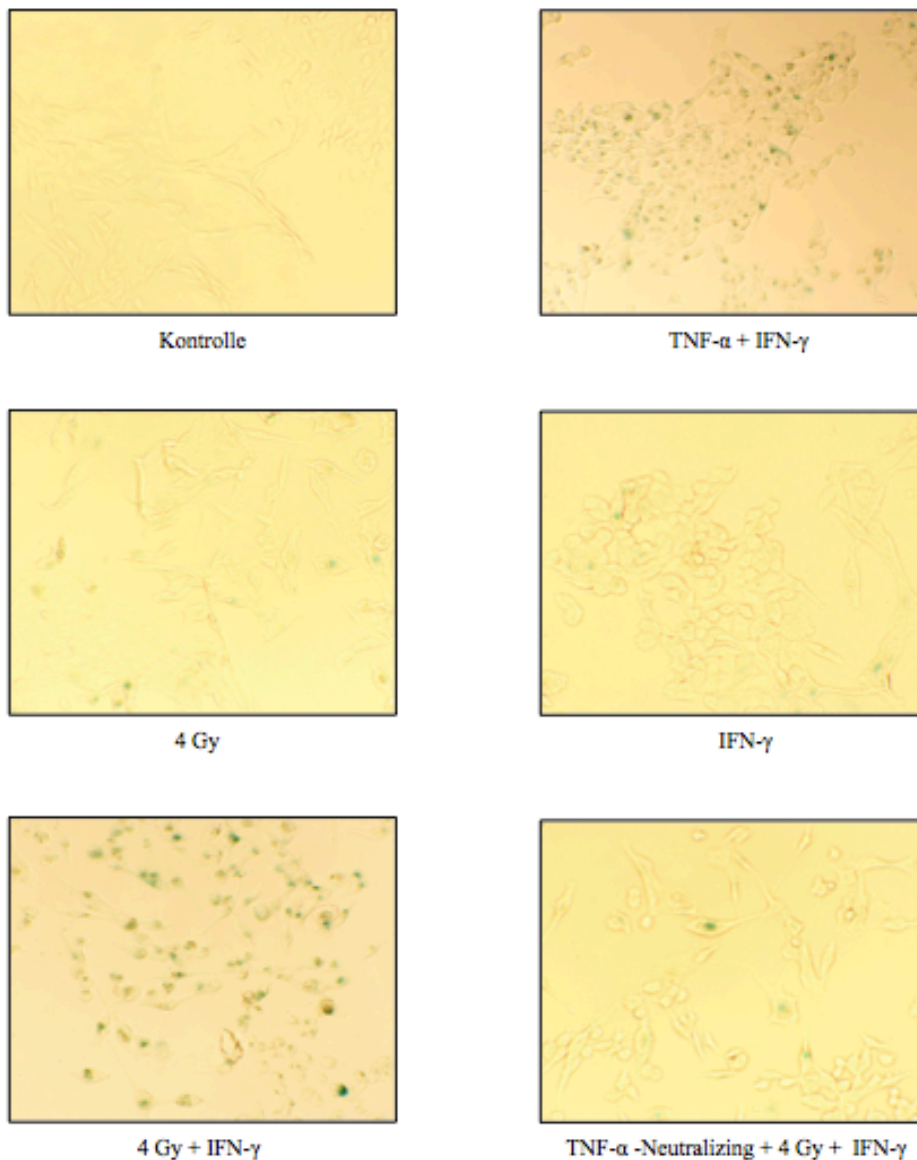
Mithilfe von  $\gamma$ H2AX Focus Assays wurde die DNA-Schadensreparaturkapazität der A204 Zelllinie nach Strahlenexposition und nach Kombinationstherapie (Bestrahlung + IFN- $\gamma$ ) eruiert. Durch die Behandlung mit IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) wurde die durchschnittliche Anzahl der residualen  $\gamma$ H2AX Foci pro Nukleus 36 h nach Bestrahlung gegenüber alleiniger Bestrahlung (2 Gy + MW) nicht signifikant erhöht (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Residuale  $\gamma$ H2AX Foci pro Nukleus 36 h nach Bestrahlung (oben). Bildaufnahme gefärbter A204 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (unten).** Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und Bestrahlung (2 Gy) bzw. der Doppelbehandlung (Bestrahlung + IFN- $\gamma$ ). Die Einzelbehandlung mit IFN- $\gamma$  zeigt im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle keinen signifikanten Unterschied. Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an residualen  $\gamma$ H2AX Foci zwischen Bestrahlung und Bestrahlung + IFN- $\gamma$  konnte nicht beobachtet werden (n.s.). n = 3.

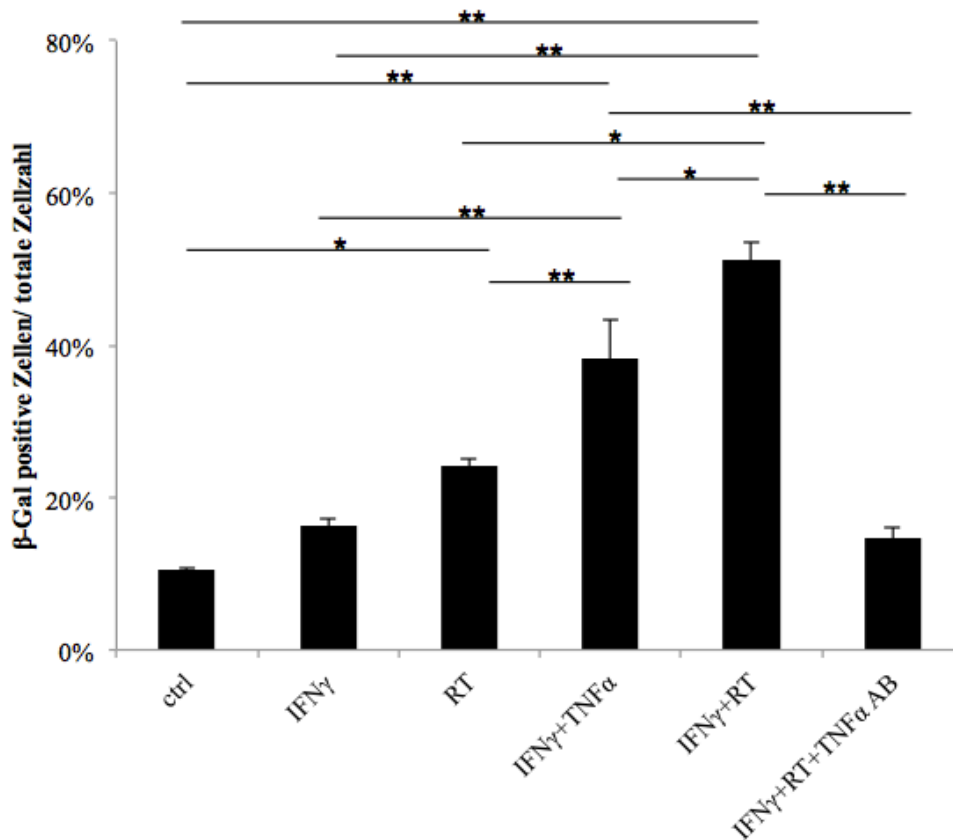
### 3.7 Seneszenz Induktion

Durch  $\beta$ -Galactosidase Assays konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung (Bestrahlung + IFN- $\gamma$ ) die Tumorzellen verstärkt in das Stadium der Seneszenz führt. Die Einzelbehandlung (Bestrahlung oder IFN- $\gamma$ ) zeigte ebenfalls eine signifikante Induktion von Seneszenz in den A204 Zellen. Durch die Zugabe eines TNF- $\alpha$  Neutralizing (deutsch: neutralisierenden) Antikörpers (2 h vor Bestrahlung) wurde der Übergang von den Tumorzellen in die Seneszenz reduziert (Abbildung 18: 4 Gy + IFN- $\gamma$  im Vergleich zu TNF- $\alpha$  Neutralizing + 4 Gy + IFN- $\gamma$ ).



