

Aus der
Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen

Inaugural-Dissertation
**Abskopale Effekte einer Radiotherapie und kombinierter
mRNA-basierter Immuntherapie in vivo**

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

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

vorgelegt von

Basler, Lucas

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber
2. Berichterstatter: Professor A. Weber

Tag der Disputation: 16.10.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Wissenschaftlicher Hintergrund	1
1.1.1	Immunologischer Hintergrund einer kombinierten Radioimmuntherapie	1
1.1.2	Aboskopale Effekte and Metastasierung	4
1.2	Eigene Vorarbeiten und Vorarbeiten der Klinik für Radioonkologie Tübingen in Zusammenarbeit mit der Firma CureVac AG	7
1.3	Experimentelle Ziele	15
1.3.1	Projektbeschreibung	15
1.3.2	Auf welchen immunologischen Prozessen basieren die beobachteten synergistischen Effekte von Vakzinierung und Strahlentherapie?	17
1.3.4	Kann eine lokale Bestrahlung in Kombination mit einer Immuntherapie eine Tumorkontrolle außerhalb des Bestrahlungs-Zielvolumens induzieren (aboskopale Effekte)?	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Mäuse	19
2.2	Zelllinien	19
2.3	CureVac RNActive® Tumorstoffe	20
2.4	Zellkultur	22
2.4.1	Zellzählung und Viabilitätsmessung	22
2.4.2	Zell-Splitting	23
2.4.3	Zell-Selektion mit G418	23
2.5	Sedation	24
2.5.1	Ketamin / Xylazin-Injektionsnarkose	24
2.5.2	Isofluran-Gasnarkose	24
2.6	Tumor-Challenge	24
2.6.1	Zell-Vorbereitung	24
2.6.2	Zell-Injektion	27
2.7	Tumormessung	29
2.8	Abbruchkriterien und Tötung der Tiere	29
2.9	Markierung und Nummerierung der Mäuse	29
2.10	Gruppenzuordnung	30
2.11	Radiotherapie	31
2.11.1	Vorbereitung und Sedation	31

2.11.2 Bestrahlung, Abschirmung und Dosimetrie	31
2.12 mRNA-basierte Vakzinierung	32
2.13 Tumor-Extraktion	32
2.14 Zytokin-Analyse mittels Mouse Cytokine Antibody Array	32
2.15 Statistische Analyse	33
3 Ergebnisse	35
3.1 Wachstumsverzögerung des Primärtumors	35
3.2 Wachstumsverzögerung des nicht-bestrahlten Sekundärtumors	42
3.3 Analyse des Tumor-Zytokinprofils	47
3.4 Physikalische Dosimetrie der Tumorbestrahlung	50
4 Diskussion	52
5 Liste der Veröffentlichungen	58
6 Zusammenfassung	59
6.1 Hintergrund	59
6.2 Methoden	59
6.3 Ergebnisse	59
6.4 Diskussion	60
7 Literaturverzeichnis	61
8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	70
9 Anhang	71
9.1 Verwendete Tiere	71
9.2 Allgemeines Material	71
9.3 Material zur Herstellung von Lösungen	71
9.4 Material für Zellkultur	72
9.5 Material für Tumordinjektion und Tumormessung	72
9.6 Software	73
10 Danksagung	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunsuppressives Mikromilieu von Tumorzellen und immunstimulatorische Effekte einer Strahlentherapie.....	7
Abbildung 2: OVA-RNActive® Tumorstimmulierung.....	9
Abbildung 3: Wachstumsverzögerung einer alleinigen Tumorstimmulierung	10
Abbildung 4: Wachstumsverzögerung und Überleben einer Immun-, Strahlen-, oder Kombinationstherapie im E.G7-OVA Tumormodell.....	11
Abbildung 5: Wachstumsverzögerung einer Immun-, Strahlen-, oder Kombinationstherapie im Lewis Lung Carcinoma (LLC) Tumormodell.....	12
Abbildung 6: Erhöhte MHC-I Expression im Anschluss an eine Strahlentherapie	13
Abbildung 7: Einfluss einer Immun-, Strahlen-, oder Kombinationstherapie auf die zelluläre Zusammensetzung des Tumor-Mikromilieus	14
Abbildung 8: Aktuelle Entwicklung RNA-basierter Tumorstimmulierung (CureVac AG)	21
Abbildung 9: Ohrlochmarkierung zur Nummerierung der Mäuse	30
Abbildung 10: Versuchsprotokoll und zeitlicher Ablauf.....	34
Abbildung 11: Tumorstimmulierung der Primärtumoren bei Behandlungsbeginn	36
Abbildung 12: Tumorstimmulierung des Sekundärtumors in Abhängigkeit des Primärtumors	37
Abbildung 13: Mittleres Tumorstimmulierung der bestrahlten Primärtumoren	39
Abbildung 14: Natürlicher Logarithmus des x-fachen Tumorstimmulierung (Primärtumor).....	40
Abbildung 15: Steigung der Wachstumskurve der bestrahlten Primärtumoren	41
Abbildung 16: Tumorstimmulierung der Sekundärtumoren bei Behandlungsbeginn.....	43
Abbildung 17: Mittleres Tumorstimmulierung der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren.....	44
Abbildung 18: Natürlicher Logarithmus des x-fachen Tumorstimmulierung (Sekundärtumor)	45
Abbildung 19: Steigung der Wachstumskurve der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren	46
Abbildung 20: Chemokinprofil der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren.	48
Abbildung 21: Zytokinprofil der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren.....	49
Abbildung 22: Bestrahlungsabschirmung und Filmdosimetrie.....	51

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosine triphosphate
BED	Biologically effective dose
C57BL/6	C57 black 6
CAR	Chimeric antigen receptor
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
CXCL16	Chemokine (C-X-C motif) ligand 16
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
DAMP	Danger associated molecular pattern
DC	Dendritic cell
E.G7-OVA	Ovalbumin-expressing transfectoma of EL4 thymoma
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EL4	EL4 thymoma
FAS	Apoptosis antigen 1
G418	Geneticin
GgOVA	Gallus gallus Ovalbumin
Gy	Gray
HMGB1	High-mobility group protein B1
IFN- γ	Interferon gamma
IL-1 α	Interleukin 1 alpha
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12

IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
LET	Linear energy transfer
LLC	Lewis lung carcinoma
M-CSF	Macrophage-Colony-Stimulating-Factor
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MHC	Major histocompatibility complex
MIG	Monokine induced by gamma interferon
MIP-1	Macrophage inflammatory protein
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MV	Megavolt
NK cells	Natural killer cells
NKT cells	Natural killer T cells
NOAEL	No-observed-adverse-effect-level
PBS	Phosphate-buffered saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PGE2	Prostaglandin E2
RANTES	Chemokine (C-C motif) ligand 5
RNA	Ribonucleic acid
RT	Radiotherapy
s.c.	Subcutaneously
SE	Standard error of the mean
TAM	Tumor associated macrophage
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
Treg	Regulatory T cell
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

1.1.1 Immunologischer Hintergrund einer kombinierten Radioimmuntherapie

Trotz vielseitiger wissenschaftlicher und pharmazeutischer Bemühungen sind die heutigen Behandlungsmöglichkeiten für viele fortgeschrittene Tumorerkrankungen nur sehr eingeschränkt. Insbesondere die Wirksamkeit etablierter Therapiestandards, inklusive systemischer Chemotherapie und Strahlentherapie, bleiben trotz der teilweise hohen Nebenwirkungen solcher Ansätze insgesamt unbefriedigend. Fortgeschrittene Tumorerkrankungen mit Bildung von Fernmetastasen stellen ein besonderes Problem der heutigen Krebstherapie dar und sind die Hauptursache für Krebstodesfälle (Sporn 1996, Sporn 1997, Geiger and Peeper 2009).

Im Verlauf des letzten Jahrzehnts wurden neue Therapiemöglichkeiten entwickelt, wie z.B. targeted therapies (u.a. EGFR-Inhibitoren, CD20-Antikörper, antiangiogenetische Antikörper) oder immunmodulatorische Therapien (Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie CTLA-4 und PD-1 Antikörper und Tumorstoffe). Diese neuartigen Therapieansätze konnten große Erfolge in jeweils einem bestimmten Patientenkollektiv erzielen, ohne dass jedoch der Großteil der Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung davon profitieren konnte. Insbesondere Immun-Checkpoint-Inhibitoren konnten auch im bereits metastasierten Stadium zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens im Vergleich zu etablierten Systemtherapien führen, vor allem z.B. bei Melanom-Patienten (Hodi, O'Day et al. 2010). Der Einsatz dieser Inhibitoren führt bei einigen, jedoch nicht allen dieser Patienten zur Induktion oder Verstärkung einer tumor-spezifischen Immunantwort (Whiteside, Demaria et al. 2016).

In den meisten Fällen führt dies jedoch nicht zu einer kompletten Tumorkontrolle, insbesondere bei Patienten mit einer hohen Tumormasse oder Patienten mit

weniger bzw. nicht-immunogenen Tumoren. Ein Grund hierfür stellt häufig das immunsuppressive Mikromilieu des Tumors dar, welches eine unzureichende Infiltration von immunkompetenten Zellen, wie z.B. zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen oder dendritischen Zellen in den Tumor zur Folge hat (Gabrilovich, Chen et al. 1996, Banchereau, Briere et al. 2000, Triozzi, Khurram et al. 2000, Vicari, Caux et al. 2002, Kobie, Wu et al. 2003, Wang and Wang 2007, Melief 2008, Whiteside, Demaria et al. 2016).

Dendritische Zellen (DCs) werden von Tumoren chemotaktisch angezogen. Tumordinfiltrierende DCs phagozytieren und prozessieren Tumorantigene. Dies bewirkt zusammen mit Gefahr- und „Freß-mich“-Signalen (Yang, Chen et al. 2007) aus dem Tumor, eine robuste DC-Reifung (Matzinger 2002) und das chemotaktische „Homing“ der aktivierten DCs in die ableitenden Lymphknoten, wo sie tumorreaktive CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aktivieren können (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2006). So kann das adaptive Immunsystem eine T-Zell-Immunität gegen Tumoren erwerben. Eine robuste Aktivität von DCs wird aber nur selten in den Tumoren beobachtet.

Das Mikromilieu von Tumoren wirkt diesen Prozessen auf verschiedenen Ebenen entgegen, wobei wahrscheinlich physikalische Faktoren (Hypoxie oder der pH-Wert) und immunsupprimierende Signalmoleküle zusammenspielen. Letztere werden von den Tumorzellen selbst oder von tumorassoziierten Makrophagen (TAM) und myeloiden Suppressorzellen (MDSC) exprimiert bzw. sezerniert (Melief 2008). Dabei wird sowohl die Differenzierung von DCs aus CD34⁺ Progenitorzellen durch VEGF, IL-6, Macrophage-Colony-Stimulating-Faktor (M-CSF), die viele Tumoren bilden, (Banchereau, Briere et al. 2000) als auch die Reifung und Aktivierung von tumordinfiltrierenden DCs durch im Tumor gebildetes PGE₂, IL-10, und TGF-β gehemmt, sodass der DC Phänotyp im Tumor oder in den tumorableitenden Lymphknoten eher demjenigen von ruhenden, nicht-aktivierten und unreifen DCs ähnelt (Gabrilovich, Chen et al. 1996, Banchereau, Briere et al. 2000, Vicari, Caux et al. 2002, Kobie, Wu et al. 2003). Eine Tumorantigen-Präsentation durch unreife DCs induziert jedoch T-Zell-Anergy

oder -Deletion und regulatorische T-Zell (Treg)-Antworten anstatt einer Antitumor-Immunität (Melief 2008).

Tumoren haben zusätzlich die Fähigkeit zirkulierende Treg-Zellen anzulocken, indem der Tumor die Expression von Adressinen auf der Oberfläche von Endothelzellen induziert und so die selektive Transmigration von Tregs aus dem Blut ins Gewebe stimuliert. Ferner können Tumorzellen den apoptotischen Zelltod der DCs induzieren (Vicari, Caux et al. 2002) und der Erkennung durch zytotoxische T-Zellen entkommen, indem sie die Expression von MHC-Klasse I Rezeptoren auf ihrer Oberfläche herunterregulieren (Demaria, Ng et al. 2004). Letztlich wurde beobachtet, dass Tumoren auch das Homing von aktivierten DCs in die ableitenden Lymphknoten hemmen können (Tiozzi, Khurram et al. 2000). Erhöht sich aber die Zahl von tumorinfiltrierenden Treg-Zellen (Wang and Wang 2007) und erniedrigt sich diejenige von CD4⁺ T-Zellen wird die DC-Aktivierung und Reifung im Tumor noch weiter unterdrückt.

Bei der Vakzinierung gegen Tumoren können tumorassoziierte oder tumorspezifische Antigene verwendet werden. Angesichts der Tatsache, dass die meisten tumorassoziierten Antigene nicht ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert werden, stellt das Überwinden der vorhandenen Toleranz gegenüber den Antigenen die größte Herausforderung bei diesem Ansatz dar. Nach großen Erfolgen mit präventiven oder therapeutischer Vakzinierung im Mausmodell (Mayordomo, Zorina et al. 1995) wurden in den letzten Jahren mehrere klinische Studien durchgeführt, in denen tatsächlich tumorspezifische CD4⁺ and CD8⁺ T-Zell Antworten ausgelöst werden konnten (Palucka, Ueno et al. 2007, Steinman and Banchereau 2007).

Einzelne klinische Vakzinierungsstudien zeigten teilweise spektakuläre Erfolge (Higano, Schellhammer et al. 2009, Kirkwood, Lee et al. 2009, Weide, Pascolo et al. 2009), die Mehrheit der Studien lieferten aber eher enttäuschende Resultate (Rosenberg, Yang et al. 2004, Melief 2008, Freedman, Neelapu et al. 2009). Die Wissenschaft ist sich einig bei der Interpretation der negativen Ergebnisse dieser

Studien und postuliert die Notwendigkeit einer Kombinationstherapie, die das Tumorwachstum über unterschiedliche Mechanismen inhibieren soll. Deshalb wird durch verschiedene Strategien (Ko-Applikation mikrobiologischer Gefahrensignale, Treg-Zelldepletion, kombinierte Strahlen- oder Chemotherapie) versucht, die Immuntoleranz gegenüber Tumoren abzuschwächen und so die klinische Wirksamkeit der Immuntherapie zu verbessern (Medzhitov 2007, Sharp, Wansley et al. 2007, Wang and Wang 2007, Chamoto, Takeshima et al. 2009, Petrausch, Jensen et al. 2009).

Insbesondere die Kombination von Strahlentherapie und Vakzinierung scheint in Tiermodellen eine signifikant verbesserte lokale Tumorkontrolle und eine verringerte Fernmetastasierung, also das Streuen von malignen Zellen von einem Primärtumor zu entfernten Körperstellen, zu bewirken (Nikitina and Gabrilovich 2001, Kim, Kim et al. 2004, Chen, Xia et al. 2005, Tseng, Trimble et al. 2009).

1.1.2 Abskopale Effekte and Metastasierung

Dabei kann Strahlentherapie die Immuntherapie auf verschiedenen Ebenen unterstützen. Durch den Strahlentod der Tumorzellen wird eine bessere Perfusion und somit Oxygenierung des Tumors erreicht. Außerdem kann eine Bestrahlung das immunsuppressive Mikromilieu von Tumorzellen positiv beeinflussen. Dabei werden immunsupprimierende Leukozyten des Tumorstromas in ihrer Funktion geschwächt (Gabrilovich, Chen et al. 1996, Kobie, Wu et al. 2003). Zusätzlich stellen apoptotische oder nekrotische Bestandteile abgestorbener Tumorzellen eine hervorragende Quelle für unspezifische und insbesondere auch tumor-assoziierte Antigene dar (Jonathan, Bernhard et al. 1999). Zum anderen bergen sie Gefahrensignale, die sowohl DCs anlocken als auch in DCs die effiziente Prozessierung und Präsentation von Tumor-Antigenen stimulieren (Apetoh, Ghiringhelli et al. 2007, Yang, Chen et al. 2007). Ionisierende Strahlung kann die Expression, sowohl von tumorassoziierten Antigenen, als auch von MHC-Klasse I Rezeptoren auf den

Tumorzellen erhöhen (Hareyama, Imai et al. 1991, Matsumoto, Takahashi et al. 1999, Kunala and Macklis 2001). Auch erleichtert eine Tumorbestrahlung das „Homing“ der aktivierten DCs zu den ableitenden Lymphknoten und erhöht somit die Effizienz der Antigen-Präsentation (Teitz-Tennenbaum, Li et al. 2008). Die Bestrahlung von Tumorzellen kann zudem die Oberflächen-Expression von FAS-Rezeptoren auf Tumorzellen induzieren und so die Zellen anfälliger für zytotoxische T-Zellen machen (Chakraborty, Abrams et al. 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine lokale Bestrahlung das Einwandern von immunkompetenten Antitumor-Effektorzellen in den Tumor erleichtert (Lugade, Moran et al. 2005). Eine Tumorbestrahlung kann also eine Immuntherapie auf Ebene der DCs, sowie über davon afferente und efferente Prozesse unterstützen.

Der Effekt einer lokalen Tumorbestrahlung kann dabei, im Sinne einer systemischen Anti-Tumor-Immunität, über die im Strahlenfeld gelegenen Tumormanifestationen (Yokouchi, Chamoto et al. 2007) hinaus reichen und sich auf Fernmetastasen ausweiten. Dies wird als „abskopaler Effekt“ einer Strahlentherapie bezeichnet. Abbildung 1 fasst das immunsuppressive Mikromilieu von Tumorzellen und mögliche immunstimulatorische Effekte einer Strahlentherapie zusammen (Basler, Kowalczyk et al. 2018). Diese systemischen, bzw. abskopalen Antitumor-Immunantworten scheinen besonders durch eine fraktionierte Bestrahlung induziert zu werden (Dewan, Galloway et al. 2009). Strahlungsinduzierte abskopale Effekte könnten daher klinisch genutzt werden, um mittels Kombination von Strahlen- und Immuntherapie eine Metastasenbildung zu unterdrücken oder die Regression etablierter Metastasen zu erzielen (Frey, Rubner et al. 2012, Postow, Callahan et al. 2012). Es existieren einige Fallberichte, die diesen Effekt einer kombinierten Radioimmuntherapie bereits in der Klinik zeigen konnten (Frey, Rubner et al. 2012, Postow, Callahan et al. 2012, Golden, Demaria et al. 2013, Demaria, Pilonis et al. 2014, Grimaldi, Simeone et al. 2014, Chandra, Wilhite et al. 2015, Golden, Chhabra et al. 2015, Reynders, Illidge et al. 2015, Siva, MacManus et al. 2015, Bhattacharyya, Purushothaman et al. 2016).

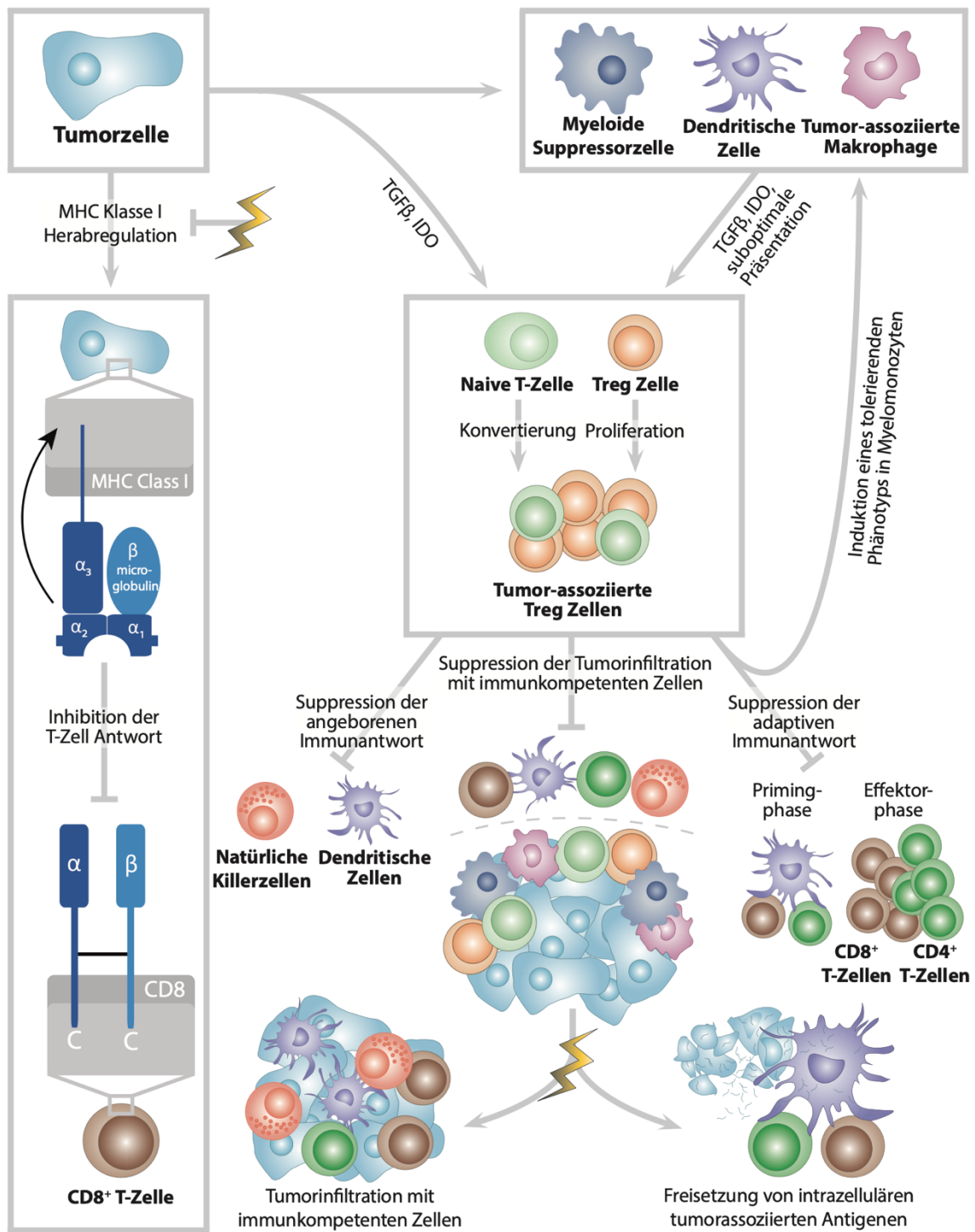


Abbildung 1: Immunsuppressives Mikromilieu von Tumorzellen und immunstimulatorische Effekte einer Strahlentherapie.

Tumoren können dem Immunsystem auf unterschiedliche Weise entkommen. Sie können eine T-Zell Antwort inhibieren, indem sie MHC-Klasse I Rezeptoren herunterregulieren. Sie induzieren Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs), Myeloide Suppressorzellen (MDSCs) und regulatorische T-Zellen (T_{reg}), was eine verminderte angeborene und adaptive Immunantwort zur Folge hat. Eine Bestrahlung führt zu einer vermehrten Expression von MHC-Klasse I Rezeptoren und damit verbundener T-Zell Antwort, zur erhöhten Infiltration von immunkompetenten Zellen in den Tumor und zur Freisetzung von tumor-assoziierten Antigenen, was eine systemische Tumor Immunantwort zur Folge haben kann, sogenannte „abkopale Effekte“. Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

**1.2 Eigene Vorarbeiten und Vorarbeiten der Klinik für Radioonkologie
Tübingen in Zusammenarbeit mit der Firma CureVac AG**

Die Klinik für Radioonkologie des Universitätsklinikums Tübingen hat in enger Zusammenarbeit mit der Firma CureVac AG, zwei syngene Maus-Tumormodelle für die kombinierte Immun- und Strahlentherapie etabliert. Immunogene und therapiesensitive E.G7-OVA Thymom- und nicht-immunogene therapieresistente Lewis Lung Cancer-Zellen (LLC), wurden subkutan in die rechten Hinterläufe von syngenem C57BL/6-Mäusen transplantiert, wo sie sich zu soliden lokalen Tumoren entwickelten. E.G7-OVA-Zellen sind mit Ovalbumin als tumorassoziiertes (fremdes) Antigen stabil transfiziert, gegen das die Mäuse mit einer speziell formulierten Zwei-Komponenten-RNA-Vakzine (OVA-RNActive®) (Fotin-Mleczek, Duchardt et al.) vakziniert wurden.

