

Diplomarbeit

Analyse der Ontogenese und Funktion humaner Tumor-associated-neutrophils

eingereicht von
Lorenz Mazzucco

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**
an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am
**Otto Loewi Forschungszentrum für Gefäßbiologie,
Immunologie und Entzündung -
Lehrstuhl für Pathophysiologie und Immunologie**

unter der Anleitung von
Univ. Prof. Dr. med. univ. Herbert Strobl
(Erstbetreuer)
**Priv.-Doz.ⁱⁿ Mag.^a Dr.ⁱⁿ rer.nat Nassim Ghaffari Tabrizi-
Wizsy**
(Zweitbetreuerin)

Graz, am 09.04.2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 09.04.2022

Lorenz Mazzucco eh.

1. Abstract	-	Seite 5
2. Zusammenfassung	-	Seite 6
3. Einleitung	-	Seite 7
3.1. Das Immunsystem und Krebs - Aufkommen und Grenzen der derzeitigen onkologischen Immunotherapie	-	Seite 8
3.2. Chronische Entzündung und myeloische Zellen im TME	-	Seite 13
3.3. Beginn der Erforschung und Erstbeschreibung der TAN	-	Seite 24
3.4. Der neutrophile Granulozyt - physiologische Entwicklung und Funktion	-	Seite 27
3.5. Die Hallmarks of Cancer	-	Seite 35
3.6. Beeinflussung der Hallmarks of Cancer durch TAN	-	Seite 40
3.7. Unabhängigkeit von proliferativen Stimuli	-	Seite 42
3.8. Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Stimuli	-	Seite 48
3.9. Resistenz gegenüber Zelltod/Induktion replikativer Immortalität	-	Seite 52
3.10. Induktion tumorassoziierter Neoangiogenese	-	Seite 58
3.11. Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung	-	Seite 65
3.12. TAN Beeinflussung der „enabling characteristics“ und des emerging hallmark „Immunevasion“	-	Seite 75
3.13. Antitumoröse Effekte der TAN	-	Seite 82
3.14. Die weiteren Phasen des Cancer-Immunoeditings	-	Seite 90
3.15. Immunsuppression durch TAN und Abgrenzung zu PMN-MDSC	-	Seite 92
3.16. Die Suche nach einer Methode zur ontogenetischen Phanotypisierung von Tumor-associated-neutrophils	-	Seite 96
3.17. Das Chorionallantoismembran (CAM)-Modell in der Tumorforschung	-	Seite 98
4. Material und Methoden - Auswahl der Tumorzelllinien	-	Seite 101
4.1. Kultur der neutrophilen Progenitorzellen	-	Seite 102
4.2. CFSE-Markierung der neutrophilen Vorläuferzellen	-	Seite 103
4.3. Generierung der Tumorspheroide	-	Seite 104
4.4. CAM-Modell	-	Seite 105
4.5. Xenotransplantation der Tumorspheroide auf CAM	-	Seite 105

4.6 Tumorresektion	-	Seite 106
4.7. Disaggregation der Tumorspheroide	-	Seite 107
4.8. FACS-Analyse	-	Seite 107
5. Ergebnisse	-	Seite 111
5.1. Neutrophile Progenitorzellen formen 3D-Spheroide mit A549-Tumorzellen:	-	Seite 112
5.2. Spheroide sowie Suspension von A549/Neutrophilen-Cokultur bilden Tumoren auf CAM	-	Seite 118
5.3. Erstellung des CD-Markerpanels	-	Seite 123
5.4. CFSE-Markierung hat keinen Einfluss auf die Oberflächenmarkerexpression	-	Seite 132
5.5. LT22s-Spheroidkultur auf CAM	-	Seite 133
5.6. Cokultur in LT22s-Spheroide beeinflusst die Differenzierung neutrophiler Granulozyten	-	Seite 136
6. Diskussion und weiterer Ausblick	-	Seite 143
Literaturverzeichnis	-	Seite 147
Abkürzungen	-	Seite 185

1. Abstract:

In addition to malignant cells, a large number of non-malignant cells are involved in the formation of neoplastic tissue. These include endothelial and stromal cells as well as various infiltrating cells of the immune system. This infiltrate represents a chronic inflammatory process, which for a long time was considered to be a protective mechanism. However it frequently correlates with an unfavorable clinical outcome. In recent years, it has been shown that the immune system plays a quite ambivalent role in the context of tumorigenesis. On the one hand, several therapies, whose strategy is the enhancement of anti-tumor T-cell responses, have now been successfully established (checkpoint inhibitor-therapy, CAR T-cell therapy). Nevertheless, it has been observed that cells of the myeloid system in particular can be manipulated by the tumor, leading to the induction of a fatal chronic inflammatory state. This state seems capable of supporting neoplasias in the acquisition of various hallmarks of cancer. One of these hallmarks is now considered to be the tumor's ability to evade or suppress the anti-tumor immune response. This is shown by comparing the immune status of cancer patients with that of healthy individuals. In particular, manipulated myeloid subsets appear to be important mediators of this immunosuppression. Among other things, they inhibit the effects of the adaptive immune system via ROS mediated T-cell oxidation, CTL-T-cell receptor nitration, and arginase release. However, these seem to be only a fraction of all relevant processes. Only the understanding and elimination of these disruptive influences will allow the full potential of T cell modifying therapies to be exploited. For a long time, it was assumed that neutrophil granulocytes had little influence on these processes. The reasons given were their short life span and low plasticity. However, the murine study showed that so-called tumor-associated-neutrophils (TAN) not only possess potent pro-tumorigenic effects (N2-TAN), but under certain circumstances can also form an anti-tumorigenic subset (N1-TAN).

Recently, an anti-tumorigenic hybrid TAN subset was isolated from human lung tumor tissue. This subset possessed antigen-presenting cell (APC) properties and was able to induce non-specific as well as tumor-specific T cell responses. In the last couple of years, many functions of individual TAN subsets have been identified. However, which TAN subsets arise from which cells has not yet been elucidated. Therefore, the aim of this work is to provide a holistic review of the current knowledge on the impact of TAN on tumorigenesis. Furthermore, a novel experimental model is presented, which could provide answers regarding the origin of TAN with the help of a CAM model.

2. Zusammenfassung:

Neben maligne entarteten Zellen, ist eine Vielzahl an non-malignen Zellen am Aufbau neoplastischer Gewebe beteiligt. Zu diesen zählen, neben Endothel- und Stromazellen, auch diverse infiltrierende Zellen des Immunsystems. Dieses Infiltrat ist Ausdruck einer chronischen Entzündung, die lange Zeit als Schutzmechanismus gewertet wurde. Paradoxerweise korreliert diese jedoch häufig mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem eine sehr ambivalente Rolle im Rahmen der Tumorgenese spielt. Einerseits konnten mittlerweile mehrere Therapien, deren Strategie die Verbesserung der antitumorösen T-Zell-Reaktion ist, erfolgreich etabliert werden (Checkpoint-Inhibitoren, CAR-T-Zell Therapie). Andererseits häufen sich Beobachtungen, dass v.a. Zellen des myeloischen Systems durch den Tumor manipuliert werden, wodurch es zur Induktion eines fatalen chronischen Entzündungszustandes kommt. Dieser scheint in der Lage zu sein, Neoplasien beim Erwerb diverser *hallmarks of cancer* unterstützen. Zu diesen wird mittlerweile auch die Fähigkeit des Tumors gezählt, sich der antitumorösen Immunreaktion zu entziehen, bzw. diese zu supprimieren. Dies zeigen Vergleiche des Immunstatus von Krebspatientinnen/-patienten mit denen Gesunder. Insbesondere manipulierte myeloische Subsets scheinen wichtige Vermittler dieser Immunsuppression zu sein. U.a. hemmen sie die Effekte des adaptiven Immunsystems über ROS meditierte T-Zelloxidation, CTL-T-Zell-Rezeptor Nitrierungen, und Arginasefreisetzung. Tatsächlich dürfte es sich hierbei jedoch nur um einen Bruchteil aller relevanten Prozesse handeln. Erst das Verständnis und die Beseitigung dieser Störfaktoren ermöglicht es, dass das volle Potential T-Zell-modifizierender Therapien auszuschöpfen.

Lange wurde davon ausgegangen, dass neutrophile Granulozyten diesen Prozess nur wenig beeinflussen. Als Gründe wurden ihre kurze Lebensdauer und geringe Plastizität angeführt. Jedoch zeigte sich im Mausmodell, das sog. *tumor-associated-neutrophils (TAN)* nicht nur potente protumoröse Effekte besitzen (N2-TAN), sondern unter bestimmten Umständen auch ein antitumoröses Subsets ausbilden können (N1-TAN).

Unlängst konnte ein antitumoröses Hybrid-TAN Subset aus humanem Tumorgewebe isoliert werden. Dieses besaß Eigenschaften antigenpräsentierender Zellen (APC) und konnte unspezifische sowie spezifische antitumoröse T-Zellreaktionen induzieren. In den letzten Jahren konnten zwar viele Funktionen einzelner TAN-Subsets beschrieben werden. Welche TAN-Subsets jedoch aus welchen Zellen entstehen, ist bis dato noch nicht geklärt. Daher ist das Ziel dieser Arbeit einerseits eine holistische Aufarbeitung des aktuellen Wissens über den Einfluss von TAN auf die Tumorgenese. Außerdem wird ein neuartiges

Experimentalmodell vorgestellt, welches unter Zuhilfenahme eines CAM-Modells Antworten bezüglich der Herkunft von TAN liefern könnte.

3. Einleitung:

Bereits vor über einem Jahrhundert wurde von Virchow erstmals das Auftreten eines entzündlichen Infiltrats im Stroma von Tumorerkrankungen beobachtet. (DeNardo et al. 2010) Mittlerweile ist bekannt, dass in nahezu jeder Neoplasie ein variabel ausgeprägter Entzündungsprozess abläuft. Dieser ist manchmal nur mittels spezieller Antikörper detektierbar andernfalls auch mittels histologischen Standardfärbungen deutlich zu erkennen. (Pagès et al. 2010). Lange war man überzeugt, dass dieser Prozess einen Versuch des Organismus darstellt, die maligne Entartung zu eliminieren, jedoch deutet eine Vielzahl von Daten darauf hin, dass das Auftreten eines entzündlichen Infiltrats im Tumor microenvironment paradoxerweise mit einer schlechteren Prognose des Krankheitsverlaufs verbunden war. (deVisser et al. 2006; Shaul and Fridlender 2019)

Dies wurde bereits von Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg zur Jahrtausendwende vermutet, welche auf der Suche nach einer Erklärung für die erstaunliche Vielfalt verschiedener Tumorentitäten, die *hallmarks of cancer* definierten. (Hanahan and Weinberg 2000) Mittlerweile versteht man darunter die biologischen Fähigkeiten, welche von malignen Zellen im Verlauf ihrer Entartung erworben werden müssen um schlussendlich das klinische Bild einer malignen Erkrankung ausbilden zu können.

Dazu zählen:

- Unabhängigkeit von äußeren Wachstumsstimuli
- Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Faktoren
- Hemmung des Zelltodes
- Etablierung replikativer Immortalität
- Aktivierung der Angiogenese,
- Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung.

Weiters waren sie mit die Ersten welche darauf hinwiesen, dass es möglicherweise unzureichend sei Tumore als Gewebe bestehend aus rein homogenen entarteten Zellen zu betrachten. Tumorerkrankungen beinhalten ebenfalls eine Vielzahl von nicht malignen Zelltypen, u.a Fibroblasten, Endothelzellen, und diverse Zelltypen des Immunsystems. Diese Zellen interagieren konstant miteinander (*cross-talk*). Zum vollen Verständnis der Tumorbologie müsse man ebenfalls deren Interaktionen mit den malignen Zellen miteinbeziehen. (Hanahan and Weinberg 2000)

Eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Beobachtungen bestätigt diese Hypothese. So besteht das TME nicht selten nur zur Hälfte aus Tumorzellen selbst, weshalb der Aufbau von Tumoren mit dem komplexer Organen zu vergleichen ist. (McGarry Houghton 2010; Hanahan and Weinberg 2011; Sionov et al. 2014) Physiologisch dient die Interaktion zwischen den verschiedenen Zellen unter anderem der strengen Regulation von Zellwachstum und Teilung, wodurch adäquate Gewebshomöostase, sowie physiologische Gewebsarchitektur aufrechterhalten und eine normale Organfunktion zu gewährleistet werden kann. (Hanahan and Weinberg 2011) Im Zuge der Krebsentstehung scheinen entartete Zellen zunehmend in der Lage zu sein diese Interaktion zu manipulieren, woraus der sukzessive Erwerb der hallmarks of cancer resultiert, welche in Folge das Voranschreiten der Erkrankung weiter beschleunigen. (Hanahan and Weinberg 2011) Vor allem die Zellen des Immunsystems scheinen starken Einfluss auf diese Akquise zu haben: So ist mittlerweile bekannt, dass sie in der Lage sind, nahezu jedes HOC zu beeinflussen. (de-Visser et al. 2006) Das dies bereits nur für die Fraktion der neutrophilen Granulozyten gilt, möchte ich in den folgenden Kapiteln darlegen. Insbesondere die Beschreibung des *Cancerimmunoeditings* zeigt die essentielle Rolle des Immunsystems im Rahmen des cross-talk auf. (Dunn et al. 2004) Mittlerweile wurden sowohl die cancer-related inflammation (CRI) als kausaler Mechanismus, sowie der Erwerb einer protumorösen Immunsuppression in die HOC aufgenommen. (Hanahan and Weinberg 2011)

3.1. Das Immunsystem und Krebs - Aufkommen und Grenzen der derzeitigen onkologischen Immunotherapie:

Die Elimination von geschädigten oder entarteten Zellen gehört zu den Kernaufgaben des Immunsystems, wodurch dieses als extrinsischer Tumorsuppressor fungiert. (Dunn et al. 2004) Daher ist es überraschend dass eine erhöhte Konzentration von Immunzellen im TME einerseits nicht zwangsläufig mit einer positiven Prognose assoziiert ist, andererseits paradoxerweise in vielen Tumoren sogar mit einer ungünstigen Prognose einhergeht. (de-Visser et al. 2006; Carus et al. 2013; Shaul and Fridlender 2019)

Es scheint unter anderem eine Rolle zu spielen welche spezifischen Immunzelltypen sich im TME befinden. So korreliert eine hohe Anzahl an zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen (*CTL*) oder natürlichen Killerzellen (*NK-Zellen*) mit einer positiveren Prognose. (Pagès et al. 2010; Nersesian et al. 2021)

In manchen Tumorentitäten, u.a Lungenkarziomen, finden sich ähnliche Ergebnisse bei Infiltration durch CD4⁺ T-Helfer-Zellen (*Th-Zellen*). (Wakabayashi et al. 2003; DeNardo et al. 2010; Tay et al. 2020)

Ähnlich wie in nicht-malignen Entzündungen, spielen T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Regulation des Ablauf der Immunreaktion und zytotoxische CD8⁺ CTL stellen die Hauptmediatoren der antitumorösen Immunität dar. (Singhal et al. 2016; Eruslanov 2017)

Der Beschreibung ihrer Funktion und Herkunft widmete sich die onkologische Forschung lange Zeit fast exklusiv, was zum abnehmenden Interesse an anderen Immunzellen führte. Beispielsweise, nahm die Anzahl der Publikationen über die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Tumorzellen nach einem Hoch in den 80'er Jahren rapide ab. (Fridlender and Albelda 2012) Die Fokussierung auf die Funktion und Herkunft spezifischer Zellen im TME führte zur Etablierung einer neuen Forschungsdisziplin, der Immunoonkologie.

Aus oben genannten Gründen finden sich deren größten Erfolge bis dato auf dem Gebiet der T-Zell Forschung. Dazu gehört die Verleihung des Nobelpreises für Physiologie und Medizin im Jahr 2018 an James Allison und Tasuku Honjo für ihre Arbeiten an PDL1 und CTLA-4. Dabei handelt es sich um Liganden für Oberflächenrezeptoren auf T-Zellen, welche deren Funktion blockieren und somit immunsuppressiv wirken, zu deren Produktion Vielzahl von Tumoren in der Lage sind und sich dadurch aktiv der antitumorösen Immunreaktion entziehen. (Latchman et al. 2001; Contardi et al. 2005; Yu et al. 2020) Die Neutralisation durch spezifische Antikörper, sogenannte *Checkpoint Inhibitoren*, verhindert diesen immunsuppressiven Effekt und soll eine stärkere antitumoröse Reaktion gewährleisten. (Leach et al. 1996; Okazaki and Honjo 2007) Die Therapie mittels Checkpoint Inhibitoren ist mittlerweile in klinischer Verwendung. (Pardoll 2012)

Ein weiterer bedeutender Erfolg ist die Etablierung der CAR-T-Zell Therapie u.a bei diffus großzelligem B-Zell-Lymphom: Hierbei werden körpereigene T-Zellen aus Patientinnen/-patientenblut isoliert und genetisch so modifiziert, dass ein artifizieller chimärer T-Zell-Rezeptor (CAR) exprimiert wird, welcher krebsspezifische Antigene erkennt, wodurch nach Rückinfusion eine starke, T-Zellaktivierung und Immunreaktion induziert wird. (Schuster et al. 2018)

Trotz dieser beachtlichen Fortschritte finden sich bei beiden Therapien erhebliche Limitationen bezüglich ihrer Effektivität und/oder Anwendbarkeit. So ist die Ansprechrate auf eine Therapie mit Checkpoint Inhibitoren in vielen Fällen gering. (Chen et al. 2018, Bai et al. 2020) Als Beispiel hierfür dient die diesbezügliche Therapie malignem Melanom, die erste Tumorentität mit einer Zulassung für CPI-Therapie. (Cameron et al. 2011) Trotz guter Er-

folge in manchen Fällen, kommt es bei der Mehrzahl der Patientinnen/Patienten entweder zu keinem Ansprechen oder zum Auftreten von Therapierefraktärität im Verlauf. (Klemen et al. 2019)

Im Rahmen einer CAR-T-Zell Therapie können schwerste, potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkungen auftreten (u.a. Zytokinsturm im Rahmen eines CRS, Zytopenien und febrile Neutropenie). (Kroschinsky et al. 2017; Schuster et al. 2018)

Der reine Fokus auf die Beeinflussung von Effekten des adaptiven Immunsystems scheint demnach nicht auszureichen, um neuartige Therapiemethoden so zu etablieren, dass sie nicht nur additiv zu herkömmlichen zytotoxischen Therapien (Radiotherapie, Chemotherapie) gegeben werden, sondern auch eine effektive Alternative zu diesen darstellen können. Zusätzlich ist eine starke Aktivität des adaptiven Immunsystems nicht zwangsläufig mit einer besseren Prognose in allen Tumorentitäten verbunden. Beispielsweise korreliert eine Infiltration von CD4⁺ Zellen in Brust- und Nierentumoren mit einer ungünstigeren Prognose. (DeNardo et al. 2010)

Weitere widersprüchliche Ergebnisse über die Rolle von CD4⁺ Zellen lieferten Experimente am HPV16 Mausmodell: Bei diesem etablierten Tumormodell wird, infolge der Expression von HPV16-Onkogenen in den basalen, teilungsfähigen Keratinozyten der Haut sowie der Zervix, die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen beobachtet. (Arbeit et al. 1996; Coussens et al. 1996) Diese verläuft identisch wie im Mensch über Hyperproliferation und Dysplasie hin zum Karzinom. (Smith-McCune et al. 1997) CD4⁺ Zelldefizienz in diesen Mäusen führt zu einer verzögerten und insgesamt leicht reduzierten Entwicklung maligner Pathologien der Haut. (Daniel et al. 2003) In weiblichen, Östrogen-behandelten Mäusen kommt es bei CD4⁺ Defizienz jedoch zu einer um 20% gesteigerten Inzidenz eines Zervixkarzinoms und einer 10-fach größeren Tumormasse im Vergleich zur Kontrolle. (Daniel et al. 2005)

Für andere CD4⁺ Zellsubsets wurde eine klar tumorfördernde Wirkung beobachtet. So haben CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen (*Treg*) direkten Einfluss auf die Tumorphprogression. (Sionov et al. 2014) Ihr Vorkommen im pankreatischen duktaalen Adenokarzinom sowie im nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinom (*non small cell lung cancer - NSCLC*) ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Dies erreichen sie u.a. über einen hemmenden Einfluss auf intratumorale CTL- und NK-Effekte mittels TGF- β sowie IL-10-Sekretion und Expression von CTLA-4. (DeNardo et al. 2010)

Auch Ergebnisse der epidemiologischen Forschung lassen keine Rückschlüsse auf die genaue Funktion des adaptiven Immunsystems im Rahmen der Tumorgenese zu. (Ha-

nahan and Weinberg 2011) So weisen HIV- und Transplantpatientinnen/-patienten im Zuge ihrer Immunsuppression zwar ein höheres relatives Risiko (RR) für die Entstehung gewisser Malignome auf. Dabei handelt es sich allerdings ausschließlich um Virus assoziierte Tumoren (u.a EBV-NHL, HHV8-Kaposi Sarkom, HPV assoziierte Plattenepithelkarzinome), die vor allem dadurch entstehen, dass der Organismus durch die Immunsuppression nicht in der Lage ist die zugrunde liegende virale Infektion adäquat zu beseitigen. (Boshoff and Weiss 2002) Gleichzeitig weisen immunsupprimierte Patientinnen/Patienten allerdings teilweise ein $RR < 1$ für manche nicht viral assoziierten Tumoren (Mamma-Ca, Blasen-Ca, Prostata-Ca) auf, was impliziert, dass diese Personen ein geringeres Risiko als die nicht immunsupprimierte Allgemeinbevölkerung haben, diese Malignome zu entwickeln. (deVisser et al. 2006)

Das adaptive Immunsystem scheint somit durchaus in der Lage zu sein, protumoröse Effekte zum Nachteil des Patientinnen/Patienten auszuüben. Wie sich gezeigt hat, vermitteln sie dies u.a durch die Kontrolle der Effekte von Zellen des angeborenen Immunsystems. (DeNardo et al. 2010) Beispielsweise induzieren $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ Treg-Zellen durch die Sekretion von IL10 und TGF- β die Bildung von immunsuppressiven myeloischen Subsets. (Tiemessen et al. 2007)

Die Prävalenz myeloischer Zellen im Tumor ist häufig mit einer schlechten Prognose verbunden. (Shaul and Fridlender 2019) Zwar ist für manche Subsets, wie die oben erwähnten NK-Zellen, in manchen Tumorentitäten eine Korrelation mit einer besseren Prognose bekannt. (Hanahan and Weinberg 2011; Nersesian et al. 2021) Das Gegenteil findet sich allerdings für eine Vielzahl von anderen Zellen der myeloischen Linie. Beispielsweise korreliert eine Infiltration von Mastzellen (MC) in Lungenadenokarzinomen und Melanomen sowie eine Infiltration von Makrophagen in Mammakarzinomen mit einer ungünstigen Prognose einher. (Leek et al. 1996; Leek et al. 1999; Imada et al. 2000; Ribatti et al. 2003)

Weiters findet man bei Tumorpatientinnen/-patienten allgemein häufig eine abnorme Zusammensetzung und Anzahl von zirkulierenden Leukozyten. Bedingt ist dies u.a durch den Tumor selbst welcher in der Lage ist, potente Zytokine (u.a G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8) sowie CC- und CXC- Chemokine (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1, CXCL6) zu produzieren. Zu deren Effekten gehört unter anderem eine gesteigerte Produktion myeloischer Zellen in und Mobilisation aus dem Knochenmark ins Blut. (Sionov et al. 2014) Dies führt in Tumorpatientinnen/-patienten zur Induktion einer Neutrophilie, welche wiederum in vielen Tumoren (u.a Lunge, Melanom, Nierenkarzinom) mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Ein lange verwendeter onkologischer Prognosefaktor ist das Neutrophil-to-Lymphocyte-Ratio (NLR). Ein höheres NLR korreliert häufig aggressiveren oder fortgeschritte-

neren Tumoren, gemessen durch ein höheres TNM-Stadium. (Shaul and Fridlender 2019)

Im Zuge der Neutrophilie findet man nicht nur einen Anstieg reifer, sondern auch unreifer Vorstufen in der Zirkulation (Almand et al 2001; Uribe-Querol and Rosales 2015)

Bei der Analyse des Knochenmarks von Melanom-Mäusen findet sich ein isolierter Anstieg der von frühen unipotenten neutrophilen Vorläuferzellen (NeP-Zellen), teilweise mit Stammzellcharakter. In bestrahlten Mäusen sind diese Zellen ebenfalls zum „*Home-ing*“ in das Knochenmark in der Lage und führen so zum selektiven Auftreten von Neutrophilen in der Zirkulation. Somit sind NeP-Zellen in der Lage in reifere Neutrophile zu differenzieren und in die Zirkulation zu migrieren. Dessen Zunahme während einer Tumorerkrankung würde die Neutrophilie erklären. Interessanterweise findet man erhöhte Konzentrationen zirkulierender humaner NeP-Zellen (hNeP) im Blut von Melanompatientinnen/-patienten. In gängigen Tumormausmodellen üben sie des weiteren protumoröse Effekte aus. So exprimieren sie u.a PD-L1, sind also zur Aktivierung des Immuncheckpoints auf T-Zellen und folglich zur Immunsuppression in der Lage. (Zhu et al. 2018)

Mit diesem Ergebnis korreliert eine Vielzahl von Analysen des Bluts von Tumorpatientinnen/-patienten, welche darauf hinweisen, dass es im Zuge der Neutrophilie auch zum Auftreten unreifer myeloischer Vorläuferzellen kommt, welche immunsuppressive, protumoröse Eigenschaften besitzen. (Fridlender and Albelda 2012; Gabrilovich et al. 2012; Uribe-Querol and Rosales 2015; Umansky et al. 2016)

Dadurch sind diese Zellen in der Lage die antitumoröse Reaktion des adaptiven Immunsystems negativ zu beeinflussen. (Almand et al. 2001; Diaz-Montero et al. 2008; Solito et al. 2011; Keskinov and Shurin 2015; Umansky et al. 2016) Als Resultat der Akkumulation von immunsuppressiven Leukozytensubsets kommt es zur funktionellen Hemmung von T-Zellen. Dies wird u.a. durch eine Verminderung der lokalen Arginin- und Cysteinkonzentrationen (notwendig für T-Zellproliferation und Aktivität), Produktion von NO und ROS (Nitrierung/Oxidation des TCR), Produktion von IL-10 und TGF- β (Hemmung der Entzündungsreaktion) sowie Expression von PD-L1 (T-Zell-Apoptoseinduktion) erreicht. (Ostrand-Rosenberg 2010; Gabrilovich et al. 2012; Pickup et al. 2013; Noman et al. 2014; Parker et al. 2015; Kumar et al. 2016) Hierbei ist für diese Arbeit besonders relevant, dass diese Effekte auch von reifen neutrophilen Subsets verursacht werden können und diese Zellen in früheren Publikationen fälschlicherweise zu den unreifen, immunsuppressiven myeloischen Zellen gezählt wurden. (Shaul and Fridlender 2019) Jedoch konnte gezeigt werden, dass reife neutrophile Granulozyten teilweise die T-Zellproliferation und Zytokinfreisetzung stärker hemmen, als ihre unreifen Varianten. (Lang et al. 2018)

Die beschriebenen Mechanismen sind möglicherweise der Grund für die teilweise geringen Therapieerfolge im Rahmen bisheriger immuno-onkologischer Verfahren. (Umansky et al. 2016) Eine Neutralisation des PD-L1 mittels Antikörper blockiert lediglich einen der zahlreichen erwähnten Mechanismen, welche den manipulierten myeloischen Zellpopulationen zur Verfügung steht, um eine Immuntoleranz des Tumors zu gewährleisten. Dies erklärt auch die unzureichenden Therapieerfolge im Rahmen von Experimenten mit Tumorstimmungsimpfungen, welche theoretisch eine effektive therapeutische Strategie darstellen sollten. (Rosenberg et al. 2004) In der Praxis allerdings beobachtete man leider nur eine geringe Induktion von antitumorösen T-Zellen, welche oftmals nicht in der Lage sind, den Tumor zu infiltrieren, oder nur geringe Avidität für das jeweilige Antigen besitzen. (deVisser et al. 2003; Rosenberg et al. 2004) Eine Erklärung dafür wäre, dass im Rahmen der Tumorstimmungsprogression eine systemische, von myeloischen Zellen getragene Immunsuppression etabliert wird, welche die Funktion der T-Zellen soweit unterminiert, dass selbst die bisherigen pharmazeutischen Strategien nicht in der Lage sind adäquate adaptive antitumoröse Reaktionen zu ermöglichen. (Umansky et al. 2016)

3.2. Chronische Entzündung und myeloische Zellen im TME:

Wenn im Zuge der unkontrollierten Teilung neoplastischer Gewebe die Versorgung mit Sauerstoff oder Nährstoffen nicht mehr ausreichend ist, kommt es in manchen Regionen des TME zu nekrotischen Prozessen. Ähnlich wie das Auftreten des Immuninfiltrats wurde dies lange als positiv betrachtet, mit der Begründung, dass vermehrter Zelluntergang einen bremsenden Effekt auf das unkontrollierte Wachstum ausüben würde. (Hanahan and Weinberg 2011) Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Prozesse miteinander zusammenhängen. So produzieren Zellen im Zuge ihres nekrotischen Absterbens u.a den Faktor IL-1 α produzieren. Dieses wiederum wirkt in benachbarten Geweben als proliferativer Stimulus, wodurch potentiell entartete Zellen ein zusätzliches, zellteilungsförderndes Signal erhalten. (Grivennikov et al. 2010)

Außerdem sind die beiden IL-1 Formen (IL-1 α , IL-1 β) äußerst potente pro-inflammatorische Zytokine. Ihre Freisetzung stellt oftmals den Beginn einer Entzündungsreaktion dar, und erfolgt im Rahmen einer Störung der Gewebshomöostase, der Gewebsintegrität sowie bei Infektionen. (Di Paolo and Shayakhmetov 2016) Dadurch kommt es einerseits zur Rekrutierung von myeloischen Zellen in das betroffene Gewebe. (Rider et al. 2011) Andererseits fördern IL-1-Signale die Fähigkeit von dendritischen Zellen (DC) T-Zellen zu aktivie-

ren und beeinflussen außerdem die Differenzierung und Funktion von CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten direkt. (Van Den Eeckhout et al. 2021)

Über die Nekrose-induzierte IL-1 α Freisetzung werden somit beide Arme des Immunsystems maßgeblich rekrutiert und/oder beeinflusst. Befindet sich die Nekrose in Tumorgewebe, werden diese Prozesse auch maßgeblich durch die erwähnten Mechanismen beeinflusst, welche schlussendlich das Auftreten von Neutrophilie und unreifen myeloischen Zellen mit immunsuppressiven Effekten bedingten. (Umansky et al. 2016) Es resultiert ein entzündliches Infiltrat variablen Ausmaßes, welches das histologische Korrelat der krebsassoziierten Entzündung (*CRI*) darstellt. (Colotta et al. 2009; DeNardo et al. 2010; Uribe-Querol and Rosales 2015)

Diese Beobachtungen erwecken den Eindruck, dass entstehende Tumore nekrotische und entzündliche Prozesse tolerieren, um dadurch Zugriff auf weiter pro-tumoröse Einflüsse zu bekommen. (Hanahan and Weinberg 2011) Die Vorstellung einer rein passiven Toleranz der Nekrose durch den Tumor scheint jedoch nicht auszureichen, denn die entarteten Zellen leisten eben selbst aktiv einen großen Beitrag zur Initiierung und Aufrechterhaltung der Entzündungsantwort.