**Abbildung 18: Expression der SA- $\beta$ -Gal in behandelten A204 Zellen.** A204 Zellen wurden unterschiedlichen Behandlungen unterzogen, für 96 h kultiviert und anschließend auf ihre SA- $\beta$ -Gal

Aktivität untersucht. Dargestellt ist eine Kontrolle mit Medium (RPMI 1640 + 10% FBS). Als Positivkontrolle diente eine Doppelbehandlung mit TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) + IFN- $\gamma$  (100 ng/mL). Untersucht wurden die Einzelbehandlungen mit Bestrahlung (4 Gy) bzw. Gabe von IFN- $\gamma$  (100 ng/mL) und die Doppelbehandlung mit Bestrahlung (4 Gy) + IFN- $\gamma$  (10 ng/mL). Unten rechts ist die Behandlung mit einem TNF- $\alpha$  Neutralizing Antikörper + 4 Gy + IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) dargestellt. Die blau-grüne Färbung der Zellen zeigt die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Einzelbehandlungen (4 Gy oder IFN- $\gamma$ ) zeigen eine größere Anzahl an seneszenten Zellen als die unbehandelte Kontrolle. Bei der Doppelbehandlung (4 Gy + IFN- $\gamma$ ) zeigt sich eine deutlich erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zur Einzelbehandlung oder der unbehandelten Kontrolle. Die Anzahl seneszenten Zellen ist durch Zugabe eines TNF- $\alpha$  Neutralizing Antikörpers reduziert. n = 3.

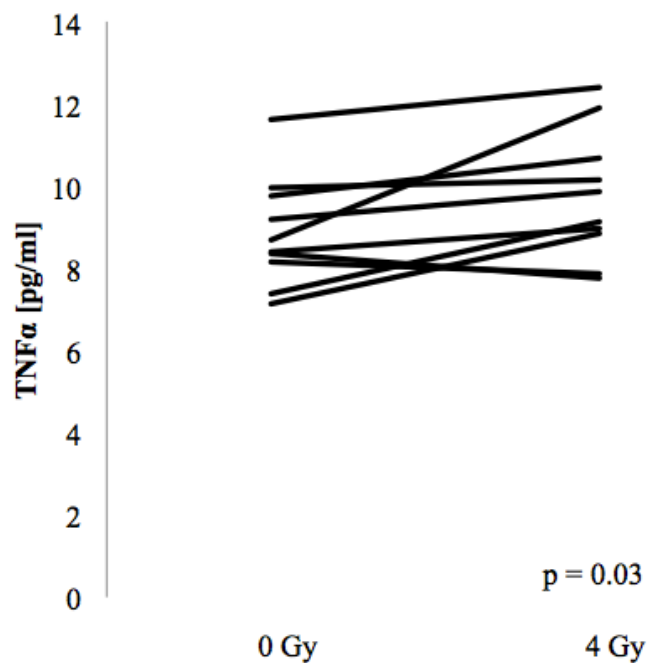


**Abbildung 19: SA- $\beta$ -Gal Positivität von A204 Zellen 96 h nach Behandlung.** Dargestellt ist die quantitative Auswertung der in Abbildung 18 aufgeführten Ergebnisse mit Mittelwerten und Standardabweichungen. In der Kontrolle wurde lediglich ein Mediumwechsel durchgeführt. Es erfolgten zwei Einzelbehandlungen: Bestrahlung mit 4 Gy bzw. IFN- $\gamma$  (100 ng/mL). Diese zeigen einen signifikanten Anstieg an SA- $\beta$ -gal positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Zudem ist eine Doppelbehandlung (Bestrahlung mit 4 Gy + IFN- $\gamma$  mit 10 ng/mL) der Zellen dargestellt. Hier stellen sich etwa 50 % der Zellen als SA- $\beta$ -Gal positiv dar ( $p < 0.05$ ). Eine Vorbehandlung der Zellen mit einem TNF- $\alpha$  Neutralizing Antikörper führt zu einer hochsignifikanten Reduktion der SA- $\beta$ -gal positiven Zellen. n = 3.

### 3.8 TNF- $\alpha$ ELISA

Mit Hilfe von ELISA Untersuchungen wurde geprüft, ob sich im Medium der Zellen das Zytokin TNF- $\alpha$  nachweisen lässt und welchen Einfluss eine Bestrahlung der Tumorzellen auf die Konzentration von TNF- $\alpha$  im Medium hat.

Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl im Medium von unbehandelten Tumorzellen als auch von bestrahlten Tumorzellen das Zytokin nachweisen lässt. Im Medium der bestrahlten A204 Tumorzellen wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikant höhere Konzentration an TNF- $\alpha$  gemessen.



**Abbildung 20: TNF- $\alpha$  ELISA: Konzentration TNF- $\alpha$  in pg/mL im Medium nach 12 h und 24 h.** Dargestellt sind die Kontrollen und Werte von korrespondierenden Messwerten bestrahlter Zellkulturen. Die bestrahlten (4 Gy) A204 Tumorzellen sezernieren signifikant mehr TNF- $\alpha$  in das Medium im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe ( $p = 0.03$ ).  $n = 3$ .

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Effekt von IFN- $\gamma$  auf das Zellüberleben in Kombination mit Bestrahlung in der A204 Rhabdomyosarkom-Tumorzelllinie *in vitro* untersucht. Insbesondere war die Wirkung einer kombinierten Behandlung von Bestrahlung + IFN- $\gamma$  im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen (nur Bestrahlung oder Zytokinbehandlung) von Interesse. Bereits seit den achtziger Jahren ist der hemmende Einfluss von IFN- $\gamma$  auf das Zellwachstum in unterschiedlichen Zelllinien bekannt (Dahl, 1977). Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass eine Doppelbehandlung (Bestrahlung + IFN- $\gamma$ ) im Gegensatz zur Einzelbehandlung (nur Bestrahlung) die reproduktive Integrität der Tumorzellen signifikant reduziert (Abbildung 9). Bemerkenswert ist, dass nur die Behandlungsreihenfolge: 1. Bestrahlung -12 h Inkubationsdauer- 2. IFN- $\gamma$  diesen Effekt auf die Klonogenität der Tumorzellen aufwies. Die Versuchsanordnung mit der Reihenfolge 1. IFN- $\gamma$  - 12 h Inkubationsdauer - 2. Bestrahlung zeigte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung keine signifikante Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit (Abbildung 10). In der Behandlungsreihenfolge: 1. Bestrahlung - 30 min Inkubationsdauer - 2. IFN- $\gamma$  konnte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung keine signifikante Reduktion der reproduktiven Integrität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der zeitliche Abstand zwischen Erst- und Zweitbehandlung scheint das Ergebnis zu beeinflussen. Demzufolge kann festgehalten werden, dass in den durchgeführten Versuchen:

- eine Kombination von Bestrahlung und IFN- $\gamma$  zu einer signifikanten Verminderung der Klonogenität der A204 Zelllinie im Vergleich zu einer alleinigen Bestrahlung geführt hat
- eine Doppelbehandlung in den Koloniebildungsversuchen nur in der Reihenfolge Bestrahlung + Zytokinbehandlung einen additiven bzw. synergistischen Effekt aufwies
- sich trotz der Behandlungsreihenfolge 1. Bestrahlung 2. IFN- $\gamma$  bei kurzer Inkubationszeit (30 min) kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der reproduktiven Integrität der A204 Tumorzellen zwischen Einzelbehandlung (nur Bestrahlung) und Doppelbehandlung beobachten lässt



Saito et al. zeigten in Koloniebildungsexperimenten ein IFN- $\gamma$  dosisabhängiges verminderstes klonogenes Überleben in sechs von sieben getesteten Tumorzelllinien (Saito *et al.*, 1987). In den hier durchgeführten Koloniebildungsexperimenten zeigte die Behandlung der Tumorzellen mit IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) keinen Einfluss auf die Plating-Efficiency. Die Koloniebildungsexperimente wurden als Delayed-Plating durchgeführt. Ob die Pre-Plating Variante zu unterschiedlichen Ergebnissen führt, sollte in weiteren Untersuchungen eruiert werden.

Der Einfluss von Bestrahlung auf die Abundanz des IFN- $\gamma$ -Rezeptor 1 und das IFN- $\gamma$ -Signaling in den A204 Tumorzellen wurde über Western Blot Versuche untersucht. In der Literatur wird die Interaktion von Bestrahlung und IFN- $\gamma$ -Signaling paradox diskutiert. Es wurde beschrieben, dass ionisierende Strahlung zu einer verminderten IFN- $\gamma$ -Rezeptor Abundanz, reduziertem STAT1-Signaling und Zell-vermittelten Immunität führt (Han *et al.*, 2002; Khodarev *et al.*, 2007). Sugihara et al. zeigten dagegen, dass ionisierende Strahlung zu einer Induktion von STAT1 und zu einer Stimulation von Interferon-stimulierenden Genen (engl. interferon-stimulated genes) führt (Sugihara *et al.*, 2011). Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die A204 Tumorzelllinie eine ausgeprägte Abundanz des IFN- $\gamma$ -Rezeptors aufweist. Eine Bestrahlung mit 2, 4 und 6 Gy führte zu keiner signifikanten Modifikation der IFN- $\gamma$ -Rezeptor Abundanz.

STAT1 nimmt eine zentrale Rolle in dem IFN- $\gamma$ -Signalweg ein und wird unter anderem durch IFN- $\gamma$  aktiviert (Schroder *et al.*, 2004). In der A204 Zelllinie führte Bestrahlung zu keiner verstärkten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT1. Ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Bestrahlung und der Abundanz von STAT1 bzw. pSTAT1 konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 13 und 14). Dies wurde auch in Arbeiten von Ramana et al. und Krause et al. für andere Zelllinien gezeigt (Krause *et al.*, 2006; Ramana *et al.*, 2002).

Der Transkriptionsfaktor STAT1 zeigt unter Betrachtung solider Tumoren neben tumorsuppressiven auch tumorfördernde Eigenschaften (Meissl *et al.*). Nach Induktion des STAT1-Signalwegs in einer Myelomzelllinie wurde eine erhöhte Kreuzresistenz gegen Bestrahlung und dem Anthrazyklin Doxorubicin beobachtet (Fryknas *et al.*, 2007).

In den durchgeführten PCR-Experimenten führte eine IFN- $\gamma$  Behandlung zu einer Steigerung der Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mRNA Abundanz. Dies wird auch durch die Literatur bestätigt (Murtas *et al.*, 2013). IRF-1 nimmt eine essentielle Rolle in unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Funktionen ein (Dou *et al.*, 2014; Romeo *et al.*, 2002). IRF-1 induziert eine Transaktivierung von p53 über Rekrutierung seines Co-Faktors p300 (Dornan *et al.*, 2004). Die Aktivierung von p53 führt zu einer tumorsuppressiven Wirkung. Unterschiedliche Dosen an Bestrahlung (2 Gy, 4 Gy und 6 Gy) veränderten die relative mRNA Abundanz von IRF-1 in der A204 Tumorzelllinie nicht. Eine kombinierte Therapie von Bestrahlung und IFN- $\gamma$  zeigte keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu der Einzelbehandlung mit IFN- $\gamma$ . Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten bereits, dass IFN- $\gamma$  unterschiedliche humane Zellen in einen Zellzyklusarrest überführen oder Zelltod induzieren kann (Burke *et al.*, 1997; Kano *et al.*, 1997). Insbesondere ein G1-Arrest wurde durch eine IFN- $\gamma$  Behandlung in einigen Zelllinien beobachtet (Harvat & Jetten, 1996). Ebenso kann Bestrahlung zu einem temporären Block von Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus führen. Dieser G2-Arrest ist von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich (Herrmann *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit T<sub>H</sub>1-Zytokinen (TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$ ) (Braumüller *et al.*, 2013) als auch DNA-Schäden (te Poele *et al.*, 2002) in unterschiedlichen Tumorzelllinien einen Zellzyklusarrest induziert. Ein solcher Arrest wurde in den durchgeführten Durchflusszytometrie-Experimenten durch Bestrahlung, IFN- $\gamma$  Behandlung und kombinierter Behandlung (Bestrahlung + IFN- $\gamma$ ) nicht beobachtet.

Der Effekt von IFN- $\gamma$ , Bestrahlung und der Kombinationsbehandlung auf die DNA-Schadensreparaturkapazität der A204 Zelllinie wurde über  $\gamma$ H2AX Assays untersucht. Die Anzahl der residualen  $\gamma$ H2AX Foci pro Nukleus waren 36 h nach Strahlenexposition gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 17). Diese Eigenschaft ionisierender Strahlung ist bekannt und in der Literatur für viele Zelllinien bereits beschrieben. Dagegen zeigt IFN- $\gamma$  alleine bzw. in Kombination mit Bestrahlung keine signifikante Modulation innerhalb der DNA-Schadensreparaturkapazität in der A204 Zelllinie. Die Arbeitsgruppe um Tsoncheva zeigte, dass IFN- $\gamma$  in zwei Zelllinien (WISH, HeLa) zu einer verminderten DNA-

Schadensreparaturkapazität führt. Allerdings wurden im Gegensatz zu dieser Arbeit die DNA-Schäden durch Ultraviolettstrahlung (UV) induziert (Tsoncheva *et al.*, 2008).