Bei den folgenden Abbildungen (Abb. 2 bis 7) handelt es sich um bereits publizierte Daten aus Fotin-Mleczek et al. (Fotin-Mleczek, Zanzinger et al. 2014) mit freundlicher Genehmigung des Verlages BioMed Central Ltd. (This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits

unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited).

Diese Immuntherapie induzierte sowohl gegen Ovalbumin gerichtete Antikörper als auch Ovalbumin-reaktive zytotoxische T-Zellen (Abbildung 2), verzögerte aber nur das Tumorwachstum um wenige Tage. Diese Wachstumsverzögerung war zudem umso geringer, je größer die Tumoren bei Beginn der Immuntherapie waren und je kürzer die Zeit war, um eine Immunantwort zu induzieren (Abbildung 3). Erfolgte vor Beginn der Immuntherapie jedoch eine Tumorbestrahlung mit 3 mal 2 Gy (Röntgenstrahlen), kam es zu einer signifikanten Wachstumsverzögerung und gesteigertem Überleben der Mäuse im Vergleich mit einer alleinigen Immun- bzw. Strahlentherapie (Abbildung 4). Zudem zeigten 40% der mit der Kombinationstherapie behandelten Mäuse eine Komplettremission im Vergleich zu 15% in den beiden anderen Therapiearmen. Ähnliche synergistische Effekte von Vakzinierung und Strahlentherapie konnten im LLC Modell gezeigt werden (Abbildung 5). In diesem Modell wurde gegen Selbstantigene vakziniert, die von den LLC-Zellen exprimiert werden. Darüber hinaus wurde durch die Bestrahlung die Expression von MHC-Klasse I Rezeptoren an der Oberfläche von LLC Tumorzellen deutlich erhöht, was diese Zellen für die Immuntherapie überhaupt zugänglich machte (Abbildung 6). Wir untersuchten den Einfluss einer Immun-, Strahlen-, oder Kombinationstherapie auf die zelluläre Zusammensetzung des Tumor-Mikromilieus und konnten eine stark erhöhte Infiltration der Tumoren mit Dendritischen Zellen, CD4+ T-Helferzellen, CD8+-Zytotoxischen T-Zellen, Natürlichen Killer-Zellen, und NKT-Zellen durch die Kombinationstherapie zeigen (Abbildung 7) (Fotin-Mleczek, Zanzinger et al. 2014).

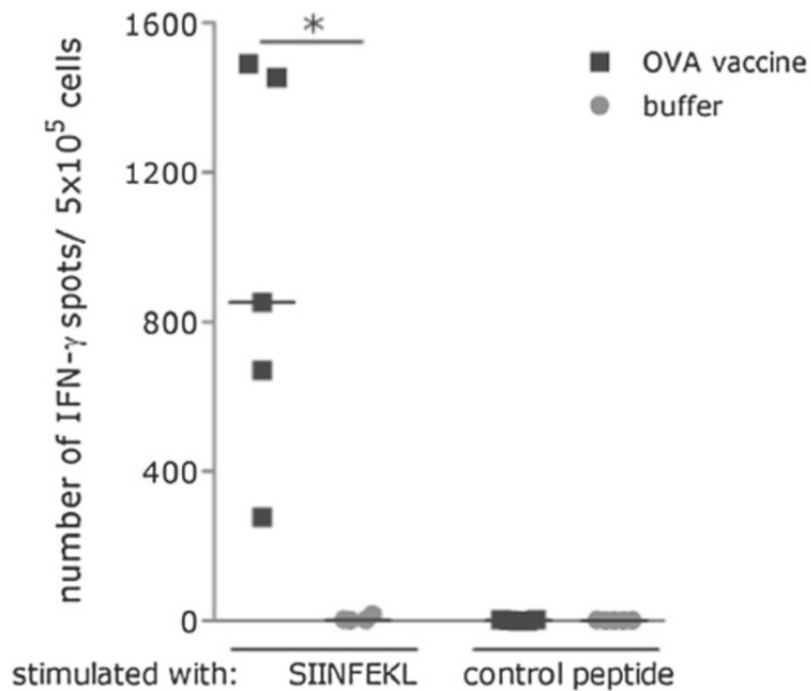


Abbildung 2: OVA-RNActive® Tumorvakzinierung

Das Vakzinieren mit OVA-RNActive® induziert effektive B- und T-Zell-Antworten. C57BL/6 Mäuse (n = 5 pro Gruppe) wurden zweimal intradermal mit OVA-RNActive® oder Pufferlösung alleine geimpft (1 Vakzinierung pro Woche). 7 Tage nach der letzten Vakzinierung wurden Splenozyten der vakzinieren Mäuse mit einem Ovalbumin-(SIINFEKL) oder einem Connexin-Epitop stimuliert und auf eine IFN- γ Sekretion mittels ELISpot Assay untersucht: Anzahl der IFN- γ spots / 5×10^5 Zellen (*p = 0.0154). Aus (Fotin-Mleczek, Zanzinger et al. 2014) mit freundlicher Genehmigung.

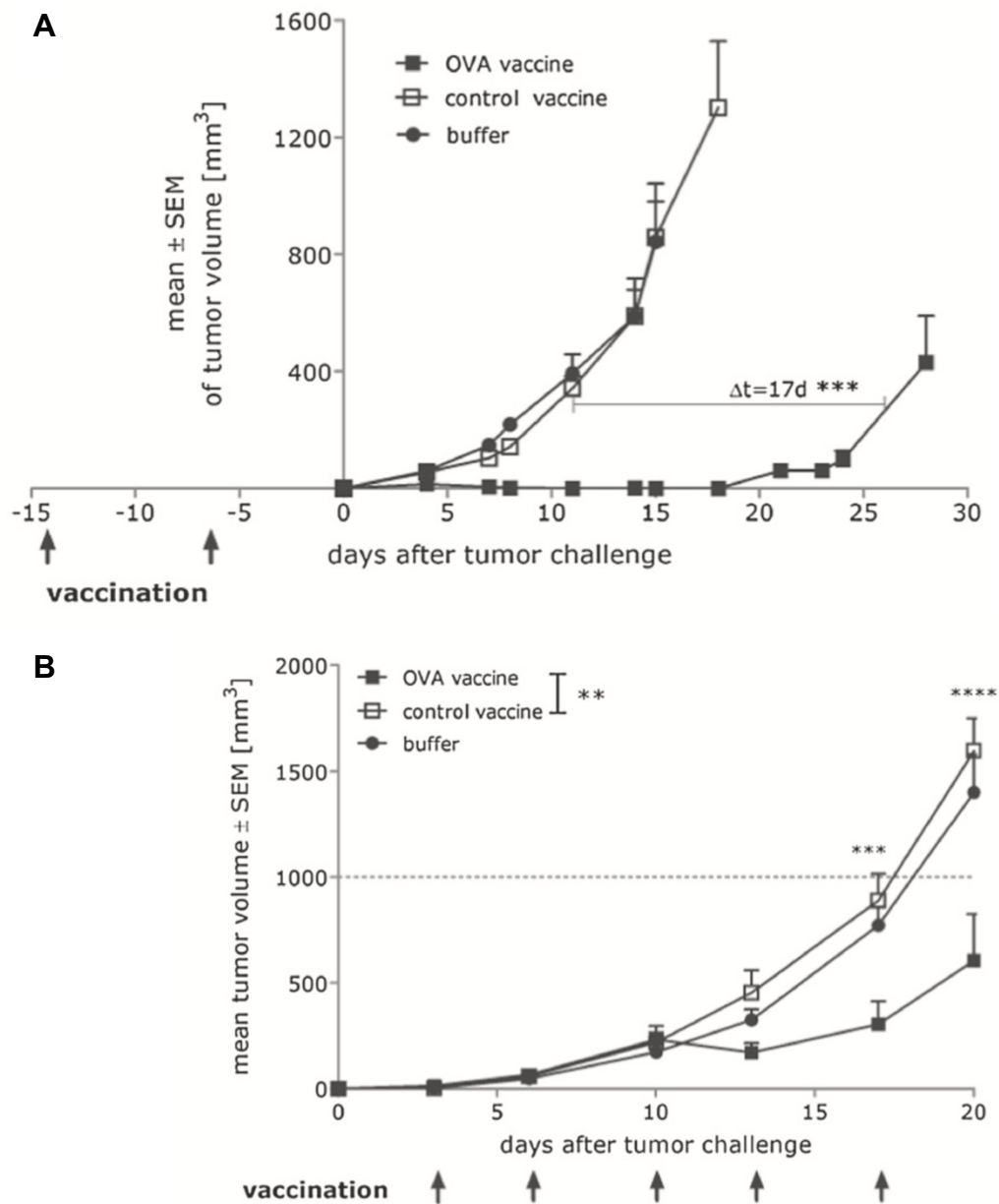


Abbildung 3: Wachstumsverzögerung einer alleinigen Tumorzunahme

Eine RActive®-basierte Vakzination hemmt das Wachstum von E.G7-OVA-Tumoren in C57BL/6-Mäusen in Abhängigkeit der Tumoralast zu Therapiebeginn. Den Mäusen wurden subkutan 0.3×10^6 syngene E.G7-OVA Tumorzellen am Tag 0 transplantiert. Gezeigt ist das mittlere Tumortumorenvolumen \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Vakzination erfolgte entweder prophylaktisch vor der Tumorzunahme (**A**) an Tag -14 und an Tag -7 (** $p < 0.0001$) oder im Anschluss an die Tumorzunahme (**B**) an Tag 3, 6, 10, 13 und 17 (** $p = 0.0091$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Die Pfeile zeigen die Tage, an denen die Vakzination erfolgte. Je früher eine Vakzination erfolgte, desto größer war die resultierende Wachstumsverzögerung. Aus (Fotin-Mlecsek, Zanzinger et al. 2014) mit freundlicher Genehmigung.

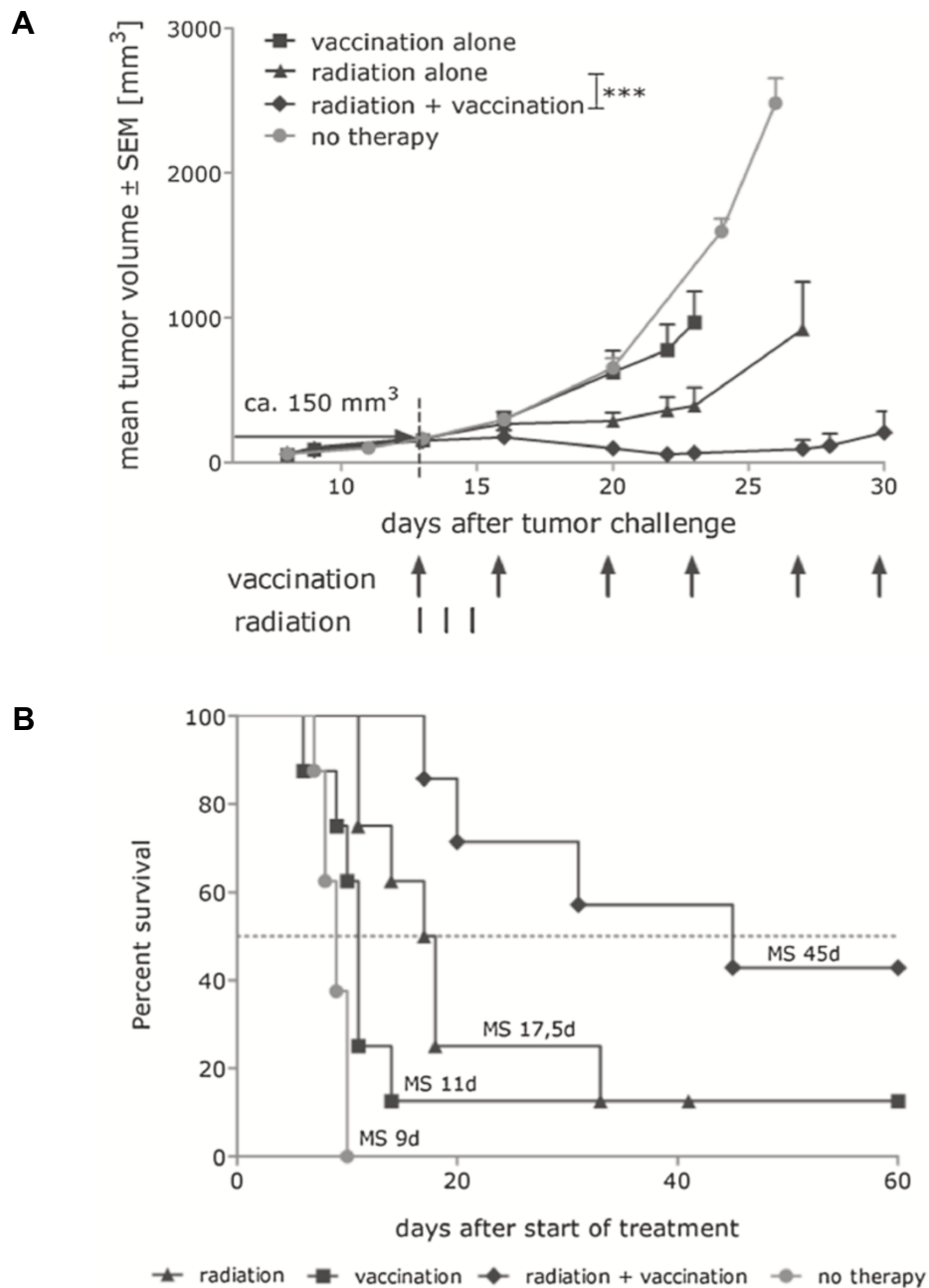


Abbildung 4: Wachstumsverzögerung und Überleben einer Immun-, Strahlen-, oder Kombinationstherapie im E.G7-OVA Tumormodell

Eine kombinierte Strahlentherapie steigert die Effizienz der Immuntherapie im E.G7-OVA Thymom-Modell. Dargestellt ist in **A** das mittlere Tumolvolumen \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) von E.G7-OVA -Tumoren ($n = 8$), die subkutan in den Hinterläufen von C57BL/6-Mäusen wachsen und in **B** das Überleben der Mäuse (MS: Mittleres Überleben). Die Kombinationstherapie aus Bestrahlung und Vakzinierung zeigt ein signifikant längeres mittleres Überleben mit 45 Tagen im Vergleich zu einer alleinigen Bestrahlung (17,5 Tage) bzw. Vakzinierung (11 Tage) und Kontrolle (9 Tage). Aus (Fotin-Mleczek, Zanzinger et al. 2014) mit freundlicher Genehmigung.

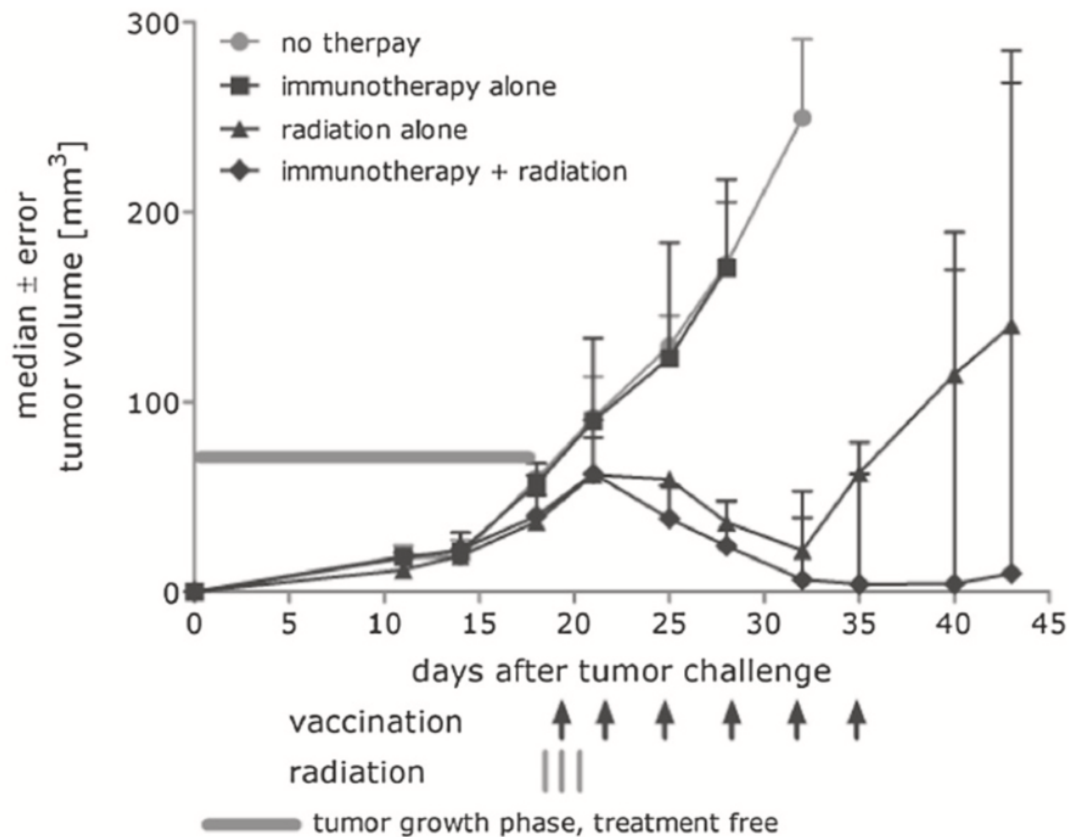


Abbildung 5: Wachstumsverzögerung einer Immun-, Strahlen-, oder Kombinationstherapie im Lewis Lung Carcinoma (LLC) Tumormodell

Auch im Lewis-Lung-Cancer-Modell führt eine kombinierte Strahlentherapie zu einer gesteigerten Effizienz der Immuntherapie mit einer verlängerten Wachstumsverzögerung. Gezeigt ist das mediane Tumolvolumen \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in Abhängigkeit von der Zeit für LLC-Tumoren, die subkutan in den Hinterläufen von C57BL/6-Mäusen wachsen ($n = 5$ pro Gruppe). Aus (Fotin-Mleczek, Zanzinger et al. 2014) mit freundlicher Genehmigung.

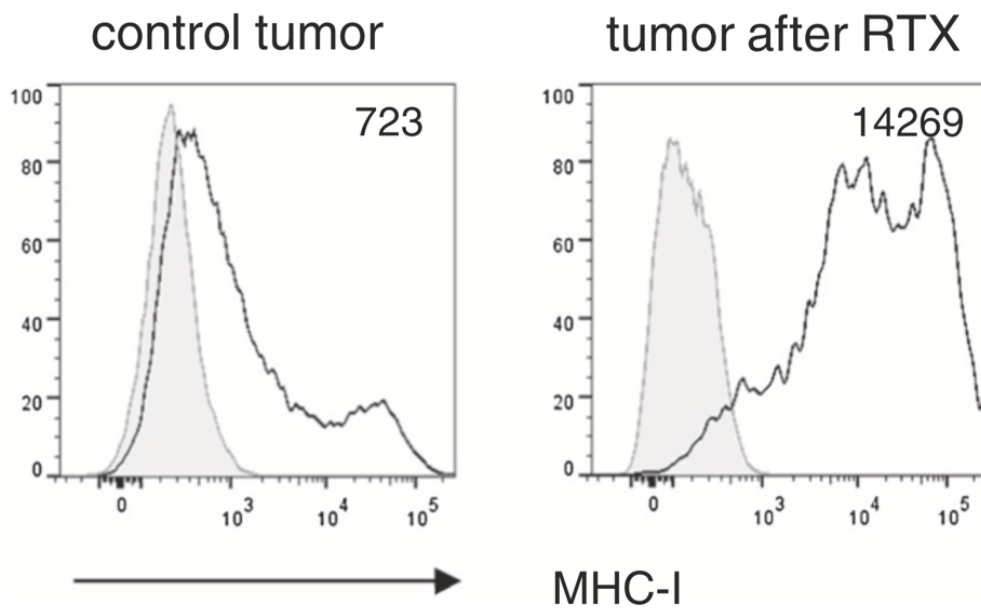


Abbildung 6: Erhöhte MHC-I Expression im Anschluss an eine Strahlentherapie

Eine Bestrahlung (RTX) induziert in LLC-Tumoren die Expression von MHC-I Molekülen signifikant, was eine Erkennung und Elimination durch zytotoxische T-Zellen teilweise erst ermöglicht. Die Analyse basiert auf Durchflußzytometrie-Histogrammen, die anhand von bestrahlten bzw. nicht-bestrahlten Einzelzell-Suspensionen von LLC-Tumorzellen generiert wurden. Aus (Fotin-Mleczek, Zanzinger et al. 2014) mit freundlicher Genehmigung.

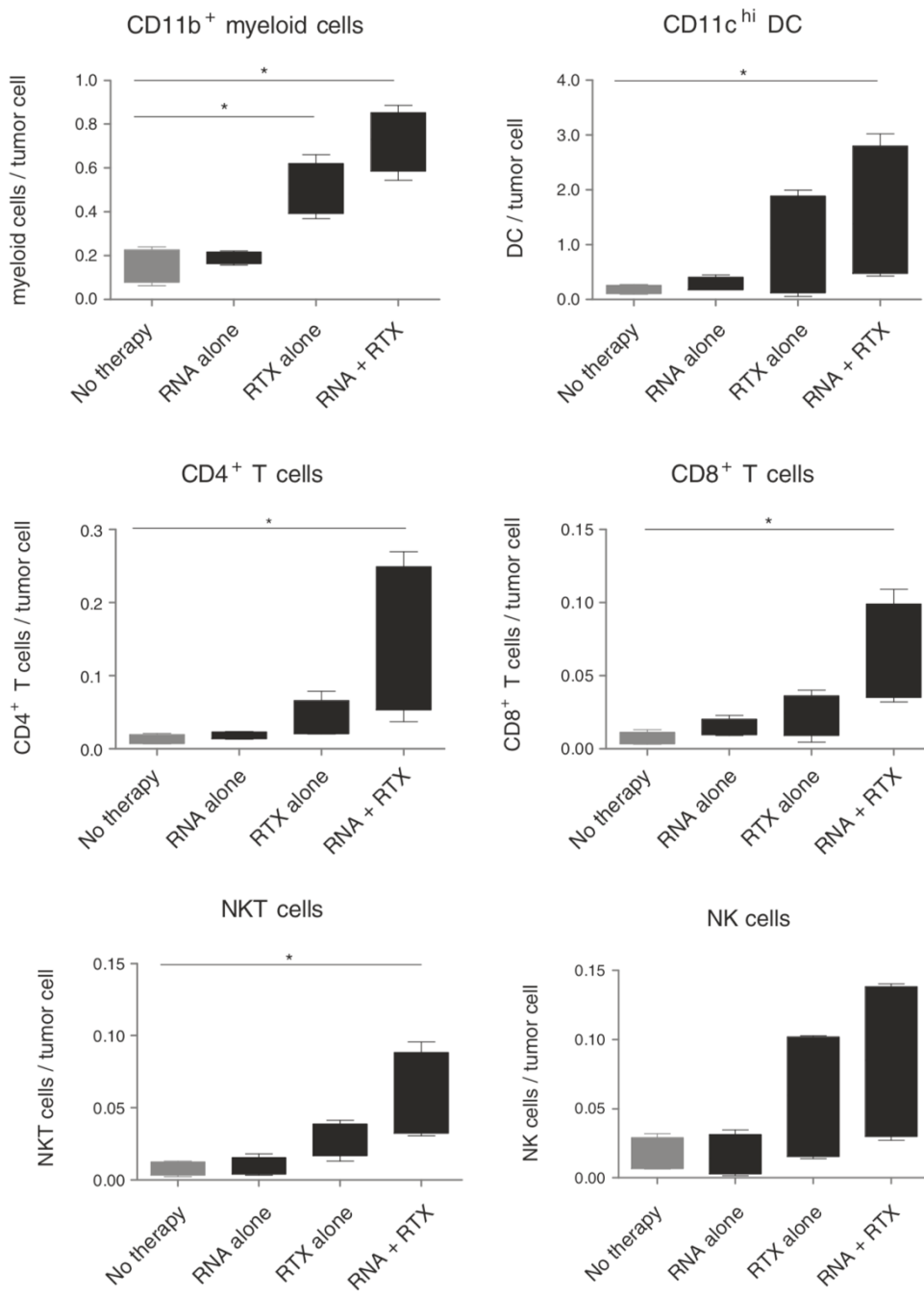


Abbildung 7: Einfluss einer Immun-, Strahlen-, oder Kombinationstherapie auf die zelluläre Zusammensetzung des Tumor-Mikromilieus

Dargestellt ist die zelluläre Immunzellverhältnis im Vergleich zur Anzahl der LLC-Tumorzellen in Abhängigkeit der Therapie (n = 4 pro Gruppe). Die Kombination von Immuntherapie (RNA) und Strahlentherapie (RTX) führt zu einer erhöhten Infiltration des Tumors mit immun-kompetenten Zellen und Effektorzellen (*p < 0.05). Aus (Fotin-Mleczek, Zanzinger et al. 2014) mit freundlicher Genehmigung.