Neben der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen und dem proinflammatorischen Beitrag der einer allfällig auftretenden Nekrose geschieht dies mitunter durch die direkte Schädigung benachbarter nicht entarteter Zellen, wodurch es zur Freisetzung von *damage associated molecular patterns* (DAMP's) kommt. (Sionov et al. 2014; Uribe-Querol and Rosales 2015; Galdiero et al. 2018)

Über alle diese Mechanismen erfolgt die Rekrutierung von neutrophile Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen sowie NK-Zellen in das Tumorgewebe. Dies geschieht in einer Art, die der einer infektiionsbedingten Immunreaktion gleicht. Diese erste Verteidigungswelle dient zur Schadensbegrenzung und bereitet die Aktivierung spezifischerer Immunreaktionen des erworbenen Immunsystems vor. (deVisser et al. 2006; McGarry Houghton 2010) Im Laufe der Entzündungsreaktion spielen myeloischen Zellen eine weitere wichtige Rolle bei der Beendigung der Abwehrreaktion und der anschließenden Wundheilung, infolge derer es zur Re-etablierung der Gewebshomöostase kommt. Mitunter die Aktivierung diese Mechanismen wird durch Malignome forciert, wodurch diese u.a. ein Umstrukturierung der extrazellulären Matrix sowie die Neubildung von Gefäßen erreichen. (Galdiero et al. 2018)

Es ist nicht zuletzt die Ähnlichkeit dieser ablaufenden Prozesse die deutlich macht, warum die schützende Funktion des Immunsystems zunächst lange Zeit auch als positiv in Bezug

auf maligne Erkrankungen betrachtet wurde. Vergleicht man die Ursachen der Induktion, lässt sich jedoch ein gravierender Unterschied zwischen „physiologischen“ Entzündungsreaktionen und der CRI feststellen. Im Rahmen Ersterer erfolgt die Rekrutierung von Immunzellen als Reaktion von geschädigten Zellen auf das auslösende Agens, de facto ungewollt von diesem. Gegenteiliges ist bei der CRI. Das hier ursächliche Agens, die maligne entarteten Zellen, sind durch die eigene Produktion proinflammatorische Mediatoren nicht unerheblich selbst direkt für die nachfolgende (chronische) Immunreaktion verantwortlich. (McGarry Houghton 2010; Stairs et al. 2011 Umansky et al. 2016 Galdiero et al. 2018)

Akute und chronische Entzündung können nicht nur anhand ihrer Dauer und der Möglichkeit zur Beendigung des Prozesses unterschieden werden. Zusätzlich differieren diese bezüglich ihres zellulären Profils, der Zusammensetzung des jeweilig vorkommenden Zytokinmilieus, sowie in der Aktivität spezifischer Signalpathways. (deVisser et al. 2006) Wie eingangs erwähnt führt die Unfähigkeit eine akute Entzündung zu beenden zum Auftreten von chronisch aktivierten Zellen des angeborenen Immunsystems, deren produzierte Faktoren nun zur T-Zell-Dysfunktion führen. (Schmielau and Finn 2001; Umansky et al. 2016)

Die weiterhin über proinflammatorische Moleküle befeuerte, jedoch nun vermehrt in ihrem effektiven Ablauf behinderte Entzündungsreaktion, kann dann nicht mehr effektiv resolviert werden, wobei die nun chronisch freigesetzten Effektormoleküle der Immunzellen (u.a. Proteasen, freie Radikale) zu einer massiven Schädigung und Umbau der Gewebsarchitektur führen und schlussendlich in Protein und DNA-Veränderungen münden, eine Tatsache die sich auch bei non-malignen entzündlichen Erkrankungen wie der chronic obstructive pulmonary disease (COPD) beobachten lässt. (deVisser et al. 2006; Bhat et al. 2015)

Die dadurch entstehende Genominstabilität ist mittlerweile als eine der *enabling characteristics* anerkannt, welche die maligne Entartung initiieren und deren Progression fördern. (Hanahan and Weinberg 2011)

Diese Effekte werden weiters dadurch verkompliziert, dass neben dem Tumor auch die rekrutierten Immunzellen zur Produktion der rekrutierenden Faktoren durch diesen angeregt werden können. (Labrousse et al. 2004) Durch diese auto- und parakrinen Feedback-Schleifen entsteht eine sukzessive Potenzierung der malignen Progression. (Umansky et al. 2016) Die tumor-assoziierten myeloischen Zellen werden so unter anderem zur Produktion großer Mengen an Chemokinen (CCL2/5/17/22, CXCL1/2) angeregt, über welche immer neue Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems in das TME gelockt werden. (Friedlender and Albelda 2010; Uribe-Querol and Rosales 2015) Dort angekommen drängen die freigesetzten Mediatoren diese Zellen zur Umwandlung in einen, der

Tumorprogression förderlichen Phänotyp (z.B. Th2-Zellen, Treg-Zellen und myeloid-derived-suppressor-cells) (Stathopoulos et al. 2010; Wu et al. 2012; Sionov et al. 2014) Zusammengefasst generieren Tumoren über diese Mechanismen ein entwicklungsbegünstigendes Milieu, einerseits durch die Etablierung einer chronischen Entzündung, andererseits durch die Manipulation der beteiligten Zellen in dem Sinn, dass diese selbst maßgeblich an der Rekrutierung weiterer Immunozyten beteiligt sind.

Wegen ihrer multifaktoriellen Beeinflussung der Tumorprogression, handelt es sich bei der CRI um die zweite Hälfte der enabling characteristics der hallmarks of cancer. (Hanahan and Weinberg 2011) Seit langem deutet eine Vielzahl an klinischen, experimentellen und epidemiologischen Daten auf eine Assoziation zwischen systemischer Entzündung und malignen Prozessen hin. (Murdoch et al. 2008) So gehen Tumorerkrankungen, ähnlich wie schwer verlaufende Infektionskrankheiten, oftmals mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust (B-Symptomatik) einher. Symptome und Biomarker der Entzündung haben weiters prädiktiven Wert vor allem in Bezug auf das Patientinnen/-patientenüberleben und Krankheitsrezidivierung. (Clarke et al. 2011) Circa 20% aller Tumore werden durch chronische Entzündung induziert, wozu lösliche Entzündungsmediatoren und Immunozyten maßgeblich beitragen. (Galdiero et al. 2018) In diesem Rahmen spielt auch die chronische Aktivierung von zentralen Signaltransduktionswegen (Pathways) der Entzündung eine wichtige Rolle. So führt die Aktivierung des NF- κ -B-Pathways sowohl in Tumorzellen selbst, wie auch in non-malignen Zellen des TME zur direkten und indirekten Förderung der Tumorentwicklung und Progression u.a. durch die Wirkung von antiapoptotischen Mitgliedern der NF- κ -B Familie auf Tumorzellen. (deVisser et al. 2006; Clarke et al. 2011; Sionov et al. 2014)

Eine mittlerweile länger bekannte Population protumoröser myeloischer Zellen ist die der *myeloid derived suppressor cells* (MDSC). Dabei handelt es sich um eine heterogene Population unreifer myeloischer Zellen, bestehend aus einer monozytären und einer granulozytären Untergruppe (Subset). Ihnen ist gemein, dass sie in der Lage sind antitumoröse T-Zell Reaktionen zu unterdrücken. Sie wurden zunächst in der Zirkulation, der Milz und im Tumor-microenvironment von tumorerkrankten Mäusen anhand ihrer CD11b⁺ Gr1⁺ Expression beschrieben, wobei die polymorphonukleäre Fraktion Ly6G⁺ (PMN-MDSC), die monozytäre Fraktion hingegen Ly6C⁺ ist (M-MDSC). (Fridlender and Albelda 2012; Bronte et al. 2016; De Sanctis et al. 2016; Umansky et al. 2016) Ähnliche Zellen sind auch im Menschen vorhanden. Hier werden LIN⁻ HLADR⁻ CD11b⁺ CD14⁻ CD15⁺ CD33⁺ Zellen als

PMN-MDSC und LIN⁻ HLADR⁻ CD11b⁺ CD14⁺ CD15⁻ Zellen als M-MDSC definiert. (Gabrilovich et al. 2012; Kumar et al. 2016) Es handelt sich hierbei eben um jene myeloischen Zellen, auf deren immunsuppressive Funktion oben näher eingegangen wurde (u.a. TCR-Oxidierung/Nitrierung, PD-L1 Expression, IL-10 und TGF- β Produktion) (siehe S. 11) Über einen physikalischen Trennmechanismus konnte eine alternative Beschreibung dieser Zellen erfolgen, im Rahmen derer sich eine morphologische Besonderheit der granulozytären Zellen feststellen lässt: Mittels Dichtezentrifugation von humanem Blut ist es möglich, Leukozyten in Fraktionen höherer (HD) und niedrigerer (LD) Dichte zu trennen. Erfolgt dies mit dem Blut gesunder Spenderinnen/Spender, befinden sich die neutrophilen Granulozyten in der HD-, die mononukleären Zellen in der LD-Fraktion. Hingegen bei Krebspatientinnen/-patienten beobachtete man das vermehrte Auftreten von neutrophilen Granulozyten in der LD-Fraktion. Interessanterweise hat sich gezeigt, dass mit dem Verlauf der Krankheitsprogression eine Zunahme dieser Zellen einhergeht. Auch die, mittels Phänotypisierung durch Oberflächenmarkerexpression definierten, M-MDSC sowie PMN-MDSC sind im Blut von Krebspatientinnen/-patienten gehäuft vorzufinden, deren Konzentration steigt mit dem Krankheitsverlauf sukzessive an bzw. sinkt nach Tumorresektion rasch ab und diese Zellen korrelieren ebenfalls mit einer ungünstigeren Prognose. (Jayaraman et al. 2012; Wang et al. 2013; Talmadge and Gabrilovich 2013; Schilling et al. 2013; Weide et al. 2013; Zhang et al. 2013; Jiang et al. 2014)

Der Vergleich von HD-Neutrophilen (HDN) und LD-Neutrophilen (LDN) hat gezeigt, dass sich diese in ihren Effekten eindrucksvoll unterscheiden. So sind HDN in der Lage Tumorzellen *in vitro* effektiv abzutöten, im Gegensatz dazu haben LDN überhaupt kein zytotoxisches Potential. (Sagiv et al. 2015) Auch lassen sich Letztere weiter in zwei Subsets unterscheiden, wobei eines aus reifen segmentkernigen Neutrophilen, das andere aus unreifen stabkernigen (*band-stage*) Neutrophilen besteht, welche den in der Maus beschriebenen G-MDSC ähneln. (Uribe-Querol and Rosales 2015; Eruslanov 2017; Lang et al. 2018)

Im Zuge adoptiven Transfers konnte gezeigt werden, dass PMN- und M-MDSC in Tumoraläsionen migrieren und dort in der Lage sind, die antitumoröse T-Zell-Aktivität zu hemmen. (Kusmartsev et al. 2005; Lang et al. 2018) Die *in vitro* Applikation von Tretinoin (ATRA) führte in beiden Subsets zur Differenzierung in reife Zellen. (Almand et al. 2001; Gabrilovich et al. 2001) Die Verabreichung von ATRA führte in Tumor-erkrankten Mäusen zu einer signifikanten Abnahme der MDSC-Fraktion, in Kombination mit einer verbesserten antitumorösen Immunreaktion. (Kusmartsev et al. 2003; Nefedova et al. 2007) ATRA-Verabrei-

chung im Rahmen von Brustkrebs, führte bei Krebspatientinnen/-patienten zu einer verbesserten Differenzierung von DC. (Gervais et al. 2005; Nefedova et al. 2007)

Lange wurde davon ausgegangen, dass die PMN-MDSC die einzigen granulozytären Zellen sind, die an der tumorinduzierten myeloischen Immunsuppression eine Rolle spielen. Trotz der Kenntnis über das zahlreiche Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten im TME war ein, den am protumorösen Prozess beteiligten tumor associated macrophages (TAM), vergleichbarer tumor associated neutrophil (TAN) lange nicht bekannt. Auch bei den Zellen der T-Zell-suppressiven unreife LDN Fraktion, die auch als G-MDSC's bezeichnet werden, handelt es sich nicht um TAN, da diese aus dem Blut von Tumorpatientinnen/-patienten und nicht dem TME selbst isoliert wurden. (Eruslanov 2017) Auch wenn diese Zellen durch tumor-produzierte Faktoren in ihrer Funktion beeinflusst werden, wäre es unzureichend anzunehmen, dass diese zirkulierenden Zellen mit TAN gleichzusetzen sind, welche konstant dem TME und den dort hochkonzentriert vorliegenden Faktoren ausgesetzt sind. (deVisser et al 2006; Sionov et al. 2014; Eruslanov 2017) Außerdem besteht aufgrund des Mangels eines spezifischen MDSC-Markerprofils immer noch Unsicherheit, ob MDSC im humanen TME, vor allem im kritischen Frühstadium überhaupt vorkommen. (Fridlender et al. 2009; Eruslanov 2017) Jedoch scheinen MDSC bzw. deren PMN-Fraktion aufgrund der oben genannten protumorösen Mechanismen, die ebenfalls für unreife LDN Fraktion bestätigt wurden, zumindest in der Zirkulation eine Rolle zu spielen. (Uribe-Querol and Rosales 2015; Zhu et al. 2018)

Transkriptomanalysen zeigten jedoch, dass es sich bei Neutrophilen im Tumor (*tumor-associated neutrophils* TAN) nicht um gewebsbasierte G-MDSC sondern um eine eigene Population handelt. (Fridlender et al. 2012) Des Weiteren ähneln sich zirkulierende Neutrophile und G-MDSC weitaus mehr, als TAN dies tun. (Fridlender and Albelda 2012)

Ein großer Anteil der Leukozyten im TME wird in vielen Fällen durch TAM gebildet (Mantovani et al. 2002) Wie erwähnt ist bei diesen Zellen lange ein protumoröser, progressionsfördernder Phänotyp bekannt, jedoch auch, dass sie unter gewissen Umständen zu antitumorösen Reaktionen in der Lage sind. Der Grund liegt in ihrem hohen Maß an Plastizität, dass es ihnen ermöglicht auf die Stimulation durch unterschiedliche Faktoren eine Vielzahl verschiedener Phänotypen einzunehmen, die verschiedene Aufgaben im Gewebe wahrnehmen. (Galdiero et al. 2018)

Dieses enorme Potential auf spezifische Stimulation mit der Ausbildung eines spezifischen, der Situation dienlichen Phänotypen zu reagieren, spielt eine wichtige Rolle in der Biologie von gesundem Gewebe. So überwachen gewebsständige Makrophagen konstant

das interstitielle Milieu und passen ihre Effektorfunktionen den jeweiligen Gewebsbedingungen an. Dadurch tragen sie u.a zur Aufrechterhaltung und Regulation adäquater Gewebshomöostase bei. (deVisser et al. 2006; Galdiero et al. 2018)

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion, erfolgt die klassische Aktivierung von Makrophagen durch Zytokine wie Interferon- γ (*INF- γ*), welches initial u.a. von rekrutierten NK-Zellen produziert wird. (DeNardo et al. 2010) Dadurch kommt es zur Polarisation in den klassischen M1-Phänotyp, der einerseits große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen (IL1- β , IL6, TNF- α , IL-12) freisetzt, über CxCL9 und CxCL10 weitere NK Zellen rekrutiert, sowie eine Th1-Reaktion induziert. (Sionov et al. 2014) Letztere ist von besonderer Wichtigkeit, da das initiale INF- γ Signal der NK-Zellen für eine vollständige Immunreaktion verstärkt werden muss. Dies erfolgt über eine INF- γ induzierte Freisetzung von IL-12 durch M1-Makrophagen und der Etablierung einer Th1-Reaktion. (Bancroft and Schreiber 1991; Dunn et al. 2004; Galdiero et al. 2013) Die Zytokine der Th1-Reaktion fördern auch die zytotoxischen, proinflammatorischen Effekte der Makrophagen weiter, sowie deren Fähigkeit zur Antigenpräsentation. (Suzuki et al. 1988; Zhu and Paul 2008) Jedoch, wie alle Effekte myeloischer Zellen, können diese unspezifischen Mechanismen auch zur Schädigung von gesundem Gewebe führen. So sind pathologische Überaktivierungen von M1 mit der Etablierung von Autoimmunpathologien assoziiert, weshalb der Organismus mittels immunsuppressiven Programmen dazu befähigt sind, dieser entgegen zu wirken. (DeNardo et al. 2010)

Kommt es in einem Gewebe zu maligner Entartung, könnten Makrophagen durch die Zytokine einer T-Helfer-1-Reaktion und dem umgebenden Stroma in einen M1-Phänotyp polarisiert werden, welcher in der Lage ist naszente Tumorzellen zu eliminieren. (Galdiero et al. 2018) Dadurch wird ein Teil des antitumorösen Effekts der „Eliminationsphase“ des Cancer-Immunoeditings vermittelt. (Dunn et al. 2004) Kann die entstehende Neoplasie dadurch nicht vollständig unterbunden werden, geht der Prozess in die Equilibriumphase über. In dieser kann das Immunsystem das Wachstum der Neoplasie zumindest noch unter Kontrolle halten. (Dunn et al. 2002)

Das Ergebnis dieses scheinbar protektiven Mechanismus ist allerdings fatal. Die unkontrollierte Teilung und zunehmende Mutationsrate der Tumorzellen führt zur Generation einer Vielzahl von genetisch verschiedenen entarteten Zellen. (Hanahan and Weinberg 2011) Der hoch immunogene Teil der Tumorzellen löst eine starke Aktivierung des Immunsystems aus und wird dadurch eliminiert. (Dunn et al. 2004)

Schwach immunogenen Phänotypen entgehen dieser Bekämpfung durch das Immunsystem und haben so die Möglichkeit der weiteren Entartung. (Dunn et al. 2004) An diesem Punkt dient die antitumoröse Reaktion fatalerweise nur noch der natürlichen Selektion. (Eruslanov 2017) Transplantationsexperimente im Mausmodell haben gezeigt, dass es Tumoren, welche in immuninkompetenten Mäusen entstanden sind unmöglich ist, in immunkompetenten Mäusen einen sekundären Tumor zu etablieren. Der umgekehrte Fall existiert nicht. Durch das nicht stattfindende Immunoediting in der defizienten Maus kommt es nicht zur Selektion der schwach immunogenen Phänotypen. Nach der Transplantation treffen diese Tumorzellen nun das erste Mal auf ein funktionales Immunsystem, welches diese nun rasch eliminieren kann. (Smyth et al. 2006)

Durch die klonale Expansion und die Genomstabilität entwickeln sich die schwach immunogenen Tumoren weiter, wobei zusätzliche Fähigkeiten zur Immunsuppression erworben werden. Nun beginnt die „Escape-Phase“, in welcher der Tumor sich aktiv der antitumorösen Immunreaktion entzieht und die infiltrierenden Immunzellen derart manipuliert, dass deren Effekte in Summe seine Progression unterstützen. (Dunn et al. 2002; Hanahan and Weinberg 2011; Sionov et al. 2014; Eruslanov 2017)

In TAM löst diese Manipulation eine alternative Aktivierung aus, bei der es zur Bildung des M2-Phänotyp kommt. Daran beteiligte Faktoren sind IL-4, IL-10, IL-13, M-CSF, TGF- β und abgelagerte Immunkomplexe. Auffällig ist, dass es sich hierbei insbesondere um Zytokine einer Th2-Reaktion handelt. (DeNardo et al. 2010; Wan 2014; Sionov et al. 2015; Galdiero et al. 2018)

Die Quelle der Th-2 Zytokine sind erneut die Tumorzellen selbst, sowie die von diesen beeinflussten Zellen des Immunsystems und Tumorstroma (Galdiero et al. 2018) Ähnlich wie M1 haben auch M2-Makrophagen physiologische Funktionen, welche durch die produzierten Effektormoleküle der M2-TAM ausgedrückt werden. Dabei handelt es sich u.a. um hohe Mengen an immunsuppressiven IL-10, diverse Wachstumsfaktoren (EGF, FGF, TGF- β), Matrix-Metalloproteasen zum Umbau der extrazellulären Matrix (MMP's) und angiogene Faktoren wie VEGF. (Sionov et al. 2014) Charakteristisch ist auch deren Produktion von CCL17, CCL22, CCL24 mit welchen sie sowohl Th2- als auch Treg-Zellen rekrutieren, zu deren Funktion auch die Kontrolle und Resolvierung von Entzündungsprozessen gehört. M2-Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine wie IL-12 nur in geringem Ausmaß, sind schlechte APC's und hauptsächlich an der Regulation von Gewebsremodelling und Angiogenese beteiligt. (DeNardo et al. 2010; Mantovani et al. 2013) Somit

scheint die Rolle der M2-Makrophagen vor allem in der Beendigung einer Entzündungsreaktion und der Regulation der darauf folgenden Reperaturprozesse zu liegen.

Interessanterweise weist die Mehrzahl der aus Tumoren isolierten TAM eben diesen M2 Phänotyp auf, und TAM sind definiert durch die Expression von VEGF, TGF- β , IL-10, Arginase-1. (Sionov et al. 2014)

Die M2-Zellen lassen sich wiederum erneut in verschiedene Subsets mit unterschiedlichen Effekten einteilen. Welches davon ausgebildet wird, scheint von der lokalen Zusammensetzung des Zytokinmilieus abzuhängen: Beispielsweise induzieren IL-4 und IL-13 den M2a-Phänotyp. Dieser produziert hohe Mengen an Arginase-1, erhöht die Kollagensynthese und die Matrixremodelling. Das stark Entzündungshemmende IL-10 fördert die Bildung des hoch immunsuppressiven M2c Phänotyp welcher u.a Matrixkomponenten wie Versican sezernieren kann. (DeNardo et al. 2010) Dies ist besonders interessant, da bekannt ist, dass manipulierte myeloische Zellen nicht nur im Tumor vorkommen, sondern auch Zielgewebe der Metastasierung für die Einnistung von gestreuten Zellen vorbereiten können (*Seed and Soil-Theorie*). Hierbei beobachtete man nicht näher definierte monozytäre Zellen, eben jenes Versican produzierenden und damit die Umkehrung des für die Metastasierung wichtigen epidermal-to-mesenchymal (*EMT*) Programs induzieren. (Sionov et al. 2014) Dadurch scheinen sie gestreuten malignen Zellen die Einnistung und die Ausbildung einer Makrometastase zu erleichtern (*Kolonialisierung*). (Hanahan and Weinberg 2011) Diese verschiedenen Subsets stellen exemplarisch den weitreichenden Aufgabenbereich von Makrophagen dar.

Die ambivalente Rolle, welche myeloische Zellen im Rahmen der Tumorgenese spielen, wurde zunächst nur für Makrophagen und einige weitere Zellen (u.a. MC's, DC's) beschrieben. (Kapsenberg and Kalinski 1999; deVisser et al. 2004; Fridlender et al. 2009) Erst gegen Ende der 2000er Jahre wurde dieser Effekt erstmals auch für neutrophile Granulozyten beschrieben, welche als TAN ebenfalls in ein antitumoröses und ein protumoröses Subset (N1-TAN/N2-TAN) unterteilt werden können. (Fridlender et al. 2009)

Ein Grund für diese, lange unentdeckte Tatsache ist, dass eine Vielzahl der Effekte der CRI über TAM übermittelt werden, weshalb diese lange Zeit im Fokus des wissenschaftlichen Interesses standen. (Galdiero et al. 2018) Das Interesse an der Interaktion zwischen Neutrophilen und Tumorzellen hingegen, nahm nach einer Hochphase Ende der 1980er und Anfangs der 1990er Jahre stark ab. Als Grund wird in der Literatur u.a das steigende Interesse an antitumorösen T-Zell-Effekten genannt. (Fridlender and Albelda 2012) Selbst als sich, im Zuge der Publikation der Hallmarks of Cancer durch Hanahan und Weinberg

und dem darin implizierten essentiellen Einfluss der chronische Entzündung auf die Tumorgenese, ein Paradigmenwechsel vollzogen wurden die tumorassoziierte Neutrophile lange Zeit als reine „bystander“ bezeichnet. Ihre kurze Lebensdauer und die Vermutung mangelnder Plastizität machten es unvorstellbar, dass diese Zellen einen solch lang andauernden, chronischen Prozess signifikant beeinflussen könnten. (McGarry Houghton 2010; Gregory and McGarry Houghton 2011; Hanahan and Weinberg 2011)

Rückblickend wirkt dies auch aufgrund der Tatsache kurios, als dass eine Assoziation zwischen neutrophilen Granulozyten und Prognose im Rahmen einer Tumorerkrankung hingegen schon lange bekannt ist. So wurde bereits 1998 beobachtet, dass alveoläre Neutrophileninfiltration bei bronchoalveolären Karzinomen (BAC) mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist. Außerdem korreliert diese Infiltration auch mit der Konzentration von IL-8 (CXCL8), welches als potentestes Chemokin der Neutrophilenrekrutierung gilt. Hohe Konzentrationen dieses Mediators korrelieren ebenfalls mit reduziertem Überleben. (Bellocq et al. 1998) Die Forschung seit Beginn des neuen Jahrtausends zeigte, dass diverse onkogene Mutationen (u.a Ras) Tumorzellen auch zur Produktion von IL-8 befähigen. (Sparmann and Bar-Sagi 2004; Ancrile et al. 2008; Lazennec and Richmond 2010) Eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten lässt sich in zahlreichen humanen Tumorentitäten beobachten (u.a. nicht-kleinzelliges-Lungenkarzinom (NSCLC), Magen-Karzinom, pankreatisches duktales Adenokarzinom, Urothelkarzinom, Cervixkarzinom, Mammakarzinom) (O’Sullivan and Lewis 1994; Griffiths et al. 1998; Caruso et al. 2002; Gaida et al. 2012; Ilie et al. 2012) In Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen (HNSCC) ist diese Infiltration ein unabhängiger Prognosefaktor für eine reduzierte Rezidivfreiheit und das Überleben. (Dumitru et al. 2011; Trelakis et al. 2011) Ähnliche Ergebnisse zeigten Studien an Nierenzellkarzinomen, pankreatischen Adenokarzinomen und Leberkarzinomen auf. (Donskov et al. 2013; Halazun et al. 2009; Jensen et al. 2009; Reid et al. 2011) Interessanterweise scheint es von der Tumorentität abhängig zu sein ob Neutrophileninfiltration auf eine schlechtere Prognose hindeutet. Im Gegensatz zur Mehrzahl der Tumorentitäten, korreliert ihr Auftreten im TME von Magenkarzinom mit einer positiven Prognose. (Caruso et al. 2002)

Neben der TME-Infiltration lässt sich bei Tumorpatientinnen/-patienten, vor allem in fortgeschritteneren Tumorstadien, häufig eine Neutrophilie im Blut beobachten. Auch diese korreliert in vielen Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose. (u.a bei BAC, Nierenzellkarzinom und malignem Melanom) (Bellocq et al. 1998; Schmidt et al. 2005; Atzpodien and Reitz 2008)

Unlängst beschrieben Zhu et al. eine früh-unipotente neutrophile Progenitorzelle, welche in Maus (NeP) und Mensch (hNeP) zu finden ist. Diese konnte einerseits im Knochenmark, andererseits in niedrigen Konzentrationen auch in der Blut beobachtet werden. Im Melanom-Mausmodell konnte interessanterweise eine Zunahme genau dieser Zellfraktion im Knochenmark festgestellt werden, jedoch nicht von anderen Zellen der myeloischen Linie. Außerdem steigt deren Konzentration in der Zirkulation bei tumorerkrankten Tieren um das 10-fache an. (Zhu et al. 2018) Diese Daten deuten darauf hin, dass die zuvor erwähnte Steigerung der Myelopoese durch Tumor-produzierte Faktoren insbesondere auf die Granulopoese stimulierend wirkt. Weitere Untersuchungen der Gruppe konnten einen protumorösen Effekt des NeP auf die Tumorprogression nachweisen. Spannend ist, dass ein vergleichbarer Prozess im Menschen beobachtet wurde. Auch der hNeP scheint sich im Rahmen eines malignen Prozesses analog zu verhalten: So macht diese Zelle im Blut gesunder Menschen ca. 1% aus, im Blut von Patientinnen/Patienten mit malignem Melanom hingegen findet sich ein Anstieg dieser Fraktion auf 3-9%. Außerdem fördern hNeP-Zellen, infolge einer Injektion dieser in Osteosarkom-induzierte NSG3-Mäuse, insbesondere das frühe Tumorwachstum. (Zhu et al. 2018)

Bereits in früheren Publikationen wurde beschrieben, dass die Malignom-induzierte Beeinflussung der Myelopoese außerdem in der Lage ist, die weitere Entwicklung der GMP-Vorläuferzelle derart zu beeinflussen, dass eine erhöhte Bildung von Tumor-associated neutrophils resultiert. (Casbon et al. 2015) Welches Zellsupset genau den Ursprung dieser darstellt, oder ob, angesichts der gegensätzlichen Effekte von N1- und N2-TAN, die unterschiedlichen TAN-Subsets aus unterschiedlichen Vorläuferzellen entstehen, ist jedoch bis dato ungeklärt. Die Zusammenschau der beschriebenen Funde, lässt zumindest erahnen, dass Tumor-produzierte Faktoren den GMP derart manipulieren, dass es zu einem unphysiologisch hohen Anstieg der hNeP kommt. Allerdings kann bis dato nicht klar festgehalten werden, ob es sich bei diesem Anstieg nicht um eine normale Reaktion des Knochenmarks auf proinflammatorische Stimuli handelt und die eigentliche Manipulation, deren Folge die Bildung protumoröser TAN ist, erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet. Zwar widerspricht dieser Theorie die Tatsache, dass hNeP selbst einen wachstumsfördernden Effekt auf maligne Zellen besitzen, andererseits ist für spezielle antitumoröse TAN Subsets bekannt, dass diese v.a. aus fast vollständig differenzierten neutrophilen Progenitorzellen entstehen, worauf zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Arbeit genauer eingegangen wird. (Singhal et al. 2016) Nichtsdestotrotz zeigen diese Beobachtungen deutlich, dass Zellen der neutrophilen Linie im Rahmen einer malignen Erkrankung sicherlich nicht unbeeiligt sind und ihr Einfluss lange Zeit unterschätzt wurde.