In den hier durchgeführten  $\beta$ -Galactosidase Assay Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Doppelbehandlung (Bestrahlung + IFN- $\gamma$ ) die A204 Tumorzellen hochsignifikant in das Stadium der Seneszenz überführt (Abbildung 18 und 19). Über 50 % der A204 Tumorzellen waren nach kombinierter Behandlung (Bestrahlung + IFN- $\gamma$ ) und anschließender Inkubationszeit von 96 h SA- $\beta$ -gal positiv. SA- $\beta$ -gal positive Zellen stellen seneszente Zellen dar. Die jeweiligen Einzelbehandlungen Bestrahlung alleine (circa 20 % SA- $\beta$ -gal positiv) bzw. IFN- $\gamma$  alleine (circa 16 % SA- $\beta$ -gal positiv) zeigten ebenfalls statistisch signifikante Veränderungen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (circa 10 % SA- $\beta$ -gal positiv). Als Positivkontrolle diente eine kombinierte Behandlung mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  ( $T_H1$ -Zytokine). DNA-Schäden und die beiden  $T_H1$ -Zytokine hemmen die Proliferation von Tumorzellen und induzieren Seneszenz (Bartkova *et al.*, 2006; Rodier *et al.*, 2009). Die Kombination von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  überführt verschiedene Tumorzellen in das Stadium der Seneszenz (Braumüller *et al.*, 2013). Dieser Effekt zeigte sich auch bei A204 Zellen (Schilbach *et al.*, 2015).

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass durch die Zugabe eines TNF- $\alpha$  Neutralizing Antikörpers (2 h vor Bestrahlung) die Anzahl an SA- $\beta$ -gal positiven Zellen hochsignifikant verringert wurde (13%). TNF- $\alpha$  scheint somit neben IFN- $\gamma$  eine entscheidende Rolle bei der Seneszenzinduktion einzunehmen. TNF- $\alpha$  wird von  $T_H1$  polarisierten Immunzellen im Tumormikromilieu freigesetzt (Mohanty & Sai Leela, 2014). In den hier gezeigten Experimenten wurden jedoch Monokulturen mit Tumorzellen eingesetzt. Daher wurde Bestrahlung als möglicher Auslöser einer TNF- $\alpha$  Freisetzung in den A204 Tumorzellen untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten ELISA Versuche zeigen, dass bestrahlte A204 Tumorzellen (Einzeldosis 4 Gy) signifikant höhere Konzentrationen an TNF- $\alpha$  im Medium aufweisen im Vergleich zu den nicht bestrahlten Kontrollen ( $p = 0.03$ ). Dies deckt sich mit Ergebnissen von Desai *et al.*, welche ähnliche Beobachtungen für andere Zelllinien machten (Desai *et al.*, 2013). Die erzielten Resultate unter Verwendung eines TNF- $\alpha$  Neutralizing Antikörpers führen zu der Annahme, dass der synergistische Effekt von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  ursächlich für die Ergebnisse der Koloniebildungsexperimente ist. Die Ergebnisse der ELISA Versuche unterstützen diese Beobachtungen.

Insgesamt kann der Effekt der Kombination aus Bestrahlung und IFN- $\gamma$  demnach nicht auf klassische Radiosensibilisierung zurückgeführt werden, wie sie für Radiochemotherapie beschrieben wurde (Dunst & Sauer, 1993; Kvols, 2005). Dieser Effekt wäre durch Zellzyklus-Verschiebung, Einfluss auf DNA-Reparatur oder Signaltransduktion zu erklären. Stattdessen wird das verminderte klonogene Überleben durch die Induktion zellulärer Seneszenz erklärt. Dieser Effekt scheint den Kombinationseffekt von Strahlentherapie und Immuntherapie von klassischen Kombinationen mit Chemotherapeutika zu unterscheiden.

Die durchgeführten Experimente und erzielten Ergebnisse erlauben keine Rückschlüsse auf günstige Fraktionierungsschemata. Es fand lediglich eine einmalige Bestrahlung (2 Gy, 4 Gy und 6 Gy) statt. Dies entspricht nicht gängigen klinischen Fraktionierungskonzepten. Zudem zeigen hyperfraktionierte (< 1,8 Gy), normofraktionierte (1,8 – 2 Gy) und hypofraktionierte (> 2,2 Gy) Bestrahlung unterschiedliche Effekte auf Tumorzellen, Tumormikromileu und auf das Immunsystem (Deloch *et al.*, 2016). Eine hyperfraktionierte Bestrahlung wirkt sich stärker auf die Vaskularisation des Tumors aus und fördert die Infiltration des Tumors durch Immunzellen (Ganss *et al.*, 2002). Eine hypofraktionierte Bestrahlung fördert dagegen verstärkt die intratumorale Ausschüttung von Typ I und II Interferonen (Burnette *et al.*, 2011). Sehr niedrige Dosen (< 1 Gy) scheinen Tumoren nur gering bis gar nicht zu beeinflussen. Die Fraktionierungskonzepte und ihre Wirkung müssen daher bei einem möglichen therapeutischen Einsatz der kombinierten Strahlen-Immuntherapie berücksichtigt werden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, insbesondere die durchgeführten Koloniebildungsexperimente, zeigen, dass die Doppelbehandlung (4 Gy + IFN- $\gamma$ ) im Vergleich zur Einzelbehandlung (4 Gy oder IFN- $\gamma$ ) das Zellüberleben stärker hemmt. Es konnte gezeigt werden, dass die A204 Tumorzelllinie durch die Behandlung mit IFN- $\gamma$  eine verringerte Klonogenität nach Bestrahlung aufweist.

Dieser additive oder synergistische Effekt von Bestrahlung und IFN- $\gamma$  Behandlung war nicht auf eine verstärkte STAT1 Phosphorylierung bzw. IRF-1 Induktion zurückzuführen. Ebenso konnten keine signifikanten Veränderungen im Zellzyklus beobachtet werden, welche die verringerte Klonogenität erklären könnten. Auch in der DNA-Reparaturkapazität konnte kein derartiger Effekt gezeigt werden.

Es wurde beobachtet, dass eine Doppelbehandlung von Bestrahlung und IFN- $\gamma$  die A204 Tumorzellen verstärkt in Seneszenz führt. Dies wurde von Braumüller et al. und Schilbach et al. in der Kombination von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Durch Bestrahlung wurde hier vermutlich die Freisetzung von TNF- $\alpha$  induziert. Durch eine Vorbehandlung mit einem TNF- $\alpha$  Neutralizing Antikörper konnte die Induktion von Seneszenz vermindert werden. Die Ergebnisse aus den TNF- $\alpha$  ELISA Experimenten stützen diese Beobachtungen. Es scheint möglicherweise eine autokrine und / oder parakrine Wirkung von TNF- $\alpha$  in Kombination mit der IFN- $\gamma$  Behandlung der Tumorzellen für die Induktion der Seneszenz verantwortlich zu sein. Dies sollte durch weitere Untersuchungen an anderen Tumorzelllinien eruiert werden.