1.3 Experimentelle Ziele

1.3.1 Projektbeschreibung

Die Vorarbeiten zeigen, dass eine Vakzinierung mit Ovalbumin-kodierender mRNA zu einer Wachstumsverzögerung und Überlebensverbesserung in vivo führen kann (Fotin-Mleczek, Duchardt et al. 2011, Lorenz, Fotin-Mleczek et al. 2011). In den letzten Jahren hat sich jedoch gezeigt, dass eine alleinige Immuntherapie oder Vakzinierung nur begrenzt effektiv in der Therapie größerer etablierter Tumoren oder Metastasen ist, da diese bereits Tumor-Immunevasionsmechanismen gebildet haben (Formenti and Demaria 2013).

Es gibt bereits umfangreiche Literaturdaten, die einen möglichen positiven Einfluss einer Chemotherapie bzw. einer Bestrahlung auf die Wirksamkeit einer Immuntherapie modellhaft belegen (Ramakrishnan, Antonia et al. 2008). Mehrere Gruppen konnten zeigen, dass eine kombinierte Strahlentherapie diese Mechanismen durchbrechen und zu einer verbesserten Tumor-Immunantwort führen kann (Demaria, Ng et al. 2004). Die genauen immunologischen Prozesse und die beobachteten synergistischen Effekte von Vakzinierung und Strahlentherapie, die zur Tumorkontrolle führen können, sind jedoch noch nicht hinreichend bekannt. Insbesondere ist bisher nicht ausreichend geklärt, ob während einer Immuntherapie die lokale Bestrahlung auch eine Tumorkontrolle von Fernmetastasen außerhalb des Strahlentherapie-Zielvolumens induzieren kann (Yokouchi, Chamoto et al. 2007, Dewan, Galloway et al. 2009).

Dieses Projekt sollte die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen einer kombinierten Radioimmuntherapie in einem syngenem Thymom Doppeltumor-Mausmodell charakterisieren. Als Immuntherapie diene dabei eine RNaActive® Tumorkonjugat-Vakzinierung der Firma CureVac (Fotin-Mleczek, Duchardt et al. 2011). Ferner sollten synergistische Effekte von Vakzinierungs- und Strahlentherapie auf Tumoren und Metastasen außerhalb des Bestrahlungszielvolumens, sogenannte abskopale Effekte identifiziert werden. Zusätzlich sollte das Tumormikromilieu des nicht-bestrahlten Sekundärtumors in

Abhängigkeit einer alleinigen Immuntherapie, Strahlentherapie oder Kombinationstherapie auf Zytokin- und Chemokin-Abundanzen untersucht werden, um ein Verständnis der zugrundeliegenden biologischen und immunologischen Mechanismen zu gewinnen.

Das hier beschriebene Projekt sollte eine Rationale liefern, die die klinische Testung von mRNA-basierten Tumorstoffen in Kombination mit Standardtherapien zur Behandlung von Krebserkrankungen im Menschen ermöglicht. Das Auftreten von Nebenwirkungen bei einer RNAActive®-basierten Immuntherapie wurde sehr ausführlich im Rahmen externer toxikologischer Prüfungen, im Zuge der Zulassung der klinischen Prüfung am Menschen, untersucht. Das Ergebnis dieser Studie bestätigt ein sehr gutes Sicherheitsprofil der verwendeten Vakzine, deren Verabreichung mit keinerlei ernsthaften Nebenwirkungen verbunden war (Beurteilung NOAEL: no-observed-adverse-effect-level). Die Nebenwirkungen der Standardtherapien sind bekannt und umfassend beschrieben, trotzdem kommen diese Therapien (auch in Kombination) bei der Behandlung von bis jetzt nicht heilbaren Krebserkrankungen zu breitem Einsatz.

Wir erhofften uns ein besseres Verständnis darüber, inwieweit eine Strahlentherapie die vakzininduzierte Immunantwort unterstützen und potenzieren kann, sodass eine Metastasierung des Tumors vermieden werden kann oder Fernmetastasen außerhalb des Bestrahlungsvolumens ebenfalls therapiert werden können. Die zu erwartenden Erkenntnisse über die zugrundeliegenden immunologischen Prozesse sollten einer besseren Translation dieser Kombinationstherapie in die Klinik dienen.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1.3.2 Auf welchen immunologischen Prozessen basieren die beobachteten synergistischen Effekte von Vakzinierung und Strahlentherapie?

Dazu wurde zum einen das Zytokinprofil im Tumor und die Immunzell-Infiltration zwischen den vier Therapiearmen (Keine Therapie, Vakzinierung, Strahlentherapie und Kombinationstherapie) verglichen. Zum anderen sollte die Immunantwort auf die Vakzine bestimmt werden, indem im Tumor und in Splenozyten der Anteil der Antigen-reaktiven zytotoxischen T-Zellen in Abhängigkeit der vier Therapieformen quantifiziert wird.

Ein besseres Verständnis, derjenigen zellulären Prozesse, durch die die Strahlentherapie die vakzininduzierte Immunantwort soweit stimuliert, dass die Immuntoleranz im Tumor durchbrochen werden kann, sind die Voraussetzung dafür, die kombinierte Immun- und Strahlentherapie zu optimieren. Diese Daten sind ferner unerlässlich, um nach Translation dieser Therapie in die Klinik, ein Therapieansprechen über die hier definierten immunologischen Verlaufsmarker frühzeitig abschätzen zu können.

1.3.4 Kann eine lokale Bestrahlung in Kombination mit einer Immuntherapie eine Tumorkontrolle außerhalb des Bestrahlungs-Zielvolumens induzieren (abkopale Effekte)?

Hierzu wurde ein syngenes E.G7-OVA Doppeltumor-Modell etabliert, bei welchem, im Gegensatz zu den Vorarbeiten, jeweils ein Tumor subkutan in die rechten Hinterläufe und zeitversetzt ein zweiter Tumor subkutan in die linke Flanke von C57BL/6 Mäusen transplantiert wurde. Nur der Primärtumor im rechten Hinterlauf wurde in den Bestrahlungsgruppen bestrahlt, während der Sekundärtumor in der linken Flanke durch eine zusätzliche Bleiabschirmung abgeschirmt wurde. Dieser Versuchsaufbau ist bestmöglich geeignet, um potenzielle abkopale Effekte einer Tumor-Bestrahlung auf einen zweiten, entfernten Tumor zu untersuchen, welcher nicht bestrahlt wird und dabei eine Streustrahlung durch die Bestrahlung des Primärtumors auszuschließen.

Würden die synergistischen Effekte einer kombinierten Immun- und Strahlentherapie auch abkopale Tumorbereiche und Fernmetastasen erfassen, hätte dies folgende Konsequenzen für eine kombinierte Immun- und Strahlentherapie beim Menschen: Normalgewebsschäden könnten dadurch vermindert bzw. vermieden werden, indem nur Teile des Tumors im Strahlentherapie-Zielvolumen erfasst werden. Sichtbare Metastasen und nicht detektierte oder sich gerade bildende Metastasen (Mikro-Metastasen) könnten durch eine Bestrahlung des Primärtumors bzw. einer anderen Metastase eradiziert werden. Ebenfalls könnten schlecht zugängliche oder bereits vorbestrahlte Primärtumoren durch eine Bestrahlung von Metastasen therapiert werden.

2 Material und Methoden

Zur Testung einer mRNA-basierten Tumorstimmung in Kombination mit einer Bestrahlung wurde ein Tumormodell benötigt, das folgende Eigenschaften aufweist:

- Immunkompetente Mäuse, um die komplexe klinische Situation mit Wechselwirkung des Tumormikromilieus mit dem Immunsystem bestmöglich darzustellen.
- Bekannte tumorassoziierte Antigene bzw. tumorspezifische Fremdagene mit beschriebenen Epitopen um diese mit der kombinierten mRNA-basierten Vakzinierung gezielt zu therapieren.
- Geeignete und robuste Wachstumskinetik der Tumorzellen, damit innerhalb der Versuchsgruppen vergleichbare Volumina des bestrahlten Primärtumors und nicht-bestrahlten Sekundärtumors vorliegen.

2.1 Mäuse

Als Mausmodell haben wir uns aufgrund der Immunkompetenz für C57BL/6 Mäuse entschieden. Diese wurden von Janvier Laboratories (Frankreich) erworben. Vor Beginn der Experimente erfolgte eine ein- bis zweiwöchige Eingewöhnungsphase in der Tierhaltung. Bei Beginn des Experiments hatten die Tiere damit ein mittleres Alter zwischen 7 und 9 Wochen. Alle Experimente erfolgten in Einhaltung von genehmigten Protokollen (R15/11) der Tierversuchskommission des Regierungspräsidiums Tübingen.

2.2 Zelllinien

E.G7-OVA, eine Maus T-Zell Lymphom Zelllinie mit stabiler Expression von *Gallus gallus* Ovalbumin (GgOVA), wurde von LGC Promochem GmbH (Deutschland) erworben.

2.3 CureVac RNAActive® Tumorvakzine

Die CureVac AG verfügt über firmeneigene patentierte Technologien zur Herstellung von mRNA Molekülen mit erhöhter Stabilität und Translatabilität (Patente: EP 1392341 und EP 1604688). Alle in dieser Studie verwendeten mRNA-basierten Tumor-Vakzine wurden mit dieser Technologie entwickelt. Sie können eine anhaltende anti-Tumor Immunität stimulieren, indem sie sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aktivieren.

Die Wirksamkeit dieser Vakzine wurde bereits in präklinischen Studien demonstriert (Fotin-Mleczek, Duchardt et al. 2011) und befindet sich aktuell in mehreren klinischen Studien. Es konnte gezeigt werden, dass mRNA-basierte Vakzine sowohl eine humorale als auch eine T-Zell vermittelte Immunität induzieren. Diese ausgeglichene Immunantwort basiert auf der Induktion von antigen-spezifischen CD4⁺ T-Helfer-Zellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Sobald diese Zellen aktiviert wurden, sezernieren sie eine Vielzahl unterschiedlicher Zytokine, die zu einer T_H1 Antwort führen, welches einen erwünschten Effekt für eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort darstellt.

Eine Immunisierung mit mRNA-basierten Vakzinen induziert außerdem ein anhaltendes Immungedächtnis über antigen-spezifische T-Gedächtniszellen. Dies konnte in Form einer Re-Challenge, also erneuten Tumor-Challenge/Injektion der überlebenden Mäuse nachgewiesen werden. Dafür wurden jedoch nicht erneut E.G7-OVA Zellen, sondern die OVA-negative parentale EL4 Thymom-Zelllinie verwendet, also nicht-immunogene Zellen, die kein OVA-Antigen tragen. Die Mehrheit der Mäuse mit kompletter Remission nach erfolgter Radioimmuntherapie (5/7 bzw. 71%) überlebten auch diese Re-Challenge, trotz fehlendem Tumor-Antigens (Fotin-Mleczek, Zanzinger et al. 2014).

Die Anzahl antigen-spezifischer T-Zellen, welche durch mRNA-basierte Vakzine induziert wurden, kann durch Erhöhung der Immunisierungsfrequenz mit

mindestens 6 Vakzinierungen signifikant gesteigert werden. Eine erhöhte Anzahl an Vakzinierungen zeigt dabei kein erhöhtes Vorkommen von immunregulatorischen Zellen, wie z.B. regulatorischen T-Zellen (Treg) oder myeloiden Suppressorzellen (MDSCs). Allerdings kommt es durch RNAActive Vakzine zu einer erhöhten Rekrutierung von aktivierten T-Zellen in das Tumorgewebe, sowie einer Sekretion von Chemokinen, die andere immunkompetente Zellen anlocken und zu einer Hochregulation einer Vielzahl von Genen führen, die für eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort notwendig sind.

Im EG7-OVA Maus-Tumormodell konnte gezeigt werden, dass sowohl eine prophylaktische Vakzinierung (vor einer Tumoringjektion) mit Ovalbumin-kodierender mRNA, als auch eine therapeutische Vakzinierung (nach erfolgter Tumoringjektion) eine starke Immunantwort gegen OVA-exprimierende Tumorzellen induzieren kann. Dieser Effekt konnte im nicht-immunogenen Lewis Lung Cancer (LLC) Modell bestätigt werden.

Neben diesen vielversprechenden präklinischen Daten befinden sich CureVacs mRNA-basierte Vakzine aktuell in mehreren klinischen Studien (CureVac-AG 2018), diese sind Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: Aktuelle Entwicklung RNA-basierter Tumorstudien (CureVac AG)

Die Firma CureVac stellt unterschiedliche Tumorstudien auf mRNA-Basis her, welche sich aktuell in unterschiedlichen Entwicklungsphasen befinden, inklusive einiger klinischen Studien. Stand Januar 2019 (Quelle: <https://www.curevac.com/de/forschung-entwicklung>)

2.4 Zellkultur

2.4.1 Zellzählung und Viabilitätsmessung

Die Tumorzellen mussten für die verwendeten Experimente in Kultur gehalten werden. Da für eine größere Anzahl an Mäusen auch eine große Menge an Tumorzellen zur Injektion benötigt wurden, erfolgte die Zellkultur unmittelbar vor der geplanten Tumor-Challenge häufig in mehreren Zellkulturflaschen. Zwischen den Experimenten erfolgte meistens eine Kultur mit nur einer oder zwei Kulturflaschen. Diese wurden regelmäßig, in der Regel zweimal in der Woche gesplittet, um ein überschießendes Wachstum und damit Absterben bzw. eine verminderte Viabilität der Tumorzellen zu vermeiden. Hierfür wurde das alte Zellmedium zunächst abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmter PBS-Lösung (37°C) vom alten Zellmedium gereinigt. Diese PBS-Lösung wurde im Anschluss erneut abgesaugt und die Zellen in der Kulturflasche wurden für 2 Minuten mit 2ml Trypsin-Lösung benetzt, um ihre Adhärenz an der Flasche aufzuheben. Diese Zeit sollte nicht überschritten werden, da auch dies die Zellviabilität verringert. Die Trypsin-Lösung wurde im Anschluss durch 8-10 ml PBS-Lösung neutralisiert und die Zellen in dieser Menge resuspendiert und in einen 50ml Falcon Tube übertragen. Falls mehrere Zellkulturflaschen vorhanden waren, erfolgten diese Schritte zeitgleich für mehrere Flaschen, welche dann in einem 50ml Falcon Tube gepoolt wurden. Zum Entfernen von Mediumresten erfolgte eine Zentrifugation des Falcon Tubes und eine erneute Resuspendierung der Tumorzellen in PBS-Lösung. Im Anschluss wurden 10ml CASY-Zählröhrchen vorbereitet und jeweils 100 µl der Zellsuspension aus den Falcon Tubes in 10ml PBS-Zähllösung verdünnt (1:100). Die anschließende Messung der Zellzahl und der Viabilität mithilfe des CASY erfolgte jeweils doppelt, um eine Abweichung z.B. durch Pipettierungenauigkeit auszugleichen. Die Werte wurden im Anschluss gemittelt und mithilfe der durchgeführten Verdünnung konnte die Zellzahl bestimmt werden. Die Zellviabilität sollte stets mehr als 85% betragen.

2.4.2 Zell-Splitting

Pro Kulturflasche können in etwa 12 Millionen E.G7-OVA Zellen gewonnen werden, diese wurden beim Splitten mit einer Menge von ca. 500.000 bis 1.000.000 Zellen pro Flasche aufgeteilt, um wieder eine ausreichende Fläche für die Zellteilung bereitzustellen. Nicht benötigte Zellen wurden verworfen.

2.4.3 Zell-Selektion mit G418

Bei längeren Kulturzeiträumen und dadurch größerer Anzahl an Zellteilungen, besteht die Möglichkeit eines Antigenverlusts der E.G7-OVA Zellen, wodurch diese das Antigen nicht mehr stabil exprimieren und die Experimente somit verfälschen würden. Um dies zu verhindern wurden die Zellen in diesem Fall mithilfe von G418 (Geneticin) selektioniert. G418 ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum mit einer ähnlichen Struktur wie Gentamicin und blockiert die Elongation der Translation bei der Proteinbiosynthese.

Geneticin kann zur Selektion von stabil transfizierten Zellen genutzt werden. Hierfür wird ein zusätzliches Neomycin-Geneticin-Resistenzgen (NeoR) in die Zellen eingeschleust und an den Vektor des gewünschten Antigens gekoppelt. Werden die Zellen in der Kultur nun Geneticin ausgesetzt, so sterben die Zellen, die den Antigenvektor verloren haben und nicht mehr exprimieren. Die Zellen mit dem gewünschten Antigen (in unserem Fall Ovalbumin) überleben dahingehend, da sie weiterhin das Neomycin-Geneticin-Resistenzgen aufweisen (Lodish 2013).

2.5 Sedation

2.5.1 Ketamin / Xylazin-Injektionsnarkose

Zur Tumorinjektion, Vermessung der Tumoren, sowie zur Durchführung der Vakzinierung erfolgte eine Injektionsnarkose bestehend aus einer intraperitonealen Injektion einer Mischung aus Ketamin (100 mg/kg KGW) und Xylazin (10 mg/kg KGW) gelöst in 100 µl einer physiologischen Kochsalzlösung. Diese wird mithilfe einer 1 ml Spritze mit einer Kanüle (0.45 mm Außendurchmesser) appliziert. Im Rahmen der Narkose wurden die Augen der Tiere vor Austrocknung und Infektion durch eine geeignete Augensalbe geschützt (z.B. durch Bepanthen Augen- und Nasensalbe).

2.5.2 Isofluran-Gasnarkose

Zur Durchführung der Bestrahlung erfolgte eine Inhalationsnarkose durch Überströmen mit einem wassergesättigtem Luft/Isofluran-Gemisch. Nach der Bestrahlung wurde die Zufuhr des Isoflurans direkt beendet, sodass es pro Bestrahlung nur zu einer kurzen Narkosezeit für eine Dauer von maximal 5 Minuten mit anschließender Aufwachzeit von ebenfalls ca. 5 Minuten kam.

2.6 Tumor-Challenge

2.6.1 Zell-Vorbereitung

Wie bereits unter 2.4.1 beschrieben, erfolgte die Zellkultur unmittelbar vor der geplanten Tumor-Challenge häufig in mehreren Zellkulturflaschen, um eine ausreichende Anzahl an Tumorzellen mit hoher Viabilität zu erreichen. Vor der Tumor-Challenge wurde das alte Zellmedium zunächst abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmter PBS-Lösung (37°C) vom alten Zellmedium gereinigt. Diese PBS-Lösung wurde im Anschluss erneut abgesaugt und die Zellen in der Kulturflasche wurden für 2 Minuten mit 2ml Trypsin-Lösung benetzt, um ihre Adhärenz an der Flasche aufzuheben. Diese Zeit sollte nicht überschritten

werden, da auch dies die Zellviabilität verringert. Die Trypsin-Lösung wurde im Anschluss durch 8-10 ml PBS-Lösung neutralisiert und die Zellen in dieser Menge resuspendiert und in einen 50ml Falcon Tube übertragen. Zum Entfernen von Mediumresten erfolgte eine Zentrifugation des Falcon Tubes und eine erneute Resuspendierung der Tumorzellen in PBS-Lösung. Im Anschluss wurden 10ml CASY-Zählröhrchen vorbereitet und jeweils 100 µl der Zellsuspension aus den Falcon Tubes in 10ml PBS-Zähllösung verdünnt (1:100). Die anschließende Messung der Zellzahl und der Viabilität mithilfe des CASY erfolgte jeweils doppelt, um eine Abweichung z.B. durch Pipettierungenauigkeit auszugleichen. Die Werte wurden im Anschluss gemittelt und mithilfe der durchgeführten Verdünnung konnte die Zellzahl bestimmt werden. Die Zellviabilität vor der Tumorzellinjektion sollte dabei stets mehr als 85% betragen. Sowohl für die Primärtumoren als auch für die Sekundärtumoren erfolgte die Injektion mit einer Menge von 3×10^5 Zellen verdünnt in 50 µl PBS-Lösung und somit einer Zellkonzentration von 6×10^6 /ml. Für die insgesamt benötigte Menge an Zellen erfolgte eine Berechnung anhand der folgenden Formel:

$$3 \times 10^5/\text{Maus (in 50 } \mu\text{l PBS)} \times \text{Anzahl der Mäuse} + 10\% \text{ Überschuss}$$

Anhand der berechneten Zellzahl wurde die benötigte Verdünnung in PBS-Lösung berechnet, um auf die gewünschte Zellkonzentration von 6×10^6 /ml zu gelangen. Nach der Verdünnung erfolgte eine erneute Zellzählung mithilfe des CASY, um zu kontrollieren, dass die Zellkonzentration tatsächlich erreicht wurde. Falls dies nicht der Fall gewesen ist, wurden die Zellen entweder bis zur gewünschten Konzentration weiter verdünnt (bei zu hoher Konzentration) oder noch einmal abzentrifugiert (bei zu niedriger Konzentration).