Neben der Neutrophilie existiert ein weiterer prognostischer Marker, welcher mit neutrophilen Granulozyten assoziiert ist - der *Neutrophil-to-lymphocyte-Ratio* (NLR). Zunächst bei Patientinnen/Patienten mit kolorektalem Karzinom (*CRC*) etabliert, wird die NLR mittlerweile, nicht zuletzt aufgrund ihrer einfachen Generierung, bei einer Vielzahl von Tumoren eingesetzt (u.a. hepatozelluläres Karzinom (*HCC*), NSCLC, malignes Melanom, Mammakarzinom) (Schmidt et al. 2005; Walsh et al. 2005; Halazun et al. 2009; Peng et al. 2015, Krenn-Pilko et al. 2014; Pistelli et al. 2015) Ein hohes NLR deutet oftmals auf eine negative Prognose bezüglich des Langzeitüberlebens an. (Paramanathan et al. 2014; Templeton et al. 2014) Dies lässt sich u.a. damit begründen, dass ein erhöhtes NLR mit einer höheren Klassifizierung des Tumors nach dem TNM-System einhergeht. (Guthrie et al. 2013) Daher bestehen durchaus Zweifel an der Aussagekraft des NLR bezüglich der Kausalität. Denn aufgrund des aktuellen Wissenstandes lässt sich auch vermuten, dass eine fortgeschrittene Tumorentität mittels ihrer „proinflammatorischen“ Stimuli eine hohe NLR induziert, jedoch nicht, dass eine hohe NLR zu einem höheren Tumorstadium führt. (Sionov et al. 2014) Dem wiederum widersprechen die zahlreichen mittlerweile bekannten protumorösen Effekte mancher TAN-Subsets, auf welche in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

3.3. Beginn der Erforschung und Erstbeschreibung der TAN:

Trotz der Kenntnis dieser klinischen und epidemiologischen Daten, kam es nicht zuletzt durch Zufall zu jenem Paradigmenwechsel, welcher TAN in den Fokus der immuno-onkologischen Forschung rückte. Studiert man die Literatur vor und nach deren Erstbeschreibung lässt sich dies deutlich erkennen: So fanden sich neutrophile Granulozyten wenn überhaupt, meist am Ende der Aufzählung wenn auf die protumorösen Effekte myeloischer Zellen eingegangen wurde. Das Attribut unbeteiligter „bystander“ blieb ihnen lange erhalten, obwohl beispielsweise der immunstimulatorische Effekt der Bacillus Calmette-Guerin (*BCG*) Therapie bei Blasenkarzinom zu dieser Zeit bereits bekannt war, wie auch der zugrunde liegende Mechanismus, für welchen sich neutrophile Granulozyten als essentiell erwiesen. (Kemp et al. 2005; Herr and Morales 2008; McGarry Houghton 2010)

Der Umbruch wurde durch eine Publikation von Prof. Zvi Fridlender et al. im Jahr 2009 ausgelöst: Wie er mir infolge meiner Kontaktaufnahme im August 2019 erzählte, beschäftigte er sich als Postdoktorand mit der FACS Analyse von CD11b⁺/Gr1⁺ Makrophagen.

Diese wurden aus murinen Tumoren isoliert, wobei in den Versuchstieren zuvor das Zyto-

24

kin TGF- β blockiert wurde. Zunächst verwirrt von den resultierenden Daten stellte er fest, dass sich die Zellen infolge der TGF- β Blockade bezüglich ihrer Größe und Granularität veränderten. Dadurch kam er zu der Annahme, dass es sich dabei nicht um Makrophagen sondern um neutrophile Granulozyten handeln könnte, denen jedoch bis dato kein hohes Maß an Plastizität und eine kurze Lebensdauer nachgesagt wurde. (McGarry Houghton 2010; Galdiero et al. 2018) Der Grund, der diese Verwechslung möglich machte war der verwendete Antikörper für den Marker Gr1. Dieser bindet sowohl den Marker Ly6C als auch Ly6G. (Daley et al. 2008) Wie erwähnt, handelt es sich bei diesen jedoch um das entscheidende Kriterium, mittels welchem murine Makrophagen von neutrophilen Granulozyten differenziert werden können. (siehe S. 15)

Dieser Beobachtung folgten Experimente an verschiedenen Mauslinien und Tumoren mit dem Ziel mögliche funktionelle Unterschiede zwischen TAN infolge der TGF- β Blockade und den TAN der Kontrollgruppe festzustellen. Es waren diese Umstände, welche erstmals aufzeigten, dass TAN ebenso in der Lage sind unterschiedliche Phänotypen auszubilden, analog zu dem bereits für TAM bekannten Modell. Analog zu diesem wurden die Neutrophilen in Folge als N1- bzw. N2-TAN bezeichnet. In der überwiegenden Mehrzahl aller untersuchten Tumoren bzw. Mauslinien konnte beobachtet werden, dass es in unbehandelten Tumoren zur Ausbildung des protumorösen N2-Phänotyp kommt. (Fridlender et al. 2009) Dieser unterstützt durch verschiedene Mechanismen eine Vielzahl der, für die Progression benötigten Hallmarks of Cancer, darunter Wachstumsfaktor-Unabhängigkeit, Angiogenese, ECM-Remodelling, Immunsuppression und die Förderung metastatischer Streuung. (Fridlender et al. 2009; Hanahan and Weinberg 2011)

Interessanterweise führte eine Reduktion des N2-TAN zu verringertem Tumorwachstum sowie erhöhter Aktivierung von CD8⁺ CTL. Auch zeigte sich, dass das nachfolgende verringerte Wachstum selbst bei Abwesenheit von CD8⁺ CTL's auftritt. Überraschenderweise zeigte sich infolge der TGF- β Blockade zeigte sich ein komplett unterschiedliches Bild: Hier kam es zu einer massiven Infiltration des Tumors durch hypersegmentierte neutrophile Granulozyten (infolge als N1-TAN bezeichnet), die hohe Mengen an immunstimulatorischen Cytokinen/Chemokinen (CCL3, CxCL9, CxCL10, IL-12, TNF- α , GM-CSF), sowie weniger T-Zell-suppressive Arginase-1 produzierten. Außerdem konnte ihnen eine verstärkte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen nachgewiesen werden. (Fridlender et al. 2009) Mitunter stimulieren sie durch diese Mechanismen die Rekrutierung und

Aktivierung von CD8-CTL, welche als wichtigste Quelle der antitumorösen Immunität bekannt sind. (Eruslanov 2017)

Im Gegensatz zur Reduktion von N2-TAN führt die Reduktion von N1-TAN zu einer verminderten CD8⁺ Aktivierung. Außerdem kam es infolge der TGF- β Blockade zur einer Erhöhung der Produktion von CC-/CxC-Chemokine im TME und die tumorassoziierten Gefäße exprimieren verstärkt ICAM1, welches zur Extravasation von Immunzellen benötigt wird. (Fridlender et al. 2009)

Dadurch konnte diese Publikation erstmals auf die Plastizität von neutrophilen Granulozyten im Rahmen einer malignen Erkrankung aufmerksam machen. Sie wird mittlerweile von der Fachwelt als „wegweisend“ angesehen. (Galdiero et al. 2018)

Auch die Annahme bezüglich der kurzen Lebensdauer konnte mittlerweile widerlegt werden: Es stellte sich heraus, dass TAN in Kultur ein signifikant längeres Überleben besitzen, als naive neutrophile Granulozyten der Zirkulation. Kultiviert man jedoch beide Zelltypen in Tumormedium (*TCM*), weisen auch beide ein erhöhtes Überleben auf. (Eruslanov et al. 2014)

Als Ursache wird das vermehrte Vorhandensein von proinflammatorischen Zytokinen (u.a. INF- γ , IL-6, IL-8, GM-CSF) angenommen, welche durch Blockade der Apoptose die Lebensdauer von Neutrophilen *in vitro* verlängern können. (Kobayashi et al. 2005; Yoshimura and Takahashi 2007) Damit scheint ein weiterer Hinweis dafür zu existieren, dass maligne Zellen durchaus ein Interesse an der Anwesenheit von Zellen des Immunsystems besitzen und diese bezüglich ihres Phänotyps und ihrer Lebensdauer beeinflussen.

Trotz dieser eindrucksvollen Ergebnisse besteht immer noch viel Unklarheit bezüglich Phänotyp, Funktion und Herkunft von TAN. Da aktuell die meisten Beobachtungen aus Mausmodellen stammen, können diese nur begrenzt auf den Menschen übertragen werden. Grund dafür ist einerseits die unterschiedliche Genetik, andererseits die zur Initiierung eines Tumors im Mausmodell oftmals verwendeten Tumorzelllinien. Diese Zellen haben bereits im Zuge ihrer ursprünglichen Entstehung *in vivo* den Prozess des Immunoeditings durchlaufen, im Zuge dessen sie u.a. ihre immunsuppressiven Fähigkeiten erwarben. (Eruslanov 2017) Außerdem werden Tumorzelllinien häufig danach ausgewählt, wie schnell sie nach Injektion in die Maus einen Tumoren etablieren können. Gerade wenn der, mitunter Jahrzehnte andauernde, Prozess der initialen Tumoretablierung im Menschen erforscht werden soll, spiegelt diese Herangehensweise dies jedoch nicht wieder. Das bereits zuvor erfolgte erfolgreiche Durchlaufen des Cancer-Immunoeditings bewirkt

außerdem, dass die mit diesen Modellen generierten Daten hauptsächlich die Funktionen der Immunzellen in fortgeschrittenen Tumorstadien widerspiegeln, eine Tatsache die insbesondere bei der Erforschung der diversen TAN-Funktionen hinderlich ist. (Eruslanov 2017) Somit scheint das Mausmodell scheint zwar grundsätzlich dazu geeignet zu sein, Mechanismen der Tumor-TAN Interaktion zu beobachten. Jedoch müssen die so erhobenen Daten kritisch betrachtet werden und können lediglich Anhaltspunkte liefern, die das Fundament der Hypothese über die Funktionen im Menschen bilden.

Weder ist beispielsweise die N1/N2-Polarisierung im Menschen bis dato sicher nachgewiesen, noch besteht überhaupt ein einheitlicher Konsens über den Phänotyp von TAN und der G-MDSC. Allerdings weisen humane TAN eine ähnliche Expression gewisser Gene auf, welche Teil der Definition von N2-TAN in der Maus sind. (Shaul and Fridlender 2019) Weiters konnten auch antitumoröse TAN-Subsets aus manchen humanen Tumoren isoliert werden. (Singhal et al. 2016) Daher wird aktuell sehr wohl angenommen, dass auch im menschlichen Organismus eine Ähnliche TAN-Plastizität, wie der in der Maus beobachteten, existiert.

3.4. Der neutrophile Granulozyt - physiologische Entwicklung und Funktion:

Aus in vitro und in vivo Experimenten ist bekannt, dass dieselben Substanzen, mit denen neutrophile Granulozyten u.a. antibakteriell wirken, auch für deren spezifische pro-/antitumoröse Wirkungen verantwortlich sind. (McGarry Houghton 2010) Weiters scheinen auch die sich im Rahmen einer Tumorerkrankung in der Zirkulation akkumulierenden unreifen neutrophilen Zellen wichtige protumoröse Effekte zu vermitteln. (Eruslanov 2017; Zhu et al. 2018; Shaul and Fridlender 2019) Daher ist es sinnvoll die physiologische Funktion und Entstehung dieser Zellen kurz zu beleuchten: Im gesunden Organismus, wirken neutrophile Granulozyten maßgeblich an der akuten Abwehr von Erregern und der Wundheilung mit. Dringen Pathogene in ein Gewebe ein, setzen die dortigen als Reaktion proinflammatorische Mediatoren frei, wodurch ein Entzündungsstimulus entsteht. Die so ins die Zirkulation abgegebenen Zytokine und Chemokine rekrutieren u.a. zirkulierende reife Neutrophile über einen chemotaktischen Gradienten in das geschädigte Gewebe. Dort angekommen eliminieren diese Erreger durch Phagozytose, Sekretion von bakteriziden Stoffen und Produktion von *neutrophil extracellular traps (NET)*. (Powell and Huttenlocher 2015; Uribe-Querol and Rosales) Durch deren Produktion von spezifischen Zyto-/Chemokinen, koordinieren und regulieren sie auch die weitere Entzündungsreaktion. (Scapini et al. 2000; Tecchio et al. 2013) Dadurch wird mitunter die Rekrutierung und endgültige Diffe-

renzung anderer Immunzellen moduliert und somit das Profil des Entzündungsinfiltrats im Gewebe beeinflusst. (Powell and Huttenlocher 2015; Shaul and Fridlender 2017)

Wie alle Zellen der myeloischen Linie entwickeln sie sich über mehrere Schritte aus der hämatopoietischen Stammzelle (*HSC*) im Knochenmark. Diese stellt den Ursprung für alle zirkulierenden Zellen des Knochenmarks da, sowohl denen des lymphatischen und myeloischen Immunsystems, als auch von den nicht immunologischen Zellen wie Erythrozyten und Thrombozyten.

Grob zusammengefasst, differenziert sich die HSC in zwei unterschiedliche Zelltypen:

- *common lymphoid progenitor* (CLP), aus welchem B- und T-Lymphozyten entstehen.
- *common myeloid progenitor* (CMP), aus welchem sowohl die Zellen des myeloischen Immunsystems, als auch die anderen hämatogenen Zellen entstehen.

Während der Entwicklung zu CLP/CMP verliert die HSC die Stammzell-typische Fähigkeit der replikativen Selbsterneuerung sowie deren Omnipotenz. Letztere wird im Verlauf der Differenzierung nach und nach eingegrenzt (Multipotenz), bis schlussendlich eine unipotente Vorläuferzelle entsteht, welche nur mehr einen spezifischen Phänotyp ausbilden kann. So ist beispielsweise der CMP nur noch in der Lage Zellen der myeloischen Linie zu bilden, nicht aber die der Lymphatischen. Der aus dem CMP entstehende GMP stellt die letzte multipotente Zelle in der Entwicklung des neutrophilen Granulozyten dar. (Murdoch et al. 2008; Hordyjewska et al. 2014; Zhu et al. 2018)

Von diesem Punkt trennt sich die weitere Entwicklungsstrecke polymorphonukleäre und monozytärer Zellen, wobei aus dem GMP entstehende unipotente Tochterzellen, nur noch einen der beiden Zelltypen bilden können. Wie bereits erwähnt wurde unlängst ein protumöröser Einfluss dieser früh unipotenten Neutrophilen beschrieben. (Zhu et al. 2018) Außerdem gelangen auch Nachweis und Phänotypisierung eines unipotenten Vorläufer der Makrophagen in Maus und Mensch (hMoP). (Hettinger et al. 2013)

Im Anschluss an diesen Prozess durchläuft die neutrophile Zelle das myeloblastäre, promyelozytäre, myelozytäre und metamyelozytäre Stadium. (Hordyjewska et al. 2014; Singhal et al. 2016)

Während dieser Entwicklungsschritte verliert der hNeP sukzessive seine Stammzell-artige Kernmorphologie, die GMP-typische Gensignatur (u.a. FosB, Egr1, Jun, Gata1/2) und Ki67-Expression. Gleichzeitig werden wichtige Genen der neutrophilen Entwicklung (Gfi1, Ets1, Per3, Cebpa, Cebpe) exprimiert. (Zhu et al. 2018)

Als erste Effektormoleküle werden bereits im Myelozyten die Serinproteasen gebildet. (Neutrophile Elastase (*NE*), Cathepsin G (*CG*) und die Proteinase 3 (*PR3*)). Später folgt die Bildung von Neutrophiler Kollagenase (*MMP8*) und Gelatinase B (*MMP9*). (Pham 2006) Diese Effektormoleküle werden in Vesikeln gespeichert, um ungewollter Schädigung der Zelle selbst, sowie des umliegenden Gewebes zu vermeiden. (Lehrer and Ganz 1990; Smith 1994) Am Ende der Entwicklungslinie steht der noch unreife, stabkernige neutrophile Granulozyt (*BSN*), aus welchem sich in Folge der reife segmentkernige Neutrophile (*PMN*). (Hordyjewska et al. 2014) Unter physiologischen Bedingungen verlässt nur der PMN und eine geringe Anzahl BSN das Knochenmark und gelangt so in die Zirkulation. Im Zuge einer entzündlichen oder malignen Pathologie kommt es durch verschiedene Zytokine (v.a GM-CSF und G-CSF) zu einer verstärkten Bildung von Neutrophilen im Knochenmark. Diese, sowie ihre unreiferen Stadien, werden durch diesen Stimulus außerdem vermehrt in die Zirkulation abgegeben, und von dort in den Entzündungsherd rekrutiert. Diese Form der Leukozytose wird als Linksverschiebung (*left-shift*) bezeichnet. (Avalos et al. 1990; Kobashi et al. 2004; Koeffel et al. 2014)

Am Ort der Entzündung angekommen, phagozytieren neutrophile Granulozyten eingedrungene Pathogene. Die dadurch entstehenden Endosomen verschmelzen mit den Granula, welche die Proteasen und ROS beinhalten, wodurch es zur raschen Zerstörung der Erreger kommt. Es existieren Hinweise darauf, dass die so entstehenden Pathogen-Fragmente in Folge von Neutrophilen selbst zur Antigenpräsentation und somit zur Stimulation des adaptiven Immunsystems verwendet werden können. (Singhal et al. 2016) Außerdem wird angenommen dass die Immunzellen diese z.T. wieder in das Interstitium regurgitieren, wonach sie von professionellen APC's aufgenommen werden und leichter präsentiert werden können. (Potter and Harding 2001; McGarry Houghton 2010)

Zusätzlich scheinen neutrophile Granulozyten dazu in der Lage zu sein, stoßweise geringe Mengen an Proteasen und ROS in regelmäßigen Abständen in die ECM abzugeben. Dadurch werden kurzzeitig lokal höhere Konzentration dieser Moleküle erreicht, als deren Inhibitoren antagonisieren können. Resultat ist fokussierte Proteolyse und bakterizide Wirkung. (Owen and Campbell 1995; Liou and Campbell 1996).

Anhand ihrer Aktivierungsstadien werden 4 Typen der neutrophilen Granulozyten im Rahmen einer Entzündungsreaktion unterschieden:

1. Naive PMN - in der Zirkulation
2. Moderat aktivierter PMN - Beteiligung an Wundheilung
3. Aktivierter PMN - In akuter Entzündungsreaktion
4. Frustrierter PMN - Bei Sepsis/ARDS

Diese unterscheiden sich nicht bezüglich ihrer freigesetzten Substanzen, jedoch in der quantitativ unterschiedlichen Freisetzung dieser. So schütten naive PMN keine, moderat aktivierte PMN geringe und aktivierte PMN erhöhte Mengen an neutrophiler Elastase aus. Ist der Stimulus der Entzündung so massiv, beispielsweise im Rahmen einer Sepsis, kann es zum Auftreten frustrierter PMN kommen, welche massive Mengen an Proteasen und ROS freisetzen. Passiert dies z.B. im Lungengewebe kommt es zur Entwicklung des potentiell letalen *acute respiratory distress syndrome (ARDS)*. (McGarry Houghton 2010)

Neben ihrer löslichen Form, können PMN ihre Effektorsubstanzen auch in Form von *neutrophil-extracellular traps (NET)* freisetzen. (Brinkmann et al. 2010)

Hierbei handelt es sich um netzartige Gebilde aus dekondensierten Chromatinfäden und Histonen. Mit diesen Fäden assoziiert sind zahlreiche der neutrophilen Granulaproteine, darunter NE, CG, LF, MPO, PR3, BPI und MMP9. (Brinkmann and Zychlinsky 2012; Shaul and Fridlender 2019)

Bei der NET-Produktion handelt es sich um einen aktiven Prozess, welcher als „NETose“ bezeichnet wird und mehrere Schritte beinhaltet:

1. Zunächst erfolgt die Abflachung der Zelle, die Dekondensation des Chromatins durch Citrullinierung am Histon H3 durch *Pepditylarginin-deiminase 4 (PAD4)*. Aktiviert wird diese durch die NADPH-Oxidase.
2. Im Anschluss kommt es zum Verlust der Kernmorphologie und dem Eintreten von Granula in den Kern.
3. Die Kernmembran geht zu Grunde, im Zytoplasma werden weitere Granula an die dekondensierten Chromatinfäden angelagert.
4. Ab diesem Punkt existieren unterschiedliche Freisetzungsmethoden - suizidale NETose vs. vitale NETose. Welche der Beiden durchgeführt wird ist abhängig davon über welchen Pathway der Prozess aktiviert wurde:

- Bei suizidaler NETose kommt es zu einer von Apoptose und Nekrose unabhängigen Form des Zelltods. Aktiviert durch spezifische *Toll-like-receptor (TLR)* - Liganden oder Fc-Rezeptoren (*FcR*) kommt es zur Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum welches die NADPH-Oxidase aktiviert. Die Plasmamembran rupturiert und die NET werden in die ECM freigesetzt.
- Die vitale NETose wird über *Lipopolysaccharide (LPS)*, TLR4-aktivierte Thrombozyten und an Komplementproteine gebundene TLR2-Liganden aktiviert. Es folgt die Bläschenbildung des Zellkerns. Daraus entsteht ein Vesikel, welches die gebildeten NET beinhaltet und durch Exozytose freigesetzt wird. Die Plasmamembran bleibt dabei erhalten. Der nun kernlose PMN ist jedoch durchaus noch zu Prozessen wie der Phagozytose in der Lage.

(Brinkmann et al. 2010; Yang et al. 2016; Jorch and Kubes 2017)

Durch ihre netzartige Struktur können NET Mikroorganismen einfangen und entweder selbstständig eliminieren, oder dadurch deren Phagozytose induzieren. (von Köckritz-Blickwede and Nizet 2009; Cooper et al. 2013) Die Anlagerung der Granulaproteine ermöglicht lokal hohe Konzentration der antimikrobiellen Substanzen zu erreichen. Dies scheint essentiell für die Wirkung der NET zu sein. (Uribe-Querol and Rosales 2015) Mittlerweile finden sich einige Hinweise darauf, dass NET, im Rahmen maligner Erkrankungen, eine nicht unerhebliche Rolle spielen könnten. (Berger-Achituv et al. 2013; Arpinati et al. 2020)

Zusätzlich zu ihren direkten Funktionen, sind neutrophile Granulozyten ebenfalls auch in der Lage, den weiteren Entzündungsprozess u.a. durch die Freisetzung zahlreicher spezifischer Zyto-/Chemokine maßgeblich zu beeinflussen. Die Folge ist eine Beeinflussung von Rekrutierung und Polarisation sowohl von Zellen des angeborenen, wie auch des erworbenen Immunsystems. (Leliefeld et al. 2015) Somit gestalten PMN auf das Profil des Entzündungsinfiltrats entscheidend mit. (McGarry Houghton 2010; Sionov et al. 2014) Es konnte gezeigt werden, dass aktivierte neutrophile Granulozyten in infektiösen Erkrankungen durch ihre Freisetzung von CXCL1/2 und CCL3 ein positives Feedback initiieren. (Kobayashi 2006; Kobayashi 2008) CXCL1/2 gehören zu den Liganden der CXCR1/2 Achse, zu dessen Mitgliedern auch CXCL8/IL-8 gehört. (Lazennec and Richmond 2010) Erneut soll auf dessen Rolle als potentestes neutrophile Granulozyten-rekrutierendes Chemokin hingewiesen werden. (Sparmann and Bar-Sagi 2004) Das von aktivierten Neutrophilen

produzierte CXCL1/2 ist in der Lage an dieselben Rezeptoren zu binden und führt dadurch zu einer Steigerung dieser Rekrutierung. Dadurch bewirken bereits am Entzündungsprozess beteiligte Neutrophile den weiteren Einstrom von naiven PMN. (Kobayashi 2006; Fridlender and Albelda 2012)

Weiters sind die Zellen u.a. zur Produktion der Zytokine TNF- α , IL-1- β , IL-12, HGF, VEGF, GM-CSF in der Lage, für welche immunmodulatorische Funktionen bekannt sind. Außerdem führt deren Produktion von CCL3 und CXCL9/10 zur Rekrutierung und anschließender Aktivierung von T-Zellen. (Scapini et al. 2000)

Diesbezüglich scheint es, dass neutrophile Granulozyten in der Lage sind die Effekte von CD8⁺ Reaktionen in erheblichem Maße zu beeinflussen. (Tvinnereim et al. 2004) Welche spezifischen Zyto-/Chemokine in einer konkreten Situation gebildet werden scheint außerdem von der spezifischen Polarisierung der PMN abzuhängen. (Fridlender et al. 2009; Sionov et al. 2014)

Nicht nur durch deren direkte Produktion, sondern auch durch die Modifikation bereits produzierter Zyto-/Chemokine und deren Rezeptoren können Neutrophile die Effekte dieser beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl MMP8 als auch MMP9 zur proteolytischen Spaltung von CXCL5 in der Lage sind. Das daraus entstehende Produkt wiederum, scheint eine stärkere PMN-Rekrutierung zu induzieren. (McGarry Houghton 2010; Song et al. 2013)

Ein ähnlicher Mechanismus ist für CXCL8/IL-8 bekannt. So katalysiert MMP9 die Spaltung dieses Chemokins, wobei das entstehende Produkt eine 10-fach stärkere chemotaktische Potenz im Vergleich aufweist. (Van den Steen et al. 2000)

Auch die neutrophilen Serin-Proteasen scheinen regulatorisch auf die Entzündungsreaktion einwirken zu können: So katalysiert Cathepsin-G eine N-Terminale Spaltung der Chemokine CXCL5,8,15, wodurch ebenfalls eine erhöhte chemotaktische Aktivität dieser Mediatoren bewirkt wird. Die breite Substratspezifität der neutrophilen Elastase, einer der Hauptbestandteile neutrophiler Granulozyten, erlaubt dieser, neben der Interaktion mit nahezu allen Bestandteilen der ECM, auch die Spaltung zahlreicher Zytokine, Zytokinrezeptoren und Integrinen. (Lee and Downey 2001; Pham 2006; Gregory and McGarry Houghton 2011)

Neben der Zyto-/Chemokin-vermittelten Modulation der Entzündungsreaktion, existieren seit längerem zarte Hinweise einer möglichen antigenpräsentierenden Funktion von neutrophilen Granulozyten: Zwar lässt sich in deren Co-Kultur mit autologen T-Zellen nur eine

schwache Induktion einer CD8⁺ Reaktion und keine Induktion einer CD4⁺ Reaktion beobachten, wobei die verwendeten PBN zuvor verschiedenen Peptidpools exponiert wurden, welche diverse HLA-I/II-exklusive Epitope von CMV, EBV, Influenzaviren und Clostridium tetani enthielten. Derselbe Prozess führt bei APC's zur Beladung von deren HLA-Strukturen, wodurch diese in der Co-Kultur signifikante T-Zell Reaktionen auslösen können, was jedoch bei PBN nicht geschah. (Singhal et al. 2016)

Unter bestimmten Bedingungen scheinen Neutrophile aber sehr wohl in der Lage zu sein Eigenschaften von professionellen APC zu erwerben. So konnte in autoimmunen oder anderweitig entzündlichen Pathologien die Expression der costimulatorischen Moleküle CD80, CD86 durch neutrophile Granulozyten beobachtet werden. (Iking-Konert et al. 2005; Wagner et al. 2006)

Im Mausmodell nehmen PMN nach Kontakt mit Ovalbumin dieses auf und prozessieren dieses anschließend und können dadurch MHC-II-abhängig Ovalbumin-spezifische T-Zellen aktivieren. Somit sind sie in der Lage Th1- und Th17-Reaktionen auszulösen. (Abi Abdallah et al. 2011) Ebenfalls beobachtete man in der Maus die Fähigkeit von PMN, mittels Präsentation von bakteriellen Antigenen eine CD8⁺ Reaktion auszulösen. (Tvinnereim et al. 2004) In einem Maus-Peritonitis-Modell kam es im Zuge der Entzündungsreaktion zum Auftreten eines speziellen neutrophilen Subsets, welches neben klassischen neutrophilen Oberflächenmarkern auch typische DC-Marker exprimiert. Diesen *Neutro-DC-Hybriden* wurde eine wichtige Rolle in der raschen Aktivierung des adaptiven Immunsystems zugeschrieben, da sie schnell bakterielle Antigene prozessieren und präsentieren, wodurch eine rasche Induktion einer CD4⁺ Reaktion unterstützt werden kann. (Geng et al. 2013) Neben den Neutro-DC-Hybriden wurden auch weitere Neutro-APC-Hybride beschrieben. (Singhal et al. 2016) Bis dato ist allerdings wenig über die Funktion dieser Subsets bekannt. Weiters ist immer noch unklar durch welche Faktoren für diese Hybridisierung notwendig sind. In vitro könnte die Expression von APC-Markern durch PMN erstmals in den 90er Jahren beobachtet werden. Dafür wurde humane neutrophile Granulozyten mit verschiedenen Entzündungsmediatoren (darunter TNF- α , M-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-3/4) stimuliert, wodurch es zur Expression einer Reihe von APC-Markern kam. (Oehler et al. 1998)

Darauf aufbauende Experimenten konnten zeigen, dass nahezu ausgereifte PMN in vitro nach Exposition mit Entzündungsmediatoren gar zur kompletten Transdifferenzierung in andere Immunzellen in der Lage sind. So bildeten BSN nach Kontakt mit GM-CSF, TNF- α und IL-1 β einen vollständig monozytären Phänotyp aus. Grund dafür sei, dass die genannten Zytokine, durch eine Aktivierung des MKK-6p38 Signalings, zu einer 5-fachen Reduk-

tion des neutrophilen Transkriptionsfaktors Cebpa und einer 4-fachen Steigerung von Jun führten. (Koeffel et al. 2014)

Interessant ist, dass es sich hierbei genau um das Gegenteil des Prozesses handelt, welcher zur Bildung der hNeP aus dem GMP führt. (Downregulation u.a von Jun, Upregulation u.a von Cebpa). (Zhu et al. 2018)

Da sich jedoch hNeP und BSN einerseits am Anfang, andererseits am Ende der Granulopoese befinden, ist besonders interessant, dass diese Prozessumkehr in Folge BSN zur Transdifferenzierung in einen nicht-neutrophilen Zelltyp befähigt, was nach dem aktuell gängigen Modell nicht möglich sein sollte.