Immer mehr Studien zeigen, dass eine Kombination von Strahlen- und Immuntherapie sinnvoll sein kann. Nichtsdestotrotz sind weitere Studien nötig, um ein besseres Verständnis über die Interaktionen zwischen Strahlentherapie, Immuntherapie, Immunsystem und Tumoren zu erlangen. Für einen möglichen therapeutischen Einsatz einer kombinierten Strahlen- und Immuntherapie muss zudem die Verträglichkeit *in vitro*, *in vivo* und in klinischen Studien eruiert werden. Da Krebspatienten häufig weitere medikamentöse Behandlungen erhalten, müssen im Hinblick auf die Patientensicherheit mögliche Wechselwirkungen und Nebenwirkung aufgezeigt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akasaki, Y., Liu, G., Chung, N. H., Ehtesham, M., Black, K. L., & Yu, J. S. (2004). Induction of a CD4<sup>+</sup> T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J Immunol*, *173*(7), 4352-4359.
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A., Behjati, S., Biankin, A. V., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, *500*(7463), 415-421. doi:10.1038/nature12477
- Amann, K., Kain, R., & Klöppel, G. (2016). *Pathologie Urogenitale und Endokrine Organe, Gelenke und Skelett*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bamberg, M., Molls, M., & Sack, H. (2009). *Radioonkologie: Klinik : mit 361 Tabellen. Bd. 2: Zuckschwerdt*.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, *444*(7119), 633-637. doi:10.1038/nature05268
- Böcker, W. (2012). *Pathologie mit rund 150 Tabellen; [Plus im Web mediscript]* (pp. 1064).
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, *15*, 749-795. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.749
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., et al. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*, *366*(26), 2455-2465. doi:10.1056/NEJMoa1200694
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Assmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., et al. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, *494*(7437), 361-365. doi:10.1038/nature11824
- Burke, F., East, N., Upton, C., Patel, K., & Balkwill, F. R. (1997). Interferon gamma induces cell cycle arrest and apoptosis in a model of ovarian cancer: enhancement of effect by batimastat. *Eur J Cancer*, *33*(7), 1114-1121.

- Burnette, B. C., Liang, H., Lee, Y., Chlewicki, L., Khodarev, N. N., Weichselbaum, R. R., et al. (2011). The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res*, *71*(7), 2488-2496. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2820
- Campos, L., Rouault, J. P., Sabido, O., Oriol, P., Roubi, N., Vasselon, C., et al. (1993). High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood*, *81*(11), 3091-3096.
- Chakraborty, M., Abrams, S. I., Coleman, C. N., Camphausen, K., Schlom, J., & Hodge, J. W. (2004). External beam radiation of tumors alters phenotype of tumor cells to render them susceptible to vaccine-mediated T-cell killing. *Cancer Res*, *64*(12), 4328-4337. doi:10.1158/0008-5472.can-04-0073
- Chiriva-Internati, M., Grizzi, F., Pinkston, J., Morrow, K. J., D'Cunha, N., Frezza, E. E., et al. (2006). Gamma-radiation upregulates MHC class I/II and ICAM-I molecules in multiple myeloma cell lines and primary tumors. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, *42*(3-4), 89-95. doi:10.1290/0508054.1
- Collado, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2007). *Cellular senescence in cancer and aging*. (130). Available from NLM (2)
- Dahl, H. (1977). Human interferon and cell growth inhibition. II. Biological and physico-chemical properties of the growth inhibitory component. *Acta Pathol Microbiol Scand B*, *85b*(1), 54-60.
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., & Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*, *104*(6), 1129-1137. doi:10.1002/cncr.21324
- Deloch, L., Derer, A., Hartmann, J., Frey, B., Fietkau, R., & Gaipl, U. S. (2016). Modern Radiotherapy Concepts and the Impact of Radiation on Immune Activation. *Front Oncol*, *6*, 141. doi:10.3389/fonc.2016.00141
- Demaria, S., Ng, B., Devitt, M. L., Babb, J. S., Kawashima, N., Liebes, L., et al. (2004). Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, *58*(3), 862-870. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.09.012
- Demaria, S., Pilonis, K. A., Vanpouille-Box, C., Golden, E. B., & Formenti, S. C. (2014). The optimal partnership of radiation and immunotherapy: from

- preclinical studies to clinical translation. *Radiat Res*, 182(2), 170-181.  
doi:10.1667/rr13500.1
- Derer, A., Deloch, L., Rubner, Y., Fietkau, R., Frey, B., & Gaipl, U. S. (2015). Radio-Immunotherapy-Induced Immunogenic Cancer Cells as Basis for Induction of Systemic Anti-Tumor Immune Responses - Pre-Clinical Evidence and Ongoing Clinical Applications. *Front Immunol*, 6, 505. doi:10.3389/fimmu.2015.00505
- Derer, A., Frey, B., Fietkau, R., & Gaipl, U. S. (2015). Immune-modulating properties of ionizing radiation: rationale for the treatment of cancer by combination radiotherapy and immune checkpoint inhibitors. *Cancer Immunol Immunother*. doi:10.1007/s00262-015-1771-8
- Desai, S., Kumar, A., Laskar, S., & Pandey, B. N. (2013). Cytokine profile of conditioned medium from human tumor cell lines after acute and fractionated doses of gamma radiation and its effect on survival of bystander tumor cells. *Cytokine*, 61(1), 54-62. doi:10.1016/j.cyto.2012.08.022
- Dornan, D., Eckert, M., Wallace, M., Shimizu, H., Ramsay, E., Hupp, T. R., et al. (2004). Interferon regulatory factor 1 binding to p300 stimulates DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol*, 24(22), 10083-10098. doi:10.1128/mcb.24.22.10083-10098.2004
- Dou, L., Liang, H. F., Geller, D. A., Chen, Y. F., & Chen, X. P. (2014). The regulation role of interferon regulatory factor-1 gene and clinical relevance. *Hum Immunol*, 75(11), 1110-1114. doi:10.1016/j.humimm.2014.09.015
- Dudley, M. E., & Rosenberg, S. A. (2003). Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(9), 666-675. doi:10.1038/nrc1167
- Dunst, J., & Sauer, R. (1993). [Simultaneous radiochemotherapy]. *Strahlenther Onkol*, 169(4), 205-212.
- Flaishon, L., Hershkoviz, R., Lantner, F., Lider, O., Alon, R., Levo, Y., et al. (2000). Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. *J Exp Med*, 192(9), 1381-1388.
- Formenti, S. C., & Demaria, S. (2013). Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst*, 105(4), 256-265. doi:10.1093/jnci/djs629



- Foss, F. M. (2002). Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol*, 29(3 Suppl 7), 5-11.
- Friedman, E. J. (2002). Immune modulation by ionizing radiation and its implications for cancer immunotherapy. *Curr Pharm Des*, 8(19), 1765-1780.
- Frucht, D. M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J. J., & Koyasu, S. (2001). IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol*, 22(10), 556-560.
- Fryknas, M., Dhar, S., Oberg, F., Rickardson, L., Rydaker, M., Goransson, H., et al. (2007). STAT1 signaling is associated with acquired crossresistance to doxorubicin and radiation in myeloma cell lines. *Int J Cancer*, 120(1), 189-195. doi:10.1002/ijc.22291
- Fuchs, E. J., & Matzinger, P. (1996). Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol*, 8(5), 271-280. doi:10.1006/smim.1996.0035
- Ganss, R., Ryschich, E., Klar, E., Arnold, B., & Hammerling, G. J. (2002). Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res*, 62(5), 1462-1470.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E. J., & Raulet, D. H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*, 436(7054), 1186-1190. doi:10.1038/nature03884
- Gehrmann, M., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., Fritz, E., Ellwart, J., Jaattela, M., et al. (2005). Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death Differ*, 12(1), 38-51. doi:10.1038/sj.cdd.4401510
- Gray, P. W., & Goeddel, D. V. (1982). Structure of the human immune interferon gene. *Nature*, 298(5877), 859-863.
- Hagemann, T., Balkwill, F., & Lawrence, T. (2007). Inflammation and cancer: a double-edged sword. *Cancer Cell*, 12(4), 300-301. doi:10.1016/j.ccr.2007.10.005
- Haikerwal, S. J., Hagekyriakou, J., MacManus, M., Martin, O. A., & Haynes, N. M. (2015). Building immunity to cancer with radiation therapy. *Cancer Lett*, 368(2), 198-208. doi:10.1016/j.canlet.2015.01.009