Die Zellvorbereitung erfolgte dabei nach folgendem Protokoll:

1.1. PBS vorwärmen auf 37°C

1.2. Berechnen, wie viele Zellen gebraucht werden, z.B.:

- bei therapeutischem Experiment:
 - 3×10^5 /Maus (in 100 μ l PBS) x Anzahl der Mäuse + Überschuss
 - Zellkonzentration 3×10^6 /ml
- 1.3. Pro Flasche erntet man ca. 12-14 Mio. E.G7-OVA Zellen → die Anzahl der zu poolenden Flaschen entsprechend der unter Punkt 1.2 berechneten Zellzahl vorbereiten.
- 1.4. Den Inhalt jeder Flasche (50 ml) in einem 50 ml Falcon abzentrifugieren, Uhrzeit notieren!
- 1.5. Alle Zellen in einem 50 ml Falcon poolen in 50 ml PBS und nochmals abzentrifugieren (= Waschschrift, um Mediumreste zu entfernen)
- 1.6. Zellen in PBS resuspendieren. Das PBS-Volumen richtet sich nach der berechneten Zellkonzentration (Punkt 1.2), wobei 2-4 ml weniger als der berechnete Wert eingesetzt werden sollten.
- 1.7. Bei einer gewünschten Zellkonzentration von 10×10^6 /ml eine 1:20 Vorverdünnung machen (950 μ l PBS + 50 μ l Zellen), bei einer gewünschten Zellkonzentration von 3×10^6 /ml eine 1:10 Vorverdünnung machen (450 μ l PBS + 50 μ l Zellen).
- 1.8. Jeweils 2x100 μ l der Vorverdünnungen im CASY zählen, evtl. auch noch andere Verdünnungen machen und einen Mittelwert bilden. Verdünnungsfaktor mit einberechnen! Die Vitalität sollte mindestens bei 85% liegen!
- 1.9. Zellen auf die gewünschte Zellkonzentration verdünnen, Zellzahl im CASY kontrollieren (Verdünnungen wie bei 1.7). Falls Zellzahl nicht stimmt, noch mal abzentrifugieren und neu einstellen

1.10. Zellen auf Eppendorf Tubes verteilen, diese sofort in den Heizblock stellen bei 37°C, Uhrzeit notieren! Vom ersten Zentrifugationsschritt (1.4) bis zum Aliquotieren der Zellen (1.10) sollten maximal 45 Minuten vergangen sein!

1.11. Zellen dann zügig injizieren

2.6.2 Zell-Injektion

An Tag -13 wurden murine, Ovalbumin-exprimierende Thymom-Zellen (E.G7-OVA) unter der in 2.5.1 beschriebenen Ketamin/Xylazin-Injektionsnarkose subkutan in den rechten Hinterlauf von 7-9 Wochen alten C57BL/6-Mäuse als Zellsuspension transplantiert (3×10^5 Zellen). Vier Tage später, an Tag -9, wurde die subkutane Injektion im Bereich der linken Flanke erneut durchgeführt (ebenfalls mit 3×10^5 Zellen). Nach dem Anwachsen der Zellen zu soliden Tumoren, erreichten die Tumoren zum Tag 0 in etwa einer Größe von 100 mm^3 (Primärtumor im Bereich der rechten Hinterläufe) bzw. 10 mm^3 (Sekundärtumor im Bereich der linken Flanke).

Die Zellinjektion erfolgte dabei nach folgendem Protokoll:

2.1. Geeignete Insulin-Spritzen aussuchen → die Öffnung der Spritzenspitze sollte im Bezug zur Maus nach außen zur Haut zeigen und die Skala muss dabei von oben ablesbar sein.

2.2. Alle Mäuse betäuben (bei mehr als 40 Mäusen am besten mit zwei Personen). Mäuse rasieren und markieren und immer gruppenweise auf einen kleinen Stapel Papier legen. Falls möglich, können die Mäuse auch schon vorher (optimaler Weise am Vortag) rasiert und markiert werden → Beim Rasieren darauf achten, möglichst die Mitte der Flanke zu treffen, weil man später beim Spritzen automatisch auf die Mitte der rasierten

Stelle zielt, so dass bei „falsch“ rasierten Mäusen der Tumor dann zu hoch oder zu niedrig sitzt.

2.3. Immer die 1er Mäuse der Reihe nach wegnehmen und nebeneinanderlegen (Gruppenreihenfolge beachten!)

2.4. Zellen vortexen, Spritze luftblasenfrei aufziehen (die letzte Maus bekommt sonst zu wenig!)

2.5. Zellen subkutan injizieren. Dazu die Haut an der rasierten Stelle hochziehen und in den sich bildenden Spalt zwischen Haut und Maus einstechen (Öffnung der Spritze zeigt nach außen!). Haut loslassen, mit der Spritze etwas nach außen ziehen und vorsichtig mit wenig Druck injizieren, so dass die Zellsuspension an der gewünschten Stelle verbleibt und nicht „verläuft“. Außerdem auf Hautfalten achten, die ebenfalls eine Ursache für das „Verlaufen“ sein können. Nacheinander alle 1er Mäuse auf diese Art injizieren.

2.6. Uhrzeit der ersten Injektion notieren!

2.7. 1er Mäuse wieder in der richtigen Reihenfolge zu ihren Gruppen zurücklegen und mit den 2er Mäusen etc. genauso verfahren.

2.8. Uhrzeit der letzten Injektion notieren!

2.9. Restliche Zellen wieder mit nach oben nehmen und noch einmal am CASY die Vitalität überprüfen.

2.7 Tumormessung

Die Tumoren wurden zweimal pro Woche mit einer Schublehre vermessen. Dafür wurde jeweils die Länge und Breite bestimmt und das Tumolvolumen mit folgender Formel berechnet:

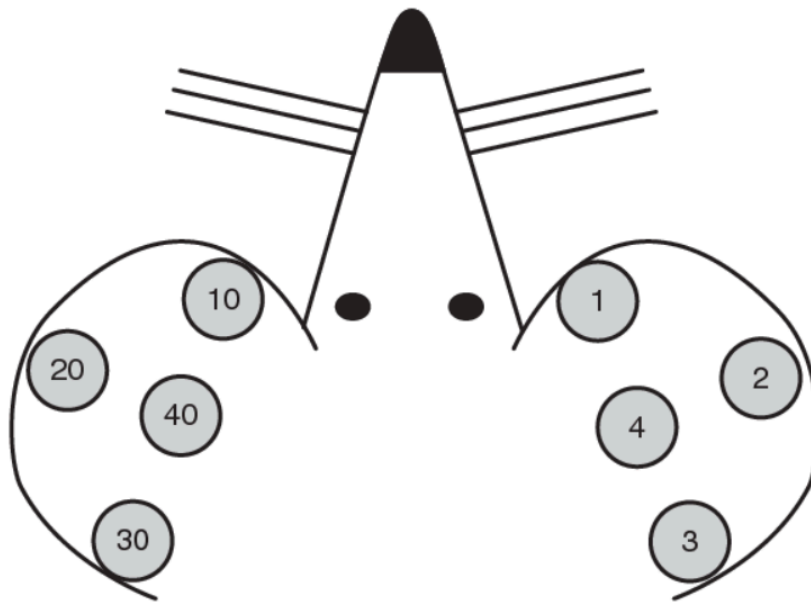
$$\text{Tumolvolumen} = (\text{Länge} \times \pi \times \text{Breite}^2) / 6$$

2.8 Abbruchkriterien und Tötung der Tiere

Bei Erreichen der Primärtumoren am rechten Hinterbein von 2000 mm³ Volumen bzw. spätestens 14 Tage nach Gruppenzuordnung und Behandlungsbeginn wurden die Tiere durch zervikale Dislokation in Betäubung (durch Ketamin/Xylazin) getötet, um das Leiden der Tiere, nach den Kriterien des Tierschutzes möglichst gering zu halten.

2.9 Markierung und Nummerierung der Mäuse

Zum Nachverfolgen des Tumorwachstums jeder einzelnen Maus erfolgte vor Gruppenzuordnung eine Markierung und Nummerierung der Tiere zu Beginn des Experiments. Hierfür existieren unterschiedliche Systeme, häufig über Ohrlochmarkierungen des linken und/oder rechten Ohrs in Betäubung (Ayadi, Ferrand et al. 2011). Die Methodik zur Nummerierung ist in Abbildung 9 dargestellt.



$5 = 1 + 4$	$50 = 10 + 40$
$6 = 2 + 4$	$60 = 20 + 40$
$7 = 3 + 4$	$70 = 30 + 40$
$8 = 1 + 2$	$80 = 10 + 20$
$9 = 2 + 3$	$90 = 20 + 30$

Abbildung 9: Ohrlochmarkierung zur Nummerierung der Mäuse

Verwendete Ohrlochmarkierung zur Nummerierung der Mäuse. Linksseitig für Zehner-Zahlen, rechtsseitig für einzelne Nummern. Mehrfachmarkierung pro Seite zur Darstellung von weiteren Nummern (Ayadi, Ferrand et al. 2011).

2.10 Gruppenzuordnung

Da die Effektivität einer Immuntherapie mit der Größe des initialen Tumolvolumens abnimmt (Whitney, Levy et al. 1974, Ghiringhelli, Larmonier et al. 2004, Gulley, Madan et al. 2011, Richard Wayne Joseph 2014), wurden nur Mäuse mit einem Primärtumolvolumen bis zu 350 mm^3 und einem Sekundärtumolvolumen bis 35 mm^3 in das Experiment eingeschlossen. Das mittlere Tumolvolumen der Primärtumoren lag hierbei bei $98.5 \pm 10 \text{ mm}^3$, während das mittlere Tumolvolumen der Sekundärtumoren bei $11.5 \pm 1 \text{ mm}^3$ lag.

Vor Beginn des Experiments wurden die Mäuse in die folgenden Versuchsgruppen aufgeteilt:

1. Kontrolle
2. Vakzinierung allein
3. Bestrahlung allein
4. kombinierte Bestrahlung und Vakzinierung (Radioimmuntherapie)

2.11 Radiotherapie

2.11.1 Vorbereitung und Sedation

Die Sedation der Tiere während der Bestrahlung erfolgte mithilfe der unter 2.5.2 beschriebenen Isofluran-Inhalationsnarkose.

2.11.2 Bestrahlung, Abschirmung und Dosimetrie

An Tag 0, 1 und 2 wurden die Mäuse in den Bestrahlungs-Armen (Bestrahlung allein oder Radioimmuntherapie) im Bereich der Primärtumoren mit jeweils 2 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 6 Gy bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte mit 6MV-Photonen (LINAC SL25, Philips) mit einer Dosisrate von 4 Gy/Minute. Die anderen Therapiegruppen (Vakzinierung allein und Kontrolle) wurden nicht bestrahlt. Dabei wurde das Bestrahlungsfeld durch einen großen Bleiblock (ca. 10 cm Schichtdicke) mit eingelassenen Blenden am Satellitenträger des Linearbeschleunigers und eine zusätzliche „on-body“ Bleiabschirmung (ebenfalls ca. 10 cm Schichtdicke) direkt am Tierkörper inkl. Abschirmung der linken Flanke (Sekundärtumor) auf die tumortragende 2 cm² große Fläche am rechten Hinterbein (Primärtumor) eingegrenzt. Es erfolgte ebenfalls eine dosimetrische Bestimmung der Bestrahlungsdosis des Primär- sowie Sekundärtumors mittels Filmdosimetrie. Abbildung 22 zeigt den detaillierten Aufbau mit Angaben zur dosimetrischen Untersuchung des Primär- und Sekundärtumors.

2.12 mRNA-basierte Vakzinierung

Beginnend an Tag 0, erhielten die Mäuse der Vakzinierungsgruppe, sowie der kombinierten Radioimmuntherapie unter Betäubung eine intradermale Injektion mit 32 µg RNActive® Vakzin, welche für Ovalbumin codierte. Die Injektion wurde dabei zweimal wöchentlich zeitgleich mit dem Vermessen der Tumoren durchgeführt. Die Injektion erfolgte dabei an vier unterschiedlichen Körperstellen (im Schulterbereich und im unteren Rumpfbereich, je auf der linken und der rechten Seite) mit jeweils 8 µg. Aufgrund der intradermalen Injektion und aus hygienischen Gründen wurden die Injektionsstellen vor der Injektion im Bereich von vier ca. 1 cm² großen Flächen rasiert. Auf eine Mock-Vakzinierung der Kontrollgruppe und der alleinigen Radiotherapie mit nicht-codierender RNA wurde verzichtet, da eine vorangegangene Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen keiner Vakzinierung und einer Mock-Vakzinierung mit nicht-codierender RNA bzw. Pufferlösung zeigen konnte (Fotin-Mleczek, Duchardt et al. 2011).

2.13 Tumor-Extraktion

An Tag 12, ca. zwei Wochen nach Therapiebeginn wurden die Mäuse in Betäubung durch zervikale Dislokation getötet und die Tumoren für die Zytokin-Analyse mittels Mouse Cytokine Antibody Array exzidiert.

2.14 Zytokin-Analyse mittels Mouse Cytokine Antibody Array

Im Anschluss an die Tumor-Extraktion wurde bei vier Mäusen pro Therapiearm das Tumorgewebe der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren analysiert. Die Analyse erfolgte dabei mittels Mouse Cytokine Antibody Array 1.0 (Affymetrix/Panomics, Santa Clara / USA). Das extrahierte Tumorgewebe wurde gemäß den Angaben des Versuchsprotokoll des Herstellers lysiert. Die Proteinmenge der Zytokine und Chemokine wurde via Chemolumineszenz dargestellt (ECL Western blotting analysis system, GE Healthcare/Amersham-Biosciences, Little Chalfont / UK). Die semi-quantitative Auswertung der

Proteinmenge erfolgte mittels Densitometrie mithilfe der Software ImageJ (ImageJ 1.49, NIH, Bethesda, MD).

2.15 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism Version 6.0d durchgeführt. Die Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurden mittels t-Test mit oder ohne Welch-Korrektur analysiert, in Abhängigkeit davon, ob eine Normalverteilung vorlag oder nicht. Vergleiche von mehreren Gruppen erfolgten mit zwei-faktorieller ANOVA (Analysis of variance) Analyse oder Kruskal-Wallis-Test, ebenfalls in Abhängigkeit einer Normalverteilung. Die Steigung der Wachstumskurve wurde berechnet, indem zunächst der natürliche Logarithmus des x-fachen Tumolvolumens (im Vergleich zum Versuchsstart an Tag 0) bestimmt wurde. Mit diesem wurde in einem zweiten Schritt die Steigung der Wachstumskurve berechnet. Das Tumorwachstum in den Abbildungen wird gezeigt als Mittelwert \pm SEM (Standard error of the mean).

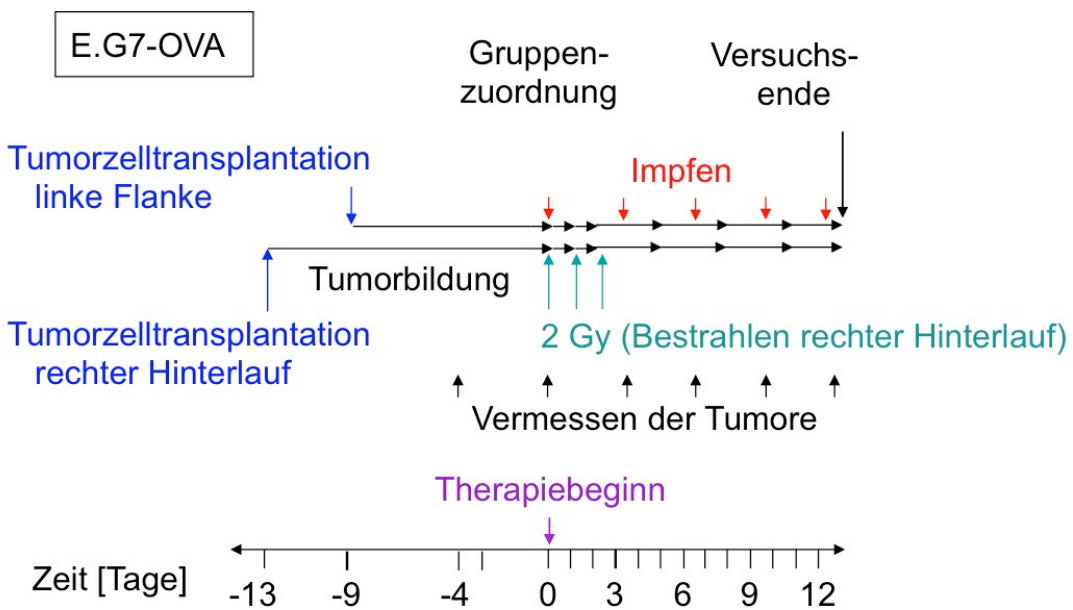
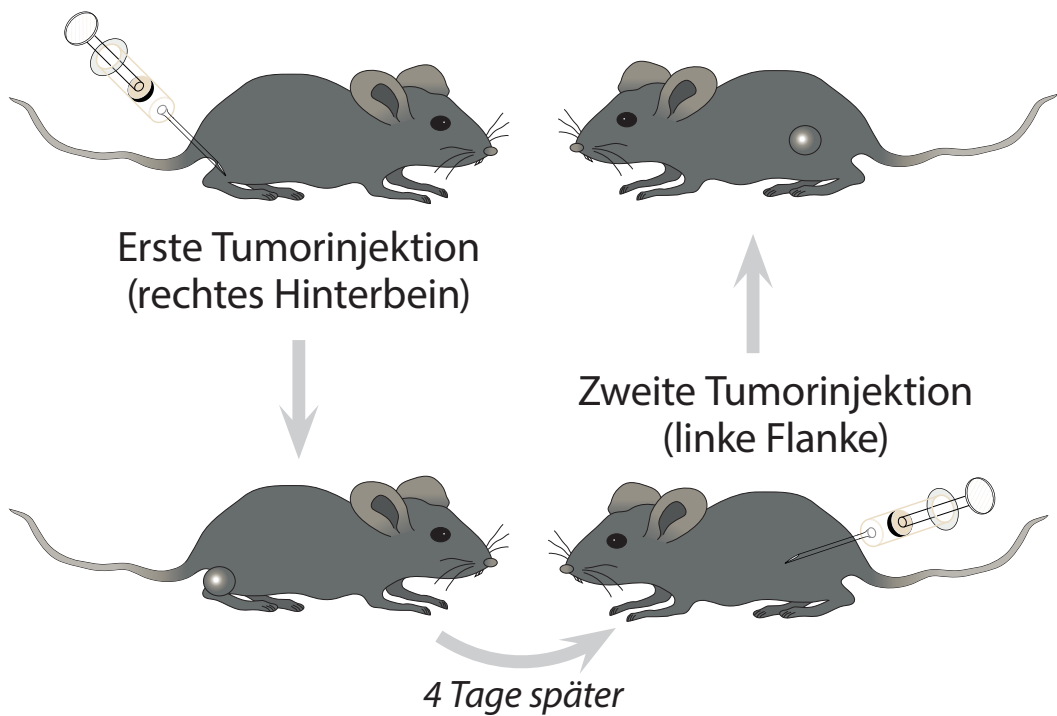


Abbildung 10: Versuchsprotokoll und zeitlicher Ablauf

Versuchsprotokoll und zeitlicher Ablauf für das E.G7-OVA Doppeltumor-Modell. Subkutane Tumoringjektion von syngenem, ovalbumin-exprimierenden Maus Thymom-Zellen (3×10^5 E.G7-OVA Zellen in 50 μ l PBS) in das rechte Hinterbein und in die linke Flanke von C57BL/6 Mäusen, fraktionierte Bestrahlung (3×2 Gy) des Primärtumors, intradermale Vakzinierung mit 32 μ g mRNA-basierter RActive® Vakzine, codierend für Ovalbumin, sowie Tumorextraktion für die Zytokinanalyse.

3 Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse wurden 2018 in Cancer Immunol Immunother veröffentlicht und sind teilweise leicht verändert dargestellt (Basler, Kowalczyk et al. 2018).

3.1 Wachstumsverzögerung des Primärtumors

Das Verhältnis des Tumolvolumens zwischen Primär- und Sekundärtumor wurde so gewählt, dass es die klinische Situation eines oftmals größeren Primarius und kleinerer Metastasen bestmöglich widerspiegelt.

Mäuse mit kleineren Primärtumoren zum Behandlungsbeginn (Tag 0) wurden bevorzugt dem Kontrollarm und dem Therapiearm mit alleiniger Tumorkonfirmierung zugeteilt, um den Zeitpunkt zu verzögern, an dem die Tiere aufgrund des Abbruchkriteriums eines Primärtumolvolumens von 2000 mm³ nach den Anforderungen des Tierschutzes aus dem Versuch genommen werden müssen.

Durch diese Gruppeneinteilung kam es zu geringen Größenunterschieden des Primärtumors mit insgesamt kleineren Tumoren in der Kontroll- und Konfirmierungsgruppe im Vergleich zur Versuchsgruppe mit der kombinierten Radioimmuntherapie und der alleinigen Bestrahlungsgruppe (Abbildung 11).

Wir konnten zeigen, dass sich die Wachstumskinetik des Primärtumors nicht signifikant von der Wachstumskinetik des Sekundärtumors unterscheidet (Abbildung 12). Da es sich um ein immunogenes Tumormodell handelt, könnte die verzögerte zweite Tumorkonfirmierung mit dem gleichen Tumorkonfirmationsantigen (Ovalbumin) bereits einen Einfluss auf das Tumorstadium beider Tumoren haben. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass eine erneute Tumor-Challenge nicht zu einer Wachstumsverzögerung führt.