Allerdings muss erwähnt werden, dass bei sämtlichen in vitro Experimenten zur Generierung von Hybrid-PMN unphysiologisch hohe Zytokinkonzentrationen verwendet wurden, welche in dieser Menge nicht im menschlichen Organismus vorzufinden sind. Somit liefern diese zwar Hinweise darauf, dass eine Hybridisierung bzw. vollständige Transdifferenzierung dieser Zellen prinzipiell möglich ist, wie dies in vivo zustande kommen könnte, kann jedoch daraus nicht abgeleitet werden. (Singhal et al. 2016)

Interessant jedoch ist, dass viele der dafür verwendeten Zytokine jenen entsprechen, welche im Rahmen einer Tumorerkrankung vermehrt durch maligne Zellen oder jene des TME produziert werden. (Sionov et al. 2014)

Wie diese Arbeit erläutern wird ist mittlerweile bekannt, dass sämtliche der in diesem Kapitel beschriebenen Mechanismen eine essentielle Rolle im Rahmen der Tumorentstehung und Progression spielen können, wobei dieselben Substanzen quantitativ oder kontextabhängig sowohl pro- als auch antitumoröse Effekte ausüben können. Beispielsweise können die ROS, welche durch die NADPH/MPO-Reaktionen entstanden sind, die DNA gesunder Zellen schädigen und können dadurch u.a das Fundament zur Entartung bilden. (Hanahan and Weinberg 2011) Andererseits können ROS der N1-TAN auch tumorzytotoxisch wirken. (Fridlender et al. 2009) Die von ihnen freigesetzten MMP's führen im TME zu massivem Remodelling der ECM, wodurch Angiogenese, Invasion und Metastasierung begünstigt werden. (Ebrahim et al. 2010; Uribe-Querol and Rosales 2015) Hingegen finden sich bei manchen MMP's Hinweise auf antitumoröse Effekte. (Balbín et al. 2003) In Abhängigkeit des polarisierten Phänotyps/Aktivierungszustands setzen Neutrophile unterschiedliche Zytokine und Chemokine frei, die maßgeblich die Etablierung eines pro- oder antitumorösen Entzündungsinfiltrats bedingen. (Fridlender and Albelda 2012)

Im folgenden Abschnitt wird daher genauer alle bis dato bekannten pro- und antitumorösen Effekte eingegangen, welche TAN auf die Hallmarks of Cancer ausüben können.

3.5. Die Hallmarks of cancer:

Bis zur Jahrtausendwende war die massive Heterogenität von malignen Erkrankungen für die Wissenschaft ein Rätsel. Mit dem Ziel die Theorie der Tumorbilogie komplett zu überarbeiten, verfassten Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 die „Hallmarks of Cancer“.

So definierten sie zunächst sechs charakteristische Fähigkeiten, deren Akquise die Voraussetzung der vollständigen malignen Entartung von Neoplasien ist.

Zu diesen zählen:

- Unabhängigkeit und konstante Aktivierung von proliferativen Stimuli
- Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Stimuli
- Widerstand gegen induzierbaren Zelltod
- Erwerb replikativer Immortalität
- Induktion der Angiogenese
- Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung

Schon in dieser Publikation äußerten sie die Vermutung, dass es sich bei Tumoren nicht um solide, homogene Konten aus entarteten Zellen handeln würde. Eher entsprächen diese in ihrem Aufbau dem komplexer Organe und beinhalten somit ebenfalls non-maligne Zellen, welche das TME bilden. Durch Sekretion einer Vielzahl an Faktoren erfolgt eine konstante Kommunikation zwischen den verschiedenen Zelltypen, durch welche deren Effekte bzw. Aktivitätszustände reguliert und moduliert werden. Zum vollständigen Verständnis der Tumorbilogie sei es daher nicht ausreichend, einzig die direkten Fähigkeiten der Tumorzellen zu verstehen, sondern die indirekten Effekte dieses „TME-Crosstalks“ müssen ebenso berücksichtigt werden. (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011)

Im nachfolgenden Jahrzehnt bestätigte sich diese Überlegung. Es zeigte sich, dass non-maligne Zellen bis zu 90% des Tumorgewebes ausmachen können. (Coussens and Werb 2002; Queen et al. 2005, Wels et al. 2008; Fridman et al. 2012) Neben malignen Zellen, den Parenchymzellen des Organs „Tumor“, finden sich darin ebenso Fibroblasten, Blut- und Lymphgefäßzellen, Perizyten, spezielle tumorspezifische mesenchymale Zellen (z.B. cancer associated fibroblasts). (deVisser et al. 2006; Hanahan and Weinberg 2011)

Nahezu alle Zelltypen des angeborenen und erworbenen Immunsystems infiltrieren das TME in variablem Ausmaß. Neben neutrophilen Granulozyten und Makrophagen wurde

auch bei NK-/DC-/B-/T-Zellen teilweise die Polarisation in spezifische Subsets im TME beobachtet. (Kapsenberg and Kalinski 1999; Fridlender et al. 2009; Shaul and Fridlender 2019)

In den Jahren nach der Publikation der Hallmarks of Cancer häuften sich die Hinweise darauf, dass das Immuninfiltrat nicht ausschließlich eine Schutzfunktion für den Organismus ausübt, sondern v.a. Effekte myeloischer Zellen aktiv die Tumorphorprogression zu fördern scheinen, indem sie den Erwerb verschiedener Hallmarks of Cancer vorantreiben. (Colotta et al. 2009; DeNardo et al. 2010; Grivennikov et al. 2010; Qian and Pollard 2010) Mittlerweile ist bekannt, dass in nahezu jeder Neoplasie ein variabler Grad an Entzündung vorhanden ist, selbst in den frühesten Stadien maligner Entartung. Wie Daten aus dem Tiermodell zeigten, führt die gezielte Verringerung oder Manipulation spezifischer Immunzellen häufig zu einer Erschwerung der Tumorinitiation und/oder Abschwächung der Progression. (deVisser et al. 2006; Fridlender et al. 2009; Pagès et al. 2010; Qian and Pollard 2010)

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse, sowie aufgrund Fortschritten in anderen Bereichen der Tumorbioieforschung publizierten Hanahan und Weinberg 2011 eine Überarbeitung ihres ursprünglichen Modells. Standen in der ersten Publikation die Fähigkeiten im Vordergrund, welche für eine maligne Entartung erworben werden müssen, ergänzten ihr Modell nun auch mit den ursächlichen Gründen des Erwerbs dieser.

Als hierarchisch den ursprünglichen Hallmarks übergeordnete Ebene definierten sie zwei *enabling characteristics*:

- Genominstabilität
- Tumorfördernde Entzündung

Außerdem wurden zwei neue *emerging hallmarks* in das Kollektiv der Tumorfähigkeiten aufgenommen, welche im Verlauf der Forschung der letzten 10 Jahre entdeckt wurden.

Dabei handelt es sich um:

- Reprogrammierung des Energiestoffwechsels
- Entzug von den Effekten des antitumorösen Immunsystems

(Hanahan and Weinberg 2011)

Unschwer lässt sich erkennen, dass sich sowohl bei den *emerging hallmarks* als auch den *enabling characteristics* ein direkter Bezug zur Funktion des Immunsystems findet. Die stark myeloisch-medierten Effekte stellen also einen wichtigen Teil der kausalen Faktoren dar, durch welche entstehende Neoplasien die Hallmarks of Cancer erwerben und sich dadurch vollständig entarten.

Bereits zu Beginn der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurden erstmals tumorfördernden Effekte von B-Zellen und Antikörpern in in vivo Experimenten beobachtet und die Korrelation zwischen dem Auftreten von Autoantikörpern und ungünstiger Prognose bei Tumorpatientinnen/-patienten ist seit der Jahrtausendwende bekannt. (Snell 1957; Kaliss 1958; Tomer et al. 1998; deVisser et al. 2005)

Aus der myeloischen Fraktion standen v.a die protumorösen Effekte von Mastzellen und TAM im Zentrum des Forschungsinteresses. Letztere stellten sich als zentrale Mediatoren der CRI heraus und besitzen weiters enge Verwandtschaft mit anderen protumorösen Zellen wie Hämangiozyten und TIE2⁺ Monozyten aufweisen. (Murdoch et al. 2008)

Wie erwähnt wurde neutrophilen Granulozyten wurde eher eine untergeordnete Rolle zugeschrieben, u.a. aufgrund ihrer Kurzlebigkeit und geringen Plastizität. (McGarry Houghton 2010; Galdiero et al. 2018)

In der, zum Paradigmenwechsel führenden Publikation von Fridlender et al. stellte sich jedoch folgendes heraus: Infolge der Applikation eines oralen TGF- β -Inhibitors (SM-16) kam es im Mausmodell zu ausgeprägten Veränderungen des Verhaltens von PMN im Tumorstroma. Diese wurden bei 3 Tumorzelllinien (AB12, LKR, TC1-Zellen) beobachtet. Im Vergleich zur Kontrolle kam es in TGF- β -inhibierten Mäusen zu einer Zunahme der myeloischen CD11b⁺ Zellen um 30-45%. Mittels anti-Ly6G wurde festgestellt, dass es sich hierbei fast ausschließlich um neutrophile Granulozyten handelte, wobei es in der monozytären Ly6C-Fraktion nur zu geringe Veränderungen. Ein analoges Bild zeigte sich auch im K-Ras aktivierten Bronchialkarzinom-Modell beobachtet. Da sich die Konzentration neutrophiler Zellen in der Zirkulation und der Milz kaum veränderte wurde angenommen, dass eine derartige Blockierung eine Verstärkung der Rekrutierung dieser Zellen in das TME und/oder eine lokale Förderung des Überlebens bewirkt. Da solche Effekte nur über eine Veränderung des Cross-talk im TME ausgelöst werden können, wurden diese Tumoren mittels RT-PCR auf Veränderungen ihres Zyto-/Chemokinprofils untersucht. In Tumoren TGF- β -inhibierter Mäuse fanden sich erhöhte Konzentrationen von iNOS, Zelladhäsionsmolekülen und verschiedenen Chemokinen. Bei allen drei Tumorentitäten fand sich eine 2 bis 5-fach erhöhte Expression der neutrophilen- Chemokine CXCL2/5 sowie CCL3. In jeweils zwei von drei wurde zusätzlich ein eine erhöhte Expression von CXCL1 (AB12 und TC1) bzw. CCL5 (AB12 und LKR) beobachtet. Im TC1-Tumoren fand sich zusätzlich eine 7-fach erhöhte Expression von GM-CSF. Aus diesen Tumoren isolierte TAN wiesen erhöhte mRNA Konzentrationen für CXCL2/5 auf. Die Blockade von TGF- β scheint daher u.a. in TAN zu einer erhöhten Expression von Chemokinen der Neutrophilenrekrutierung zu führen.

Auch in der morphologischen Analyse zeigten sich signifikante Veränderungen der TAN infolge der TGF- β Blockade. So beobachtete man eine Zunahme der, für reife neutrophilen Granulozyten charakteristischen, Segmentierung des Zellkern. Da derartige morphologische Veränderung auch auf eine funktionelle Veränderung der Zellen hindeuten könnten, wurde mittels Depletion dieser Zellen versucht, mehr über deren Effekte in Erfahrung zu bringen. Erstaunlicherweise kam es hier zu unterschiedlichen Effekte, abhängig davon ob eine TGF- β -Inhibition erfolgte:

- In non-SM16 Mäusen führte die Depletion von TAN zu einer leichten, aber signifikanten Reduktion des Tumorwachstums
- In SM16 Mäusen jedoch kam es dadurch zu einem deutlichen Anstieg des Tumorwachstums. Mittels Anti-Ly6G erfolgte zunächst eine systemische Depletion der neutrophiler Zellen. 3-4 Tage nach der letzten Injektion kam es zum Wiederauftreten dieser und infolge zur erneuten Wachstumsinhibitor. Selbiges beobachtet man nach direkter intratumorale Injektion. Orale SM16 Zufuhr verringerte die Tumorlast um 80-90% im Vergleich zu Kontrollen. Wiederholte Injektion von anti-Ly6G reduzierte dieses Ergebnis auf 40%.

Wie diese Ergebnisse zeigen, besitzen TAN unter bestimmten Bedingungen potente antitumoröse Effekte. In der Co-Kultur mit den jeweils in vivo verwendeten Tumorzellen waren CD11b⁺ Zellen, welche aus den Kontrollmäusen stammten, erst ab einem Verhältnis von 20:1 (CD11b⁺ : Tumorzellen) zytotoxisch. Aus SM16 Mäusen isolierte CD11b⁺ Zellen hingegen hatten bereits ab einem Verhältnis von 10:1 zytotoxische Wirkung, mit einem dosisabhängigen Anstieg bei 20:1. Die durchschnittliche Zytotoxizität betrug ca. 42% (SM16) bzw. ca. 16% (Kontrollen)

Infolge der SM16 Gabe fand sich in kultivierten Tumorresektaten 40% mehr NO als in der Kontrolle und isolierte SM16-CD11b⁺ Zellen produzierten 45% mehr H₂O₂.

Sowohl anti-TNF- α , als auch NO-Synthase-Inhibitoren führten zu keiner Verringerung dieses Effekts. Die Blockade der Produktion von H₂O₂ sowie die Zugabe von Katalase reduzierten die Zytotoxizität auf ca. 21%. Somit scheint die TGF- β Blockade eine erhöhte Tumorzytotoxizität durch Veränderungen der Sekretion der potenten Effektormoleküle des Immunsystems herbeizuführen. Die separate Co-Kultivierung von Kontroll-TAM/TAN sowie SM16-TAM/TAN mit Tumorzellen zeigte, dass einzig SM16-TAN ein deutliches zytotoxisches Potential gegenüber Tumorzellen aufwies. Ein schwacher zytotoxischer Effekt

konnte unter bestimmten Bedingungen auch bei Kontroll-TAN nachgewiesen werden wohingegen Kontroll-TAM unter Umständen sogar leicht protumorös zu sein schienen.

Um die morphologische und funktionelle Veränderung von TAN infolge der TGF- β Inhibition genauer zu beleuchten wurde das mRNA-Profil dieser Zellen untersucht. Hier konnte erstmals deutlich die Plastizität neutrophiler Granulozyten im TME nachgewiesen werden, die sich durch eine deutliche Veränderung der Genexpression äußert:

Zunächst wurden BMN mit Kontroll-TAN verglichen. War eine Expression von iNOS, CCL2,3,5 und Arginase in Ersteren nicht nachweisbar, fand sich bis auf iNOS in non-SM16-TAN eine deutliche Expression dieser Proteine. Bezüglich ihrer TNF- α und VEGF Expression konnte keine Unterschied beobachtet werden. Bei SM16-TAN hingegen fanden sich 2-5 fach reduzierte Konzentrationen von Arginase, ein potenter Immunosuppressor, sowie eine signifikant verringerte Expression von CCL2/5 und VEGF im Vergleich zur Kontrolle. Gleichzeitig beobachtet man eine bis zu 7-fach erhöhte Expression des immunstimulatorischen TNF- α . Ähnliche Ergebnisse konnten auch im orthotropen K-Ras Lungentumormodell nachgewiesen werden.

Schlussendlich wurde der Einfluss von SM16 Gabe auf CD8⁺ Zellen untersucht: Die Depletion von CD8⁺ Zellen durch anti-CD8 führte zum kompletten Verlust des therapeutischen Effekts von SM16. Auch nach TGF- β -Inhibition kam es bei gleichzeitiger CD8⁺ Depletion zur deutlichen Reduktion der Rekrutierung neutrophiler Zellen.

Weiters führte die kombinierte Reduktion von TAN und CD8⁺ in non-SM16-Mäusen zwar zu einer Zunahme des Tumorwachstums, welche durch den Verlust der antitumorösen CTL-Funktion erklärbar ist. Allerdings wurde trotzdem ein schwacher, jedoch signifikanter antitumoröser Effekt gemessen, welcher auf die TAN Reduktion zurückgeführt wurde. Somit scheinen TAN in unbehandelten Mausmodell einen CD8⁺ unabhängigen protumorösen Effekt zu besitzen. Jedoch könnte der erwähnte schwach antitumoröse Effekt von TAN in non-SM16 Mäusen auf die Existenz eines spezifisch antitumorös wirkenden Subsets zurückzuführen sein. Außerdem führte die alleinige Reduktion von TAN zu einer deutlich erhöhten Expression des T-Zellaktivierungsmarkers 4-1BB. Diese erhöhte Aktivierung korrelierte mit einem verringerten Tumorwachstum.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtung an der unbehandelten Maus zeigte sich bei SM16-Mäusen ein gänzlich anderes Bild: So konnte hier eine erhöhte Anzahl an CD8⁺ Zellen im

TME, sowie eine erhöhte Aktivierung dieser feststellen. Infolge von TAN Depletion kam es auch in Fall zur deutlichen Verringerung der CD8⁺ Aktivierung. (Fridlender et al. 2009)

Mittlerweile wird diese Publikation in der Fachwelt als Grundstein der heutigen TAN-Forschung angesehen. Ausgehend von dem antitumorösen Effekt einer Verringerung von TAN in Kontrollmäusen, der bereits bekannten Korrelation zwischen infiltrierenden TAN und Prognose und dem stark antitumorösen Effekt von TAN infolge der TGF- β Blockade wurde von Fridlender und Albelda eine Polarisationshypothese aufgestellt, welche zwei Subsets für dieser Zellen definiert - die antitumorösen N1- und protumorösen N2-TAN. (Fridlender et al. 2009; Fridlender and Albelda 2012)

Trotz dieser Ergebnisse zweifelten Kritikerinnen/Kritiker dennoch daran, dass die Fähigkeit von TAN zur Polarisation derer von TAM vergleichbar wäre. Sie führten die Unterschiede zwischen N1- und N2-TAN eher auf unterschiedliche Aktivierungszustände zurück, durch welche es lediglich zu quantitativen Veränderungen in der Freisetzung derselben Effektmoleküle komme. Eine tatsächliche Polarisation hingegen würde eine irreversible und signifikante Expression unterschiedlicher Genen voraussetzen. (Gregory and McGarry Houghton 2011) Diesbezüglich konnte mittlerweile eine signifikant (in machen Fällen bis zu 5000-fach) höhere CCL17 Expression in N2 im Vergleich zu BMN nachgewiesen werden (Mishalian et al. 2013) Hingegen zählt die Expression dieses Chemokin zu den im N1-TAN am meisten downregulierten. (Shaul et al. 2016) Diese Veränderungen deuten eher auf eine tiefgreifendere Veränderung der jeweiligen Zellen im Sinne einer Polarisation, als lediglich auf einen unterschiedlichen Aktivierungszustand, bei welchem sich die Zellen auf genetischer Ebene wenn nur minimal unterscheiden würden.

Außerdem handelt es sich bei CCL17 um eines der Chemokine, für welche die Vermittlung protumoröser Effekte bekannt ist, da dieses Treg in das TME rekrutiert welche die antitumoröse Immunreaktionen erheblich abschwächen. (Fridlender et al. 2012; Mishalian et al. 2014) Dieser Effekt ist derart entscheidend für die Tumorprogression, dass er exemplarisch für die Darlegung des deutlichen Einflusses von TAN auf die Hallmarks of Cancer (in diesem Fall „Immunevasion“) herangezogen werden kann. (Hanahan and Weinberg 2011)

3.9. Beeinflussung der Hallmarks of Cancer durch TAN:

Die zahlreichen, mittlerweile bekannten Effekte von TAN auf die verschiedensten Hallmarks of Cancer führen dazu, dass deren potenter Einfluss auf die Tumorgenese nicht mehr ignoriert werden kann. So beeinflussen die Effekte der von ihnen produzierten Sub-

40

stanzen jeden klassischen Hallmarks, also die *Unabhängigkeit der Proliferation* (McGarry Houghton et al. 2010), die *Resistenz gegenüber Wachstumsinhibition* (Gaida et al. 2012), die *Resistenz gegenüber Zelltod/Unterstützung bei der Immortalisierung* (Acuff et al. 2006), *Induktion der Angiogenese* (Bergers et al. 2000) *Invasion* (Ginzberg et al. 2001) und *Metastasierung* (Sato et al. 2006; Kowanetz et al. 2010, Spicer et al. 2012). Außerdem fördern sie beide Mechanismen, welche den Erwerb der klassischen Hallmarks verursachen - die *enabling characteristics*. Dazu werden die *CRI* und die *Genominstabilität* gezählt. (Hanahan and Weinberg 2011)

Erstere wird u.a durch die zuvor beschriebene Expression von Interleukin-8 verursacht, welche typisch für viele verschiedene Tumorentitäten ist. Die nachfolgenden Rekrutierung neutrophiler Granulozyten erfolgt über die CXCL2-CXCR2-Achse, welche infolge durch Mediatoren der TAN selbst zur Rekrutierung weiterer Zellen genutzt wird. (siehe S. 14, 24, 31) Das dadurch entstehende Infiltrat stellt das histologische Korrelat der *CRI* dar. Die TAN produzierten ROS und RNS, besitzen das Potential die DNA der malignen Zellen weiter zu schädigen wodurch deren *Genominstabilität* gefördert wird. (Haqqani et al. 2000; Hanahan and Weinberg 2011). Weiters rekrutierten TAN u.a. durch CCL-17 auch spezifische, die antitumoröse Immunreaktion hemmende Immunozyten, wodurch es schlussendlich zur Unempfindlichkeit gegenüber dieser, der *Immunevasion*, kommt. (Zhang et al. 2005; Filipazzi et al. 2007; Yang et al. 2008; Brierie and Moses 2010; Waight et al. 2011; Zamarron and Chen 2011; Abrams and Waight 2012; Mishalian et al. 2014)

Dabei ist anzumerken, dass die Effektoren der TAN nicht spezifisch für einen Hallmark sind. Oftmals werden gleich mehrere Hallmarks durch eine spezifische Substanz beeinflusst. (Uribe-Querol and Rosales 2015) Auffällig hierbei ist, dass dies ein gängiges Prinzip der, den Hallmark of Cancer zugrundeliegenden Kausalfaktoren ist: Beispielsweise fördert die Hyperaktivierung der Onkogene RAS und MYC nicht nur die Zellproliferation, sondern spielt auch bei der Regulation des Energiemetabolismus und der Gefäßneubildung eine wichtige Rolle. (Hanahan and Weinberg 2011)

Grundsätzlich erstaunlich ist, dass das zytotoxische Potential neutrophiler Granulozyten gegenüber Tumorzellen bereits seit Jahrzehnten in vitro und in vivo beobachtet werden konnte. (Gerrard et al. 1981; Katano and Torsi 1982)

Jedoch erst im Anschluss an die Beobachtungen von Fridlender et al. häuften sich weitere Hinweise auf die Existenz von antitumorösen TAN-Funktionen. Dennoch scheint dies paradox, da häufig eine Korrelation zwischen Neutrophilen und zahlreichen Parameter, wel-

che ein fortgeschrittenes Tumorstadium sowie eine ungünstige Prognose indizieren, beobachtet wurde. (Shaul and Fridlender 2019)

Diesem wiederum widerspricht, dass in den letzten Jahren auch TAN mit antitumorösen Funktionen aus reseziertem Gewebe von Tumorpatientinnen/-patienten isoliert wurden. (Singhal et al. 2016)

In den nun folgenden Kapiteln wird die komplexe Interaktion zwischen TAN und Tumorzellen sowie deren Tumorprogression dargelegt. Um dies so übersichtlich wie möglich zu gestalten, werde die protumorösen Effekte anhand der einzelnen durch sie beeinflussten Hallmarks beschrieben. Anschließend folgt unter Zuhilfenahme des Konzepts des Immuneditings sowohl eine Beleuchtung der antitumorösen TAN Funktionen, als auch die ihrer immunsuppressiven Effekte.