- Han, S. K., Song, J. Y., Yun, Y. S., & Yi, S. Y. (2002). Gamma irradiation-reduced IFN-gamma expression, STAT1 signals, and cell-mediated immunity. *J Biochem Mol Biol*, 35(6), 583-589.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., et al. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol*, 1(6), 475-482. doi:10.1038/82717
- Hartmann, E., Wollenberg, B., Rothenfusser, S., Wagner, M., Wellisch, D., Mack, B., et al. (2003). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res*, 63(19), 6478-6487.
- Harvat, B. L., & Jetten, A. M. (1996). Gamma-interferon induces an irreversible growth arrest in mid-G1 in mammary epithelial cells which correlates with a block in hyperphosphorylation of retinoblastoma. *Cell Growth Differ*, 7(3), 289-300.
- Herold, G. (2014). *Innere Medizin 2014 : eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*: Eigenverl.
- Herrmann, T., Baumann, M., & Dörr, W. (2006). *Klinische Strahlenbiologie: kurz und bündig*: Elsevier, Urban und Fischer.
- Hicklin, D. J., Marincola, F. M., & Ferrone, S. (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today*, 5(4), 178-186.
- Hinson, A. R., Jones, R., Crose, L. E., Belyea, B. C., Barr, F. G., & Linardic, C. M. (2013). Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front Oncol*, 3, 183. doi:10.3389/fonc.2013.00183
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(8), 711-723. doi:10.1056/NEJMoa1003466
- Hosoi, H. (2016). Current status of treatment for pediatric rhabdomyosarcoma in the USA and Japan. *Pediatr Int*, 58(2), 81-87. doi:10.1111/ped.12867

- Hunder, N. N., Wallen, H., Cao, J., Hendricks, D. W., Reilly, J. Z., Rodmyre, R., et al. (2008). Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med*, 358(25), 2698-2703. doi:10.1056/NEJMoa0800251
- Kaatsch P, S. C. (2013). *German Childhood Cancer Registry - Report 2012 (1980-2012)*.
- Kano, A., Watanabe, Y., Takeda, N., Aizawa, S., & Akaike, T. (1997). Analysis of IFN-gamma-induced cell cycle arrest and cell death in hepatocytes. *J Biochem*, 121(4), 677-683.
- Karstens, J. H. (2010). *Strahlentherapie und Radioonkologie aus interdisziplinärer Sicht*: Lehmanns Media.
- Kaur, P., & Asea, A. (2012). Radiation-induced effects and the immune system in cancer. *Front Oncol*, 2, 191. doi:10.3389/fonc.2012.00191
- Khodarev, N., Minn, A., Efimova, E., Roach, P., Darga, T., labay, E., et al. (2007). Ionizing radiation activates interferon-inducible Stat1-dependent pathway and leads to the formation of cross-resistance to irradiation and interferon. *Cancer Res*, 67(9 Supplement), 2172-2172.
- Kim, K. S., Choi, K. J., & Bae, S. (2012). Interferon-gamma enhances radiation-induced cell death via downregulation of Chk1. *Cancer Biol Ther*, 13(11), 1018-1025. doi:10.4161/cbt.20990
- Klöpffel, G., Kreipe, H. H., Remmele, W., & Dietel, M. (2013). *Pathologie Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen Pathologie, SpringerLink : Bücher* (pp. 819).
- Krause, C. D., He, W., Kotenko, S., & Pestka, S. (2006). Modulation of the activation of Stat1 by the interferon-gamma receptor complex. *Cell Res*, 16(1), 113-123. doi:10.1038/sj.cr.7310015
- Kriegs, M., Kasten-Pisula, U., Rieckmann, T., Holst, K., Saker, J., Dahm-Daphi, J., et al. (2010). The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining. *DNA Repair (Amst)*, 9(8), 889-897. doi:10.1016/j.dnarep.2010.05.005

- Krysko, D. V., Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., & Vandenabeele, P. (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, *12*(12), 860-875. doi:10.1038/nrc3380
- Kvols, L. K. (2005). Radiation sensitizers: a selective review of molecules targeting DNA and non-DNA targets. *J Nucl Med*, *46 Suppl 1*, 187s-190s.
- Lauber, K., Ernst, A., Orth, M., Herrmann, M., & Belka, C. (2012). Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Front Oncol*, *2*, 116. doi:10.3389/fonc.2012.00116
- Lugade, A. A., Moran, J. P., Gerber, S. A., Rose, R. C., Frelinger, J. G., & Lord, E. M. (2005). Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. *J Immunol*, *174*(12), 7516-7523.
- Mahaney, B. L., Meek, K., & Lees-Miller, S. P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J*, *417*(3), 639-650. doi:10.1042/bj20080413
- Mantovani, G., Maccio, A., Madeddu, C., Mura, L., Massa, E., Gramignano, G., et al. (2003). Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms, and serum cytokine levels in cancer patients: impact of an antioxidant treatment. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, *22*(1), 17-28.
- Meissl, K., Macho-Maschler, S., Müller, M., & Strobl, B. The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. *Cytokine*.
- Mohanty, S. K., & Sai Leela, K. (2014). *Textbook of immunology*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Pub.
- Muhlethaler-Mottet, A., Di Berardino, W., Otten, L. A., & Mach, B. (1998). Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity*, *8*(2), 157-166.
- Müller-Hermelink, N., Braumüller, H., Pichler, B., Wieder, T., Mailhammer, R., Schaak, K., et al. (2008). TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell*, *13*(6), 507-518. doi:10.1016/j.ccr.2008.04.001

- Murtas, D., Maric, D., De Giorgi, V., Reinboth, J., Worschech, A., Fetsch, P., et al. (2013). IRF-1 responsiveness to IFN-gamma predicts different cancer immune phenotypes. *Br J Cancer*, *109*(1), 76-82. doi:10.1038/bjc.2013.335
- Natali, P. G., Nicotra, M. R., Bigotti, A., Venturo, I., Marcenaro, L., Giacomini, P., et al. (1989). Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(17), 6719-6723.
- Nikitina, E. Y., & Gabrilovich, D. I. (2001). Combination of gamma-irradiation and dendritic cell administration induces a potent antitumor response in tumor-bearing mice: approach to treatment of advanced stage cancer. *Int J Cancer*, *94*(6), 825-833.
- Nobler, M. P. (1969). The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation. *Radiology*, *93*(2), 410-412. doi:10.1148/93.2.410
- Ochsenbein, A. F., Klenerman, P., Karrer, U., Ludewig, B., Pericin, M., Hengartner, H., et al. (1999). Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(5), 2233-2238.
- Ochsenbein, A. F., Sierro, S., Odermatt, B., Pericin, M., Karrer, U., Hermans, J., et al. (2001). Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature*, *411*(6841), 1058-1064. doi:10.1038/35082583
- Ognjanovic, S., Linabery, A. M., Charbonneau, B., & Ross, J. A. (2009). Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer*, *115*(18), 4218-4226. doi:10.1002/cncr.24465
- Palena, C., & Schlom, J. (2010). Vaccines against human carcinomas: strategies to improve antitumor immune responses. *J Biomed Biotechnol*, *2010*, 380697. doi:10.1155/2010/380697
- Pappo, A. S., Parham, D. M., Rao, B. N., & Lobe, T. E. (1999). Soft tissue sarcomas in children. *Semin Surg Oncol*, *16*(2), 121-143.
- Pedrazzoli, P., Secondino, S., Perfetti, V., Comoli, P., & Montagna, D. (2011). Immunotherapeutic Intervention against Sarcomas. *J Cancer*, *2*, 350-356.