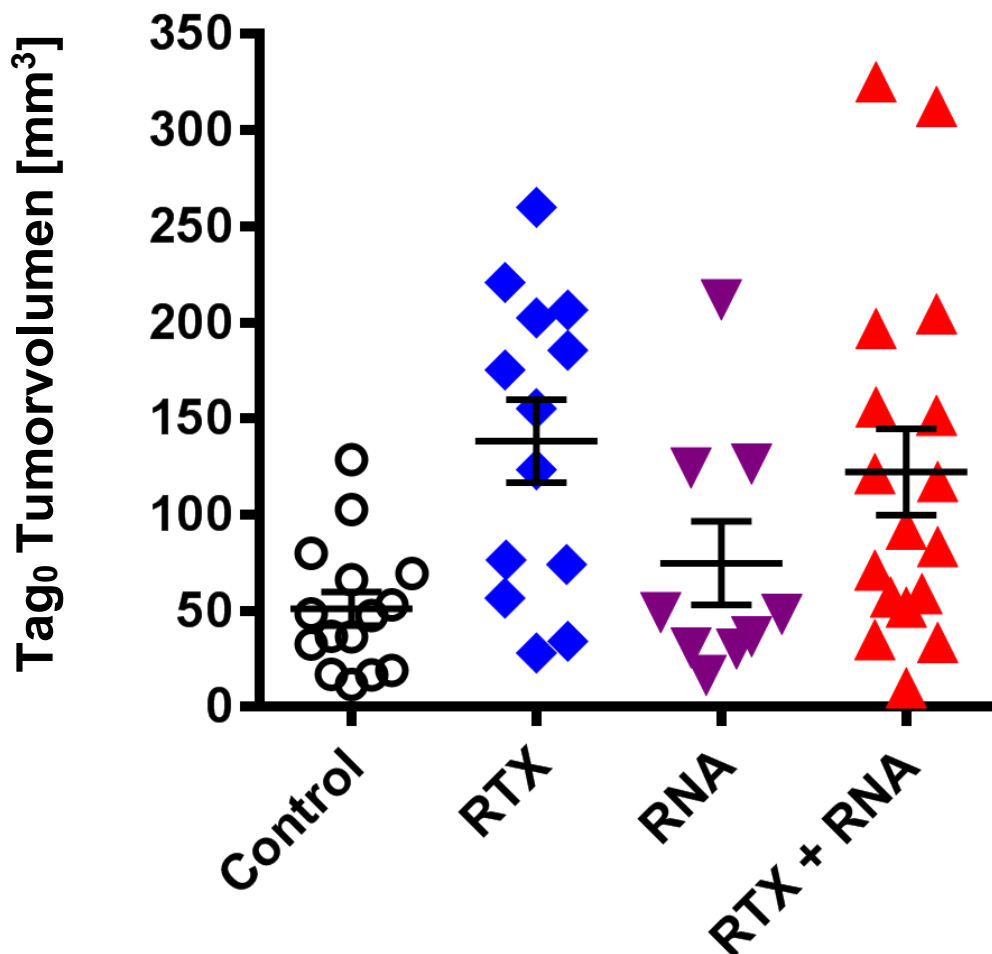


Abbildung 11: Tumorvolumina der Primärtumoren bei Behandlungsbeginn

Tumorvolumina in mm^3 der Primärtumoren aufgeteilt in die Behandlungsgruppen und Kontrollgruppe an Tag 0 (Behandlungsbeginn). Die minimale Anzahl an Mäusen pro Gruppe betrug $n = 9$ für die alleinige Vakzinierung. Kleinere Primärtumoren wurden bevorzugt dem Kontrollarm und dem Therapiearm mit alleiniger Tumorstimmulierung zugeteilt, um den Zeitpunkt zu verzögern, an dem die Tiere aufgrund des Abbruchkriteriums eines Primärtumorvolumens von 2000 mm^3 aus dem Versuch genommen werden müssen. Dies führte zu insgesamt kleineren Tumoren in der Kontroll- (Control) und Vakzinierungsgruppe (RNA) im Vergleich zur Versuchsgruppe mit der kombinierten Radioimmuntherapie (RTX+RNA) und der alleinigen Bestrahlungsgruppe (RTX). Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

Steigung der Wachstumskurve des Sekundärtumors (linke Flanke) mit und ohne Primärtumor (rechtes Hinterbein)

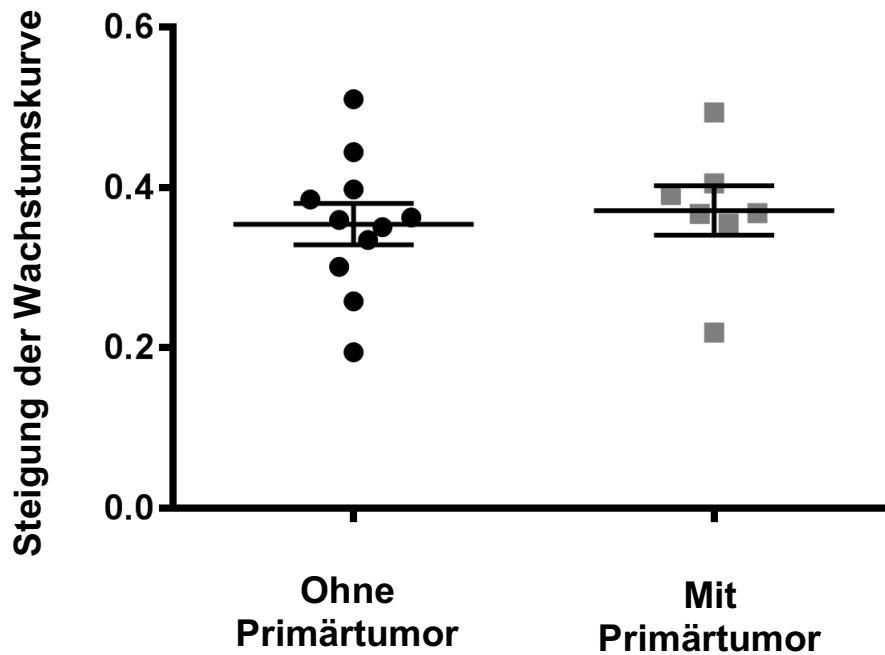


Abbildung 12: Tumorwachstum des Sekundärtumors in Abhängigkeit des Primärtumors

Steigung der Wachstumskurve der Sekundärtumoren in Abhängigkeit, ob gleichzeitig ein Primärtumor vorhanden ist ($n = 7$) oder nicht ($n = 11$). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Wachstumskinetik des Sekundärtumors, obwohl es sich um immunogenes Tumormodell handelt. Eine zweite Tumoringektion mit dem gleichen Tumorigen (Ovalbumin) führt also nicht zu einer zusätzlichen Wachstumsverzögerung.

Bezüglich des Primärtumorwachstums konnten wir zeigen, dass eine alleinige Tumorkvakzinierung keinen signifikanten Effekt auf das Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe hat. Dies ist im Einklang mit unseren vorherigen Experimenten und bestätigt, dass eine alleinige Vakzinierung keinen Effekt auf die lokale Kontrolle größerer Tumoren hat (Fotin-Mleczek, Zanzinger et al. 2014).

Eine Bestrahlung allein hingegen, führte zu einer signifikanten Wachstumsverzögerung des Primärtumors im Vergleich zur Vakzinierungs- ($p = 0.028$, Abbildung 15) und Kontrollgruppe ($p = 0.0005$, Abbildung 15). Die einzelnen Ergebnisse und Berechnungsschritte sind in den Abbildungen 13-15 dargestellt.

Die kombinierte Radioimmuntherapie zeigte eine noch ausgeprägtere Wachstumsverzögerung des Primarius im Vergleich zur Vakzinierungs- und Kontrollgruppe (jeweils $p < 0.0001$), ebenfalls im Einklang mit unseren Vorexperimenten. Wir konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Bestrahlungsgruppe und der kombinierten Radioimmuntherapie in Bezug auf die Wachstumsverzögerung des Primärtumors finden.

Dafür zeigte sich eine insgesamt höhere Rate an Komplettremissionen des Primarius durch die Kombinationstherapie mit einer kompletten Remission bei ca. 53% der Mäuse (9/17) im Vergleich zu 15% (2/13) bei der alleinigen Bestrahlung. Dies weist auf einen (super-)additiven Effekt einer kombinierten Radioimmuntherapie auch in großen Primärtumoren hin (Abbildung 15).

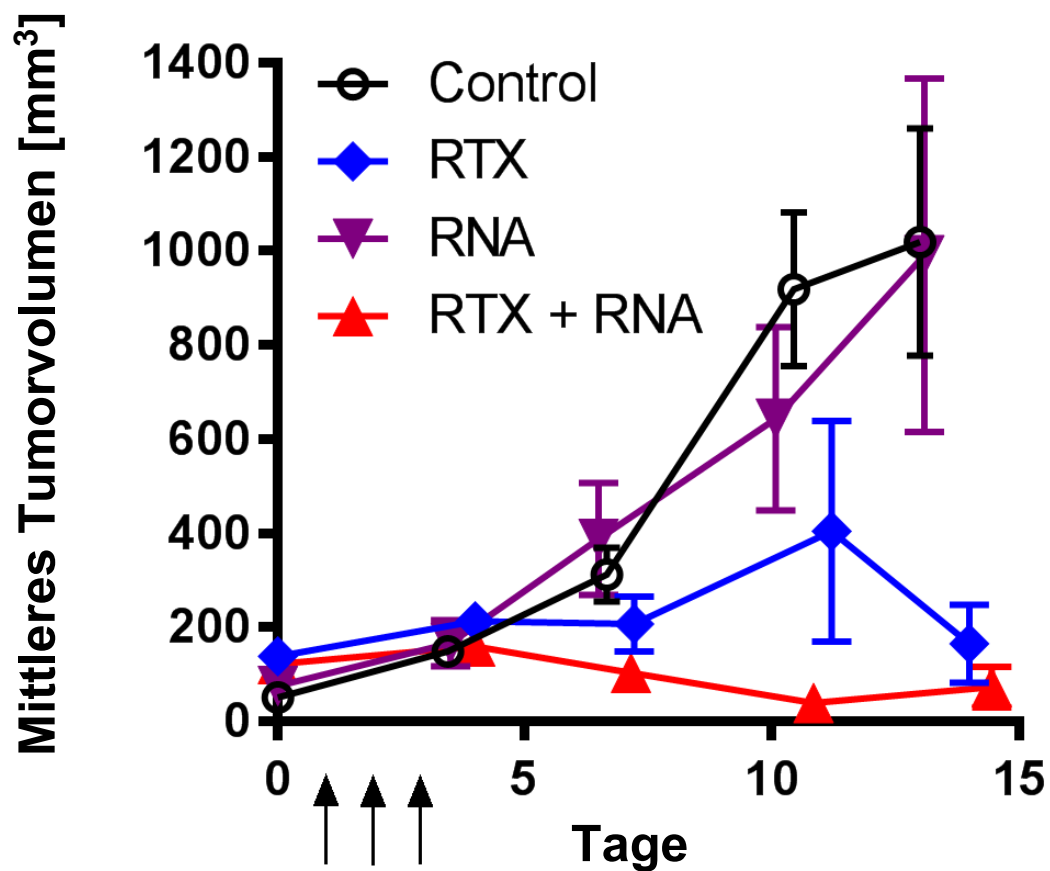


Abbildung 13: Mittleres Tumorumvolumen der bestrahlten Primärtumoren

Mittleres Tumorumvolumen in $\text{mm}^3 \pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) der bestrahlten Primärtumoren über den Behandlungszeitraum von 14 Tagen nach Versuchsgruppen aufgeteilt. Die Bestrahlung erfolgte an den Tagen 1, 2 und 3 mit jeweils 2 Gy Einzeldosis. Es zeigt sich eine deutliche Wachstumsverzögerung für die beiden Bestrahlungsgruppen (RTX, RTX+RNA), wobei der Effekt bei der kombinierten Radioimmuntherapie noch ausgeprägter ist. Zwischen der Kontrollgruppe (Control) und alleinigen Vakzinierung (RNA) gab es keine signifikanten Unterschiede (minimales $n = 9$). Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

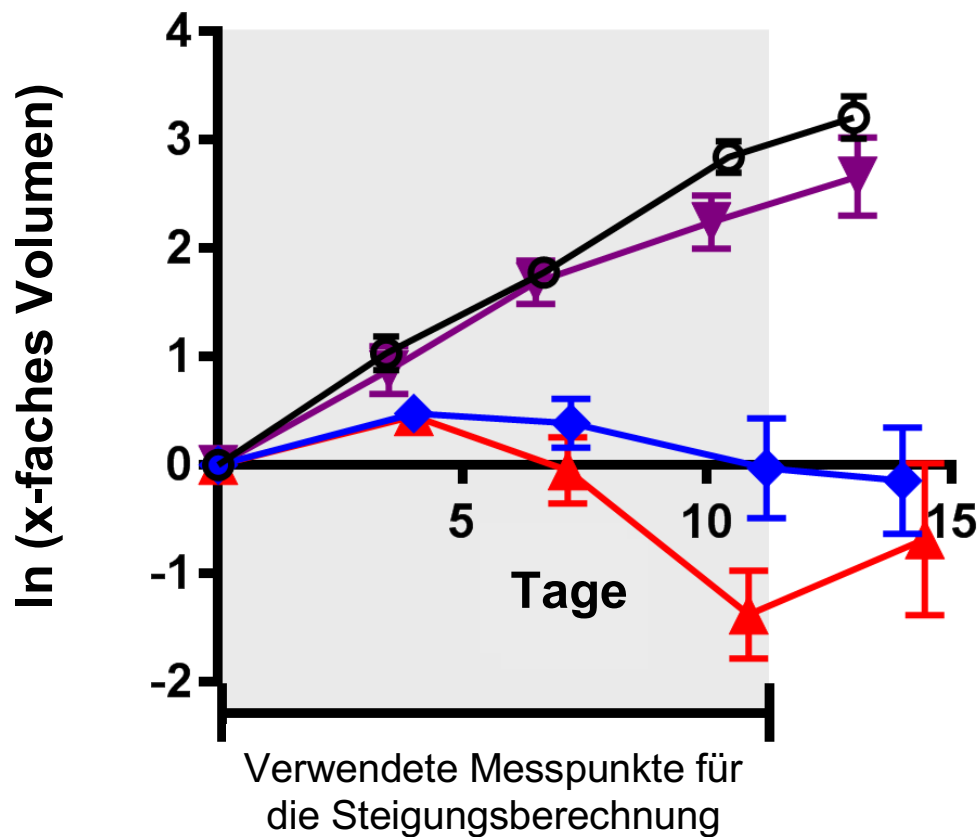


Abbildung 14: Natürlicher Logarithmus des x-fachen Tumolvolumens (Primärtumor)

Um die Steigung der Wachstumskurve der Primärtumoren zu berechnen, erfolgte zunächst die Berechnung des natürlichen Logarithmus des x-fachen Tumolvolumens im Vergleich zum Behandlungsbeginn (Tag 0, minimales $n = 9$). Zu erkennen ist eine positive Wachstumskurve für die Kontrollgruppe (schwarz) und alleinige Vakzinierung (violett), eine sehr flache Wachstumskurve für die alleinige Bestrahlung (blau) und ein negatives Wachstum für die kombinierte Radioimmuntherapie (rot). Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

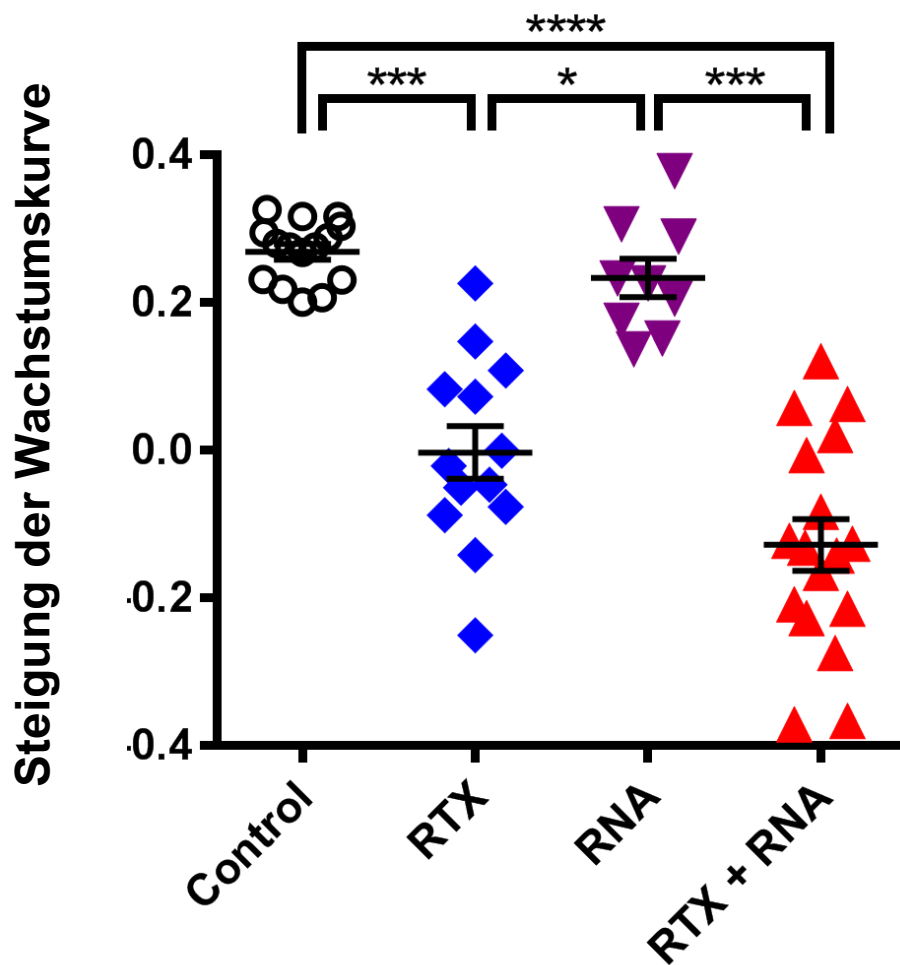


Abbildung 15: Steigung der Wachstumskurve der bestrahlten Primärtumoren

Steigung der Wachstumskurve der bestrahlten Primärtumoren aufgeteilt nach den Versuchsgruppen. Die Steigung der Kontrollgruppe und der alleinigen Tumorstimmulierung liegt deutlich im positiven Bereich, ein signifikanter Unterschied zwischen diesen zwei Versuchsgruppen lässt sich jedoch nicht ausmachen. Die alleinige Bestrahlung führt zu einem Wachstumsstillstand im Vergleich zum Versuchsstart (Tag 0) und somit zu einer Steigung im Bereich des Nullpunkts. Die alleinige Bestrahlung führt damit zu einer signifikant besseren Wachstumsverzögerung im Vergleich zur Stimulierungs- ($p = 0.028$, ANOVA) und Kontrollgruppe ($p = 0.0005$, ANOVA). Die kombinierte Radioimmuntherapie zeigte eine noch ausgeprägtere Wachstumsverzögerung im Vergleich zur Stimulierungs- und Kontrollgruppe (jeweils $p < 0.0001$, ANOVA). Wir konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Bestrahlungsgruppe und der kombinierten Radioimmuntherapie finden. Es zeigte sich jedoch eine höhere Rate an Komplettremissionen des Primarius durch die Kombinationstherapie mit einer kompletten Remission bei ca. 53% der Mäuse (9/17) im Vergleich zu 15% (2/13) bei der alleinigen Bestrahlung. Minimales $n = 9$. Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

3.2 Wachstumsverzögerung des nicht-bestrahlten Sekundärtumors

Im Gegensatz zu den Primärtumoren, zeigte sich bei der TumorgroÙe der Sekundärtumoren kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen vor Therapiebeginn (Tag 0, Abbildung 16).

Die kombinierte Radioimmuntherapie war nicht nur effektiv in der Behandlung der Primärtumoren, sondern führte auch bei den Sekundärtumoren zu einer signifikanten Wachstumsverzögerung im Vergleich zur Vakzinierungsgruppe ($p = 0.002$, Abbildung 19) und der nicht-behandelten Kontrollgruppe ($p = 0.01$, Abbildung 19). Die einzelnen Ergebnisse und Berechnungsschritte sind in den Abbildungen 17-19 dargestellt.

Interessanterweise zeigte auch eine alleinige Bestrahlung einen Trend zu einer verlangsamten Wachstumskinetik der Sekundärtumore im Vergleich zur Vakzinierungs- und Kontrollgruppe. Dies könnte für einen gering ausgeprägten abkopalen Effekt durch eine alleinige Bestrahlung ohne kombinierte Immuntherapie sprechen, insgesamt war dieser jedoch nicht statistisch signifikant.

Obwohl die kombinierte Radioimmuntherapie im Gegensatz zur alleinigen Bestrahlung einen signifikanten Unterschied zur Vakzinierungs- und Kontrollgruppe zeigen konnte, bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der kombinierten Radioimmuntherapie und der Bestrahlung allein ($p = 0.22$).

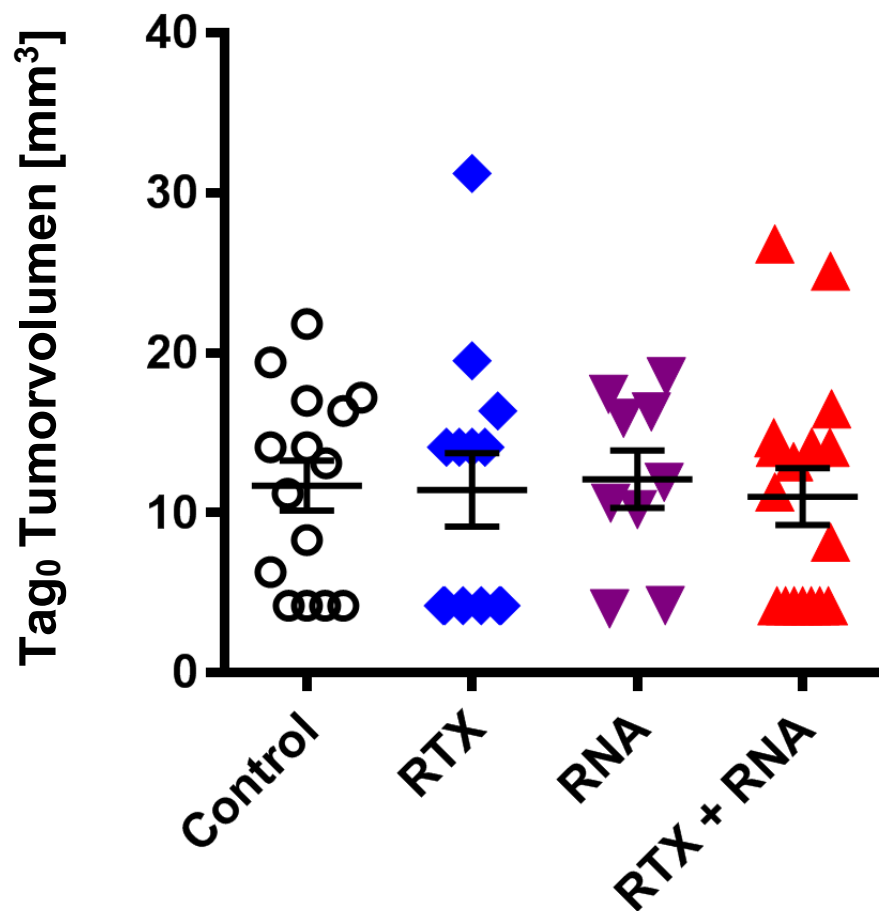


Abbildung 16: Tumorvolumina der Sekundärtumoren bei Behandlungsbeginn

Tumorvolumina in mm^3 der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren aufgeteilt in die Behandlungsgruppen und Kontrollgruppe an Tag 0 (Behandlungsbeginn). Im Gegensatz zu den Primärtumoren, zeigte sich bei der Tumorgröße der Sekundärtumoren kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen vor Therapiebeginn. Dargestellt sind die Kontrollgruppe/Control in schwarz, die Bestrahlungsgruppe/RTX in blau, die Vakzinierungsgruppe/RNA in violett und die kombinierte Radioimmuntherapie/RTX+RNA in rot. Minimales $n = 9$. Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

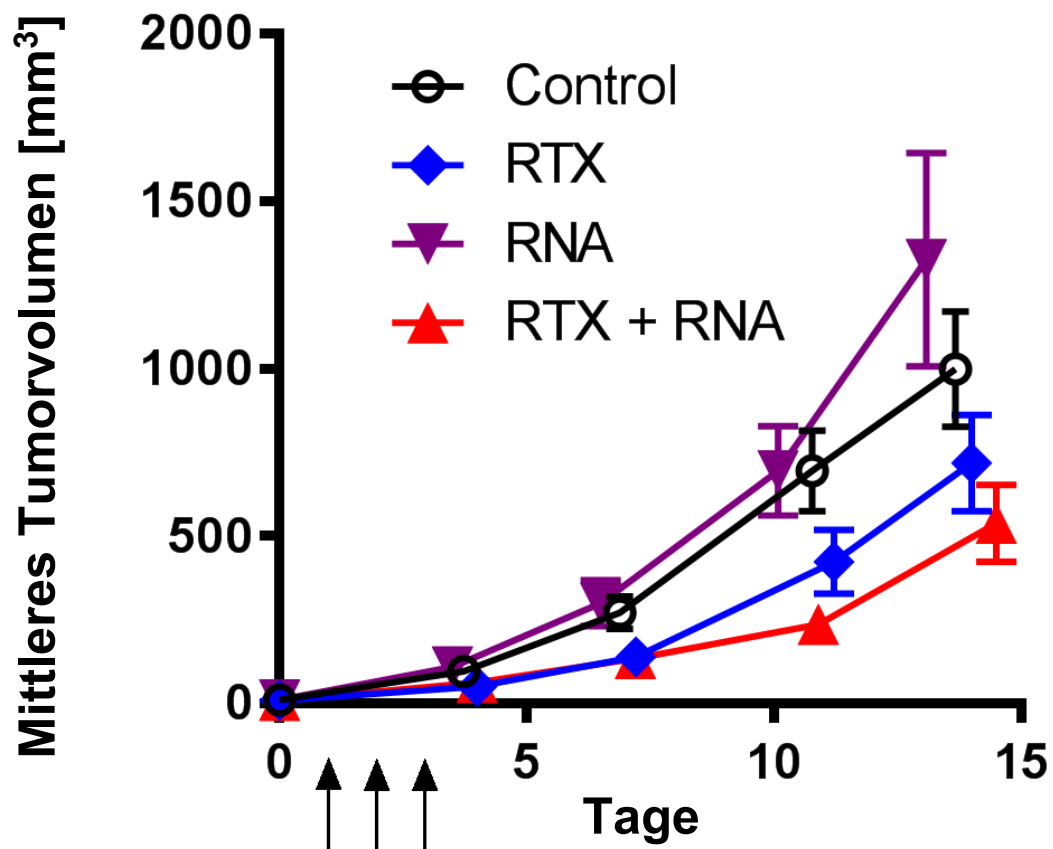


Abbildung 17: Mittleres Tumorumvolumen der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren

Mittleres Tumorumvolumen in $\text{mm}^3 \pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren über den Behandlungszeitraum von 14 Tagen nach Versuchsgruppen aufgeteilt. Die Bestrahlung der Primärtumoren erfolgte an den Tagen 1, 2 und 3 mit jeweils 2 Gy Einzeldosis. Es zeigt sich eine leichte Wachstumsverzögerung für die beiden Bestrahlungsgruppen (RTX, RTX+RNA) mit einem leicht ausgeprägteren Effekt bei der kombinierten Radioimmuntherapie. Zwischen der Kontrollgruppe (Control) und der alleinigen Vakzinierung (RNA) gab es auch hier keine signifikanten Unterschiede. Minimales $n = 9$. Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

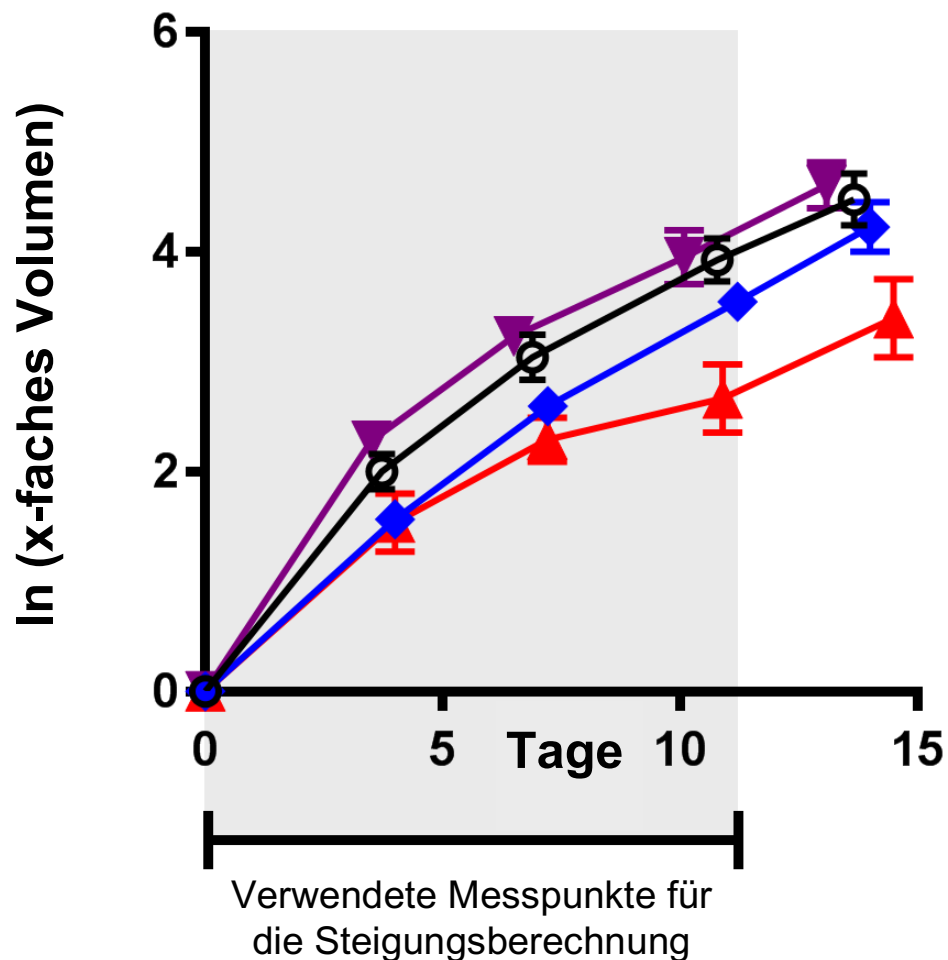


Abbildung 18: Natürlicher Logarithmus des x-fachen Tumolvolumens (Sekundärtumor)

Um die Steigung der Wachstumskurve der Sekundärtumoren zu berechnen, erfolgte zunächst die Berechnung des natürlichen Logarithmus des x-fachen Tumolvolumens im Vergleich zum Behandlungsbeginn (Tag 0). Im Vergleich zu den Primärtumoren haben hier alle Versuchsgruppen eine positive Wachstumskurve. Auch hier gibt es zwischen der Kontrollgruppe (schwarz) und der alleinigen Vakzinierung (violett) keine signifikanten Unterschiede. Die Wachstumskurven der Bestrahlungsgruppe (blau) und insbesondere der kombinierten Radioimmuntherapie (rot) verlaufen jedoch etwas flacher. Minimales $n = 9$. Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

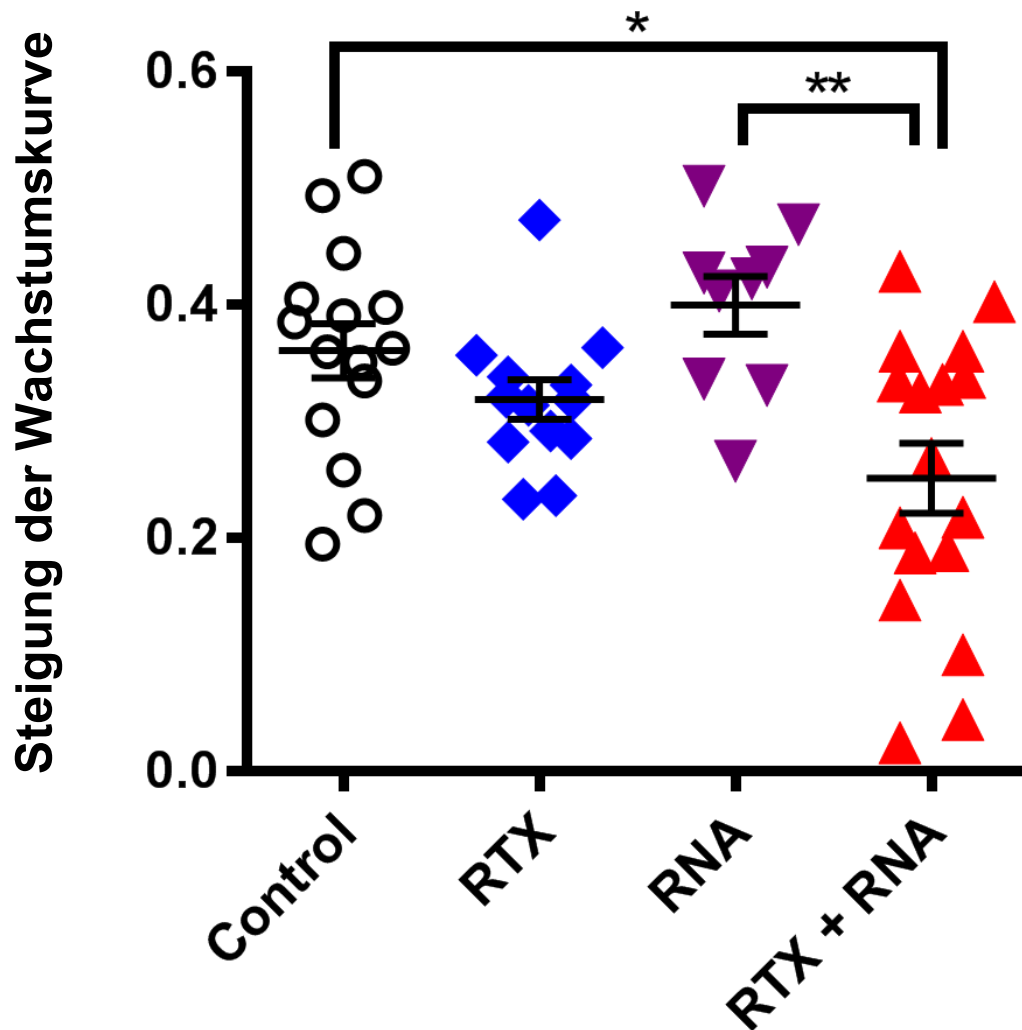


Abbildung 19: Steigung der Wachstumskurve der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren

Steigung der Wachstumskurve der nicht-bestrahlten Primärtumoren aufgeteilt nach den Versuchsgruppen. Die Steigung lag im Gegensatz zu den Primärtumoren bei allen Versuchsgruppen im positiven Bereich, eine Komplettremission bzw. Tumorkontrolle des Sekundärtumors konnte also in keiner der Therapiegruppen erreicht werden. Die alleinige Bestrahlung (RTX) zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen, es ließ sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der kombinierten Radioimmuntherapie (RTX+RNA) und der nicht-behandelten Kontrollgruppe (Control, $p = 0.01$, ANOVA) und der alleinigen Tumorstimulation ausmachen (RNA, $p = 0.002$, ANOVA). Trotz dieser Differenz bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der kombinierten Radioimmuntherapie und der alleinigen Bestrahlung ($p = 0.22$, ANOVA). Minimales $n = 9$. Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

3.3 Analyse des Tumor-Zytokinprofils

Ein weiteres Ziel unserer Studie war die Analyse der immunologischen Prozesse und des biologischen Hintergrunds einer kombinierten Radiotherapie und Immuntherapie. Der Fokus lag hierbei insbesondere auf dem nicht-bestrahlten Sekundärtumor im Bereich der linken Flanke und somit die Analyse möglicher abkoppler Effekte außerhalb des Strahlenfelds.

Hierfür führten wir eine Zytokin-Microarray Analyse der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren durch (n = 4 pro Gruppe). Es zeigten sich signifikante Unterschiede im Zytokinprofil der verschiedenen Behandlungsgruppen.

Im Therapiearm der kombinierten Radioimmuntherapie zeigte sich eine signifikant erhöhte Proteinabundanz des Chemokins CCL5/RANTES im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrollgruppe (p = 0.005), sowie den beiden Monotherapiearmen: Radiotherapie (p = 0.016) und Tumorstimmulierung (p = 0.03). Die Ergebnisse der Chemokinprofile sind in Abbildung 20 dargestellt.

Außerdem bestand bei der kombinierten Radioimmuntherapie eine signifikant erhöhte Proteinabundanz für das Chemokin CXCL9/MIG im Vergleich zur Kontrollgruppe (p = 0.046) und alleinigen Bestrahlungsgruppe (p = 0.032). Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur alleinigen Tumorstimmulierung.

Weitere, jedoch nicht signifikante Trends konnten sowohl für protumorigene, als auch für antitumorigene Chemokine und Zytokine gezeigt werden, z.B. TNF- α , CCL3, IL-1 α , VEGF, und M-CSF. Die Ergebnisse der Zytokinprofile sind in Abbildung 21 dargestellt.

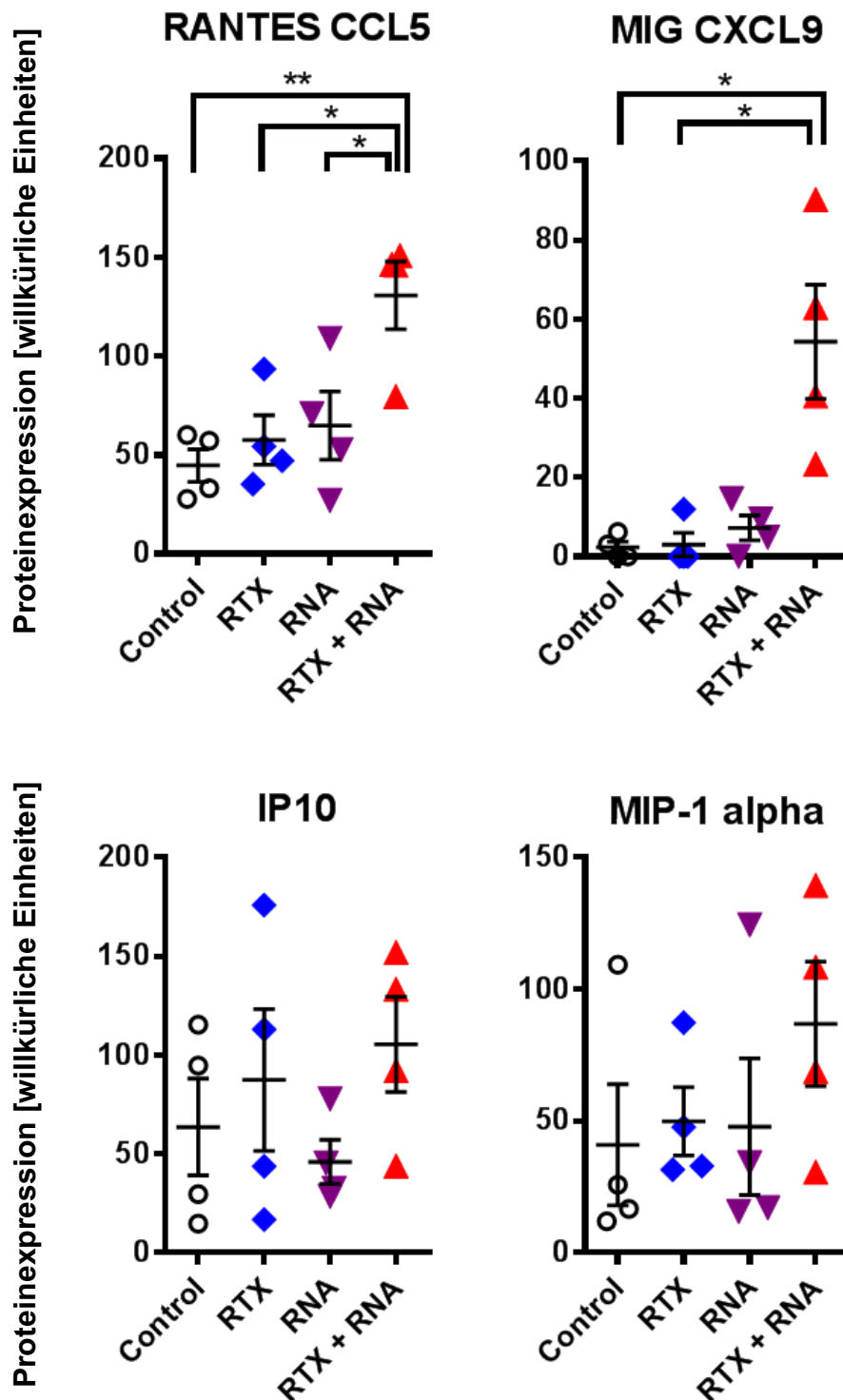


Abbildung 20: Chemokinprofil der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren.

Das Maus-Zytokin-Antibody-Array zeigte Unterschiede in den Chemokin und Zytokinprofilen der abgeschirmten nicht-bestrahlten Sekundärtumoren (n = 4). Obwohl die Tumoren nur eine Bestrahlungsdosis von maximal 3 x 0.01 Gy durch die Bestrahlung des Primärtumors erhielten, zeigte die kombinierte Radioimmuntherapie signifikante Unterschiede für CCL5/RANTES und CXCL9/MIG im Vergleich zu den anderen Gruppen (Kruskal-Wallis). Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

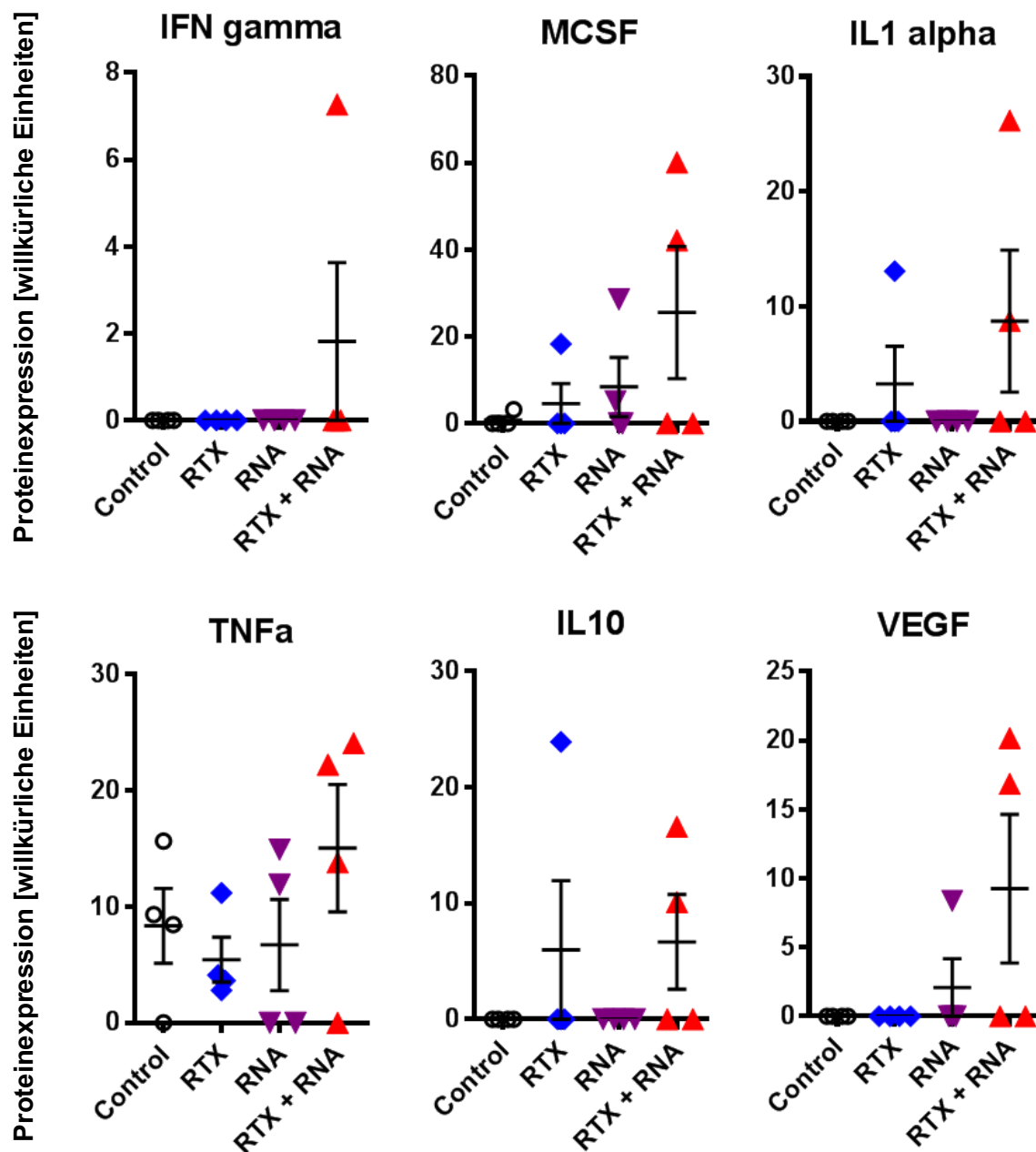


Abbildung 21: Zytokinprofil der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren.

Das Maus-Zytokin-Antibody-Array zeigte Unterschiede in den Chemokin und Zytokinprofilen der abgeschirmten nicht-bestrahlten Sekundärtumoren (n = 4). Auch im Zytokinprofil zeigte die kombinierte Radioimmuntherapie eine vermehrte Expression einiger pro-immunogener Zytokine. Diese Trends für TNF- α , CCL3, IL-1 α , VEGF, M-CSF und weitere Zytokine waren jedoch insgesamt nicht signifikant (Kruskal-Wallis). Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

3.4 Physikalische Dosimetrie der Tumorbestrahlung

Die Bestrahlungsdosis des Primär- und Sekundärtumors wurde mithilfe einer Film-Dosimetrie überprüft. Hierbei wurde eine Bestrahlungsdosis von 3 Gy verwendet und die Dosis beider Tumoren in Form eines Querprofils dargestellt (siehe Abbildung 22).

Die Abschirmung bestand dafür aus einem großen Bleiblock mit eingelassenen Blenden am Linearbeschleuniger-Satellitenträger und einer zusätzlichen on-body Bleiabschirmung direkt am Tierkörper inklusive der linken Flanke (Bereich der Sekundärtumoren). Beide Bleiabschirmungen hatten eine Schichtdicke von ca. 10 cm.

Hierbei konnten wir zeigen, dass die mittlere Dosis des zweifach abgeschirmten Sekundärtumors auf der linken Flanke nur etwa $1.1 \% \pm 0.3\%$ (Mittelwert \pm SE, $n = 3$) beträgt und somit eine adäquate Dosisabschirmung erreicht wird. Für die von uns in den Versuchen verwendete Einzeldosis von 2 Gy für den Primärtumor bedeutet dies eine Einzeldosis von 0.022 Gy für den Sekundärtumor und eine Gesamtdosis von 6 Gy, respektive 0.066 Gy.

Eine adäquate Dosisabschirmung und Dosimetrie sind für den tatsächlichen Nachweis von abkopalen Effekten essentiell, da die beiden Tumoren (Primär- und Sekundärtumor) insbesondere im Maus-Modell, sehr nahe beieinander liegen. In der Klinik ist dies in den meisten Fällen nicht der Fall und es existieren deutlich größere physikalische Abstände zwischen einem Primärtumor und den vorhandenen Metastasen.

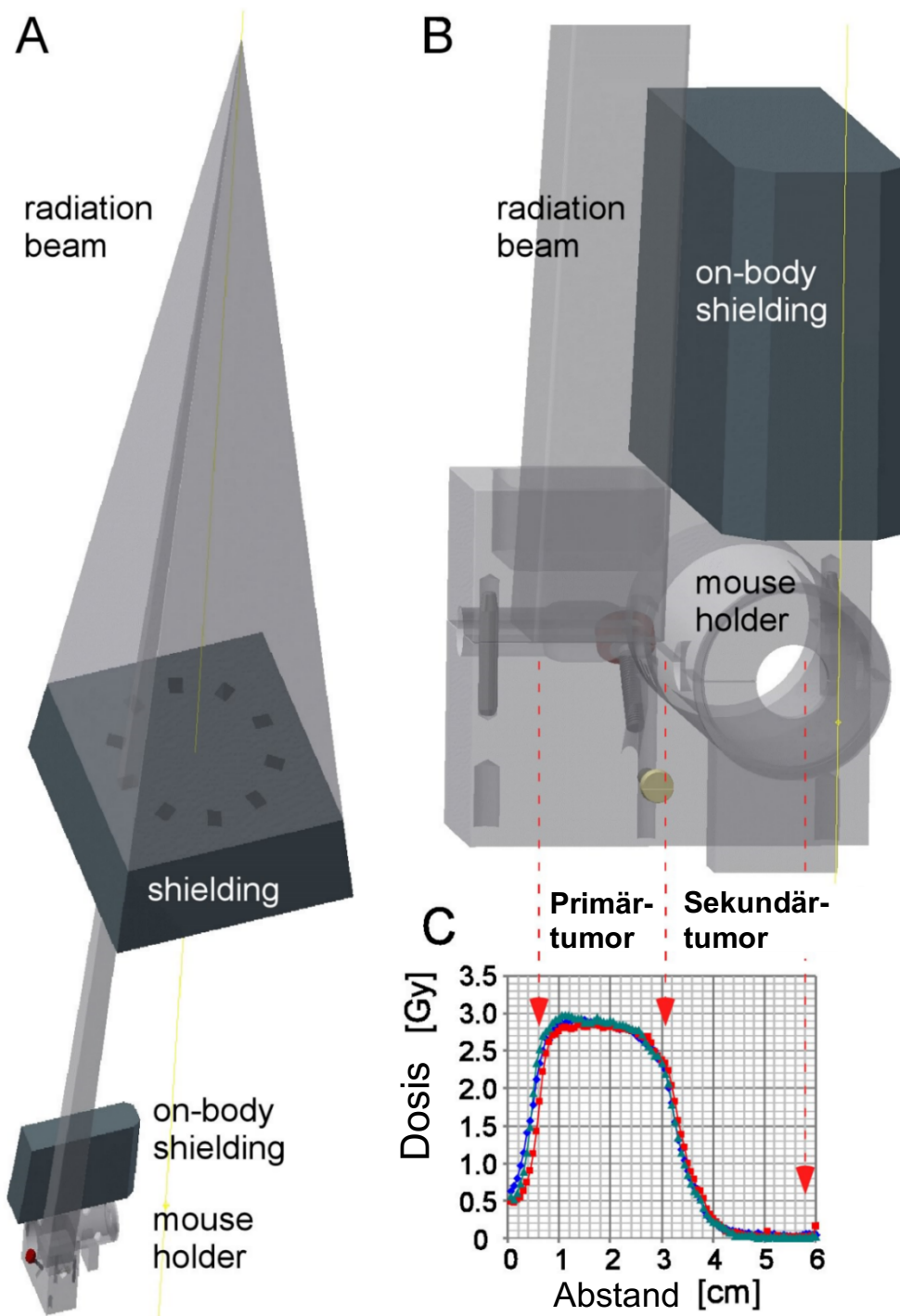


Abbildung 22: Bestrahlungsabschirmung und FilmDOSimetrie.