3.8. Unabhängigkeit von proliferativen Stimuli:

Die wohl wichtigste Fähigkeit von malignen Zellen ist die Aufrechterhaltung einer konstanten chronischen Proliferation. In gesundem Gewebe Proliferation dadurch induziert, dass spezifische Zellen Wachstumsfaktoren freisetzen, die in parakriner Weise benachbarte Zellen zur Mitose anregen. In der Regel erfolgt dies durch eine Bindung an membranständige Rezeptoren (z.B. *Tyrosinkinaserzeptoren*), wodurch es zur Autophosphorylierung ihrer intrazellulären Domänen kommt. In Folge ermöglicht dies die Anlagerung und anschließende Phosphorylierung von *second messenger Proteinen*. Dadurch wird das initiale Signal in Form einer Signalkaskade weitergeleitet, wodurch schlussendlich eine Veränderung des Zellstoffwechsels zugunsten der Mitose erreicht wird. (Perona 2006; Lemmon and Schlessinger 2010) Da diese parakrine Sekretion jedoch einer strengen zeitlichen und räumlichen Kontrolle unterliegt, lassen sich diese Mechanismen nur schwer beobachten. Deshalb existieren noch zahlreiche unbeantwortete Fragen bezüglich des genauen physiologischen Ablaufs (z.B. Welche Zellen setzen welche Wachstumsfaktoren aufgrund welches Stimulus frei?). (Hanahan and Weinberg 2011)

Als sicher gilt, dass vor allem gewebständige Zellen des Immunsystems diesen Prozess entscheiden mitregulieren. Ihr hohes Maß an Plastizität erlaubt es, sich an verschiedenste interstitiale Bedingungen anzupassen und somit eine Vielzahl an Effektorfunktionen ausüben zu können. (Finch and Crimmins 2004; deVisser et al. 2006)

Weiters scheinen Wachstumsfaktoren nicht nur im Bedarfsfall sezerniert zu werden, sondern liegen auch als inaktive Form, gebunden an ECM-Proteine, in der Matrix vor. Der Ab-

bau dieser Proteine durch Proteasen setzt sie aus dieser Bindung frei, wodurch sie nun hochkonzentriert in einem spezifischen Gewebsareal wirken können. (Hanahan and Weinberg 2011)

Um sich dieser Kontrolle zu entziehen, entwickeln entartete Zellen eine Reihe an Strategien, welche für ein chronisch proliferatives Signaling sorgen:

- Eine Möglichkeit hierfür ist die eigenständige Produktion von Wachstumsfaktoren. Durch deren Freisetzung kommt es zur autokrinen Wachstumsstimulation. (Hanahan and Weinberg 2011) So wurde in einigen humanen Tumoren die Überexpression von G-CSF festgestellt. (Braun et al. 2004; Revoltella et al. 2012; Hsu et al. 2013; Urtinguio et al. 2013) Wie sich später zeigen wird, spielt diese Zytokin v.a. eine Rolle in der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem, jedoch ist mittlerweile bekannt, dass manche Tumoren ebenfalls in der Lage sind den Rezeptor dieses Liganden (G-CSFR) zu exprimieren und dadurch einen Wachstumsstimulus zu erhalten. Zu diesen zählen das Ovarialkarzinom, das kolorektale Karzinom, und das Harnblasenkarzinom. (Tachibana et al. 1997; Ninci et al. 2000; Yang et al. 2005)
- Maligne Zellen sind außerdem in der Lage, gezielt gesunde Zellen des umgebenden TME direkt zur Produktion von Wachstumsfaktoren anzuregen. Zu diesen zählen insbesondere Fibroblasten, aber auch diverse Zellen des Immunsystems. (Bhowmick et al. 2004; Cheng et al. 2008) Dieser Effekt ist ebenso indirekt möglich: So konnte beobachtet werden, dass Zellen des Mammakarzinoms die Produktion von Onkostatin M in Neutrophile Granulozyten stimulieren. In weiterer Folge fördert dieses Zytokin wiederum die Produktion von VEGF in den Tumorzellen selbst, für das neben proangiogenen- auch proliferative Effekte bekannt sind. (Queen et al. 2005)
- Ferner sind maligne Zellen in der Lage ihre eigenen Wachstumsfaktorrezeptoren zu „manipulieren“. Dies ist eine Folge der *Genominstabilität*. Die erhöhte Mutagenität des Genoms einer Tumorzelle hat charakteristische DNA-Veränderungen zur Folge (*Genamplifikation*, *-deletion* und *-inversion*). Die Amplifikation des entsprechenden Gens führt dazu, dass erhöhte Mengen eines spezifischen Rezeptors exprimiert werden. Dies hat eine Hyperreagibilität zur Folge. Selbst bei normalen Ligandenkonzentrationen wird ein verstärktes proliferatives Signal induziert. Die charakteristischste Manipulation von Re-

zeptoren ist jedoch deren strukturelle Veränderung. Verursacht wird diese durch Deletion, Translokation oder Inversion. Infolge kann eine *Gain-of-function Mutation* auftreten, durch welche der veränderte Rezeptor nun unabhängig von seinem Liganden chronisch aktiviert ist. (Hanahan and Weinberg 2011) So führen Mutationen der katalytischen Untereinheit der *PI3K* zu einem hyperaktiven PkB/Akt-Signaling. Dieser Signaltransduktionsweg ist unter anderem für das Zellüberleben und Zellwachstum zuständig, und aktiviert u.a. den potenten Transkriptionsfaktor c-MYC. (Jiang and Liu 2008; Manning and Toker 2017) Es wird geschätzt, dass dieser die Expression von 15% aller Gene des humanen Genoms regulieren kann. (Gearhart et al. 2007)

Außerdem können bestimmte *Loss-of-function Mutationen* ebenfalls zur Entwicklung chronischen Proliferationsstimulus führen. Das wichtige Onkogen RAS beispielsweise erhält diesen Effekt durch einen mutationsbedingten Funktionsverlust seiner GTPase Untereinheit. In einer gesunden Zelle folgt auf die Aktivierung von RAS zunächst die Anlagerung eines GTP Moleküls, wodurch der Rezeptor aktiviert wird. Die Spaltung des GTP durch die GTPase Untereinheit von RAS, führt zu dessen Inaktivierung. Dieses intrinsische negative Feedback soll chronische Aktivität unterbinden. Dies ist die Folge des mutationsbedingten Funktionsverlusts in malignen Zellen. (Hanahan and Weinberg 2011)

Mittlerweile ist bekannt, dass das mutierte RAS-Protein ebenfalls die Rekrutierung von Tumor associated neutrophils fördert. Auch in diesem Fall spielt das Chemokins CXCL8/IL-8 eine entscheidende Rolle, da dessen Produktion unter anderem ein Effekt des hyperaktiven RAS-Signalings ist. (Sparmann and Bar-Sagi 2004; Ancrile et al. 2008; Lazennec and Richmond 2010) Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass die IL-8 Konzentration im TME mit einer ungünstigen Prognose korreliert. (Bellocq et al. 1998)

Hinweise darauf, dass auch TAN selbst die Tumorpheriferation beeinflussen, finden sich bereits in der Publikation von Fridlender et al., in welcher die TAN-Plastizität erstmals beschrieben wurde: Einerseits wurde beobachtet, dass eine Reduktion von TAN in nicht TGF- β inhibierten Kontrollmäusen zu einem signifikant verringerten Tumorzellwachstum führte. Dies ließ sich ebenfalls bei gleichzeitiger Neutralisation von TAN und CTL beobachten. Dies ist insofern erwähnenswert, da ein weiterer beobachteter Effekt der alleinigen TAN-Reduktion eine erhöhte CD8 Aktivität war, welche eine verstärkte Tumorzellelimination zur Folge hatte. Die geringere Tumorzellgröße wäre somit nicht nur durch das Wegfallen eines etwaigen tumorsupportiven Stimulus durch TAN, sondern durch die erhöhte CD8⁺ Aktivität

zu erklären. Da ein verringerter Wachstumseffekt auch bei gleichzeitiger CD8⁺ Reduktion gemessen wurde deutet dies darauf hin, dass TAN einen von T-Zellen unabhängigen proliferationsfördernden Effekt ausüben. (Fridlender et al. 2009)

Mittlerweile existiert eine Vielzahl an Publikationen, die eine Assoziation zwischen den Effektorsubstanzen neutrophiler Granulozyten und der malignen Proliferation beschreiben: Einer der wichtigsten protumorösen Mechanismen der TAN wird durch die Neutrophile Elastase vermittelt. Hierbei handelt es sich um einen der Haupteffektoren von neutrophilen Granulozyten. Ihr zentraler Stellenwert lässt sich auch dadurch erkennen, dass diese Protease 2% des gesamten Trockengewichts des Immunozyten ausmacht. (Gregory and McGarry Houghton 2010) Hauptaufgabe der NE ist die Elimination eines breiten Spektrums an invasiven Mikroorganismen, weshalb das Enzym eine breite Substratspezifität besitzt. (Korkmaz et al. 2008) Im immunoonkologischen Kontext ist eine ambivalente Rolle der NE bekannt. So wirken hohe NE-Konzentrationen zytotoxisch auf A549 Lungentumorzellen, niedrige Konzentration führten hingegen zu einer gesteigerten Proliferation von A549. (Gregory and McGarry Houghton 2010) Bemerkenswert ist der Mechanismus, durch welchen dies erreicht wird: So konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen in der Lage sind NE über Clathrin-coated-pits aufzunehmen. Aufgrund der breiten Substratspezifität finden sich auch in der Zelle zahlreiche Moleküle, welche durch das Enzym metabolisiert werden können. Eines davon ist das *insulin-receptor-substrate 1* (IRS-1), welches durch die NE abgebaut wird. Jedoch bindet IRS-1 die regulatorische Untereinheit der PI3K, das Protein p85. In Folge des Abbaus von IRS-1 kommt es zu einem Anstieg von p85, welches nun unbehindert mit p110 komplexiert und die PI3K bildet. Die erhöhte Konzentration dieses Proteins führt nun zur verstärkten Weiterleitung seiner Signale, also ein hyperreaktiver PI3K-Pathway. Zu diesen zählt u.a. das proliferationsfördernde Signal des Platelet derived growth factor receptor (PDGFR). (McGarry Houghton et al. 2010) Neben A549-Zellen wurde dieser Mechanismus auch in Zellen von Ösophagus-, Magen- und Mammakarzinomen beobachtet. Des Weiteren wurde in diesen Publikationen eine NE-bedingte Freisetzung von latentem *Transforming growth factor- α* (TGF- α) beobachtet. (Wada et al. 2006; Wada et al. 2007; Nawa et al. 2012)

Ein weiteres Enzym der neutrophilen Granulozyten, die *Matrix-Metalloprotease 9*, scheint ebenfalls in der Lage zu sein, die Tumorphiliferation zu unterstützen. Bei MMP's handelt es sich um eine Gruppe strukturell ähnlicher Enzyme mit einem Zink-Ion in katalytischen Zentrum, welches essentiell für deren Reaktionen ist. Wie die Neutrophile Elastase besit-

zen sie eine breite Substratspezifität. Inhibiert werden sie durch Mitglieder der Gruppe der *tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)*. (Kessenbrock et al. 2010)

Die, auch als Gelatinase B bezeichnete, MMP9 befindet sich in den sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten. Aufgrund ihrer hohen Affinität zu Komponenten der Basalmembran wird davon ausgegangen, dass sie unter anderem eine Rolle im Extravasationsprozess dieser Zellen spielt. (Gregory and McGarry Houghton 2011; Uribe-Querol and Rosales 2015)

Experimente an HPV16 Mäusen zeigten, dass die bei diesen Tieren typische Keratinozytenproliferation bei MMP9 defizienten Mäusen verringert ist. Werden jedoch MMP9 kompetenten Leukozyten in diese transplantiert, führt dies wiederum zu einem Anstieg der Proliferation. (Coussens et al. 2000) Im TME sind TAN sowie TAM eine wichtige Quelle dieser Protease. In vitro wurde das sekretorische Potential zwischen diesen beiden Zelltypen verglichen. Es zeigte sich, dass 10^6 Neutrophile in der Lage waren innerhalb 1-2h 100-200 ng des Zymogens Pro-MMP9 freizusetzen. TAM hingegen würden für dieselbe Menge jedoch mehrere Wochen benötigen. Bei HNSCC Patientinnen/Patienten wurde außerdem beobachtet, dass TAN die größte Menge an MMP9 produzieren. (Dumitru et al. 2012; Deryugina et al. 2014; Deryugina and Quigley 2015) Eine Besonderheit humaner neutrophiler Granulozyten ist, dass diese MMP9 nicht wie andere Zellen in Kombination mit ihrem Inhibitor TIMP-1 sezernieren. (Ardi et al. 2007) Da das sezernierte Zymogen pro-MMP9 erst durch andere Proteasen aktiviert werden muss, welche jedoch ebenfalls durch TIMP-1 inhibiert werden, führt die TIMP freie Sekretion zu einer schnelleren Aktivierung des Enzyms. Gleichzeitig wird dieses durch die relativ verringerte TIMP-1 Konzentration auch vermindert inaktiviert. In Summe resultiert somit eine schnellere und länger andauernde Aktivität der Protease. (Uribe-Querol and Rosales 2015) Außerdem ist mittlerweile bekannt, dass die von neutrophilen Granulozyten sezernierte hypochlorige Säure (*HOCL*) ebenfalls fähig ist, eine Vielzahl an Matrix-Metalloproteasen (inklusive MMP9) zu aktivieren und weiters TIMP-1 zu inhibieren, wodurch sich der Effekt der Proteasen weiter potenziert. (Shabani et al. 1998) An dieser Stelle sei jedoch angemerkt, dass sich auch Publikationen finden, welche eine Förderung der Tumorproliferation durch MMP9 in Frage stellen: So konnte in MMP9-defizienten Mäusen, infolge der Injektion der Lungenkarzinomzelllinie A549, keine gesteigerte Wachstumsrate im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die Gruppe führte den protumorösen Effekt von MMP9 jedoch auf deren günstigen Einfluss auf das Überleben maligner Zellen zurück. (Acuff et al. 2006) Auf diesen Mechanismus soll, im Rahmen der Beschreibung des nachfolgenden HoC, genauer eingegangen werden.

In humanen Tumoren finden sich oftmals erhöhte Konzentrationen des Wachstumsfaktors TGF- β -1. (Wojtowicz-Praga 2003; Levy and Hill 2006) Obwohl es zu den Wachstumsfaktoren gezählt wird, ist dieses Zytokin vor allem für seine antiproliferativen Effekte auf Zellen bekannt. (Aaronson 1991) Dieser übt zu Beginn der Tumorgenese einen wachstumshemmenden Effekt auf die malignen Zellen aus. (Jakowlew 2006) In späteren Entwicklungsstadien jedoch vermittelt es paradoxerweise einen proliferationssteigernden Effekt. Erreicht wird dies durch eine Entkopplung des inhibitorischen TGF- β Signals von seinem Signaltransduktionsweg, einem Charakteristikum für viele Tumorentitäten. Hierbei kommt es jedoch nicht zur bloßen Redundanz, sondern zur Umleitung des Signals auf andere Pathways, welche eine Reihe an protumorösen Effekten aktivieren. (Jakowlew 2006; Hanahan and Weinberg 2011) So fördern diese Tumorinitiation, -progression und Metastasierung. (Bierie and Moses 2010)

Dieser Effekt resultiert grundsätzlich aus der Inhibition eines physiologischen Mechanismus, wobei TAN hier keine zunächst Rolle spielen. Im Verlauf jedoch sind diese Zellen wichtig für Bereitstellung dieses Zytokins, wodurch indirekt protumoröse Effekte vermittelt werden. Diese Bereitstellung erfolgt in einer Art und Weise, welche Hanahan und Weinberg auch bei der Freisetzung anderer Wachstumsfaktoren im Tumor beobachteten. (Hanahan and Weinberg 2011) Neben seinem direkten Einfluss auf maligne Zellen, reguliert TGF- β auch essentielle Immunreaktionen zugunsten des Tumors. Im Mausmodell konnte nach adoptivem Transfer von modifizierten CD8⁺ Zellen, welche einen inaktiven TGF- β Rezeptor exprimierten, eine gesteigerte Apoptose von Prostatakarzinomzellen beobachtet werden. (Zhang et al. 2005) Wie bereits erwähnt führt die Inhibition von TGF- β außerdem zur Ausbildung eines antitumorösen TAN-Phänotyps in der Maus. (Fridlender et al. 2009)

Demzufolge besitzt dieser Wachstumsfaktor einen signifikanten Einfluss auf viele Aspekte des Krankheitsverlaufs. Typischerweise sezernieren Tumorzellen TGF- β überwiegend als inaktiven Komplex in die ECM. (Sionov et al. 2014) Verschiedene Enzyme sind dann in der Lage den Wachstumsfaktor aus seiner latenten Form freizusetzen. Zu diesen zählen auch die von TAN produzierte NE und MMP9. (Wada et al. 2006; Wada et al. 2007; Bierie and Moses 2010) Zusätzlich können ROS, welche ebenfalls von neutrophilen Granulozyten gebildet werden, inaktives TGF- β aktivieren. (Barcellos-Hoff and Dix 1996) Durch die Aktivierung und im Verlauf stetig zunehmende Rekrutierung von TAN scheint als immer mehr TGF- β freigesetzt zu werden. Dessen vielfältige Effekte beschleunigen schließlich die Tumorprogression exponentiell. (Sionov et al. 2014)

Da die TGF- β Freisetzung von zentraler Bedeutung ist, möchte ich bereits an dieser Stelle auf eine Hypothese eingehen, welche im Verlauf dieser Arbeit noch öfter dargelegt wird. Für diese ebenfalls wichtig ist Fähigkeit gewisser TAN-Subsets der Maus, in frühen Tumorstadien antitumorös und T-Zell stimulatorisch wirken zu können (Fridlender et al. 2009; Mishalian et al. 2013; Singhal et al. 2016)

Dadurch lässt sich folgende Vermutung aufstellen: Die Reaktion auf eine maligne Entartung führt zunächst zu einem Einstrom von neutrophilen Granulozyten in das Gewebe. Die von neoplastischen Zellen provozierte Entzündung induziert in diesen die Sekretion von Effektorsubstanzen, welche potentiell zytotoxisch wirken können. Wie erwähnt zählen dazu die NE sowie MMP9, Cathepsin G und ROS. Zunächst führt dies zur Elimination eines Teils der Tumorzellen, wodurch eine große Menge an potentiellen Tumorantigenen freigesetzt wird. Diese führen über Antigenpräsentation zur Aktivierung von T-Zellen und somit zur Induktion einer adaptiven Immunreaktion. Im Zuge dieser wird u.a. INF- γ freigesetzt, welches die Aktivität der neutrophilen Granulozyten weiter erhöht. Wie bereits bei der Beschreibung der MDSC erwähnt sind ROS, deren Sekretion nun ebenfalls immer weiter gefördert wird, jedoch auch zur Unterdrückung zahlreicher T-Zelleffekte in der Lage (darunter Abschwächung der CD8⁺ Funktion sowie Hemmung der Th1-Induktion). (siehe S. 11) Gleichzeitig folgt auf die Sekretion hoher Mengen an ROS und Proteasen eine immer stärker werdende Freisetzung von TGF- β aus seiner latenten Form. Dadurch wird einerseits die adaptive Immunreaktion u.a. von CD8⁺ T-Zellen (wie erwähnt der wichtigste Mediator der antitumorösen Immunreaktion) gehemmt und außerdem die Polarisierung von TAN in einen protumorösen Phänotyp gefördert, welcher die Tumorprogression aktiv unterstützt. (Sionov et al. 2014)

3.8. Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Stimuli:

Das alleinige Vorhandensein eines chronisch proliferativen Stimulus scheint häufig nicht auszureichen, um die Progression der malignen Entartung zu gewährleisten. So existieren in der Zelle neben proliferativen Signalpathways auch solche, deren Aktivierung zu einer starken Hemmung der Zellteilung führt und diese dadurch limitiert. Die charakteristisch unkontrollierte Mitose von Tumorzellen kann demnach durch die adäquate Funktion dieser inhibitorischen Pathways unterdrückt werden. Gene, welche die daran beteiligten Proteine kodieren, werden daher als *Tumorsuppressorgene* bezeichnet. Deren Inaktivierung ist ein weiteres typisches Charakteristikum nahezu aller Tumoren. Mittlerweile ist eine Vielzahl

solcher Gene bekannt und es werden laufend neue beschrieben. Die Funktion von potentiellen Tumorsuppressorgenen wird durch artifiziell induzierten Funktionsverlust im Tiermodell bewiesen. Diese inhibitorischen Pathways sind in der Lage den Zustand der Zelle und ihrer Umgebung konstant zu überwachen. Aufgrund des unterschiedlichen Ursprungs ihrer gemessenen Parameter lassen sie sich grob in den *intrinsischen* und *extrinsischen* Kreislauf unterteilen. Jeder dieser Kreisläufe besitzt einen zentralen Regulator, welcher durch Signale seiner unterschiedlichen Pathways aktiviert werden kann, wodurch in Folge ein wachstumshemmenden Effekte vermittelt wird. (Hanahan and Weinberg 2011)

Die Aktivierung des intrinsischen Kreislaufs beginnt i.d.R. an einem intrazellulären Stress-Sensor. Diese messen u.a die Verfügbarkeit von Sauerstoff und Nährstoffen, sowie das Ausmaß von eventuell vorhandenen DNA-Schäden. Abnormitäten dieser Parameter aktivieren über Signaltransduktion schlussendlich das Protein *p53*. Dieses ist in der Lage den Zellzyklus so lange zu arretieren, bis sich die Bedingungen für die Zelle gebessert haben oder etwaige Schäden behoben wurden. Kann dies nicht erreicht werden, ist p53 ebenfalls in der Lage die Apoptose zu induzieren. Dies dient dazu den gesamten Organismus vor schwerem Schaden zu schützen. (Sherr and McCormick 2002; Hanahan and Weinberg 2011)

Ausgangspunkt von Signalpathways des extrinsischen Kreislaufs ist typischerweise ein membranständiger Rezeptor, welcher durch wachstumshemmende Liganden aktiviert wird. Der zentrale Regulator dieses Kreislaufs ist das *Retinoblastom-Protein (Rb-Protein)*. In seiner dephosphorylierten Form bindet es Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Ungebunden fördern sie die Expression von wichtigen Proteinen der DNA-Replikation. Ihre Bindung an das Rb-Protein verhindert dies, weshalb die Zelle in diesem Fall nicht in die S-Phase der Mitose voranschreiten kann. (Goodrich et al. 1991) Neben den hemmenden Signale des extrinsischen Kreislaufs beeinflussen auch die Signale von proliferationsfördernden Pathways das Rb-Protein. Die gegensätzlichen Signale werden somit an diesem Punkt zusammengeführt und es entscheidet sich, ob die Zelle in die S-Phase eintreten kann oder dies verhindert wird. Biochemisch wird dies durch die unterschiedlichen Effekte erreicht, welche die unterschiedlichen Pathways auf den zentralen Regulator ausüben. Wachstumsfördernde Pathways (u.a Ras, PI3K/PKB-Akt) führen zur Bildung von *Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK)*. Diese phosphorylieren das Rb-Protein, wodurch anschließend E2F freigesetzt wird. Pathways des extrinsischen Kreislauf fördern Produktion von Proteinen (u.a INK4-Familie), welche die Phosphorylierung von Rb durch CDK's hemmen. Dies verhindert den Eintritt der Zelle in die S-Phase. (Sherr and McCormick 2002)

Ein Funktionsverlust der wachstumshemmenden Regulatoren führt zur Verschiebung dieser Balance, wodurch die Proliferation gefördert wird. Die Proliferation von gesunden Zellen wird also sowohl durch extrinsischen fördernde, als auch extrinsischen hemmende Faktoren reguliert. Es scheint plausibel, dass es sich hierbei um eine doppelte Absicherung handelt: Ein proliferativer Stimulus muss unter Umständen stärker sein, als eine eventuell vorliegende Inhibition. Erst dann ist es der Zelle möglich sich zu teilen. Bei ausschließlicher chronischen Aktivierung eines proliferativen Signalpathways (bsp. hyperaktives RAS) treffen dessen Signale auf Ebene des Rb-Proteins dennoch auf die hemmenden Signale des extrinsischen Kreislaufs. Wird diese schützende Komponente jedoch gleichzeitig kompromittiert, resultiert daraus eine Steigerung der Effektivität des chronisch proliferativen Signals. Dies erklärt das häufige Auftreten derartiger *loss-of-function* Mutationen in humanen Tumoren.

Die Kompromittierung dieser schützenden Kreisläufe muss allerdings nicht zwangsläufig durch deren Funktionsverlust erfolgen, wie sich an den Effekten der TAN zeigt. Diese scheinen dazu in der Lage zu sein, spezifische inhibitorische Mechanismen zugunsten des Tumors unterminieren. Dadurch beeinflusst wird vor allem der hemmende Einfluss der *Kontaktinhibitor*: In einer Zellkultur weisen gesunde Zellen spezifische Verhaltensmuster auf. Über Zell-Zell-Verbindungen formen sie zweidimensionale Monoschichten. Diese Kontakte scheinen einen wachstumshemmenden Stimulus auf die Zellen auszuüben und stellen dadurch die Integrität der Monoschichten sicher. Interessanterweise geht dieser Mechanismus in Tumorzellen verloren, weshalb diese in vitro häufig dreidimensionale Zellhaufen bilden. Hierbei handelt es sich vermutlich um das in vitro Erscheinungsbild eines Mechanismus, der in vivo dafür sorgt dass eine adäquate Gewebsarchitektur aufrechterhalten werden kann. (Hanahan and Weinberg 2011)

Bis dato sind mehrere Mechanismen bekannt, die einen Beitrag zur Kontaktinhibitor leisten. Besonders der Effekt des NF2-Genprodukts *Merlin* scheint bezüglich der TAN Effekte von besonderem Interesse zu sein: Die Mutation dieses Gens führt im Menschen zum Auftreten der Neurofibromatose Typ 2. In Folge kommt es zur Bildung diverser Tumoren des ZNS, u.a Schwannome und Meningeome. (Striedinger et al. 2008) Das Protein Merlin erfüllt wichtige Aufgaben für die Bildung und Aufrechterhaltung von interzellulärer Verbindung. Es ist in der Lage das Zelladhäsionsmolekül *E-Cadherin* mit Tyrosinkinase Rezeptoren benachbarter Zellen (u.a EGFR) zu vernetzen. Dadurch kommt es nicht nur zu einer Stärkung der Zelladhäsion, sondern ebenfalls zur Inaktivierung der beteiligten Wachstumsfaktorrezeptoren. Durch diese quantitative Reduktion stehen deren Liganden nun weniger potentielle Andockstellen zur Verfügung, wodurch die Zelle in Summe unempfindlicher für

wachstumsfördernde Stimuli wird. (Okada et al. 2005; Curto et al. 2007; Hanahan and Weinberg 2011)

In vitro Experimente zeigten, dass die Co-Kultivierung von TAN mit einer Monoschicht aus Zellen des *pankreatisch-duktales-Adenokarzinom (PDAC)* deren Dyshäsion fördern. Zurückzuführen ist dies auf eine Funktion der NE, welche in der Lage ist E-Cadherin abzubauen. (Gaida et al. 2012)

Beobachtungen im Colitis-Ulcerosa-assoziierten-Tumor Mausmodell zeigten, dass es in Folge einer chemisch induzierten chronischen Colitis vermehrt zum Auftreten von Tumoren kommt. In den Entzündungsherden fand sich neben einer erhöhte Konzentration von CXCL2 ebenfalls eine erhöhte Anzahl an CXCR2⁺ Neutrophilen. Die Aktivierung der CXCL2-Achse führte außerdem zur Produktion von MMP9 und NE, welche eine erhöhte Proliferation und Angiogenese bedingten. Die Verabreichung von anti-Ly6G führte sowohl zur verringerten mRNA-Expression dieser Proteasen sowie zur signifikanten Reduktion dieser Effekte. (Shang et al. 2012) Daher lässt sich vermuten, dass der wachstumsfördernde Effekt u.a durch die verminderte Kontaktinhibition vermittelt wird, bewerkstelligt durch den NE-assoziierten E-Cadherin Abbau. Analog zu den Beobachtungen im erwähnten Colitis-Ulcerosa Mausmodell, findet auch in der Publikation von Hanahan und Weinberg Erwähnung, dass entzündliche Prozesse bereits in den frühesten Stadien der neoplastischen Entartung auffindbar sind und diese somit bereits von Beginn an aktiv unterstützen könnten (Shang et al. 2012; Hanahan and Weinberg 2011) Möglicherweise geschieht dies mitunter durch die wachstumsfördernden und die Kontaktinhibition-hemmenden Mechanismen der Neutrophilen Elastase.

Der Hypothese von Sionov et al. (2015) bezüglich des zeitlichen Ablaufs und der Veränderung von TAN im Zuge der Tumorprogression, sowie den bislang bekannten Funktionen von humanen TAN würde dies allerdings auf den ersten Blick widersprechen. Denn diese deuten darauf hin, dass TAN in den Frühstadien der malignen Erkrankung antitumoröse Effekte ausüben und die Elimination von Tumorzellen möglicherweise entscheidend mitbeeinflussen. (Sionov et al. 2014; Eruslanov et al. 2017) Shaul und Fridlender wiesen allerdings erst kürzlich in einer Publikation darauf hin, dass die Effekte neutrophiler Granulozyten äußerst dynamisch sind und durchaus bekannt ist, dass diese zur selben Zeit zwei komplett gegensätzliche Funktionen ausüben können, möglicherweise aufgrund verschiedener, gleichzeitig aktiver Subsets. (Shaul and Fridlender 2019)

Es wäre nicht überraschend wenn diese Dichotomie auch die Funktionen der NE betreffen würde. So publizierten Gregory und McGarry Houghton zum einen, dass hohe Konzentra-

tionen dieser Protease zytotoxisch auf A549 Lungentumorzellen wirkt. (Gregory and McGarry Houton 2011) Zum anderen beschrieben sie ebenfalls erstmalig den proliferationsfördernden Einfluss der NE durch den Abbau von IRS1. (Houghton et al. 2010)

3.9. Resistenz gegenüber Zelltod/Induktion replikativer Immortalität:

Eine weitere Absicherung des Organismus gegen maligne Entartung ist der induzierbare Zelltod in Form der Apoptose. Dieser Prozess ist eng mit den bereits beschriebenen wachstumshemmenden Signalkreisläufen verbunden. Er kann als drastischste Maßnahme betrachtet werden die eintritt, sollten diese versagen. Auslöser sind eine Vielzahl an Stressoren (u.a erhöhtes onkogenes Signaling, ungenügende Konzentrationen an Wachstumsfaktoren, Nähr- und Sauerstoffmangel sowie DNA-Schäden). Im Anschluss an deren Auftreten kommt es zur Erhöhung der p53-Konzentration in der Zelle. Wie bereits erwähnt arretiert dieses Protein nicht nur den Zellzyklus, sondern ist unter Umständen in der Lage Zelltod zu induzieren. Dies erreicht es durch eine veränderte Interaktion zwischen den Mitgliedern der BCL-2 Proteinfamilie. Diese lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen, eine *proapoptotische* und eine *antiapoptotische*. Zu ersterer zählen *Bax* und *Bak*, welche in der äußeren Membran von Mitochondrien verankert sind. Deren Effekte werden durch Mitglieder der zweiten Gruppe (u.a *Bcl-2*, *Bcl-xl*, *Bcl-w*) unterdrückt. Sie binden *Bax* und *Bak*, über eine spezielle Protein-Protein-Interaktionsdomäne, das BH3-Motiv. Ohne diese Interaktion führen die Mitglieder der proapoptotischen Familie zur Disruption der Mitochondrienmembran, wodurch Cytochrom-C in das Zytoplasma freigesetzt und dadurch die Enzyme der Caspasefamilie aktiviert werden, welche den enzymatisch vermittelten Zerfall der Zelle verursachen. Die in sich kollabierten Reste, die *apoptotic bodies*, werden dann von professionellen Phagozyten beseitigt.

Entscheidend für die Induktion ist, dass spezielle Proteinen dieses Wechselspiel der beiden Gruppen zugunsten von *Bax* und *Bak* beeinflussen können. Sie werden als BCL-2-artige Proteine bezeichnet und besitzen ebenfalls BH3-Motive (*BH3-only Proteine*). Unter bestimmten Bedingungen werden sie vermehrt gebildet und binden entweder Mitglieder der antiapoptotische Fraktion, wodurch diese ihre Funktion nichtmehr ausüben können, oder aktivieren direkt die Proteine der proapoptotischen Gruppe. Eine verlängerte Expression von p53 führt beispielsweise zur Bildung der BH3-only Proteine *Noxa* und *Puma*, welche dies bewirken. (Lowe et al. 2004; Juntila and Evan 2009; Hanahan and Weinberg 2011) Im Laufe ihres Lebens akquirieren Zellen potentiell laufend neue DNA-Schäden.