- Peng, G. (2010). Characterization of regulatory T cells in tumor suppressive microenvironments. *Methods Mol Biol*, 651, 31-48. doi:10.1007/978-1-60761-786-0\_2
- Pollack, S. M., Loggers, E. T., Rodler, E. T., Yee, C., & Jones, R. L. (2011). Immune-based therapies for sarcoma. *Sarcoma*, 2011, 438940. doi:10.1155/2011/438940
- Rakshit, S., Chandrasekar, B. S., Saha, B., Victor, E. S., Majumdar, S., & Nandi, D. (2014). Interferon-gamma induced cell death: Regulation and contributions of nitric oxide, cJun N-terminal kinase, reactive oxygen species and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta*, 1843(11), 2645-2661. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.06.014
- Ramana, C. V., Gil, M. P., Schreiber, R. D., & Stark, G. R. (2002). Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol*, 23(2), 96-101.
- Reinhardt, D., Nicolai, T., & Zimmer, K.-P. (2014). *Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter SpringerLink : Bücher* (pp. 1571).
- Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., et al. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348(6230), 124-128. doi:10.1126/science.aaa1348
- Rocha, G., Deschenes, J., & Rowsey, J. J. (1998). The immunology of corneal graft rejection. *Crit Rev Immunol*, 18(4), 305-325.
- Rodier, F., Coppe, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Munoz, D. P., Raza, S. R., et al. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*, 11(8), 973-979. doi:10.1038/ncb1909
- Romeo, G., Fiorucci, G., Chiantore, M. V., Percario, Z. A., Vannucchi, S., & Affabris, E. (2002). IRF-1 as a negative regulator of cell proliferation. *J Interferon Cytokine Res*, 22(1), 39-47. doi:10.1089/107999002753452647
- Rosenberg, S. A. (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411(6835), 380-384. doi:10.1038/35077246
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Kammula, U. S., Hughes, M. S., Phan, G. Q., et al. (2011). Durable complete responses in heavily pretreated patients with

- metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 17(13), 4550-4557. doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-0116
- Saito, T., Berens, M. E., & Welander, C. E. (1987). Interferon-gamma and cytotoxic agents studied in combination using a soft agarose human tumor clonogenic assay. *Cancer Chemother Pharmacol*, 19(3), 233-239.
- Scheithauer, H., Belka, C., Lauber, K., & Gaipl, U. S. (2014). Immunological aspects of radiotherapy. *Radiat Oncol*, 9, 185. doi:10.1186/1748-717x-9-185
- Schilbach, K., Alkhaled, M., Welker, C., Eckert, F., Blank, G., Ziegler, H., et al. (2015). Cancer-targeted IL-12 controls human rhabdomyosarcoma by senescence induction and myogenic differentiation. *Oncoimmunology*, 4(7), e1014760. doi:10.1080/2162402x.2015.1014760
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75(2), 163-189. doi:10.1189/jlb.0603252
- Shahabi, V., Postow, M. A., Tuck, D., & Wolchok, J. D. (2015). Immune-priming of the tumor microenvironment by radiotherapy: rationale for combination with immunotherapy to improve anticancer efficacy. *Am J Clin Oncol*, 38(1), 90-97. doi:10.1097/COC.0b013e3182868ec8
- Skamene, S., Abish, S., Mitchell, D., & Freeman, C. (2015). Radiotherapy is Important for Local Control at Primary and Metastatic Sites in Pediatric Rhabdomyosarcoma. *Cureus*, 7(11), e388. doi:10.7759/cureus.388
- Staveley-O'Carroll, K., Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., et al. (1998). Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(3), 1178-1183.
- Sugihara, T., Murano, H., Nakamura, M., Ichinohe, K., & Tanaka, K. (2011). Activation of interferon-stimulated genes by gamma-ray irradiation independently of the ataxia telangiectasia mutated-p53 pathway. *Mol Cancer Res*, 9(4), 476-484. doi:10.1158/1541-7786.mcr-10-0358
- Tagawa, M. (2000). Cytokine therapy for cancer. *Curr Pharm Des*, 6(6), 681-699.
- te Poele, R. H., Okorokov, A. L., Jardine, L., Cummings, J., & Joel, S. P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 62(6), 1876-1883.

- Tochner, Z., & Slavin, S. (1988). Immune modulation by ionized irradiation. *Curr Opin Immunol*, 1(2), 261-268.
- Tsoncheva, V. L., Todorova, K. A., & Maximova, V. A. (2008). Decreased DNA repair capacity of UV-irradiated cells following interferon treatment. *Z Naturforsch C*, 63(7-8), 605-611.
- Vanpouille-Box, C., Pilonis, K. A., Wennerberg, E., Formenti, S. C., & Demaria, S. (2015). In situ vaccination by radiotherapy to improve responses to anti-CTLA-4 treatment. *Vaccine*, 33(51), 7415-7422. doi:10.1016/j.vaccine.2015.05.105
- Wannenmacher, M., Wenz, F., & Debus, J. (2013). *Strahlentherapie*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Watanabe, Y., Suzuki, O., Haruyama, T., & Akaike, T. (2003). Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *J Cell Biochem*, 89(2), 244-253. doi:10.1002/jcb.10501
- Wei, S., Egenti, M. U., Teitz-Tennenbaum, S., Zou, W., & Chang, A. E. (2013). Effects of tumor irradiation on host T-regulatory cells and systemic immunity in the context of adoptive T-cell therapy in mice. *J Immunother*, 36(2), 124-132. doi:10.1097/CJI.0b013e31828298e6
- Weller, M., Malipiero, U., Aguzzi, A., Reed, J. C., & Fontana, A. (1995). Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *J Clin Invest*, 95(6), 2633-2643. doi:10.1172/jci117965
- Wilky, B. A., & Goldberg, J. M. (2014). Immunotherapy in sarcoma: a new frontier. *Discov Med*, 17(94), 201-206.
- Windbichler, G. H., Hausmaninger, H., Stummvoll, W., Graf, A. H., Kainz, C., Lahodny, J., et al. (2000). Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br J Cancer*, 82(6), 1138-1144. doi:10.1054/bjoc.1999.1053
- Youn, J. I., & Gabilovich, D. I. (2010). The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol*, 40(11), 2969-2975. doi:10.1002/eji.201040895



Zaidi, M. R., & Merlino, G. (2011). The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clin Cancer Res*, 17(19), 6118-6124. doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-0482

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen, Labor Experimentelle Radioonkologie unter Betreuung von Prof. S. M. Huber durchgeführt.

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder der AG Huber) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig (nach Anleitung durch Labormitglieder der AG Huber).