Bestrahlungsaufbau mit zweifacher Abschirmung im Satellitenträger (A) und in der Maushalterung mit „on-body shielding“ (B). Die Abschirmung des Sekundärtumors auf der linken Flanke wurde mittels FilmDOSimetrie und einem Maus-Phantom gemessen. C zeigt die geometrische Dosisverteilung. Die Ergebnisse zeigen, dass die Sekundärtumoren im Bereich der linken Flanke im Mittel $1.1 \pm 0.3\%$ (Mittelwert \pm SE, $n = 3$) der Bestrahlungsdosis des Primärtumors im Bereich des rechten Hinterbeins erhalten haben. Aus Basler et al., 2018, Cancer Immunol Immunother, verändert.

4 Diskussion

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse eine erhöhte lokale Tumorkontrolle in den bestrahlten Primärtumoren bei Anwendung einer kombinierten Radioimmuntherapie im Vergleich zu einer alleinigen Bestrahlung oder Tumorzellvaksinierung. Diese Resultate stehen im Einklang und bestätigen Erkenntnisse aus verschiedenen anderen präklinischen Tiermodellen (Demaria, Ng et al. 2004, Dewan, Galloway et al. 2009, Formenti and Demaria 2013, Deng, Liang et al. 2014, Reynders, Illidge et al. 2015, Twyman-Saint Victor, Rech et al. 2015).

In den nicht-bestrahlten Sekundärtumoren konnten wir keinen abskopalen Effekt durch eine alleinige Bestrahlung des Primärtumors induzieren, obwohl es sich bei dem von uns verwendeten Tumormodell um ein immunogenes Ovalbumin-exprimierendes Thymom-Modell handelt. Es ließ sich jedoch ein kleiner Trend zu einer Wachstumsverzögerung nachweisen, welcher jedoch nicht signifikant war. Andere präklinische Studien, in welchen ebenfalls Maus Doppeltumor-Modelle zur Anwendung kamen, haben diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse gezeigt (Marconi, Strolin et al. 2017). In einigen dieser Studien konnte durch eine alleinige Bestrahlung des Primärtumors ein abskopaler Effekt des Sekundärtumors beobachtet werden (Camphausen, Moses et al. 2003), in anderen Studien jedoch nicht (Deng, Liang et al. 2014).

In unserem Tumormodell zeigte nur die kombinierte Radioimmuntherapie des Primärtumors eine signifikante Wachstumsverzögerung des Sekundärtumors und somit einen abskopalen Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur alleinigen Vakzinierung. Insgesamt war dieser Effekt jedoch klein und führte nicht zu einer abskopalen Tumorkontrolle des Sekundärtumors, wie in anderen präklinischen Modellen mit einer Doppel-Checkpoint-Inhibition gezeigt werden konnte (Twyman-Saint Victor, Rech et al. 2015).

Allerdings ist eine abkopale Tumorkontrolle im Rahmen einer einzelnen Immuntherapie und kombinierter Radiotherapie eher die Ausnahme als die Regel. Die meistbeschriebene Form eines abkopalen Effekts in anderen präklinischen Studien ist ebenfalls nur eine Wachstumsverzögerung des Sekundärtumors (Reynders, Illidge et al. 2015). Zusammengenommen deuten diese Daten daraufhin, dass eine Radiotherapie tatsächlich in der Lage ist eine kombinierte Immuntherapie in ihrer Wirkung zu unterstützen und eventuell auch selbst dazu in der Lage ist einen kleinen systemischen bzw. abkopalen Effekt zu induzieren.

In der Radiobiologie ist das Konzept der "biologisch effektiven Dosis" (BED) weit verbreitet. Die BED beschreibt dabei biologisch äquivalente Dosen für den induzierten Tumor-Zelltod im Rahmen unterschiedlicher Bestrahlungs-Schemata und Fraktionierungen. Auch für die Induktion einer Anti-Tumor Immunantwort bzw. möglichen abkopalen Effekten spielen die Bestrahlungsdosis, die Fraktionierung und der zeitliche Ablauf eine wichtige Rolle und das Konzept der BED wurde auch hierfür herangezogen um mögliche Unterschiede zu erklären (Marconi, Strolin et al. 2017).

In letzter Zeit haben sich vor allem hypofraktionierte Bestrahlungskonzepte zur Induktion einer Immunantwort bewährt. Insbesondere wurde ein Bestrahlungsbereich mit Einzeldosen zwischen 8 Gy und 12 Gy identifiziert, der zu einer hohen Freisetzung und Konzentration von zytoplasmatischer Doppelstrang-DNA führt und somit besonders immunogen ist (Vanpouille-Box, Alard et al. 2017). Das von uns verwendete Bestrahlungskonzept mit einer dreimaligen Einzeldosis von 2 Gy könnte daher die nur begrenzte Induktion eines abkopalen Effekts erklären. Die sehr geringe Streustrahlung von insgesamt 0.066 Gy im Bereich des kontralateralen Sekundärtumors ist zu gering, um die Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit vollständig zu erklären und Bestrahlungsdosen von 0.1 Gy wurden als Schwellendosis beschrieben, um überhaupt eine Wachstumsverzögerung zu induzieren.

Potenzielle hormetische, also positive Effekte einer niedrig-LET (linearer Energietransfer) Bestrahlung werden in der Literatur insgesamt kontrovers diskutiert, jedoch liegt die Streustrahlung der nicht-behandelten Sekundärtumoren in unserer Studie im Bereich von einer diagnostischen Computertomographie (Ma, Kong et al. 2013, Janiak, Wincenciak et al. 2017).

Effektive Anti-Tumor-Immunantworten und abskopale Effekte einer Radiotherapie sind abhängig von einem effizienten Priming von T-Zell Antworten (Eckert, Gaipf et al. 2017). Eine Bestrahlung kann dieses Priming unterstützen, indem eine erhöhte Freisetzung von tumor-assoziierten Antigenen induziert und die Expression von MHC-1 Molekülen an der Tumorzell-Oberfläche hochreguliert werden. Zusätzlich kommt es zu einer Freisetzung von sogenannten DAMPs (danger associated molecular patterns), wie z.B. ATP, Calreticulin und HMGB1 (high-mobility group protein B1), welche das angeborene Immunsystem aktivieren und damit eine effektive Immunstimulation unterstützen.

Sowohl eine alleinige Bestrahlung, als auch eine kombinierte Radioimmuntherapie führen zu einer Veränderung des Tumormikromilieus und des Zytokinprofils (Eckert, Jelas et al. 2017). Eine Induktion bestimmter Zytokine in Folge einer Radiotherapie wurde ebenfalls für IFN γ und CXCL16 beschrieben (Charo and Ransohoff 2006, Lugade, Sorensen et al. 2008, Matsumura, Wang et al. 2008, Matsumura and Demaria 2010, Formenti and Demaria 2013, Wennerberg, Lhuillier et al. 2017). Eine lokale Induktion einer Immunantwort durch eine Tumorbestrahlung, kann auch zu einer systemischen Anti-Tumor-Immunität führen. Diese steht dabei in Abhängigkeit von CD8⁺ T-Zellen und ist unabhängig von CD4⁺ T-Zellen (Vanpouille-Box, Pilonis et al. 2015, Rodriguez-Ruiz, Rodriguez et al. 2016, Wennerberg, Lhuillier et al. 2017).

Auf der anderen Seite kann eine Bestrahlung auch zu immunsupprimierenden Mechanismen führen. Auch bei lokal angewandten klassischen klinischen Fraktionierungsschemata konnte eine ausgeprägte Lymphopenie beobachtet werden (Yovino, Kleinberg et al. 2013).

Bestrahlte Tumoren zeichnen sich außerdem durch erhöhte Spiegel von TGF β (Carl, Flindt et al. 2016) und eine gesteigerte PD-L1 Expression aus (Twyman-Saint Victor, Rech et al. 2015). Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer Akkumulation von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und M2 Makrophagen, was eventuell durch eine erhöhte Radioresistenz von T_{reg} Zellen im Vergleich zu anderen T-Zellen erklärt werden kann (Formenti and Demaria 2013).

Es existiert eine steigende Anzahl an klinischen Fallberichten, welche die Existenz von abkopalen Effekten im Rahmen einer kombinierten Radioimmuntherapie unterstützen (Demaria, Ng et al. 2004, Frey, Rubner et al. 2012, Postow, Callahan et al. 2012, Golden, Demaria et al. 2013, Demaria, Pilonis et al. 2014, Chandra, Wilhite et al. 2015, Golden, Chhabra et al. 2015, Reynders, Illidge et al. 2015, Bhattacharyya, Purushothaman et al. 2016, Levy, Chargari et al. 2016). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Radiotherapie zu antigen-spezifischen systemischen Immunantworten in Patienten führen kann (Nesslinger, Sahota et al. 2007, Schaeue, Comin-Anduix et al. 2008). Allerdings ist dieser Effekt in den meisten Fällen nicht stark genug, um eine klinisch apparente Kontrolle von Tumoren bzw. Metastasen zu erreichen. Mögliche Erklärungen dafür sind ein unzureichender Wechsel bzw. unzureichende Polarisierung von einem immunsuppressivem Mikromilieu zu einer effektiven Anti-Tumor Immunantwort. Um diese Immunresistenz zu überwinden, werden unterschiedliche Ansätze diskutiert. In oligometastasierten Patienten könnte die Bestrahlung aller Läsionen bzw. Metastasen einen Vorteil gegenüber der Bestrahlung einer einzelnen Indexläsion haben.

Die optimale Behandlungskombination und auch die zeitliche Abfolge einer Bestrahlung könnten sich zusätzlich auch nach der Art der verwendeten Immuntherapie unterscheiden und zum Beispiel für Tumorstoffe anders aussehen, als bei Checkpoint-Inhibitoren, onkolytischer Virotherapie oder CAR T-Zellen. Die richtige Kombination könnte auch die Wahrscheinlichkeit von systemischen Anti-Tumor-Immunantworten bzw. abkopalen Effekten erhöhen und somit das klinische Outcome der Patienten weiter verbessern (Apetoh,

Ladoire et al. 2015, Farkona, Diamandis et al. 2016, Khalil, Smith et al. 2016, Eckert, Gaipf et al. 2017, Salama and Moschos 2017).

Für mRNA-basierte Behandlungsstrategien wurde beschrieben, dass sie in der Lage sind antigen-spezifische T-Zell Antworten zu induzieren. Sie befinden sich aktuell in unterschiedlichen klinischen Studien mit einer kombinierten Radiotherapie (Fotin-Mleczek, Zanzinger et al. 2014, Sebastian, Papachristofilou et al. 2014, McNamara, Nair et al. 2015, Fiedler, Lazzaro et al. 2016). Weitere Strategien beinhalten die Kombination mehrerer Immuntherapien zusammen mit einer lokalen Bestrahlung, z.B. Doppel-Checkpoint-Inhibitoren (Langer, Gadgeel et al. 2016) oder den gezielten Einsatz von Zytokinen, wie z.B. IL-12 um eine T-Zell Expansion, Aktivierung und T_H1 Polarisierung zu induzieren (Deplanque, Shabafrouz et al. 2017, Eckert, Jelas et al. 2017).

Zusätzlich stellt die Identifikation der korrekten Bestrahlungsdosis und Fraktionierung, welche dem "immunogensten" Bestrahlungsschema entspricht, eine klinisch hochrelevante Frage dar. Eine eindeutige Antwort auf diese Frage ist trotz zahlreicher präklinischer Daten nur schwierig zu finden und wird aktuell in der Literatur kontrovers diskutiert. Es könnte diesbezüglich auch Unterschiede je nach Tumorentität und der verwendeten Immuntherapie geben (Dewan, Galloway et al. 2009, Demaria and Formenti 2012, Schaeue, Ratikan et al. 2012, Demaria, Pilonis et al. 2014, Gaipf, Multhoff et al. 2014, Rodel, Frey et al. 2015, Levy, Chargari et al. 2016, Whiteside, Demaria et al. 2016).

Für die klinische Translation müssen jedoch auch immer die Limitationen von präklinischen Modellen und auch die Unterschiede im Immunsystem zwischen Menschen und Mäusen bedacht werden (Mestas and Hughes 2004), insbesondere im Bereich der Polarisierung der T-Zell-Antwort (Del Prete, De Carli et al. 1993) und des Chemokin-Repertoires (Zlotnik and Yoshie 2000). Letztendlich müssen sich die präklinischen Erkenntnisse also erst im klinischen Setting, am besten in Form von randomisierten Studien bewähren. Hierfür laufen

jedoch bereits heute eine Vielzahl an klinischen Phase 2 und 3 Studien auf deren Ergebnisse wir in den nächsten Jahren hoffen können.

5 Liste der Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden am 16.01.2018 in Cancer Immunology, Immunotherapy veröffentlicht und sind teilweise leicht verändert dargestellt:

Autoren: Basler, L., A. Kowalczyk, R. Heidenreich, M. Fotin-Mleczek, S. Tsitsekidis, D. Zips, F. Eckert und S. M. Huber

Titel: "Abscopal effects of radiotherapy and combined mRNA-based immunotherapy in a syngeneic, OVA-expressing thymoma mouse model."

Referenz: Cancer Immunol Immunother. 2018 Apr;67(4):653-662.
doi: 10.1007/s00262-018-2117-0. Epub 2018 Jan 16.

6 Zusammenfassung

6.1 Hintergrund

Die Metastasierung von Tumoren und die Tumor-Immunevasion stellen große Herausforderungen in der Behandlung von Tumorerkrankungen dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Radiotherapie das immunsuppressive Mikromilieu von Tumoren überwinden kann und eine zunehmende Anzahl von Fallberichten deuten sogar auf "systemische" bzw. abkopale Anti-Tumoreffekte einer lokalen Strahlentherapie mit einer einhergehenden systemischen Immunantwort hin. Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung potentieller abkopaler Effekte einer Strahlentherapie allein (RTX) und in Kombination mit einer mRNA-basierten Tumorstimmung (CureVac RNAActive®).

6.2 Methoden

Hierzu wurden C57BL/6 Mäuse mit ovalbuminexprimierenden Thymomzellen in das rechte Hinterbein (Primärtumor) und in die linke Flanke (Sekundärtumor) mit einer Verzögerung von 4 Tagen injiziert (Doppeltumor-Modell). Die Primärtumoren wurden dabei mit 3 Fraktionen à 2 Gy bestrahlt, während die Sekundärtumoren mehrfach abgeschirmt wurden, um den Einfluss einer direkten Bestrahlung größtmöglich zu minimieren. Die Therapiegruppe mit einer alleinigen Tumorstimmung (RNA) und die kombinierte Radioimmuntherapie (RTX+RNA) erhielten zweimal wöchentlich eine intradermale mRNA-basierte RNAActive®-Stimmung. Zusätzlich erfolgte eine Cytokin-Microarray-Analyse der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren, um den biologischen Hintergrund potentieller abkopaler Effekte zu analysieren.

6.3 Ergebnisse

Sowohl eine alleinige Strahlentherapie, als auch die kombinierte Radioimmuntherapie führten zu einer signifikanten Verzögerung des

Primärtumorwachstums und zu einer vollständigen Tumorkontrolle bei 15% (RTX) bzw. 53% (RTX+RNA) der Mäuse. In den kleineren Sekundärtumoren verlangsamte die Radioimmuntherapie die Wachstumsrate im Vergleich zur alleinigen Tumorstabilisierung (p = 0.002) und der Kontrollgruppe (p = 0.01) signifikant. Zusätzlich zeigte das Tumor-Mikromilieu der nicht-bestrahlten Sekundärtumoren signifikante Unterschiede in der Zytokin- und Chemokin-Expression in Abhängigkeit der durchgeführten Therapie und insgesamt signifikante Unterschiede bzw. Trends für die Induktion pro-immunogener Zytokine durch die kombinierte Radioimmuntherapie im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen.

6.4 Diskussion

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass auch eine normofraktionierte Bestrahlung mit relativ niedrigen konventionellen Bestrahlungsdosen zu einer Wachstumsverzögerung, sowohl des bestrahlten Primär- als auch, im Falle einer kombinierten Radioimmuntherapie, des nicht-bestrahlten kontralateralen Sekundärtumors führen kann. Die geringe Streustrahlung im Bereich des Sekundärtumors ist dabei zu gering um die Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit vollständig zu erklären, sodass wir von einem systemischem bzw. abskopalen Bestrahlungseffekt ausgehen.

Eine Kombination aus Immuntherapie und Radiotherapie kann sowohl eine lokale, als auch eine systemische Anti-Tumor-Immunität induzieren und stellt daher eine sehr vielversprechende Behandlungsstrategie von Tumorerkrankungen dar, was auch klinisch bereits unabhängig für mehrere Tumorentitäten und Tumorhistologien gezeigt werden konnte.

Tübingen, 8. Oktober 2019



7 Literaturverzeichnis

Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M. C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F. J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J. P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. Andre, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer and L. Zitvogel (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." Nat Med **13**(9): 1050-1059.

Apetoh, L., S. Ladoire, G. Coukos and F. Ghiringhelli (2015). "Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure?" Ann Oncol **26**(9): 1813-1823.

Ayadi, A., G. Ferrand, I. G. Cruz and X. Warot (2011). "Mouse Breeding and Colony Management." Curr Protoc Mouse Biol **1**(1): 239-264.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.

Basler, L., A. Kowalczyk, R. Heidenreich, M. Fotin-Mleczek, S. Tsitsekidis, D. Zips, F. Eckert and S. M. Huber (2018). "Abscopal effects of radiotherapy and combined mRNA-based immunotherapy in a syngeneic, OVA-expressing thymoma mouse model." Cancer Immunol Immunother.

Bhattacharyya, T., K. Purushothaman, S. S. Puthiyottil, A. Bhattacharjee and G. Muttah (2016). "Immunological interactions in radiotherapy-opening a new window of opportunity." Ann Transl Med **4**(3): 51.

Camphausen, K., M. A. Moses, C. Menard, M. Sproull, W. D. Beecken, J. Folkman and M. S. O'Reilly (2003). "Radiation abscopal antitumor effect is mediated through p53." Cancer Res **63**(8): 1990-1993.

Carl, C., A. Flindt, J. Hartmann, M. Dahlke, D. Rades, J. Dunst, H. Lehnert, F. Gieseler and H. Ungefroren (2016). "Ionizing radiation induces a motile phenotype in human carcinoma cells in vitro through hyperactivation of the TGF-beta signaling pathway." Cell Mol Life Sci **73**(2): 427-443.

Chakraborty, M., S. I. Abrams, K. Camphausen, K. Liu, T. Scott, C. N. Coleman and J. W. Hodge (2003). "Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy." J Immunol **170**(12): 6338-6347.

Chamoto, K., T. Takeshima, D. Wakita, T. Ohkuri, S. Ashino, T. Omatsu, H. Shirato, H. Kitamura, Y. Togashi and T. Nishimura (2009). "Combination immunotherapy with radiation and CpG-based tumor vaccination for the eradication of radio- and immunoresistant lung carcinoma cells." Cancer Sci **100**(5): 934-939.

Chandra, R. A., T. J. Wilhite, T. A. Balboni, B. M. Alexander, A. Spektor, P. A. Ott, A. K. Ng, F. S. Hodi and J. D. Schoenfeld (2015). "A systematic evaluation of abscopal responses following radiotherapy in patients with metastatic melanoma treated with ipilimumab." Oncoimmunology **4**(11): e1046028.

Charo, I. F. and R. M. Ransohoff (2006). "The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation." N Engl J Med **354**(6): 610-621.

Chen, Z., D. Xia, X. Bi, A. Saxena, N. Sidhu, A. El-Gayed and J. Xiang (2005). "Combined radiation therapy and dendritic cell vaccine for treating solid tumors with liver micro-metastasis." J Gene Med **7**(4): 506-517.

CureVac-AG (2018). "CureVacs Pipeline."

Del Prete, G., M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti and S. Romagnani (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production." J Immunol **150**(2): 353-360.

Demaria, S. and S. C. Formenti (2012). "Radiation as an immunological adjuvant: current evidence on dose and fractionation." Front Oncol **2**: 153.

Demaria, S., B. Ng, M. L. Devitt, J. S. Babb, N. Kawashima, L. Liebes and S. C. Formenti (2004). "Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated." Int J Radiat Oncol Biol Phys **58**(3): 862-870.

Demaria, S., K. A. Pilonis, C. Vanpouille-Box, E. B. Golden and S. C. Formenti (2014). "The optimal partnership of radiation and immunotherapy: from preclinical studies to clinical translation." Radiat Res **182**(2): 170-181.

Deng, L., H. Liang, B. Burnette, M. Beckett, T. Darga, R. R. Weichselbaum and Y. X. Fu (2014). "Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice." J Clin Invest **124**(2): 687-695.

Deplanque, G., K. Shabafrouz and M. Obeid (2017). "Can local radiotherapy and IL-12 synergise to overcome the immunosuppressive tumor microenvironment and allow "in situ tumor vaccination"?" Cancer Immunol Immunother **66**(7): 833-840.

Dewan, M. Z., A. E. Galloway, N. Kawashima, J. K. Dewyngaert, J. S. Babb, S. C. Formenti and S. Demaria (2009). "Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody." Clin Cancer Res **15**(17): 5379-5388.

Eckert, F., U. S. Gaipl, G. Niedermann, M. Hettich, K. Schilbach, S. M. Huber and D. Zips (2017). "Beyond checkpoint inhibition – Immunotherapeutical strategies in combination with radiation." Clinical and Translational Radiation Oncology **2**: p29–35.

Eckert, F., U. S. Gaipl, G. Niedermann, M. Hettich, K. Schilbach, S. M. Huber and D. Zips (2017). "Beyond checkpoint inhibition – Immunotherapeutical strategies in combination with radiation." Clinical and Translational Radiation Oncology **2**(Supplement C): 29-35.

Eckert, F., I. Jelas, M. Oehme, S. M. Huber, K. Sonntag, C. Welker, S. D. Gillies, W. Strittmatter, D. Zips, R. Handgretinger and K. Schilbach (2017). "Tumor-targeted IL-12 combined with local irradiation leads to systemic tumor control via abscopal effects in vivo." Oncoimmunology **6**(6): e1323161.

Farkona, S., E. P. Diamandis and I. M. Blasutig (2016). "Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer?" BMC Med **14**: 73.

Fiedler, K., S. Lazzaro, J. Lutz, S. Rauch and R. Heidenreich (2016). "mRNA Cancer Vaccines." Recent Results Cancer Res **209**: 61-85.

Formenti, S. C. and S. Demaria (2013). "Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift." J Natl Cancer Inst **105**(4): 256-265.

Fotin-Mleczek, M., K. M. Duchardt, C. Lorenz, R. Pfeiffer, S. Ojkic-Zrna, J. Probst and K. J. Kallen (2011). "Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity." J Immunother **34**(1): 1-15.