Da hierdurch in Folge eine maligne Entartung begünstigt werden kann, wird diese Schutzfunktion nach einer gewissen Anzahl an Zellteilungen automatisch aktiviert, um den Organismus vor schweren Schäden zu bewahren. Tumoren stehen daher vor einer besonderen Herausforderung, sind doch sowohl chronisch erhöhte Zellproliferation, als auch ein erheblich mutiertes Genom essentiell für Krankheitsentstehung und Progression. Um zu überleben müssen maligne Zellen daher sowohl eine Unempfindlichkeit gegenüber proapoptischen Stimuli, sowie eine replikative Immortalität entwickeln. Im Zuge derartiger Reprogrammierung kommt es in der Zelle interessanterweise zum Auftreten gravierender Kollateralschäden, die die gesamte weitere Krankheitsprogression massiv mitbestimmen. (Hanahan and Weinberg 2011) Da sich in mehreren Publikationen auch Hinweise für eine begünstigende Beteiligung von TAN hinsichtlich dieser Prozesse findet, sollen diese kurz näher beleuchtet werden: Abhängig von ihrer spezifischen Differenzierung durchläuft eine Zelle im Laufe ihres Lebens eine gewisse Anzahl an Zellzyklen. Allerdings ist die obligate DNA-Verdoppelung vor jedem Durchlauf ein potentiell fehleranfälliger Prozess, wodurch es zum Auftreten von Mutationen kommen kann. Mit längerer Lebensdauer geht weiters auch eine verlängerte Exposition gegenüber potentiell Genom-schädigenden Substanzen einher. Jedoch sind die Korrekturmechanismen der Zelle in der Lage, das Ausmaß der dadurch verursachten Spontanmutationen äußerst gering zu halten. Eine komplette Verhinderung dieser ist dennoch nicht möglich. Außerdem wäre in diesem Fall ein Evolutionsprozess von Lebewesen nicht möglich. Eine kontrollierte Elimination von zu alten, geschädigten Zellen ist somit zwingend erforderlich. (Salk et al. 2010)

Die Enden chromosomaler DNA werden als Telomere bezeichnet. Hierbei handelt es sich um einen der zentralen Regulatoren der Apoptoseinduktion. Fundament der Telomere ist ein 6 Basenpaare langes Satelliten-DNA Muster, welches sich repetitiv wiederholt. Bei jedem Durchlaufen des Zellzyklus geht ein kleines Fragment der Telomere verloren. Somit werden sie im Verlauf sukzessive kürzer. Erreicht diese Reduktion einen kritischen Punkt werden die Chromosomen instabil und anfällig für sog. *End-zu-End-Fusionen*, wodurch *dizentrischen Chromosomen* entstehen. Dies wird auch als *Telomerkrise* bezeichnet und führt in Folge zur Apoptose. (Ducray et al. 1999; Blasco 2005; Salk et al. 2010)

In der überragenden Mehrheit der Tumoren wird dieser Prozess jedoch durch die Expression eines Enzyms verhindert, welches normalerweise nur in Keim- und Stammzellen auftritt, die *Telomerase*. (Cong et al. 2002; Blasco 2005)

Dabei handelt es sich um eine spezielle DNA-Polymerase, die in der Lage ist Telomersegmente neu zu generieren und an die chromosomalen Enden anzufügen. In diesem Fall werden die Chromosomen erneut stabilisiert und somit der induzierte Zelltod verhindert.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass es in entarteten Zellen häufig zunächst eine Telomerkrise variabler Dauer stattfindet, welche dennoch überlebt wird. Erst im weiteren Verlauf kommt es zur Expression der Telomerase. (Hanahan and Weinberg 2011) Auffällig hierbei ist, dass es sich vor allem um prä-maligne Zellen handelt. (Hansel et al. 2006; Kawai et al. 2007) Besonders erwähnenswert ist, dass das Auftreten der instabilen Chromosomen im Rahmen der Telomerkrise einen massiven protumorösen Effekt verursachen kann: Die kritische Verkürzung der Telomere resultiert zunächst in einer Instabilität des Chromosoms. Wird dieses Chromosom in der S-Phase verdoppelt, entsteht ein zweites instabiles homologes Chromosom. Diese Instabilität begünstigt das Auftreten von End-zu-End-Fusionen, durch die es einer strukturellen Verbindung der beiden Chromosomen kommt. Dadurch können sie in der Anaphase, in welcher die Chromosomen durch mikrotubulären Zug an den Zentromeren getrennt werden, nicht mehr gleichmäßig aufgeteilt werden. Aufgrund der atypischen Verbindung des dizentrischen Chromosoms kommt es an einer zufälligen Stelle zum Strangbruch. Resultat sind zwei ungleiche haploide Chromosomen. Eine der Tochterzellen erhält das Chromosom mit einer variablen Anzahl an Amplifikationen von Genen, die andere das mit einer variablen Anzahl an Deletionen. Da diese jedoch selbst wiederum keine Telomere besitzen, wiederholt sich dieser Prozess während der Mitose der Tochterzellen erneut und tut dies fortlaufend in jeder weiteren Zellgeneration. Dies wird als *breakage-fusion-bridge cycle* bezeichnet. (Murnane 2012)

In gesunden Zellen ist das Auftreten dizentrischer Chromosomen ein starkes Gefahrensignal und ein Auslöser der Apoptose. Wird diese jedoch verhindert, führt dies zu einem exponentiellen Anstieg der Mutagenität des Genoms. Diese kann nun für erhebliche genetische Diversifikation und Entartung sorgen. Führen diese Mutationsprozesse zur Induktion der Telomerase-Expression, kann diese nun die Telomerenden wiederherstellen, wodurch der Zyklus durchbrochen wird. Im Falle maligner Entartung sind das Resultat Zellen, welche bereits vor dem BFB-Prozess u.a. zur unkontrollierten Proliferation neigten und deren Genom während des BFB-Zyklus massiv geschädigt und modifiziert wurde. (Hanahan and Weinberg 2011)

Analysen von humanem Gewebe zeigten, wie essentiell dieser Prozess für die Entstehung humaner Tumoren ist: In Vergleichen zwischen prä-malignen und malignen Brustgeweben wurde beobachtet, dass in Ersteren keine Telomeraseexpression stattfand, diese jedoch erodierte Telomerregionen und deutliche Anzeichen nonklonaler chromosomaler Veränderungen aufwiesen. In Tumorzellen wiederum war eine deutliche Telomeraseexpression nachweisbar und es fand sich eine klonale Häufung spezifischer aberranter Karyotypen. (Chin et al. 2004; Raynaud et al. 2010)

Wenn also die Mechanismen des programmierten Zelltod kompromittiert werden, folgt initial eine Zunahme der Mutagenität und somit auch der Progression entarteter Zellen, insbesondere im Rahmen der Telomerkrise. Expression der Telomerase führt letztendlich zur Immortalisierung der genetisch stark beschädigten Zellen. (Hanahan and Weinberg 2011) Bleibt die Immortalisierung aus, führt die immer weiter ansteigende chromosomale Instabilität schlussendlich zu massiven Defekten im Stoffwechsel, welche zum Absterben der Zelle führen. (Boland et al. 2009; Dabas et al. 2012) Dies ist ein hervorragendes Beispiel für Darwin'sche Selektion, welche an mehreren Stellen der Tumorphathogenese eine Rolle spielt. (Salk et al. 2010)

Daher besteht eine enge Verbindung zwischen den Hallmarks „Widerstand gegen den Zelltod“ und „Erwerb replikativer Immortalität“, wobei Effekte des Ersteren u.a. den Erwerb des Zweiteren unterstützen, und somit eine wichtige Funktion im Voranschreiten der Progression spielen.

Auch diese Prozesse können durch mehrere TAN produzierte Substanzen beeinflusst werden:

Nach ihrer Injektion wurde in MMP9-defizienten-Mäusen eine 4-fache Zunahme des Anteils apoptotischer A549 Zellen, verglichen mit MMP9-kompetenten-Konterollmäusen, beobachtet. Speziell MMP9 aus im Knochenmark generierten Zellen scheint bereits im Frühstadium einen wichtigen Beitrag für das Überleben von entarteten Zellen zu leisten. (Acuff et al. 2006) Auf die besondere Stellung neutrophiler Granulozyten im Bezug auf diese Protease, wurde bereits zuvor eingegangen. (siehe S. 45) Wie genau MMP9 das Tumorzellüberleben fördert ist jedoch noch unklar. Eine möglicher Mechanismus ist ihre Interaktion mit Zelloberflächenmolekülen. Komplexiert MMP9 mit CD44 kommt es zur Aktivierung von latentem TGF- β welches für die antiapoptotischen Effekte verantwortlich sein könnte. (Acuff et al. 2006) Gehen diese Effekte tatsächlich von diesem Zytokin aus ist plausibel, dass andere TGF- β freisetzenden Produkte der Neutrophilen wie ROS oder NE dadurch ebenfalls das Tumorzellüberleben unterstützen können. (Sionov et al. 2014)

Einen zusätzlichen Apoptose-hemmenden Stimulus scheint das Zytokin TNF- α zu liefern, welches im TME ebenfalls häufig erhöht ist. Hinweise lieferten Vergleiche zwischen TNF- α - und TNF- α -Rezeptor-defizienten-Mäusen. Letztere waren im Vergleich zur Kontrolle waren empfindlich gegenüber chemischer Tumorinduktion. (deVisser et al. 2006)

Eine Vielzahl an Zellen des TME exprimieren TNF- α -Rezeptoren, weshalb dieses Zytokin eine Vielzahl von Funktionen zu regulieren vermag. Dazu zählt auch die Förderung des Überlebens neoplastischer Zellen. (Balkwill et al. 2005) Der zugrundeliegende Mechanismus

mus wurde in Mäusen mit Neigung zur Entwicklung cholestatischer Hepatitis beobachtet. Eine derartige Veranlagung begünstigt die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms. Nähere Untersuchungen zeigten, dass Überleben und maligne Progression der Hepatozyten durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert wurden. Dessen Aktivierung und Transfer in den Zellkern ist wiederum abhängig von parakrinen vermittelten TNF- α Signalen. Eine Hemmung dieser Signale sowie die Induktion des NF- κ B-Inhibitors *I- κ B* führten auch in fortgeschrittenen Stadien neoplastischer Progression zu einer Unfähigkeit der Zellen sich in ein vollständiges HCC zu entwickeln. (Pikarsky et al. 2004) Ähnliche Ergebnisse konnte man in Mausmodellen mit Kolitis assoziierter Tumorgenese feststellen: Hier wurde die NF- κ B Funktion indirekt durch Knockout eines wichtigen Proteins in dessen Signalpathway, dem *Inhibitors der NF κ B-Kinase (IKK β)*, erreicht. (Greten et al. 2004)

Als Transkriptionsfaktor führt NF- κ B zur Expression einer Vielzahl von Genen, deren Produkte verschiedene Hallmarks beeinflussen (z.B. MMP9, CXCL8, COX2, VEGF). Unter diesen fanden sich auch mehrere antiapoptotisch wirkende Proteine, u.a. BCL-2. (Luo et al. 2004) Der Anstieg antiapoptotischer BCL-2 Proteine resultiert in einer verstärkten Bindung der proapoptotischen Faktoren *Bak* und *Bax*. Deren Bildung wird i.d.R. durch p53 induziert um Apoptose auszulösen. In Verbindung mit antiapoptotischen BCL-2 Proteinen sind *Bak* und *Bax* jedoch nicht mehr in der Lage die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran zu stören. Somit kommt es zu keiner Cytochrom-C Freisetzung und die Apoptose wird verhindert. (Hanahan and Weinberg 2011) Die Expression dieser antiapoptotischen Mediatoren bedingt also ein gesteigertes Tumorzellüberleben. (Sionov et al. 2014) Jedoch zeigen Beobachtungen der letzten Jahre, v.a. im Kontext mit tumorinfiltrierenden myeloischen Zellen, diesbezüglich Widersprüche auf: Sowohl TAM als auch TAN produzierten TNF- α im TME. (Mishalian et al. 2013) Hinsichtlich TAM lassen sich dessen Effekte mit dem oben beschriebenen Mechanismus vereinbaren. So wurde der antiapoptotische Effekt ihrer TNF- α Produktion auf prä-maligne Zellen in mehreren Studien beschrieben. (Balkwill 2002; Karin and Greten 2005) Paradoxe Weise allerdings, weisen protumoröse M2-TAM eine verminderte Produktion von TNF- α sowie eine reduzierte Expression von NF κ B auf. (Mantovani and Sica 2010) Während die Verringerung des Letzteren ein Ausdruck des limitierten inflammatorischen Potentials der Makrophagen sein könnte, passend zur typischen schwach ausgeprägten chronischen Entzündung im TME, erscheint die verminderte Produktion von TNF- α in Anbetracht der oben beschriebenen Beobachtungen folgewidrig. Zellen die im Krankheitsverlauf immer protumoröser werden, würden einen wichtigen protumorösen Mechanismus verlieren.

Eine mögliche Erklärung liefern Publikationen, welche die Effekte von TNF- α und TAN untersuchen: Im Gegensatz zu den vorigen Beobachtungen ist beispielsweise seit längerem bekannt, dass TAN mittels TNF- α tumorzytotoxisch wirken können. (Di Carlo et al. 2001) Der von Fridlender et al. beschriebene N1-TAN stimuliert u.a durch TNF- α eine antitumoröse CD8⁺ CTL-Reaktion. (Scapini et al. 2000; Fridlender et al. 2009)

Interessanterweise findet sich analog zu TAM dieselbe Reduktion der TNF- α Produktion auch bei TAN. Nach der Etablierung des Tumors, finden sich darin weniger TNF- α produzierende TAN. (Mishalian et al. 2013)

Daraus lässt sich folgendes schließen: TNF- α scheint unter gewissen Umständen einen protumorösen Effekt zu besitzen, indem es die Induktion es programmierten Zelltods in Tumorzellen abschwächt und dadurch u.a. die gravierenden Auswirkungen der BFB-Zyklen begünstigt. Allerdings scheint es ebenso proapoptotische Wirkungen ausüben zu können, nicht zuletzt aufgrund seiner potenten proinflammatorischen Wirkung. Interessanterweise wurde der protumoröse TNF- α Effekt von TAM nur in prämaligen Zellen beobachtet. Kommt es in diesen zu einer Erhöhung der Mutationsrate, wird dadurch die instabile Gewebshomöostase endgültig gestört und es folgt die Entwicklung eines vollständig ausgeprägten Malignoms. Da dafür Immortalisierung von Nöten ist, verschwindet mit ihrem Auftreten ein potenter Apoptosestimulus, die Telomerkrise. Ab diesem Zeitpunkt besteht nun möglicherweise weniger Bedarf an Stimuli, welche die Resistenz gegenüber des induzierten Zelltods unterstützen. Im Verhältnis könnten dadurch die zytotoxischen Effekte von Mitgliedern der TNF- α -Familie relevanter werden. Beispielsweise ist bekannt, dass *TNF α -apoptosis-inducing-ligand (TRAIL)*, ebensoein Mitglied, in der Lage ist selektiv transformierte, entartete Zellen zu eliminieren während gesunde Zellen davon nicht betroffen sind. (Brincks et al. 2013; Amarante-Mendes and Griffith 2015)

Weiters ist bekannt, dass NF κ B nicht am tumorzytotoxischen Effekt von TNF- α beteiligt ist. (Verma et al. 1995) Man kann daher vermuten, dass TNF- α initial ein weiterer Faktor ist, welcher die Transformation von prämaligen in maligne Zellen fördert. Nachdem diese vollzogen wurde ist es für die weitere Progression vorteilhafter, die tumorzytotoxischen und proinflammatorischen TNF- α Effekte zu inhibieren. Dies könnte die progressionsabhängigen Veränderungen der Expression erklären.

Ein weiterer Apoptose-hemmender Mechanismus von TAN könnte aus ihrer Beeinflussung des PI3K-Signaltransduktionsweg stammen, dessen proliferationsfördernde Wirkung bereits beschrieben wurde. (siehe S.44) Zu multifunktionellen Effekten dieses Pathways zählt

neben der Proliferationsförderung auch die Hemmung des Zelltods. Diese Tatsache machen sich Tumoren zunutze, indem sie durch diese die erhöhte Eigenproduktion von Wachstumsfaktoren aktivieren (in diesem Fall *Insulin-like-growth-factor 1/2*) und dadurch zur autokrinen Stimulation führen. (Hanahan and Weinberg 2011) Die NE assoziierte Aktivierung von PI3K in Tumorzellen sollte daher auch zu einer erhöhten Apoptoseresistenz führen.

Jedoch muss hierbei erwähnt werden, dass zu starke PI3K - Signale in Folge zur Expression eines weiteren Zelltod-induzierenden BH3-only Protein, *Bim*, führt. Dies stellt einen weiteren zellulären Schutzmechanismus da, welcher zur Selektion der Tumorzellen führt. Dadurch wird der Phänotyp bevorteilt welcher die Signale am besten ausnützen kann, ohne gleichzeitig dadurch Apoptose zu induzieren. (Hanahan and Weinberg 2011) Sehr wahrscheinlich resultiert der endgültige Effekt aus der Summe der verschiedenen Mechanismen. So könnten die erhöhten proapoptotischen Signale eines hyperreaktiven PI3K-Signaltransduktionswegs durch den antiapoptotischen TNF- α Effekt kompensiert werden.

3.10 Induktion tumorassoziierter Neoangiogenese:

Ab einem gewissen Zeitpunkt in der Tumorgenese, besteht ein Bedarf an neugebildeten Gefäßen, welche in den Tumor einwachsen und ihn mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. (Murdoch et al. 2008) Ob allerdings allein der Versorgungszustand tatsächlich der entscheidende Faktor für die Induktion der Angiogenese ist, wird nun seit längerem hinterfragt. Noch bis vor kurzem wurde angenommen, dass die Bildung von tumorassozierten Gefäßen dann benötigt wird, wenn sich bereits eine schnell wachsende, makroskopische sichtbare Läsion gebildet hat. Erst ab diesem Zeitpunkt würden Tumorzellen selbst die Neubildung der Gefäße induzieren. Jedoch werfen Veränderungen im Energiestoffwechsel, welche typischerweise früh in Tumorzellen stattfinden, zahlreiche, teils noch ungeklärte Fragen auf. Die daraus resultierenden Effekte erschweren bis heute eine klare Aussage darüber, ob die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen tatsächlich der Hauptgrund für die Induktion der Angiogenese sind. (Hanahan and Weinberg 2011)

Die allgemein bekannteste Anomalie wurde bereits in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts von Otto Warburg beschrieben: Im Zuge des nach ihm benannten "Warburg-Mechanismus" verändert sich in Tumorzellen die Art wie Glukose metabolisiert wird. Während in gesunde Zellen mittels aerobar Glykolyse entstandenes Pyruvat dem Citratzyklus zuge-

führt wird und die entstandenen Reduktionsäquivalente der oxidativen Phosphorylierung dienen, verzichten Tumorzellen typischerweise auf die beiden letztgenannten Schritte. Sie bauen Glukose durch die anaerobe Glykolyse zu Laktat ab, welches in das TME exportiert wird. (Warburg 1956) Der überwiegende Anteil des produzierten *Adenosintri-phosphat (ATP)* entsteht jedoch durch die Verstoffwechslung der Reduktionsäquivalente in der Atmungskette. Durch die anaerobe Glykolyse entsteht 18-mal weniger ATP, welches den Tumorzellen zur Verfügung steht. (Hanahan and Weinberg 2011) Tumorzellen limitieren also paradoxerweise ihren Energiestoffwechsel, obwohl sie aufgrund ihrer gestiegenen Teilungsrate eigentlich mehr Energie benötigen müssten. Zwar kompensieren sie diesen Nachteil mit der erhöhten Expression des Glukosetransporters *GLUT-1*, gleichwohl erscheint diese Umstellung äußerst unintuitiv. (Jones and Tompson 2009) Die Tatsache, dass erhöhte Zellteilung auch eine erhöhte Biosynthese von diversen Makromolekülen und Zellorganellen benötigt, deren Bausteine (u.a Aminosäuren, Nukleoside) dem Tumor ebenfalls von extern zugeführt werden müssen, sowie das typische Auftreten von nekrotischen Prozessen im Tumor, scheinen zunächst gute Gründe für die Induktion von tumorassoziierter Neoangiogenese zu sein. (Hanahan and Weinberg 2011)

Eine andere Erklärung liefert die Hypothese von *Prof. Van Rensselaer Potter*, die aktuell eine Renaissance erlebt: Dieser schlussfolgerte, dass die fehlende weitere Verstoffwechslung der Intermediärprodukte zu ATP es erlaubt, diese für die Bildung eben jener oben genannter Bausteine für Zellorganellen und Makromoleküle zu verwenden. (Potter 1958; Van der Heiden et al. 2009) Weiters wurde mittlerweile beobachtet, dass der Warburg-Mechanismus auch in sich schnell teilendem embryonalem Gewebe zum Einsatz kommt um den hohen Biosyntheseanforderungen gerecht zu werden. (Hanahan and Weinberg 2011)

Mittlerweile ist auch bekannt, dass es zwischen verschiedenen Tumorzellpopulationen zu einer energetische Symbiose kommt: Eine Subpopulation metabolisiert Glukose mittels des Warburg-Mechanismus zu Laktat und sezerniert dieses in das TME. Die zweite Subpopulation nimmt dieses auf, führt es dem Citratzyklus zu, und verstoffwechselt die entstandenen Reduktionsäquivalente in der Atmungskette. Die Folge ist eine Steigerung der Stoffwechseleffizienz, welche es in Kombination mit der erhöhten Expression der Glukosetransporter erlaubt, die Effekte der erschwerten Nährstoffversorgung zu kompensieren. Während eine Subpopulation nur Glukose aufnehmen muss, muss nur die Zweite mit Sauerstoff versorgt sein um das bereitgestellte Laktat nützen zu können. Dadurch wird das

Überleben von Zellen unter hypoxischen Bedingungen erleichtert. Dieser Mechanismus findet sich ebenfalls unter physiologischen Bedingungen, u.a. im Energiestoffwechsel arbeitender Muskulatur, und wird mittels der Energieumstellung von Tumorzellen zweckentfremdet. (Semenza 2008; Feron 2009; Kennedy and Dewhirst 2010; Hanahan and Weinberg 2011)

Für eine gewisse Zeit erlaubt die Ökonomisierung von energetischen und synthetischen Stoffwechselprozesse vermutlich das Überleben unter Mangelbedingungen. Kann der Mangel dadurch jedoch nicht mehr kompensiert werden, kommt es zum nekrotischen Zelltod im betroffenen Areal. Wie bereits erwähnt, kommt es dadurch auch zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, weshalb die Vermutung entstand, dass maligne Prozesse ein gewisses Maß an Nekrose tolerieren, um die dadurch vermittelten progressionsfördernden Effekte zu erhalten. (Hanahan and Weinberg 2011)

Daraus resultiert ein folgender Widerspruch: Wenn Tumoren durch Toleranz von Nekrose einen Vorteil erhalten, dann wäre die Induktion der Angiogenese zu diesem Zeitpunkt von Nachteil. Obwohl durch den Energiemangel und die resultierende Nekrose myeloische Zellen rekrutiert werden, welche in großem Ausmaß an der Gefäßneubildung beteiligt sind, zeigen Daten aus Tier und Mensch, dass angiogene Prozesse bereits in viel früheren prä-malignen Stadien vorzufinden sind (u.a Dysplasien, Carcinoma in situ). (Hanahan and Folkman 1996; Raica et al. 2009) Des Weiteren vermuten manche Publikationen, dass gewisse Tumorentitäten auch aktiv antiangiogen sein könnten. So präsentieren hochaggressive Tumoren wie das pankreatische duktales Adenocarcinom regelmäßig hypo- und stellenweise komplett avaskuläre Areale. (Olive et al. 2009) Da aggressive Tumoren v.a für ein rapides Wachstum bekannt sind, müssten sich diese, wenn der Energiemangel wirklich ein solch kritischer Punkt in der Progression wäre, entweder eher als hypervaskulär präsentieren oder zu Grunde gehen.

Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur Tumorzellen, sondern auch die tumorinfiltrierenden myeloischen Zellen eine zentrale Rolle bei der Induktion der Angiogenese spielen. (Murdoch et al. 2008) Da deren Auftreten bereits in den frühesten Stadien der malignen Entartung beobachtet wurde, könnten diese die notwendige Erklärung für das frühe Auftreten der angiogenen Prozesse sein. (deVisser et al. 2006; Qian and Pollard 2010) Diese Beobachtungen erfordern eine Überarbeitung des bisherigen Modells der Tumorangiogenese. Die Annahme das maligne Zellen erst durch Auftreten von Nähr- und Sauerstoffmangel angiogene Prozesse induzieren um ihr Überleben zu sichern, ist nicht mehr haltbar. Mit

dem aufkommenden Interesse an der Funktion der TAN hat sich gezeigt, dass diese Zellen ganz wesentlich an der Bildung tumorassoziierter Gefäße beteiligt sind. Während in manchen Tumoren mutierte Onkogene der Grund für die erhöhte Expression von proangiogenen Faktoren darstellen, beobachtet man in anderen, dass diese Signale hauptsächlich durch Zellen des Immunsystems produziert werden. (Hanahan and Weinberg 2011)

Die Angiogenese selbst stellt einen der beiden gefäßbildenden Schritte während der embryonalen Entwicklung des Menschen dar. Sie folgt der zunächst stattfindenden *Vaskulogenese*, in welcher die ersten Endothelzellen im Organismus ausdifferenzieren und rudimentäre Gefäßröhren bilden. Vermittelt durch angiogene Stimuli, kommt es anschließend zum Aussprossen neuer Gefäße aus diesen. Im erwachsenen Organismus ist dieser Mechanismus die meiste Zeit hinweg inaktiv, und wird nur im Zuge von speziellen Gewebsreaktionen kurzzeitig aktiviert (u.a weiblicher Zyklus, Wundheilung). (Hanahan and Weinberg 2011)

Um eine übermäßige Aktivierung zu verhindern eine Notwendige aber gleichzeitig zuzulassen, existiert auch für die Angiogenese ein molekularer Schaltmechanismus (*angiogenic switch*), vergleichbar dem anderer biologischer Prozesse (z.b Apoptose). Beteiligt sind Zytokine, die sich einer von zwei Gruppen zuordnen lassen, einer Stimulierenden und einer Hemmenden. Aus Ersterer sind der mit als wichtigste *vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF)*, der plazentare Wachstumsfaktor (PIGF), sowie die Mitglieder der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (fibroblast growth factors - FGFs) zu nennen. (Carmeliet 2005; Murdoch et al. 2008; Ribatti 2008) Zur Gruppe der Inhibitoren zählen u.a *Thrombospondin-1 (TSP-1)* und *Angiostatin*. (Folkman 1995)

Anders als bei der Bcl-2-Familie der Apoptose, interagieren diese Faktoren jedoch nicht über Protein-Domänen miteinander. Sie aktivieren stattdessen spezifische Oberflächenrezeptoren, welche von endothelialen Zellen exprimiert werden. (Hanahan and Weinberg 2011) Während es in physiologischen Prozessen (z.b im Rahmen der Wundheilung) zur transienten Aktivierung der Angiogenese kommt, beobachtet man in Tumoren eine chronische Aktivierung dieser. Zu den typischen abnormen Charakteristika der daraus resultierenden Tumorgefäße zählen frühzeitiges Ausprossen von Kapillaren, verworrene, lecke und übermäßig verzweigte Gefäße, erhöhte endotheliale Proliferation und Apoptose, ungleichmäßiger Blutfluss sowie das Auftreten von Mikrohämorrhagien. (Baluk et al. 2005; Nagy et al. 2010)

Stellt man sich nun die Frage nach der Ursache dieses Ungleichgewichts, erkennt man wieder ein für Tumorerkrankungen typisches Muster: Einerseits führen Hypoxie sowie verstärkte onkogene Signale zur Erhöhung der VEGF-Genexpression in malignen Zellen. (Carmeliet 2005; Mac Gabhann and Popel 2008; Ferrara 2009) Jedoch wurde auch beschrieben, dass produziertes VEGF, ähnlich dem TGF- β , nach dessen Sekretion in Form einer latenten Vorstufe in der ECM gespeichert wird und erst die Wirkung von Matrix-Metalloproteasen (v.a MMP9) freigesetzt und aktiviert wird. (Kessenbrock et al. 2010) Wie bereits erwähnt können viele Zellen MMP9 produzieren, allerdings nehmen neutrophile Granulozyten hierbei eine besondere Rolle ein (u.a. durch TIMP-1 freie Sekretion, HOCL-Effekte). (siehe S. 45) Interessanterweise wurden für mehrere Chemokine der Neutrophilenrekrutierung ebenfalls proangiogene Effekte beschrieben (u.a CXCL8). (Uribe-Querol and Rosales 2015; Umansky et al. 2018) Im Mausmodell konnte außerdem beobachtet werden, dass CXCL6 in Melanomen nicht nur für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten wichtig ist, sondern auch mit einer Zunahme von Angiogenese und Tumorstromawachstum korreliert. (Gijbbers et al. 2005; Verbeke et al. 2011) Infolge der Verabreichung eines spezifischen Antikörper gegen CXCL6, kam es zu einer Reduktion ebendieser Effekte. (Verbeke et al. 2011) Von neutrophilen Granulozyten produziertes CXCL2 verstärkt ebenfalls die Angiogenese, sowie die Rekrutierung von weiteren Neutrophilen. (Strieter et al. 1995)

Allerdings muss auch angemerkt werden, dass besagte Chemokine ihre Effekte über die die Rezeptoren CXCR1/2 ausüben. (Sionov et al. 2014) Diese Rezeptoren finden sich auch auf malignen- und endothelialen Zellen selbst, sodass unklar ist ob die proangiogenen Effekte tatsächlich durch die Rekrutierung von TAN, oder doch eher durch direkte Stimulation an den entsprechenden Zellen bedingt sind. (Uribe-Querol and Rosales 2015) Obwohl diese Frage bis dato unbeantwortet ist, wurden mehrerer Mechanismen beschrieben, mit welchen TAN die Angiogenese stimulieren. Neben ihrer Genotoxizität und immun-suppressiven Effekten, zählen mache Publikationen die Angiogenese zu den Haupteffekten von protumorösen TAN. (McGarry Houghton and Gregory 2011)