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

Tübingen, 2016

Ivan Jelas

## 8 Anhang

**Tabelle 7: Materialien**

Name	Gelöst in	Hersteller
EtOH	absolut, $\geq 99,8\%$	Sigma-Aldrich
FBS	100%	Biochrom (Merck Millipore)
Formaldehydlösung	mind. 37%	Merck KGaA
Glycerol		MERCK
Glycin PUFFERAN®	$\geq 99\%$	Carl Roth
Leupeptin hemisulfate	2,5 mg/mL in dH <sub>2</sub> O	Carl Roth
n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside, ULTROL® Grade	100 mg/L in dH <sub>2</sub> O	Calbiochem
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	1 M in dH <sub>2</sub> O	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	1,5 M in dH <sub>2</sub> O	VWR
Natriumfluorid (NaF)	0,5 M in dH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
Natriumpyrophosphat (NaPP)	200 mM in dH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
PageRuler™ Prestained Protein Ladder		Fermentas
PBS Tablets	1 Tablette in 500 mL dH <sub>2</sub> O	gibco®
Pepstatin (A)	2,5 mg/mL in EtOH	Carl Roth
PhosSTOP (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets)	1 Tablette in 10 mL Zellysepuffer	Roche
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	100 mM in EtOH	Carl Roth
Rotiphorese® Gel 30 (37, 5:1)		Carl Roth
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE Laufpuffer	1 x in dH <sub>2</sub> O	Carl Roth

RPMI-1640 Medium		Sigma-Aldrich
SDS	20% (w/v) in dH <sub>2</sub> O	Carl Roth
TEMED	etwa 99%	Sigma-Aldrich
TRIS-HCl	1 M in dH <sub>2</sub> O	Carl Roth
Triton-X Trizma® base	≥ 99,9%	Sigma-Aldrich
Trizma® HCl	≥ 99,0%	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	1 x in HBSS	Sigma-Aldrich
Tween® 20 BioChemica		AppliChem

**Tabelle 8: Puffer und Lösungen**

Puffer/Lösung	Bestandteil	Konzentration	Träger
Probenpuffer 4x	SDS	4% (w/v)	dH <sub>2</sub> O
	TRIS-HCl	200 mM	
	Glycerol	20% (v/v)	
	Bromphenolblau	0,005%	
Trenngelpuffer pH 8,8 <sub>a</sub>	Trizma® base	1,5 M	dH <sub>2</sub> O
	SDS	0,4% (w/v)	
Sammelgelpuffer pH 6,8 <sub>a</sub>	Trizma® base	500 mM	dH <sub>2</sub> O
	SDS	0,4% (w/v)	
Transferpuffer pH 8,3	Trizma® base	25 mM	dH <sub>2</sub> O
	Glycin PUFFERAN®	190 mM	
	Isopropanol <sub>b</sub>	20% (v/v)	
TBS/Tween (TBS-T) pH 8,0	Trizma® HCl	1 mM	dH <sub>2</sub> O
	NaCl	150 mM	
	Tween® 20 BioChemica	0,1% (v/v)	

**Tabelle 9: Mastermix für die cDNA-Synthese**

Bestandteil	Konzentration	Finale Konzentration	Beispiel für eine Reaktion
Transcriptor Reverse Transcription Reaction Buffer	5x	1x	4 µL
Anchored-oligo(dT)18 Primer	50 µM	5 µM	2 µL
Desoxynukleosid-triphosphate	10 mM each	1 mM each	2 µL
Transcriptor Reverse Transcriptase	20 Units/µL	10 Units	0,5 µL
Protector RNase Inhibitor	40 Units/µL	20 Units	0,5 µL

**Tabelle 10: Mastermix für die Real-Time PCR**

Bestandteil	Konzentration	Finale Konzentration	Beispiel für eine Reaktion
QuantiFast SYBR Green PCR Buffer	2x	1x	10 µL
Wasser (PCR Grade)			6 µL
Gen-spezifische Primer	10 x	1x	2 µL

**Tabelle 11: Verwendete QuantiTect® Primer Assays**

Name	Ziel mRNA	Hersteller
Hs_IRF-1_	IRF-1	Qiagen
Hs_GAPDH_2_SG	GAPDH	Qiagen

**Tabelle 12: Programm der Real-Time PCR**

Denaturierung				
Zyklen	1	Analysen	keine	
Target (° C)	Detektion	Dauer (hh:mm:ss)	Ramp Rate (° C/sek)	Detektionen (per ° C)
95	keine	00:03:00	4,40	

Annealing				
Zyklen	40	Analyse	Quantifizierung	
Target (° C)	Detektion	Dauer (hh:mm:ss)	Ramp Rate (° C/sek)	Detektionen (per ° C)
95	keine	00:00:03	4,40	
60	eine	00:00:30	2,20	

Schmelzen				
Zyklen	1	Analyse	Schmelzkurve	
Target (° C)	Detektion	Dauer (hh:mm:ss)	Ramp Rate (° C/sek)	Detektionen (per ° C)
95	keine	00:00:10	4,40	
62	eine	00:00:05	2,20	
98	kontinuierlich		0,11	5

Kühlen				
Zyklen	1	Analyse	keine	
Target (° C)	Detektion	Dauer (hh:mm:ss)	Ramp Rate (° C/sek)	Detektionen (per ° C)
40	keine	00:00:30	2,20	

**Tabelle 13: Lysepuffer**

Bestandteil	Konzentration	Finale Konzentration
HEPES, pH 7.4 <sup>a</sup>	1 M	50 mM
n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosidea	100 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ g/mL
NaCl <sub>a</sub>	1,5 M	150 mM
NaPP <sub>a</sub>	200 mM	10 mM
NaF <sub>a</sub>	0,5 M	150 mM
EDTAA <sub>a</sub>	0,5 M	1 mM
dH <sub>2</sub> O <sub>a</sub>		fill
Natriumorthovanadat <sub>b</sub>	1 M	2 mM
Aprotinin <sub>b</sub>	2 mg/mL	5 $\mu$ g/mL
Leupeptin <sub>b</sub>	2,5 mg/mL	5 $\mu$ g/mL
Pepstatin <sub>b</sub>	2,5 mg/mL	3 $\mu$ g/mL
Phenylmethylsulfonylfluorid <sub>b</sub>	1,5 M	150 mM

<sup>a</sup> Mischung aus diesen Bestandteilen längere Zeit lagerfähig bei -20 °C

<sup>b</sup> werden erst vor Gebrauch dazugeben; zusätzlich kommen noch jeweils 1 Tablette cOmplete Tablets, Mini EDTA free und PhosSTOP (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets) auf 10 mL Lysepuffer hinzu

# Danksagung

Hiermit möchte ich mich übergreifend bei allen bedanken, die mich während des Anfertigens dieser Dissertation unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephan Huber sowie Frau Dr. Franziska Eckert, welche mir unermüdliche Unterstützung und Betreuung haben zu kommen lassen. Ein großer Dank geht ebenfalls an Heidrun Faltin, für die tägliche Unterstützung im Labor sowie der gesamten AG Huber. Vielen Dank an meine Familie und Freunde, die mich während meines gesamten Lebenswegs und Studiums stetig unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Eva Jelas (geboren Conradt) bedanken. Ohne deine verständnisvolle Art, deine Unterstützung und deinen Rückhalt wäre vieles nicht möglich. Ich bin unendlich dankbar, dass ich jemanden wie dich in meinem Leben haben darf.