Fotin-Mleczek, M., K. Zanzinger, R. Heidenreich, C. Lorenz, A. Kowalczyk, K. J. Kallen and S. M. Huber (2014). "mRNA-based vaccines synergize with radiation therapy to eradicate established tumors." Radiat Oncol **9**: 180.

Freedman, A., S. S. Neelapu, C. Nichols, M. J. Robertson, B. Djulbegovic, J. N. Winter, J. F. Bender, D. P. Gold, R. G. Ghali, M. E. Stewart, V. Esquibel and P. Hamlin (2009). "Placebo-controlled phase III trial of patient-specific immunotherapy with mitumprotimut-T and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after rituximab in patients with follicular lymphoma." J Clin Oncol **27**(18): 3036-3043.

Frey, B., Y. Rubner, R. Wunderlich, E. M. Weiss, A. G. Pockley, R. Fietkau and U. S. Gaipl (2012). "Induction of abscopal anti-tumor immunity and immunogenic tumor cell death by ionizing irradiation - implications for cancer therapies." Current medicinal chemistry **19**(12): 1751-1764.

Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh and D. P. Carbone (1996). "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." Nat Med **2**(10): 1096-1103.

Gaipl, U. S., G. Multhoff, H. Scheithauer, K. Lauber, S. Hehlhans, B. Frey and F. Rodel (2014). "Kill and spread the word: stimulation of antitumor immune responses in the context of radiotherapy." Immunotherapy **6**(5): 597-610.

Geiger, T. R. and D. S. Peeper (2009). "Metastasis mechanisms." Biochim Biophys Acta **1796**(2): 293-308.

Ghiringhelli, F., N. Larmonier, E. Schmitt, A. Parcellier, D. Cathelin, C. Garrido, B. Chauffert, E. Solary, B. Bonnotte and F. Martin (2004). "CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative." Eur J Immunol **34**(2): 336-344.

Golden, E. B., A. Chhabra, A. Chachoua, S. Adams, M. Donach, M. Fenton-Kerimian, K. Friedman, F. Ponzio, J. S. Babb, J. Goldberg, S. Demaria and S. C. Formenti (2015). "Local radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to generate abscopal responses in patients with metastatic solid tumours: a proof-of-principle trial." Lancet Oncol **16**(7): 795-803.

Golden, E. B., S. Demaria, P. B. Schiff, A. Chachoua and S. C. Formenti (2013). "An abscopal response to radiation and ipilimumab in a patient with metastatic non-small cell lung cancer." Cancer Immunol Res **1**(6): 365-372.

Grimaldi, A. M., E. Simeone, D. Giannarelli, P. Muto, S. Falivene, V. Borzillo, F. M. Giugliano, F. Sandomenico, A. Petrillo, M. Curvietto, A. Esposito, M. Paone, M. Palla, G. Palmieri, C. Caraco, G. Ciliberto, N. Mozzillo and P. A. Ascierto (2014). "Abscopal effects of radiotherapy on advanced melanoma patients who progressed after ipilimumab immunotherapy." Oncoimmunology **3**: e28780.

Gulley, J. L., R. A. Madan and J. Schlom (2011). "Impact of tumour volume on the potential efficacy of therapeutic vaccines." Curr Oncol **18**(3): e150-157.

Hareyama, M., K. Imai, K. Kubo, H. Takahashi, H. Koshiba, Y. Hinoda, M. Shidou, A. Oouchi, A. Yachi and K. Morita (1991). "Effect of radiation on the expression of carcinoembryonic antigen of human gastric adenocarcinoma cells." Cancer **67**(9): 2269-2274.

Higano, C. S., P. F. Schellhammer, E. J. Small, P. A. Burch, J. Nemunaitis, L. Yuh, N. Provost and M. W. Frohlich (2009). "Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer." Cancer **115**(16): 3670-3679.

Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos and W. J. Urba (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(8): 711-723.

Janiak, M. K., M. Wincenciak, A. Cheda, E. M. Nowosielska and E. J. Calabrese (2017). "Cancer immunotherapy: how low-level ionizing radiation can play a key role." Cancer Immunol Immunother **66**(7): 819-832.

Jonathan, E. C., E. J. Bernhard and W. G. McKenna (1999). "How does radiation kill cells?" Curr Opin Chem Biol **3**(1): 77-83.

Khalil, D. N., E. L. Smith, R. J. Brentjens and J. D. Wolchok (2016). "The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy." Nat Rev Clin Oncol **13**(5): 273-290.

Kim, K. W., S. H. Kim, J. G. Shin, G. S. Kim, Y. O. Son, S. W. Park, B. H. Kwon, D. W. Kim, C. H. Lee, M. Y. Sol, M. H. Jeong, B. S. Chung and C. D. Kang (2004). "Direct injection of immature dendritic cells into irradiated tumor induces efficient antitumor immunity." Int J Cancer **109**(5): 685-690.

Kirkwood, J. M., S. Lee, S. J. Moschos, M. R. Albertini, J. C. Michalak, C. Sander, T. Whiteside, L. H. Butterfield and L. Weiner (2009). "Immunogenicity and antitumor effects of vaccination with peptide vaccine +/- granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and/or IFN-alpha2b in advanced metastatic melanoma: Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E1696." Clin Cancer Res **15**(4): 1443-1451.

Kobie, J. J., R. S. Wu, R. A. Kurt, S. Lou, M. K. Adelman, L. J. Whitesell, L. V. Ramanathapuram, C. L. Arteaga and E. T. Akporiaye (2003). "Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines." Cancer Res **63**(8): 1860-1864.

Kunala, S. and R. M. Macklis (2001). "Ionizing radiation induces CD20 surface expression on human B cells." Int J Cancer **96**(3): 178-181.

Langer, C. J., S. M. Gadgeel, H. Borghaei, V. A. Papadimitrakopoulou, A. Patnaik, S. F. Powell, R. D. Gentzler, R. G. Martins, J. P. Stevenson, S. I. Jalal, A. Panwalkar, J. C. Yang, M. Gubens, L. V. Sequist, M. M. Awad, J. Fiore, Y. Ge, H. Raftopoulos, L. Gandhi and K.-. investigators (2016). "Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study." Lancet Oncol **17**(11): 1497-1508.

Levy, A., C. Chargari, A. Marabelle, J. L. Perfettini, N. Magne and E. Deutsch (2016). "Can immunostimulatory agents enhance the abscopal effect of radiotherapy?" Eur J Cancer **62**: 36-45.

Lodish, H. F. (2013). Molecular cell biology. New York, W.H. Freeman and Co.

Lorenz, C., M. Fotin-Mleczek, G. Roth, C. Becker, T. C. Dam, W. P. Verdurmen, R. Brock, J. Probst and T. Schlake (2011). "Protein expression from exogenous mRNA: uptake by receptor-mediated endocytosis and trafficking via the lysosomal pathway." RNA Biol **8**(4): 627-636.

Lugade, A. A., J. P. Moran, S. A. Gerber, R. C. Rose, J. G. Frelinger and E. M. Lord (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.

Lugade, A. A., E. W. Sorensen, S. A. Gerber, J. P. Moran, J. G. Frelinger and E. M. Lord (2008). "Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity." J Immunol **180**(5): 3132-3139.

Ma, S., B. Kong, B. Liu and X. Liu (2013). "Biological effects of low-dose radiation from computed tomography scanning." Int J Radiat Biol **89**(5): 326-333.

Marconi, R., S. Strolin, G. Bossi and L. Strigari (2017). "A meta-analysis of the abscopal effect in preclinical models: Is the biologically effective dose a relevant physical trigger?" PLoS One **12**(2): e0171559.

Matsumoto, H., T. Takahashi, N. Mitsuhashi, K. Higuchi and H. Niibe (1999). "Modification of tumor-associated antigen (CEA) expression of human lung cancer cells by irradiation, either alone or in combination with interferon-gamma." Anticancer Res **19**(1A): 307-311.

Matsumura, S. and S. Demaria (2010). "Up-regulation of the pro-inflammatory chemokine CXCL16 is a common response of tumor cells to ionizing radiation." Radiat Res **173**(4): 418-425.

Matsumura, S., B. Wang, N. Kawashima, S. Braunstein, M. Badura, T. O. Cameron, J. S. Babb, R. J. Schneider, S. C. Formenti, M. L. Dustin and S. Demaria (2008). "Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells." J Immunol **181**(5): 3099-3107.

Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-305.

- Mayordomo, J. I., T. Zorina, W. J. Storkus, L. Zitvogel, C. Celluzzi, L. D. Falo, C. J. Melief, S. T. Ildstad, W. M. Kast, A. B. Deleo and et al. (1995). "Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity." Nat Med **1**(12): 1297-1302.
- McNamara, M. A., S. K. Nair and E. K. Holl (2015). "RNA-Based Vaccines in Cancer Immunotherapy." J Immunol Res **2015**: 794528.
- Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." Nature **449**(7164): 819-826.
- Melief, C. J. (2008). "Cancer immunotherapy by dendritic cells." Immunity **29**(3): 372-383.
- Mestas, J. and C. C. Hughes (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." J Immunol **172**(5): 2731-2738.
- Nesslinger, N. J., R. A. Sahota, B. Stone, K. Johnson, N. Chima, C. King, D. Rasmussen, D. Bishop, P. S. Rennie, M. Gleave, P. Blood, H. Pai, C. Ludgate and B. H. Nelson (2007). "Standard treatments induce antigen-specific immune responses in prostate cancer." Clin Cancer Res **13**(5): 1493-1502.
- Nikitina, E. Y. and D. I. Gabrilovich (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.
- Palucka, A. K., H. Ueno, J. W. Fay and J. Banchereau (2007). "Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells." Immunol Rev **220**: 129-150.
- Petrausch, U., S. M. Jensen, C. Twitty, C. H. Poehlein, D. P. Haley, E. B. Walker and B. A. Fox (2009). "Disruption of TGF-beta signaling prevents the generation of tumor-sensitized regulatory T cells and facilitates therapeutic antitumor immunity." J Immunol **183**(6): 3682-3689.
- Postow, M. A., M. K. Callahan, C. A. Barker, Y. Yamada, J. Yuan, S. Kitano, Z. Mu, T. Rasalan, M. Adamow, E. Ritter, C. Sedrak, A. A. Jungbluth, R. Chua, A. S. Yang, R. A. Roman, S. Rosner, B. Benson, J. P. Allison, A. M. Lesokhin, S. Gnjatich and J. D. Wolchok (2012). "Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma." The New England journal of medicine **366**(10): 925-931.
- Ramakrishnan, R., S. Antonia and D. I. Gabrilovich (2008). "Combined modality immunotherapy and chemotherapy: a new perspective." Cancer Immunol Immunother **57**(10): 1523-1529.
- Reynders, K., T. Illidge, S. Siva, J. Y. Chang and D. De Ruyscher (2015). "The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant." Cancer Treat Rev **41**(6): 503-510.
- Richard Wayne Joseph, J. E.-S., Jedd D. Wolchok, Anthony M. Joshua, Antoni Ribas, F. Stephen Hodi, Omid Hamid, Caroline Robert, Adil Daud, Wen-Jen Hwu, Richard Kefford, Peter Hersey, Jeffrey S. Weber, Amita Patnaik, Dinesh Prasad De Alwis, Andrea Marie Perrone, Soonmo Peter Kang, Scot Ebbinghaus, Keaven M. Anderson, Tara C. Gangadhar (2014). "Baseline tumor size as an independent prognostic factor for overall

survival in patients with metastatic melanoma treated with the anti-PD-1 monoclonal antibody MK-3475." *J Clin Oncol* **32:5s**: suppl; abstr 3015 [Abstract].

Rodel, F., B. Frey, G. Multhoff and U. Gaipl (2015). "Contribution of the immune system to bystander and non-targeted effects of ionizing radiation." *Cancer Lett* **356**(1): 105-113.

Rodriguez-Ruiz, M. E., I. Rodriguez, S. Garasa, B. Barbes, J. L. Solorzano, J. L. Perez-Gracia, S. Labiano, M. F. Sanmamed, A. Azpilikueta, E. Bolanos, A. R. Sanchez-Paulete, M. A. Aznar, A. Rouzaut, K. A. Schalper, M. Jure-Kunkel and I. Melero (2016). "Abscopal Effects of Radiotherapy Are Enhanced by Combined Immunostimulatory mAbs and Are Dependent on CD8 T Cells and Crosspriming." *Cancer Res* **76**(20): 5994-6005.

Rosenberg, S. A., J. C. Yang and N. P. Restifo (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." *Nat Med* **10**(9): 909-915.

Salama, A. K. and S. J. Moschos (2017). "Next steps in immuno-oncology: enhancing antitumor effects through appropriate patient selection and rationally designed combination strategies." *Ann Oncol* **28**(1): 57-74.

Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco and J. L. Rodriguez-Fernandez (2006). "The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells." *J Immunol* **176**(9): 5153-5159.

Schaue, D., B. Comin-Anduix, A. Ribas, L. Zhang, L. Goodglick, J. W. Sayre, A. Debucquoy, K. Haustermans and W. H. McBride (2008). "T-cell responses to survivin in cancer patients undergoing radiation therapy." *Clin Cancer Res* **14**(15): 4883-4890.

Schaue, D., J. A. Ratikan, K. S. Iwamoto and W. H. McBride (2012). "Maximizing tumor immunity with fractionated radiation." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **83**(4): 1306-1310.

Sebastian, M., A. Papachristofilou, C. Weiss, M. Fruh, R. Cathomas, W. Hilbe, T. Wehler, G. Rippin, S. D. Koch, B. Scheel, M. Fotin-Mleczek, R. Heidenreich, K. J. Kallen, U. Gnad-Vogt and A. Zippelius (2014). "Phase Ib study evaluating a self-adjuvanted mRNA cancer vaccine (RNAActive(R)) combined with local radiation as consolidation and maintenance treatment for patients with stage IV non-small cell lung cancer." *BMC Cancer* **14**: 748.

Sharp, H. J., E. K. Wansley, C. T. Garnett, M. Chakraborty, K. Camphausen, J. Schlom and J. W. Hodge (2007). "Synergistic antitumor activity of immune strategies combined with radiation." *Front Biosci* **12**: 4900-4910.

Siva, S., M. P. MacManus, R. F. Martin and O. A. Martin (2015). "Abscopal effects of radiation therapy: a clinical review for the radiobiologist." *Cancer Lett* **356**(1): 82-90.

Sporn, M. B. (1996). "The war on cancer." *Lancet* **347**(9012): 1377-1381.

Sporn, M. B. (1997). "The war on cancer: a review." *Annals of the New York Academy of Sciences* **833**: 137-146.

Steinman, R. M. and J. Banchereau (2007). "Taking dendritic cells into medicine." *Nature* **449**(7161): 419-426.

- Teitz-Tennenbaum, S., Q. Li, R. Okuyama, M. A. Davis, R. Sun, J. Whitfield, R. N. Knibbs, L. M. Stoolman and A. E. Chang (2008). "Mechanisms involved in radiation enhancement of intratumoral dendritic cell therapy." J Immunother **31**(4): 345-358.
- Triozzi, P. L., R. Khurram, W. A. Aldrich, M. J. Walker, J. A. Kim and S. Jaynes (2000). "Intratumoral injection of dendritic cells derived in vitro in patients with metastatic cancer." Cancer **89**(12): 2646-2654.
- Tseng, C. W., C. Trimble, Q. Zeng, A. Monie, R. D. Alvarez, W. K. Huh, T. Hoory, M. C. Wang, C. F. Hung and T. C. Wu (2009). "Low-dose radiation enhances therapeutic HPV DNA vaccination in tumor-bearing hosts." Cancer Immunol Immunother **58**(5): 737-748.
- Twyman-Saint Victor, C., A. J. Rech, A. Maity, R. Rengan, K. E. Pauken, E. Stelekati, J. L. Benci, B. Xu, H. Dada, P. M. Odorizzi, R. S. Herati, K. D. Mansfield, D. Patsch, R. K. Amaravadi, L. M. Schuchter, H. Ishwaran, R. Mick, D. A. Pryma, X. Xu, M. D. Feldman, T. C. Gangadhar, S. M. Hahn, E. J. Wherry, R. H. Vonderheide and A. J. Minn (2015). "Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer." Nature **520**(7547): 373-377.
- Vanpouille-Box, C., A. Alard, M. J. Aryankalayil, Y. Sarfraz, J. M. Diamond, R. J. Schneider, G. Inghirami, C. N. Coleman, S. C. Formenti and S. Demaria (2017). "DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity." Nat Commun **8**: 15618.
- Vanpouille-Box, C., K. A. Pilonis, E. Wennerberg, S. C. Formenti and S. Demaria (2015). "In situ vaccination by radiotherapy to improve responses to anti-CTLA-4 treatment." Vaccine **33**(51): 7415-7422.
- Vicari, A. P., C. Caux and G. Trinchieri (2002). "Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation." Semin Cancer Biol **12**(1): 33-42.
- Wang, H. Y. and R. F. Wang (2007). "Regulatory T cells and cancer." Curr Opin Immunol **19**(2): 217-223.
- Weide, B., S. Pascolo, B. Scheel, E. Derhovanessian, A. Pflugfelder, T. K. Eigentler, G. Pawelec, I. Hoerr, H. G. Rammensee and C. Garbe (2009). "Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients." J Immunother **32**(5): 498-507.
- Wennerberg, E., C. Lhuillier, C. Vanpouille-Box, K. A. Pilonis, E. Garcia-Martinez, N. P. Rudqvist, S. C. Formenti and S. Demaria (2017). "Barriers to Radiation-Induced In Situ Tumor Vaccination." Front Immunol **8**: 229.
- Whiteside, T. L., S. Demaria, M. E. Rodriguez-Ruiz, H. M. Zarour and I. Melero (2016). "Emerging Opportunities and Challenges in Cancer Immunotherapy." Clin Cancer Res **22**(8): 1845-1855.
- Whitney, R. B., J. G. Levy and A. G. Smith (1974). "Influence of tumor size and surgical resection on cell-mediated immunity in mice." J Natl Cancer Inst **53**(1): 111-116.
- Yang, D., Q. Chen, H. Yang, K. J. Tracey, M. Bustin and J. J. Oppenheim (2007). "High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin." J Leukoc Biol **81**(1): 59-66.

Yokouchi, H., K. Chamoto, D. Wakita, K. Yamazaki, H. Shirato, T. Takeshima, H. Dosaka-Akita, M. Nishimura, Z. Yue, H. Kitamura and T. Nishimura (2007). "Combination tumor immunotherapy with radiotherapy and Th1 cell therapy against murine lung carcinoma." Clin Exp Metastasis **24**(7): 533-540.

Yovino, S., L. Kleinberg, S. A. Grossman, M. Narayanan and E. Ford (2013). "The etiology of treatment-related lymphopenia in patients with malignant gliomas: modeling radiation dose to circulating lymphocytes explains clinical observations and suggests methods of modifying the impact of radiation on immune cells." Cancer Invest **31**(2): 140-144.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-127.

8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Labor Experimentelle Radioonkologie der Universitätsklinik für Radioonkologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Stephan Huber durchgeführt. Kooperationspartner des Projekts war die Firma CureVac AG unter Betreuung von Frau Dr. Mariola Fotin-Mleczek.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Stephan Huber (Arbeitsgruppenleiter, Laborleiter) und Frau Dr. Mariola Fotin-Mleczek (Chief Technology Officer, CureVac AG).

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Aleksandra Kowalczyk (CureVac AG), Frau Dr. Regina Heidenreich (CureVac AG) und Herrn Prof. Dr. Stephan Huber (Radioonkologie UKT) von mir durchgeführt.

Sämtliche Methoden, inklusive der Sedation, Ohrlochmarkierung, Tumorinjektion, Tumormessung, Gruppenzuordnung, Tumorstanzung, Tumorextraktion, sowie die Chemokin- und Zytokinanalyse wurden ebenfalls von mir durchgeführt, teilweise mit Unterstützung durch Mitarbeiter der Firma CureVac AG oder Prof. Dr. Stephan Huber.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich mit Unterstützung von Prof. Dr. Stephan Huber.

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

Zürich, den 08.10.2019


Lucas Basler

9 Anhang

9.1 Verwendete Tiere

- C57BL/6 Mäuse mit einem mittleren Alter zwischen 7 und 9 Wochen bei Versuchsbeginn

9.2 Allgemeines Material

- Laborkittel
- Mundschutz
- Überziehschuhe
- Einmal-Handschuhe, Peha-soft® nitrile white – Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
- Zellstoff
- Descosept AF – Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld-Beiseförth, Deutschland
- 70 % Ethanol aus Wasser und Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Ethanol - Merck Millipore, München, Deutschland / Ethanol 99 % S – SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland

9.3 Material zur Herstellung von Lösungen

- Pipette - eppendorf Research 1000 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipette - eppendorf Research 100 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipette - eppendorf Research 10 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipette - eppendorf Research 2,5 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße 1,5 mL - Eppendorf, Hamburg, Deutschland

- eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße 2,0 mL - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Macro-Pipettierhilfe – Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Messpipetten, 5 mL, 10 mL, 25 mL, Corning® Costar® Stripette® - Sigma-Aldrich® St. Louis, Missouri, USA
- Glasflaschen mit Schraubverschluss, 500 mL, 1000 mL – Schott AG, Mainz, Deutschland
- Wäge-Spatel

9.4 Material für Zellkultur

- Pipetten (aufgeführt unter Material zur Herstellung von Lösungen)
- 15 mL Polystyrene Conical Tube - BD Falcon™ - BD Biosciences, Bedford, MA, USA
- 50 mL Polystyrene Conical Tube - BD Falcon™ - BD Biosciences, Bedford, MA, USA
- Inkubator HeraCell®, Einstellung 37 °C, 5 % CO₂ – Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
- 8-Kammer-Kulturplatten, 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue Culture Treated Slides Glass Slide, includes Chamber Removal Devices - BD Falcon™ - BD Biosciences, Bedford, MA, USA
- 96-Well Kulturplatten, Tissue Culture Plate, Flat bottom with lid - Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland

9.5 Material für Tumorinjektion und Tumormessung

- BD MICRO FINE+ U 100 Insulin-Spritzen, BD Biosciences, Bedford, MA, USA

- Schermaschine Aesculap GT415 Exacta, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
- Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
- Digitaler Heizblock, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße 2,0 mL - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Digitale Schieblehre, WABECO, Remscheid-Lüttringhausen, Deutschland

9.6 Software

- Microsoft® Word für Mac 2011, Version 14.5.9 - Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Microsoft® Excel für Mac 2011, Version 14.5.9 - Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Endnote X7.2 (Bld 9970) - Thomson Reuters, NYC, USA / Toronto, Kanada
- Adobe® Illustrator® CC, Version 17.0.0 - Adobe Systems, San José, CA, USA
- Adobe® InDesign® CC, Version 9.0 - Adobe Systems, San José, CA, USA
- Prism 6 for Mac OS X, Version 6.0c - GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA

10 Danksagung

Ich möchte mich hiermit sehr herzlich bei allen Beteiligten des Projekts und den Kooperationspartnern für Ihre große Hilfe und Unterstützung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt dabei Herrn Professor Stephan Huber, der mich stets während der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt hat und immer beratend zur Seite stand.

Ebenso möchte ich mich sehr herzlich bei der Firma CureVac AG (Mariola Fotin-Mleczek, Aleksandra Kowalczyk und Regina Heidenreich) bedanken. Insbesondere dafür, dass ich meine Dissertation und Experimente mit Hilfe der von Ihnen bereit gestellten Technologien und Vakzinen auf mRNA-Basis durchführen konnte.

Ein weiterer Dank gilt dem gesamten Team der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen, insbesondere allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des «Labors Experimentelle Radioonkologie» (inkl. Professor Stephan Huber, Frau Dr. Franziska Eckert und Heidrun Faltin).

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während meines gesamten Studiums und darüber hinaus, stets unterstützt haben.