Wie bereits angesprochen, stammt ein nicht unerheblicher Teil ihres angiogenen Effekts aus der Produktion von MMP9. In einem Modell, mit welchem die Karzinogenese von Langerhansinseln beobachtet werden konnte, wurde beschrieben, dass neutrophile Granulozyten direkt an diesem Prozess beteiligt sind. Die von Ihnen produzierte MMP9 setzt latent gebundenes VEGF frei und verschiebt dadurch die Balance in Richtung Angiogenese. Im Gegensatz zu ebenfalls MMP9-produzierenden Makrophagen, welche sich verstärkt

62

in der Peripherie der Läsionen akkumulierten, waren die Neutrophilen bevorzugt innerhalb dieser vorzufinden. Ihre Reduktion führte zu einer reduzierten Aktivierung der Angiogenese. (Nozawa et al. 2006)

Das angiogene Potential von neutrophilen Granulozyten wurde auch abseits von malignen Erkrankungen beobachtet: In Co-Kultur mit dreidimensionalen Kollagennetzen im ex ovo CAM-Modell führten isolierte humane Neutrophile zu einer starken Gefäßbildung. Die reine Applikation von aktiviertem MMP9 führte ebenfalls zu einer vergleichbaren Angiogenese, wodurch ihr Einfluss auf diesen Prozess bestätigt werden konnte. (Ardi et al. 2007)

Die Interaktion zwischen MMP9 und latentem VEGF konnte auch in verschiedenen Tumormodellen nachgewiesen werden, und könnte möglicherweise eine obligate Voraussetzung für die Induktion der Angiogenese darstellen. (Ebrahim et al. 2010; Uribe-Querol and Rosales 2015)

Ebenfalls scheinen klinische Beobachtungen diesen Hypothese zu unterstützen: So waren aus Tumorpatientinnen/-patienten isolierte neutrophile Granulozyten in der Lage erhöhte Mengen an MMP9 zu bilden. In HNSCC Patientinnen/Patienten war die MMP9 Produktion von TAN höher als die von allen anderen dazu befähigten Zellen im TME. (Dumitru et al. 2012) Des Weiteren korreliert bei HCC Patientinnen/Patienten eine erhöhte TAN-Konzentration mit einer verstärkten Angiogenese. (Kuang et al. 2009; Kuang et al. 2011)

Die Interaktion mit VEGF ist jedoch nicht der einzige proangiogene MMP9-Effekt. So wurde gezeigt, dass MMP9 ebenfalls zur Freisetzung von proangiogenem FGF2 führt. (Ardi et al. 2009)

Daten aus dem Mausmodell deuten jedoch auch darauf hin, dass das angiogene Potential von TAN abhängig vom Vorhandensein spezifischer Zytokine im TME sein könnte: So führte die Präsenz von $\text{INF-}\beta$ zur verringerten TAN medierten Angiogenese. Dies wurde damit begründet, dass durch die Wirkung des Zytokins die intrazellulären Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren *c-myc* und *STAT3* reduziert wurden. Diese wiederum fördern in neutrophilen Granulozyten die Expression von MMP9, aber auch von VEGF. (Jablonska et al. 2010)

Die Kenntnis der verantwortlichen Transkriptionsfaktoren ermöglicht die Entdeckung weiterer Zytokine, welche Gefäßneubildung fördern. Erwähnenswert ist u.a. der Granulozytenkoloniestimulierende Faktor (G-CSF): Dieser fördert über einen *STAT3* abhängigen Mechanismus die angiogenen Fähigkeiten von unreifen myeloischen Zellen. (Shojaei et al. 2007; Shojaei and Ferrara 2008) Diese Aktivierung würde erklären, warum G-CSF verdächtigt wird, die VEGF-Produktion in neutrophilen Granulozyten zu erhöhen. (Ohki et al. 2005)

Die Beantwortung dieser Frage ist hierbei auch von hoher klinischer Bedeutung. So scheinen die Effekte von kolonienstimulierenden Faktoren wie G-CSF oder GM-CSF äußerst komplex zu sein und dürften sowohl pro- als auch antitumoröse Effekte beinhalten. Bis dato ist noch fraglich, welche von beiden überwiegen. Jedoch werden beide Faktoren bereits heute routinemäßig auf onkologischen Abteilungen zur Bekämpfung therapieinduzierter Neutropenien eingesetzt. Angesichts ihrer potentiell protumorösen Effekte ist allerdings nicht mehr mit Sicherheit zu sagen, ob daraus tatsächlich immer ein Benefit resultiert oder die Verabreichung eventuell zum Nachteil der/des Patientin/Patienten ist. (Sionov et al. 2014)

Beispielsweise zeigten Beobachtungen, dass Brustkrebszellen durch die Produktion von GM-CSF in der Lage sind TAN derart zu stimulieren, dass diese als Reaktion Onkostatine bilden. In den malignen Zellen löst dies wiederum die Produktion von VEGF. (Queen et al. 2005)

Neben MMP9 beeinflussen weitere Proteasen der neutrophilen Granulozyten auf die Gefäßneubildung. Es lässt sich behaupten, dass all jene Enzyme, welche zur Veränderung von ECM und Basalmembran befähigt sind, grundsätzlich im Verdacht stehen proangiogen zu wirken zu können. Der Umbau der ECM scheint notwendig zu sein, damit sich neue Gefäße bilden können. (Ardi et al. 2007) Zu den bekanntermaßen beteiligten Proteasen zählt mitunter *Cathepsin G*. (Segal 2005) Dieses Enzym soll an dieser Stelle besonders hervorgehoben werden, da es sein angiogener Effekt über einen interessanten Mechanismus vermittelt: In einem Mammakarzinom-Mausmodell verstärkte Cathepsin-G zunächst TGF- β Signale, was eine gesteigerte Expression von VEGF und MCP-1 zur Folge hatte, welche schlussendlich die Angiogenese erhöhten. (Wilson et al. 2010)

Dies könnte eine Erklärung für eine bis dato noch unbeantwortete Frage bezüglich des Metastasierungsprozesses liefern: Hanahan und Weinberg vermuteten, dass maligne Zellen zur erfolgreicher Streuung diverse Veränderungen durchlaufen. Jedoch würden im Zuge dessen auch gewisse, bereits bei der Etablierung des Primärtumors erworbene Fähigkeiten verloren gehen. Zu diesen zählten Sie auch die Fähigkeit eine effektive Gefäßneubildung zu induzieren. Die erfolgreiche Bildung einer Makrometastase erfordert allerdings, diesen Hallmarks erneut zu erlernen. (Hanahan and Weinberg 2011) Mittlerweile ist bekannt, welchen entscheidenden Beitrag myeloische Zellen zur Etablierung von Markometastasen leisten. (Sionov et al. 2014) Die Ergebnisse der Publikation von Wilson et al. (2010) lassen vermuten, dass u.a. rekrutierte neutrophile Granulozyten diesen Prozess mitunter durch proangiogene Effekte unterstützen. Dies stellt jedoch nur einen ihrer, an

diesem Prozess beteiligten Mechanismen dar, weshalb nun genauer auf den Hallmark Invasion und Metastasierung eingegangen werden soll.

3.11. Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung:

Das Auftreten von Metastasen bedeutet bis dato häufig eine massive Verschlechterung der Prognose und Verminderung der Chance auf Heilung. (Cheng and Naoto 2011) So ist die metastatische Streuung der Hauptmortalitätsgrund für Krebspatientinnen/-patienten. (Cavallaro and Christofori 2004; Talmadge and Fidler 2010) Im Laufe der Invasion und Metastasierung wächst der Tumor zunächst sukzessive in das umliegende Gewebe ein, wodurch dieses geschädigt wird. Ab einem gewissen Punkt erwerben maligne Zellen ebenfalls die Fähigkeit, in angrenzende Gefäße eindringen. Über die Zirkulation gelangen sie zu anderen Geweben, in welche sie im Rahmen eines Extravasationsprozesses migrieren. Dort angekommen sind sie unter Umständen dazu in der Lage eine Makrometastase zu bilden. Diese schädigt nach ihrer Etablierung wiederum das benachbarte Gewebe durch dieselben Mechanismen, welche auch um die Primärläsion stattfinden. (Yang and Weinberg 2008; Talmadge and Fidler 2010; Galdiero et al. 2018)

Die zugrundeliegenden komplexen Mechanismen von Invasion und Metastasierung, waren um die Jahrtausendwende zu großen Teilen unbekannt. Aufgrund ihres hohen prognostischen Einflusses, ist die funktionale Beschreibung invasiver und metastatischer Prozesse heute ein großen Teil der modernen Krebsforschung. (Hanahan and Weinberg 2011)

Dass Tumoren durch die fortschreitende Progression ein höheres Maß an Malignität erwerben, ist seit langer Zeit bekannt. Das histologische Korrelat hiervon ist u.a die progressive lokale Invasion und das Auftreten von Fernmetastasen. Ebenfalls lässt sich an diesem Punkt der Tumorgenese partiell eine Veränderung der Zellform, sowie der Adhärenz an die ECM beobachten. (Hanahan and Weinberg 2011) Auf molekularer Ebene zeigt sich typischerweise eine veränderte Expression von bestimmten Zelladhäsionsmolekülen, einerseits eine Verminderung von *E-Cadherin*, andererseits eine erhöhte Expression von *N-Cadherin*. E-Cadherin ist an der Bildung von *Adherens-Junctions*, einer Form des Zellkontakts, beteiligt und gewährleistet dadurch Aufbau und Erhalt von gesunder, epithelialer Gewebsarchitektur. Diese ist ein obligate Voraussetzung für eine physiologische Organfunktion. (Cavallaro and Christofori 2004) Im Rahmen der Kontaktinhibition ist es auch an der Hemmung übermäßiger Proliferation beteiligt. (siehe S. 49) Dadurch wirkt E-Cadherin

anti-invasiv und anti-metastatisch. (Berx and van Roy 2009) Weiters wurde eine inverse Korrelation zwischen der Konzentration an exprimiertem E-Cadherin und Tumorgrading sowie Mortalität beschrieben. (Cavallaro and Christofori 2004) In der überwiegenden Mehrzahl der epithelialen Malignome lässt sich eine starke Verminderung seiner Expression beobachten. Dies erreichen maligne Zellen sowohl durch genetische, als auch durch epigenetische Modifikation. (Cavallaro and Christofori 2004; Berx and van Roy 2009) Andere Adhäsionsmoleküle hingegen werden zu diesem Zeitpunkt typischerweise vermehrt gebildet. Dabei handelt es sich v.a. um solche, die an Migrationsprozessen während der Embryogenese oder Entzündungen beteiligt sind.

Prominentestes Beispiel hierfür ist *N-Cadherin*, welches u.a. bei der Migration von Neuronen und mesenchymalen Zellen während der Organogenese eine wichtige Rolle spielt. (Hanahan and Weinberg 2011) Dessen Expression befähigt maligne Zellen zu einer verstärkten Interaktion mit Zellen und Komponenten der ECM, zur Ablösung einzelner Zellen aus dem Verband des Primums und zur Interaktion mit endothelialen Zellen. Außerdem scheint es in der Lage zu sein *promigratorische* Signale zu vermitteln. Dadurch lässt sich begründen, warum erhöhte N-Cadherinexpression sowie Reduktion von E-Cadherin mit erhöhter Invasion und Zellmotilität korreliert. (Cavallaro and Christofori 2004)

Der Metastasierungsprozesses besteht aus verschiedenen Schritten, die zusammengefasst als *Invasions-Metastasierungskaskade* bezeichnet werden. Initial erfolgt die *lokale Invasion* des Tumors in das benachbarte Gewebe. Mittelbar kommt es zur *Intravasation* einzelner Zellen oder Zellaggregaten in Lymph- und Blutgefäße und anschließend deren *Transit* in der Zirkulation. Sind Tumorzellen in der Lage die Gefäße zu verlassen, wandern sie in ein neues Gewebe ein (*Escape*). Dort versuchen sie zunächst kleine Tumorknoten zu bilden (*Mikrometastasierung*). Im entscheidenden letzten Schritt, der *Kolonialisation*, wächst die Mikrometastase schlussendlich zur vollständigen Makrometastase heran. (Talmadge and Fidler 2010)

Zur Erfüllung aller Schritte, ausgenommen der Kolonialisation, verwenden Tumorzellen hierfür einen Mechanismus, welcher an vielen Prozessen der embryonalen Morphogenese und der Wundheilung beteiligt ist, der *epithelial-mesenchymalen Transition (EMT)*. (Polyak and Weinberg 2009; Hanahan and Weinberg 2011) Während der Embryogenese wird dieser Prozess von mehreren Transkriptionsfaktoren reguliert (u.a. *Snail, Slug, Twist, Zeb1/2*) Deren gesteigerte Expression konnte in einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen werden und korreliert mit der Bildung von Metastasen. (Yang and Weinberg 2008; Taube et al. 2010)

Werden sie gebildet, kommt es zu charakteristischen molekularen, zytologischen und histologischen Veränderungen, darunter:

- erhöhte Expression von MMP's
- erhöhte Apoptoseresistenz
- Verlust der Adherens Junctions und damit einhergehender Veränderung der Zellmorphologie von polygonal-epithelartigen hin zu spindelförmig-mesenchymalen Zellen.

All diese erworbenen Fähigkeiten sind mit Invasion und Metastasierung assoziiert. (Peinado et al. 2004) Auch wurde beschrieben, dass EMT zur Entstehung stammzellartige Tumorzellen führt, welche bevorzugt in umliegendes Gewebe einwandern und erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen therapeutischen Verfahren aufweisen. (Polyak and Weinberg 2009) Durch den Verlust von E-Cadherin, lösen sich maligne Zellen aus der Verbindung mit ihren Nachbarzellen. Durch die Expression von N-Cadherin und anderen Molekülen der Zellmigration, sowie durch die Expression von Matrix-Metalloproteasen, sind sie in der Lage mit den umliegenden Stromakomponenten zu interagieren und sich dadurch einen Weg in das benachbarte Gewebe und letzten Endes in die Lumina von Blut und Lymphgefäßen zu bahnen. (Hanahan and Weinberg 2011)

Induziert wird die EMT durch eine Vielzahl von Signalen, vor allem mesenchymalen Ursprungs. Dazu zählen Tumor-Stromazellinteraktion, zahlreiche Wachstumsfaktoren und Hypoxie. Der prominenteste Stimulus entstammt dem Zytokin TGF- β . Dieses induziert mehrere Signaltransduktionswege, welche die Expression der EMT aktivierenden Transkriptionsfaktoren aktivieren. (Polyak and Weinberg 2009)

Da die myeloischen Zellen des TME in der Lage sind, große Mengen dieses Zytokins bereitzustellen, scheinen sie auch an dieser Stelle eine bedeutende Rolle einzunehmen. (Galdiero et al. 2018) Erneut soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass TGF- β die Bildung des N2-TAN Phänotyp fördert, dessen protumoröse Effekte ebenfalls an der Invasions-Metastasierungskaskade beteiligt sind. (Fridlender et al. 2009)

Dabei sind es vor allem verschiedene enzymatischen Produkte der neutrophilen Granulozyten sowie ROS, welche TGF- β aus seiner latenten, in der ECM gespeicherten Form aktivieren können. (siehe S. 46) Die Assoziation zwischen Metastasierung und neutrophilen Granulozyten wurde u.a in Melanomen und HNSCC beobachtet. (Loukinova et al. 2000; Schaidler et al. 2003; Dumitru et al. 2011) Beteiligt ist hierbei eine Vielzahl an direkten und

indirekten Mechanismen, welche aus der komplexen Interaktion zwischen TAN und Tumorzellen entstehen: Beispielsweise kommt es durch die Freisetzung von Hyaluron aus malignen Zellen zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten über *TLR-4*. Diese scheinen dadurch das migratorische Potential von Tumorzellen zu erhöhen. (Wu et al. 2011) Die Bildung von *Macrophage-migration-inhibiting-factor (MIF)* durch HNSCC-Zellen, führt nicht nur zur Rekrutierung von TAN, sondern erhöht durch diese Zellen ebenfalls die Invasionsfähigkeit des Tumors. (Dumitru et al. 2011) Möglicherweise erklärt die TAN induzierte Freisetzung von TGF- β auch die folgenden Beobachtungen: Zum Einen konnte eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Neutrophileninfiltration im PDAC und dem Auftreten der EMT gezeigt werden. In vitro Co-Kultivierung von neutrophilen Granulozyten mit malignen Zellen führte weiters zur erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors *Twist*, dem Auftreten von *Zeb-1* sowie erhöhte Translokation von β -*Catenin* in den Zellkern. (Grosse-Steffen et al. 2012) Letzteres ist das Resultat einer EMT-typischen β -Catenin Erhöhung und dessen gesteigerter Translokation in den Zellkern. Erreicht wird dies durch die Inhibition der *Glykogensynthasekinase-3- β (GSK3 β)*. Dies erfolgt wiederum durch eine Aktivierung des *Wnt-Pathways*, welcher wiederum durch die Effekte von TGF- β beeinflusst wird. (Polyak and Weinberg 2009) Dadurch lässt sich eine Verbindung zwischen TAN und den molekulargenetischen Anzeichen der EMT herstellen.

Generell lassen sich drei Orte bestimmen, an denen neutrophile Granulozyten die Invasions und Metastasierungsprozesse beeinflussen:

- TAN-Effekte im TME der Primärläsion
- Interaktion zwischen zirkulierenden Tumorzellen und neutrophilen Granulozyten
- Einfluss auf die Bildung der prämetastatischen Nische durch myeloischen Zellen aus dem Knochenmark

Neutrophile Granulozyten scheinen initial das metastatische Potential von malignen Zellen erhöhen zu können. So erhöhen aus Tumoren isolierte PMN (*tcPMN*) in Ratten das metastatische Potential von *Mamma-Adenokarzinomzellen*. (Welch et al. 1989) Durch die Produktion von HGF, fördern TAN des *Bronchoalveolärenkarzinoms* die Migration maligner Zellen. (Wislez et al. 2003) Ein ähnlicher Effekt wurde ebenfalls im humanen *HCC* sowie im *cholangiozellulären Karzinom (CCC)* beobachtet. (Imai et al. 2005) Neben dieser direkten Einwirkung, scheinen vor allem das ECM-Remodelling ihrer Proteasen ausschlaggebend für Invasion und Metastasierung zu sein. So fördern NE, Cathepsin-G, Proteinase-3,

und MMP-9 die Zellmotilität, Migration und Invasion. (Dumitru et al. 2013) Die genauen Mechanismen scheinen sehr vielfältig zu sein. Exemplarisch sei hier abermals auf den dyshäsionsfördernden Effekt der NE auf PDAC-Zellen verwiesen, welcher bereits im Zuge der Kontaktinhibition beschrieben wurde. (siehe S. 49) Eine weitere mögliche Erklärung liefert das sog. *Gegenstromprinzip*: Durch tumorproduzierte Chemokine rekrutiert, müssen sich neutrophile Granulozyten zunächst einen Weg vom Ort der Extravasation hin zur Läsion bahnen. Dafür verwenden sie teilweise die eben erwähnten Enzyme, durch deren Wirkung es zur Bildung von ECM-Kanälen zwischen Gefäß und Tumor kommt, durch welche die Immunzellen migrieren. Nachdem sie den Kontakt zum Primum verloren haben und durch die EMT mit promigratorischen Fähigkeiten ausgestattet wurden, könnten maligne Zellen eben diese Kanäle in umgekehrter Richtung nutzen um dadurch zum nächstgelegenen Gefäß zu gelangen. (Piccard et al. 2011) Dies würde ebenfalls erklären, warum IL-8 produzierende Tumoren ein höheres metastatisches Potential besitzen als solche, welche dieses Chemokin nicht produzieren. (De Larco et al. 2004) Auch die oben erwähnten tcPMN produzierten zum Teil hohe Mengen dieser Enzyme. (Welch et al. 1989) Eine Dyshäsionsförderung durch neutrophile Granulozyten wurde weiters auch beim BAC beschrieben. So beobachtete eine klinische Studie die Korrelation zwischen hohen Konzentrationen an neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage mit einem höherem Maß an Tumorzellablösung (*Tumorshedding*). Dieses Shedding wiederum ist ebenfalls assoziiert mit einem reduzierten Patientinnen/Patientenüberleben. (Wislez et al. 2007)

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass TAN durch die Produktion sowie Freisetzung von Signalmolekülen das metastatische Potential von Tumorzellen direkt erhöhen. Das Proteasen-induzierte ECM-Remodelling scheint die Migration von malignen Zellen erleichtern zu können. Dadurch resultiert die Invasion in umliegendes Gewebe, welche die Grundlage für nachfolgende Intravasation bildet. Auch an dieser scheinen neutrophile Granulozyten erneut beteiligt zu sein:

In vitro Experimente zeigten, dass Zellen der humanen Brustkrebstumorlinie *MDA-MB-231* in der Lage sind, eine Monoschicht aus Endothelzellen zu durchdringen, allerdings gelang dies nur in Cokultur mit Neutrophilen, nicht aber in der Einzelkultur. Weiters beobachtete man, dass Kultivierung mit *tumor-conditioned-medium* (TCM) die Zytotoxizität der Neutrophiler Granulozyten verringerte jedoch ihre Expression von Adhäsionsmolekülen erhöhte. (Wu et al. 2001)

Erneut ist es die NE, welche diesen Prozess förderlich beeinflussen kann. So korrelieren

erhöhte Konzentrationen in Tumorpatientinnen/-patienten mit einer ungünstigen Prognose. (Sato et al. 2006) Weiters konnte gezeigt werden, dass NE-Inhibition eine verringerte hepatische Metastasierung zur Folge hat. (Doi et al. 2002) Abseits der TME assoziierten TAN, interagieren auch neutrophile Granulozyten innerhalb der Gefäße mit Tumorzellen, welche die Passage in die Zirkulation bewältigt haben. Diese scheinen dadurch eine wichtige Unterstützung für die Extravasation zu erhalten:

So können neutrophile Granulozyten zirkulierenden Tumorzellen als Anker an der Gefäßwand dienen, wodurch diese schlussendlich zur Extravasation befähigt werden. Über die Interaktion von ICAM-1 auf Seiten der Tumorzellen und β -2 Integrin auf der der Immunzellen kommt es hierbei zur einer Quervernetzung zwischen den Zellen. (Huh et al. 2010) Da Neutrophile zur Adhäsion an die Gefäßwand befähigt sind, vermitteln sie diese Fähigkeit nun indirekt an die Tumorzellen. Weiters werden hierdurch die *focal-adhesion kinase (FAK)*-, sowie die *p38-mitogen activated protein kinase (p38-MAPK)* Signaltransduktionswege in Tumorzellen aktiviert, welche die nun notwendigen Migrationsprozesse zur aktivieren scheinen. (Huh et al. 2010) Im in vivo Modell wurde gezeigt, dass diese erhöhte Migration in einer erhöhten Etablierung von Lebermetastasen mündet. Die an der Gefäßwand angelagerten Neutrophilen dienen den Tumorzellen hierbei als Brücke zwischen dem Gefäßlumen und dem Lebergewebe. (Spicer et al. 2012)

Nachdem TAN den Weg zum Gefäß geebnet haben, helfen scheinbar auch zirkulierende neutrophile Zellen bei den weiteren Schritten der Metastasierung maligner Zellen, nachdem sie von Diesen beeinflusst wurden.

Schlussendlich liefern neutrophile Granulozyten sowie andere myeloischen Zellen einen nicht unerheblichen Beitrag am Ort der zukünftigen Metastasierung selbst, der sog. prämetastatischen Nische (*premetastatic niche*):

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts vermutete der britische Arzt Stephen Paget, dass Tumoren nicht wahllos in zufällige Organe metastasieren. Seine Theorie fußt auf der Beobachtung, dass spezifische Tumorentitäten regelmäßig in dieselben Organe streuen. (Sionov et al. 2014)

Beispielsweise metastasiert das Mammakarzinoms typischerweise in Knochen, Lunge, Leber und Hirn. (Lacroix 2006)

Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei nicht um einen randomisierten Prozess zu handeln scheint. So geht man heute davon aus, dass ein gewisses Maß an Kompatibilität zwischen Tumor und Metastasierungsgewebe besteht. Dies wird als *Seed-and-Soil-Theorie* bezeichnet. (Talmadge and Fidler 2010; Sionov et al. 2014) Untermuert wird dies

durch die Beobachtung, dass etablierte Tumoren dazu befähigt sind, eine Infiltration des späteren Metastasierungsareals durch non-maligne Zellen aus der Zirkulation zu induzieren. (Hiratsuka et al. 2002) Hierbei handelt es sich um VEGFR1⁺ myeloische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Instruiert durch den Primärtumor scheinen sie infolge ihrer Migration das Zielgewebe für gestreute maligne Zellen hospitable zu gestalten. (Kaplan et al. 2005; Hiratsuka et al. 2006; Sionov et al. 2014)

Grob lässt sich die Metastasierung auch in zwei Schritte unterteilen: Als *Dissemination* sämtliche Prozesse der Invasions-Metastasierungskaskade mit Ausnahme der Bildung der Makrometastase, welche nach dem Eindringen der gestreuten Zellen in ihr Zielgewebe und erfolgreicher Etablierung einer Mikrometastase stattfindet. Dieser Letzte Schritt wird als *Kolonisation* bezeichnet. Der Unterschied zwischen beiden ist, dass die Kolonisation nicht durch die die EMT-regulierenden Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Klinische Beobachtungen unterstützen dies insofern, als dass es bei einer Vielzahl an Patientinnen/Patienten trotz erfolgreicher Etablierung von Mikrometastasen nie zu einer Weiterentwicklung in eine Makrometastase kommt. (Heiss et al. 1995; Townson and Chambers 2006; Aguirre-Ghiso 2007; McGowan et al. 2009)

Die Gründe hierfür scheinen multifaktoriell und variabel zu sein: Zum einen lässt sich bei bestimmten Tumorentitäten ein explosionsartiges Wachstum von gesteuerten Mikrometastasen beobachten, nachdem das Primum chirurgisch reseziert wurde. In diesem Fall scheint dieser Faktoren zu sezernieren, die gestreuten Zellen in einem inaktiven Zustand überführen. (Folkman 2002; Demicheli et al. 2008)

Andere Tumorentitäten hingegen bilden Makrometastasen teilweise erst Jahrzehnte später, selbst nach vollständiger Entfernung der Primärläsion. Hier kommt es wenn nur zu einem vernachlässigbaren Einfluss des Primums auf die Kolonialisierung. In diesem Fall besteht eher der Verdacht, dass die gestreuten malignen Zellen zunächst schlecht an die neue Gewebsumgebung angepasst sind. (Townson and Chambers 2006; Aguirre-Ghiso 2007; Barkan et al. 2010) In der Vergangenheit konnten solche Mikrometastasen artifiziell nachgebildet und beobachtet werden, was zu der Vermutung führte, dass deren Unfähigkeit zur Aktivierung der Angiogenese einer der Gründe ist, warum sich zunächst keine Makrometastase formieren kann. (Aguirre-Ghiso 2007; Naumov et al. 2008) Weitere hemmende Effekte scheinen in die normale ECM eingebettete, wachstumshemmende Faktoren, sowie die antitumoröse Immunreaktionen zu sein. (Aguirre-Ghiso 2007; Teng et al. 2008; Barkan et al. 2010) Außerdem könnte der transformierende EMT-Prozess einen Verlust von bereits erworbenen Hallmarks zur Folge haben, denn nach deren Extravasati-

on lässt sich bei gestreuten Zellen eine Umkehrung dieses Prozesses, eine mesenchymal-epitheliale-Transition (*MET*) beobachten. Es wird vermutet, dass das Wiedererlangen eines epithelialen Phänotyps ebenfalls eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Etablierung einer Makrometastase darstellt. (Hugo et al. 2007; Hanahan and Weinberg 2011) Da es durch die EMT zur gravierenden Veränderung verschiedenster zellulärer Prozesse kommt ist es durchaus plausibel, dass davon auch Mechanismen der bereits erworbenen Hallmarks betroffen sind. Die Umkehrung dieser Transformation könnte ein Weg sein, diese wiederzuerlangen. Induziert wird diese unter anderem durch Substanzen (u.a. Versican), welche von bereits erwähnten VEGFR-1+ myeloischen Vorläuferzellen produziert werden. (Gao et al. 2012) Allerdings deutet die teilweise Jahre andauernde Latenz zwischen Streuung und Etablierung der Makrometastase mancher Tumorentitäten darauf hin, dass der Wiedererwerb verloren gegangener Hallmarks durch die MET allein nicht für die Kolonialisierung ausreicht.

Dieses Verhalten wurde u.a. bei Mammakarzinomen und das Melanomen beobachtet. (Townson and Chambers 2006; Aguirre-Ghiso 2007; Barkan et al. 2010) Bei beiden ist wiederum ein großer Beitrag von TAN an der Krankheitsprogression bekannt. (Uribe-Querol and Rosales 2015)

Die erneute Umstellung des Zellstoffwechsels alleine scheint also nicht auszureichen. Die neue, noch nicht ausreichend tumorbeeinflusste Gewebsumgebung selbst könnte eine, noch zu überwindende Hürde für gestreute maligne Zellen darstellen. Dies weiters ein guter Grund für die Existenz des Phänomens der metastatischen Nische, in welcher v.a. myeloische Zellen, in Folge ihrer Manipulation durch das Primum, das Zielgewebe bereits vor Ankunft der metastasierenden Zellen empfänglicher für diese machen. So konnte in der Lunge von Mäusen mit *Mamma-Adenokarzinomen*, die Bildung einer solchen Nische durch CD11b+ GR1+ Zellen beobachtet werden. Diese Zellen wiesen verringerte INF- γ , sowie eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Faktoren und MMP9 auf. Letztere führte zu exzessivem ECM-Remodelling und Bildung von abnormen Gefäßen. Die Deletion des MMP9-Gens führte zu einer Verhinderung dieser Effekte, sowie zu einer reduzierten Metastasierung des Tumors in die Lungen. (Yan et al. 2010)

Jedoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass der genaue Phänotyp der beteiligten myeloischen Zellen bis dato nicht genau bekannt ist. Beteiligt ist sehr wahrscheinlich eine Vielzahl verschiedenster Zelltypen sowie deren Vorläufer. So handelt es sich bei den Versican-produzierenden Zellen um Vorläuferzellen monozytären Ursprungs. (Gao et al. 2012) Allerdings finden sich einige Hinweise für eine Beteiligung neutrophiler Granulozy-

ten an der Entwicklung sowohl der Mikro- als auch der Makrometastase, deren genau Funktion allerdings ebenfalls noch ungeklärt ist:

Grund hierfür kann sein, dass sich in der prämetastatischen Nische hohe Konzentrationen an Chemokinen, für die ein PBN rekrutierender Effekt bekannt ist, finden. (Hiratsuka et al. 2006) Eine weitere Publikation beschreibt eine frühzeitige Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in prämetastatischem Lungengewebe. (Granot et al. 2011) Dies deutet durchaus auf eine mögliche Beteiligung dieser Zellen bei der Etablierung der Nische hin. (Sionov et al. 2014) Ihre erhöhte Anzahl im Gewebe ist assoziiert mit einer Hemmung der Zytotoxizität von NK-Zellen. (Sceneay et al. 2012) Den deutlichsten Hinweis auf eine Beteiligung liefert ein Depletionsexperiment: Eine Reduktion von Gr1⁺ sowie Ly6G⁺ Zellen in prämetastatischem Lungengewebe führt zu einer verringerten metastatischen Streuung in das Organ. (Kowanetz et al. 2010)

Die erwähnte NETose scheint ebenfalls im Verdacht, an der Metastasierung beteiligt zu sein: So folgt auf das Auftreten von NET in mikrovaskulären Gefäßen unmittelbar die Bildung von Mikrometastasen in der Leber. (Cools-Lartigue et al. 2013) Warum dies der Fall ist, ist allerdings bisher ebenfalls nicht bekannt. Jedoch wurde in drei Tumormodellen folgende Beobachtung gemacht: PBN welche aus Mäusen mit *chronisch myeloischer Leukämie (CML)*, sowie *Mamma-* oder *Lungenkarzinomen* isoliert wurden, produzierten nach Stimulation mit *platelet-activating-factor (PAF)* mehr NET, als solche gesunder Tiere. Zusätzlich fand sich in tumorbefallenen Tieren eine erhöhte Konzentration von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und eine erhöhte Konzentration an zellfreier-DNA. Bei dieser handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um NET, da in den zirkulierenden Neutrophilen ein erhöhtes Auftreten von zitrulliniertem Histon H3 auffindbar ist. (Demers et al. 2012) Bei diesem handelt es sich um das Resultat des ersten Reaktionsschrittes der NETose. (siehe S.28)

Bezüglich der klinische Relevanz von NET existiert vor allem eine interessante Studie: Acht an *Ewing-Sarkom* erkrankte Patientinnen/Patienten, wurden präoperativ mittels MPO-Färbung auf das Vorhandensein von NET überprüft. Bei den zwei positiv getesteten Patientinnen/Patienten kam es postoperativ rasch zu einer Rezidivierung der Erkrankung. (Berger-Achituv et al. 2013) Leider finden sich bis dato jedoch keine weiteren klinischen Daten, welche diesen Verdacht bestätigen, und Aufschluss über die prognostische Relevanz von NET liefern.

In *secreted-protein-acidic-and-rich-in-cystein* negativen (*sparc*-)Mäusen, kommt es infolge einer defekten Kollagenformation zu einer ungenügenden Trennung der Kompartimente von sekundär lymphatischen Organen. Daraus resultiert eine normalerweise nicht stattfindende erhöhte Interaktion zwischen NET und B-Zellen, welche in weiterer Folge eine erhöhte Proliferation und Inhibition der Apoptose aufweisen, wodurch maligne Transformation hin zum B-Zell-Lymphom begünstigt wird. (Sangaletti et al. 2014)

Somit lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Im Rahmen einer Tumorerkrankung könnten PBN anfälliger für die Aktivierung der NETose werden, wodurch es in der Zirkulation auch erhöhte Konzentrationen dieser kommt. Weiters scheint die verstärkte Interaktion von NET das Überleben von B-Lymphozyten zu fördern. Dieser Prozess könnte sich nicht nur in defekten Lymphknoten, sondern möglicherweise in der Zirkulation abspielen. Die protumoröse klinische Relevanz von B-Zellen wurde vor ca. 70 Jahren B-Lymphozyten beschrieben. (Snell 1957; Kaliss 1958; Ran and Witz 1972) Dies konnte mittlerweile in einer Vielzahl von Publikationen bestätigt werden. Exemplarisch hierfür erwähnt sei eine Studie, in welcher B/T-Zell defiziente HPV16 Mäuse im Vergleich zur Kontrolle eine massive Reduktion der Inzidenz von invasiven Karzinomen aufwiesen (von ca. 50% auf ca. 6%). Sowohl adoptiver Transfer von B-Lymphozyten, als auch von Serum aus normalen HPV16-Mäusen führte zum Auftreten der typischen Charakteristika, die in Verbindung mit der Etablierung einer malignen Läsion stehen (chronische Entzündung, Angiogenese Induktion und Keratinozytenhyperproliferation). (deVisser et al. 2005) Würden die NET, welche ebenfalls an der Etablierung der Mikrometastase beteiligt sind, in gleicherweise die Funktion von B-Zellen beeinflussen, könnte dadurch ein starker protumoröser Stimulus entstehen.

Zusammenfassend lässt sich daher vermuten, dass sowohl TAN sowie neutrophile Granulozyten in der Zirkulation und prämetastatischem Zielgewebe den Metastasierungsprozesse auf vielfältige Art und Weise unterstützen könnten. Besonders deren Einfluss auf die Etablierung einer Makrometastase ist hierbei von besonderer Bedeutung. Bei Ihnen könnte es sich um einen der wesentlichen Mediatoren handeln, welche die protumorösen Fähigkeiten in den metastasierten Zellen wiederherstellen, die zuvor durch die EMT „verlernt“ wurden.

Ähnlich der Etablierung des Primums, könnte nach erfolgreicher Bildung einer Mikrometastase erneut eine maligne Progression stattfinden. Passend hierzu beobachtete man auch in sich etablierenden Metastasen eine erhöhte Rekrutierung von Neutrophilen, die sich um die malignen Läsion akkumulieren und u.a über MMP9 das Überleben der Tumorzellen

günstig beeinflussen. Bei MMP9 Knockout Mäusen wiederum beobachtete man signifikant mehr Apoptose der gestreuten Zellen. (Acuff et al. 2006; Redondo-Muñoz et al. 2010)

3.12. TAN Beeinflussung der „enabling characteristics“ und des emerging hallmark „Immunevasion“:

Dem Erwerb der Hallmarks of Cancer liegen spezifische Mechanismen zugrunde, welche von Hanahan und Weinberg als „enabling characteristics“ bezeichnet wurden. Hierbei handelt es sich um die *Genominstabilität* und die *Cancer-related-Inflammation (CRI)*. (Hanahan and Weinberg 2010)

Zwischen diesen und den bis dato bekannten Effekten der TAN lässt sich eine Verbindung herstellen.

Genominstabilität und CRI:

Genominstabilität ist die die Grundlage jeder malignen Erkrankung, und die daraus resultierende sukzessive Zunahme der Mutationsrate ist eine zwingend notwendige Voraussetzung für die Entstehung von Tumorzellen. (Negrini et al. 2010) Durch sie entsteht eine variable Anzahl unterschiedlicher maligner Phänotypen, von denen manche anderen gegenüber einen Selektionsvorteil besitzen. Dadurch erlangen diese nach und nach die Dominanz im Gewebe. (Hanahan and Weinberg 2011) Dies geschieht u.a durch die Inaktivierung der *Caretaker-Genen*, die für die Aufrechterhaltung eines stabilen Genoms essentiell sind. (Kinzler and Vogelstein 1997) Deren Genprodukte sind an Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden beteiligt, und zählen somit zu den tumorsuppressiven Mechanismen einer gesunden Zelle. (Ciccia and Elledge 2010; Hanahan and Weinberg 2010; Negrini et al. 2010) Durch deren Verlust wird die Anhäufung von weiteren Mutationen ermöglicht. In Experimenten konnten mutierte Varianten der Caretaker-Gene erfolgreich in Mäusen etabliert werden. Dies resultierte in einer deutlich erhöhte Krebsinzidenz der Tiere. (Barnes and Lindahl 2004) Treffen die Mutationen kritische Protoonko- oder weitere Tumorsuppressorgene, ist die Zelle wenn nur mehr in der Lage diese Kompromittierung zu kompensieren, jedoch kann dieser Schaden nicht mehr behoben werden. Jedoch benötigt es mehrere solcher protumorösen Mutationen, damit dadurch eine voll entwickelte maligne Entartung entstehen kann. (Knudson 2001) Ohne die Möglichkeit zur Reparatur, bedingen Defekte im Reparaturmechanismus nun allerdings eine sukzessive Akkumulation der Muta-

tionen. Dieser Zeitpunkt stellt den Beginn der Entwicklung einer potentiell lebensbedrohlichen Erkrankung dar.

Es lässt sich behaupten, dass die Genominstabilität ursächlich für die Entwicklung sämtlicher Hallmarks of Cancer ist, und diese sowohl direkt als auch indirekt beeinflusst: So kommt es durch *Gain-/Loss-of-function Mutationen* nicht nur zur Unabhängigkeit von proliferativen Stimuli, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Faktoren und Widerstand gegenüber der Apoptoseinduktion. Auch die replikative Immortalität als Resultat der Telomeraseinduktion, sowie die Aktivierung der Angiogenese und der Invasion und Metastasierung, an all diesen Prozessen ist in irgendeiner Form eine abnorme, unphysiologische Genexpression beteiligt. (Siehe spezifische Kapitel)

Ein weiterer extrinsischer Faktor, welcher Genominstabilität begünstigt, sind die Tumor-associated-neutrophils. Es wurde gezeigt, dass die reaktiven Sauerstoff und Stickstoffverbindungen, welche sie im Rahmen der CRI im TME produzieren, durch oxidative DNA-Schädigung die Tumorgenese direkt begünstigt. (Haqqani et al. 2000; Knaapen et al. 2006)

Zudem lässt sich Anhand der TAN-Effekte ebenfalls beschreiben, wie sich *enabling characteristics* und die klassische Hallmarks of Cancer selbst und gegenseitig beeinflussen. Dies sei exemplarisch in einem simplifizierten Modell dargestellt:

Auf die Inaktivierung von Caretakter-Genen folgt zunächst ein Anstieg der Mutationsrate, da Spontanmutationen nicht mehr adäquat beseitigt werden können. Dadurch erhöht sich schrittweise die Anzahl der Mutationen der Zelle soweit, bis diese zur Aktivierung des induzierbaren Zelltods über p53 führen müssten.

Dieser kann jedoch durch gleichzeitigen Erhalt eines ausreichenden antiapoptotischen Stimulus verhindert werden, welcher wiederum selbst ein Effekt der erhöhten Mutationsrate sein kann (z.B. *Gain-of-function* Mutationen in antiapoptotischen-, *Loss-of-function* Mutationen in proapoptotischen Pathways). Wie beschrieben führen hierzu auch spezifische Effekte der TAN. (siehe S. 43, 57)

Kombiniert mit der Unfähigkeit zur Apoptoseinduktion, führt die immer weiter voranschreitende Entartung der Zelle früher oder später auch zur mutativen Veränderung von proliferationsfördernden Genen. Durch den Anstieg der Zellteilungsrate wächst die Läsion nicht nur, sondern jede entstehende Tochterzelle bildet auch den Ausgangspunkt für die Entwicklung eines neuen, einzigartigen malignen Genotyps.

Warum dies so wichtig ist, möchte ich mithilfe eines einfachen Gedankenexperiments aufzeigen: Stellt man sich eine Modellzelle mit 10 Genen vor, welche jeweils nur einen von zwei Zuständen (nicht-mutiert / mutiert) erfüllt, so existieren $2^{10} = 1024$ unterschiedliche Varianten wie diese Zelle mutiert sein kann. Nun stellt man sich vor diese Modellzelle wird zum Zeitpunkt x einem mutagenen Agens ausgesetzt, welches das Potential hat jedes Gen zu verändern, dies aber nicht zwingend der Fall ist.

Würde die Mutation eines spezifischen Gens alleine über die Entartung entscheiden, so gäbe es $2^9 = 512$ Varianten des entarteten Genotyps. Mittels La'place'scher Wahrscheinlichkeitsformel zeigt sich, dass es in $512/1024$ Fällen zur malignen Entartung kommen würde, $512/1024 = 0,5$ also in 50% der Fälle. Man sieht es kommt nur darauf an, ob das entscheidende Gen nun mutiert, oder nicht.

Da jedoch eine maligne Entartung mehr als eine Mutation benötigt, legt man nun weiter fest, dass mindestens 3 Gene gleichzeitig mutiert sein müssen so kommt man nur mehr auf $2^7 = 128$ Varianten, und kommt somit nur noch auf 12,5% Chance auf die Entstehung einer Neoplasie. Dazu muss erwähnt werden dass hierbei angenommen wird, dass 30% des Genoms mutiert sind, ein immens hoher Anteil.

Dieses Gedankenexperiment verdeutlicht wie unwahrscheinlich die Entstehung eines malignen Genotyps prinzipiell ist. In der Realität kommen zusätzlich eine Vielzahl erschwerende Faktoren, u.a die Unterteilung in Introns und Exons, die vielfältigen Effekte einer mutativen Veränderung, die im Zielgen nicht zwangsläufig den gewünschten protumörösen Effekt erzeugt, welcher für eine Entartung notwendig ist (bsp. Gain of function eines Tumorsuppressorgens), sowie epigenetische Modifikationen. Weiters besitzt die reale Zelle logischerweise ein Vielfaches an Genen und Mutagene sind i.d.R. bei weitem nicht stark genug, alle zum selben Zeitpunkt zu verändern.

Für die Krebserkrankung stehen die Chancen zu Beginn daher eher ungünstig. Mit der Generierung von genetisch instabilen Tochterzellen, welche unfähig sind auf vorhandene Schäden adäquat zu reagieren, erhöht sich jedoch die Chance, dass in irgendeiner dieser Zellen eine weitere protumöröse Mutation stattfindet, welche die Balance ein Stück weiter in Richtung maligner Entartung verschiebt. Auch der Proliferationsanstieg wird nicht alleine intrinsisch, sondern auch durch extrinsische Faktoren getragen, unter anderem durch die Effekte der NE-Freisetzung aus TAN. (siehe S. 44)

Der Kipppunkt an dem die Genominstabilität endgültig überhandnimmt, stellt schlussendlich die Telomerkrise mit ihren BFB-Zyklen, die aus der rapiden Zellteilung resultiert. Auch klinisch lässt sich zeigen, dass erst zu diesem Zeitpunkt die genetische Diversifikation der Zellen massiv zunimmt, da es nun zur massiven Zunahme der chromosomalen Instabilität

(CIN) kommt. (siehe S. 53) Es ist anzunehmen, dass CIN der primäre Mechanismus ist, welcher zur Destabilisierung des Krebszellgenoms führt. (Lengauer et al. 1998) TAN scheinen hierbei als eine Art „Wegbereiter“ zu dienen, indem sie die essentiellen Mechanismen, die zur Telomerkrise führen, günstig mitbeeinflussen könnten.

Durch die von Ihnen im Rahmen der CRI vermittelte Förderung der Genominstabilität, fördern TAN eine weitere, kritisch relevante Fähigkeit des Tumors, welche mittlerweile zu den ursprünglichen Hallmarks of Cancer hinzugefügt wurde. Dabei handelt es sich um die *Immuno evasion*. (Dunn et al. 2004; Hanahan and Weinberg 2011; Sionov et al. 2014)

Immunevasion:

Bereits im Jahr 1909 wurde vermutet, dass das Immunsystem grundsätzlich dazu in der Lage ist maligne entartete Zellen zu erkennen und zu zerstören. (Ehrlich 1909) Mit der Zunahme des immunologischen Wissen im Verlauf des 20. Jahrhunderts, wurde auch dieses Konzept theoretisch weiterentwickelt und zunächst als „*Cancer-Immunosurveillance*“ bezeichnet. (Thomas 1959; Burnet 1970)

Jedoch war die empirische Überprüfung dieses Modell zum Zeitpunkt der Erstbeschreibung mangels der dafür notwendigen Methoden oftmals nicht möglich. Auch die ersten Versuche, welche mehrere Jahrzehnte später durch die Etablierung von immunkompromittierten Mäusen möglich wurden, erzielten nicht die gewünschten Ergebnisse, da die verwendeten Mäuse die Abschwächung des Immunsystems nämlich einzig durch zufällige spontane Mutationen erwarben. Dies führte allerdings nicht zu einem kompletten Funktionsverlust des Immunsystems, lediglich zu seiner Kompromittierung. Die verbliebenen Restfähigkeiten waren ein zu starker Störfaktor, um zuverlässige Aussagen über die Rolle des Immunsystem im Zuge von malignen Erkrankungen zu gewährleisten. (Stutman 1974)

Erst das Aufkommen monoklonaler Antikörpern, gezielter Genmodifikationsmethoden und dem transgenen Mausmodell, ermöglichte es diese Hypothese erstmals verlässlich einer empirischen Überprüfung zu unterziehen. (Dunn et al. 2004)

Überraschenderweise deuteten die Ergebnisse allerdings nicht nur auf eine protektive Funktion hin, sondern zeigen auch, dass das Immunsystem paradoxerweise die Tumorgenese unterstützen kann. Infolge kam es zur kompletten Überarbeitung des Modells der *Cancer-Immunosurveillance*, welche schlussendlich als eine von drei aufeinanderfolgenden Phasen im neu etablierten Modell des *Cancer-Immunoeditings* aufging. (Shankaran et al. 2001; Dunn et al. 2002) In diesem Modell erfolgt ein Wechsel von einer antitumorösen hin zu einer protumorösen Funktion, durch das Durchlaufen von drei charakteristischen Phasen, welche als die „*3 E's des Cancerimmunoeditings*“ bezeichnet werden. Auf eine zu

Beginn ablaufende *Eliminationsphase* (ehemals Cancer-Immunosurveillance), in welcher es sowohl zur Induktion einer Entzündungsreaktion und dem daraus resultierenden Angriff auf entartete Zellen kommt, folgt weiters die *Equilibriumphase*, in der sich gering immunogene Tumorzellen und das Immunsystem im labilen Gleichgewicht befinden. Schlussendlich erfolgt die *Escapephase*, in der die malignen Zellen die Fähigkeit zum Wachstum in einer immunkompetenten Umgebung erhalten. (Dunn et al. 2004)

Diese knapp zusammengefasste Beschreibung des Prozesses mag zunächst den Anschein erwecken, dass das Immunsystem alleine in der ersten Phase eine aktive Rolle einnimmt, und in den darauffolgenden Phasen immer weiter in seinem Handeln eingeschränkt wird. Jedoch wird anhand der genaueren Beleuchtung dieses Prozesses erkenntlich, dass die Limitation der antitumorösen Fähigkeit in Wirklichkeit von unterschiedlichen Teilen des Immunsystems selbst ausgeübt wird, welche durch den Tumor manipuliert werden. Wie sich in den letzten Jahren zeigte, sind auch TAN, durch die Expression von immunsuppressiven Faktoren, sowie der Rekrutierung von spezifischen immunregulatorischen Zellen, ganz wesentlich an der Entwicklung eines tumorprotektiven TME beteiligt. (Mishalian et al. 2014; Sionov et al. 2015; Uribe-Querol and Rosales 2015)

Dank der Arbeit von Fridlender et al. lässt sich auch anhand der TAN die eben beschriebene Dichotomie der Tumor-Immunsysteminteraktion darlegen, da diese Zellen unter gewissen Bedingungen ebenfalls stark antitumoröses Potential zu besitzen scheinen. (Fridlender et al. 2009) Ähnliches ist auch bei TAM, Mast- und dendritischen Zellen möglich. (DeNardo et al. 2010; Sionov et al. 2014; Galdiero et al. 2018)

In der folgenden Beschreibung der einzelnen Phasen des Cancer-Immunoeditings, werden daher ebenfalls Ergebnisse bezüglich der antitumorösen Mechanismen von TAN erläutert:

Eliminationsphase:

Während des Durchlaufens der drei Phasen des Immunoeditings, findet nach und nach ein Dominanzwechsel zwischen den daran beteiligten Komponenten statt. (Dunn et al. 2004) Zu Beginn der Eliminationsphase erfolgt die Induktion einer Entzündungsreaktion, durch welche Zellen des Immunsystems an den Ort der Schädigung rekrutiert werden. Ausgelöst wird diese durch lokale Gewebsschädigung, resultierend aus dem Erwerb spezifischer Hallmarks durch entartete Zellen, durch die es zu ECM-Remodelling kommt (Induktion der Angiogenese und des invasiven Wachstums). (Carmeliet and Jain 2000; Sternlicht and Werb 2001) Um derartige Fähigkeiten zu erwerben, müssen bereits erhebliche mutative Veränderungen in den betroffenen Zellen stattgefunden haben. Dies würde

allerdings wiederum die intrinsischen tumorsuppressiven Mechanismen, und in weiterer Folge die Induktion der Apoptose ausgelöst. (Hanahan and Weinberg 2011). Wenn eine Entzündungsreaktion jedoch erst durch die genannten Hallmarks ausgelöst wird lässt sich daraus schließen, dass die intrinsischen Schutzmechanismen zu dem Zeitpunkt bereits kompromittiert wurden, an dem das Immunsystem auf die Läsion aufmerksam wird. Daher bezeichnet man die Eliminationsphase auch als *extrinsischen Tumorsuppressor*. (Macleod 2000)

Als Reaktion auf die Gewebsschädigung folgt u.a. die Rekrutierung von Makrophagen und NK-Zellen, aber auch NK-T- und $\gamma\delta$ -T-Zellen. (Benlagha and Bendelac 2000; Dunn et al. 2004) In Resektaten von *humanen NSCLC* in frühen Stadien, findet sich ebenfalls oftmals eine variabel ausgeprägte Infiltration neutrophiler Granulozyten, weshalb man vermuten kann, dass diese ebenfalls eine integrale Komponente der frühen Abwehrreaktion darstellen. (Uribe-Querol and Rosales 2015; Singhal et al. 2016)

Abseits der Rekrutierung durch Gewebsschädigung, produzieren Tumorzellen selbst Faktoren, welche Immunzellen anlocken und einen entzündlichen Prozess im TME auslösen. Unter diesen befindet sich auch Interleukin-8, bekanntermaßen der stärkste rekrutierende Botenstoff für neutrophile Granulozyten. (Sionov et al. 2014)

Am Ort der Schädigung erkennen die rekrutierten Zellen verschiedenste veränderte Moleküle, welche u.a aufgrund der genetische Transformation auf Tumorzellen exprimiert werden. (Dunn et al. 2004) $\gamma\delta$ T- sowie NK-T-Zellen können zusätzlich mittels ihres T-Zell-Rezeptors auf Tumorzellen exprimierte CD1-Glykolipidkomplexe erkennen. (Benlagha and Bendelac 2000) Das Resultat dieser unterschiedlichen Erkennungsmechanismen ist essentiell für die Induktion der weiteren antitumorösen Entzündungsreaktion, die Produktion von INF- γ . Dieses führt u.a. zu einem weiteren Anstieg der Rekrutierung von Immunzellen, durch die die gesamte Entzündungsreaktion verstärkt wird. (Dunn et al. 2004)

TAM scheinen bei dieser Amplifikation einen wichtigen Beitrag zu leisten: Spaltprodukte im Rahmen des ECM-Remodelling stimulieren diese Zellen zur Produktion von IL-12. Dieses bewirkt in NK-Zellen wiederum die Produktion von INF- γ . Durch dieses positive Feedback wird abermals die IL-12 Produktion der Makrophagen erhöht. (Bancroft et al. 1991; Hodge-Dufour et al. 1997) Mittlerweile ist bekannt, dass auch Subsets von neutrophilen Granulozyten in diesem Fall als Quellen für INF- γ dienen können. (Scapini et al. 2000) Zusätzlich wurde gezeigt, dass dieses Zytokin bei TAN die Entwicklung eines potenten antitumorösen Subsets auslösen kann. (Singhal et al. 2016)

Als Folge der stetigen Erhöhung seiner Konzentration, induziert IFN- γ selbst sowohl direkte, als auch indirekte antitumoröse Prozesse: So wirkt es auf Zielzellen antiproliferativ, proapoptotisch und angiostatisch. (Luster and Leder 1993; Bromberg et al. 1996; Kumar et al. 1997; Coughlin et al. 1998; Qin and Blankenstein 2000)

Neben der Produktion von IL-12, führt die Makrophagen-Stimulation außerdem zur Freisetzung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen (ROS/RNS), welche tumorzytotoxisch wirken. (Nathan et al. 1983; Schreiber et al. 1983; MacMicking et al. 1997)

Zusätzlich verstärkt es antitumoröse Effekte von NK-Zellen, die mittels TRAIL und Perforin-abhängigen Mechanismen Tumorzellen abtöten können. (Smyth et al. 2001; Hayakawa et al. 2002)

All diese Mechanismen stellen jedoch nur den ersten Schritt der eigentlichen antitumorösen Immunreaktion dar. Infolge des ersten Angriffs auf die maligne Läsion, kommt es zu einer erhöhten Verfügbarkeit von Tumorantigenen. Angelockt durch das Zytokinmilieu, migrieren unreife dendritische Zellen in den Entzündungsherd und werden dort entweder direkt, oder indirekt durch Interaktion mit NK-Zellen aktiviert. (Gerosa et al. 2002) Die aktivierten DC phagozytieren, prozessieren und präsentieren nun die freigesetzten Tumorantigene. (Dunn et al. 2004) Auch auf diesen Prozess könnten spezifische TAN Subsets einen unterstützenden Einfluss ausüben, indem sie die Antigenverarbeitung übernehmen und die daraus resultierenden Fragmente freisetzen, wodurch die antigenpräsentierenden Proteine der DC direkt beladen werden können. (Singhal et al. 2016)

Im Anschluss daran migrieren die DC in die regionalen Lymphknoten, wo sie eine Th-1 Reaktion in naiven CD4⁺ T-Zellen auslösen. Diese wiederum ermöglichen in Folge die Aktivierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen im Rahmen der Antigen „*Cross-presentation*“. (Huang et al. 1994; Albert et al. 1998; Schoenberger et al. 1998; Heath and Carbone 2001; Yu et al. 2003)

Durch die Aktivierung beider T-Zell-Subsets erfolgt die vollständige antitumoröse Immunreaktion. Nun migrieren die aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in das TME, wo sie sich an der Elimination maligner Zellen beteiligen. (Dunn et al. 2004)

Die tumorspezifischen CD8⁺ CTL stellen dabei den zentralen Effektor der antitumorösen Immunreaktion dar. (Eruslanov 2017) Sowohl über direkte als auch indirekte Mechanismen sind sie in der Lage, Tumorzellen nach deren Erkennung abzutöten. (Dunn et al. 2004)

Auch hier spielt INF- γ eine wichtige Rolle, da dieses die Immunogenität von Tumorzellen erhöht, wodurch diese für CD8⁺ CTL leichter erkennbar werden. (Shankaran et al. 2001)

Zusätzlich produzieren CD8⁺ CTL selbst INF- γ , wodurch dessen direkter Einfluss auf Proliferation, Apoptose und Angiogenese weiter verstärkt wird. Am Ende der Aktivierungskas-

kade angekommen, sind diese Mechanismen potentiell in der Lage die maligne Entartung komplett einzudämmen und somit die Krebsentstehung vollständig zu verhindern. Ist dies der Fall kommt es nicht zur Progression in die zwei weiteren Phasen des *Cancer-Immune editing*s. (Dunn et al. 2004)

Epidemiologisch betrachtet, lässt sich dadurch auch das charakteristische Auftreten und die Häufung von Tumoren in der älteren Bevölkerung erklären: Da die Effizienz des Immunsystems im Laufe des Lebens abnimmt, ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass die Eliminationsphase dazu in der Lage ist die entstehende Neoplasie zu beseitigen. Dadurch wird der Organismus anfälliger, eine solche Erkrankung zu entwickeln. (Dunn et al. 2004)

3.12. Antitumoröse Effekte der TAN:

Mittlerweile existieren zahlreiche Hinweise dafür, dass TAN unter bestimmten Umständen ebenso antitumoröse Effekte besitzen. Unter Verwendung der Tumorzelllinien AB12 oder Lewis-Lung-Carcinoma (LLC) zeigte sich in zwei verschiedenen Mausmodellen, dass im Frühstadium beider entstehenden Tumoren die daraus isolierten TAN größere Mengen an TNF- α , NO sowie H₂O₂ produzierten und stärker tumorzytotoxisch wirkten.

Weiters beobachtete man, dass sich TAN in diesem Stadium fast ausschließlich an den Rändern der Tumoraläsion vorfanden. Aus späteren Stadien isolierte TAN, scheinen im Verlauf der Tumorprogression diese Fähigkeiten zu verloren zu haben. Gleichzeitig beobachtete man in diesem Fall ebenfalls, das verstärkte Auftreten von TAN innerhalb des TME.

(Mishalian et al. 2013)

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, welche im Zuge der Erstbeschreibung der unterschiedlichen TAN-Phänotypen aufgestellt wurde: In tumorbefallenen Mäusen entwickeln TAN durch die Inhibition von TGF- β einen verstärkt tumorzytotoxischen Phänotyp, welcher als N1-TAN bezeichnet wurde. Weiters kam es durch diese Manipulation ebenfalls zu einer Erhöhung des TAN-Anteils, scheinbar auf Kosten der Makrophagenfraktion, welche abnahm. Die isolierten N1-TAN töteten in vitro direkt co-kultivierte Tumorzellen ab und verzögerten in vivo das Tumorwachstum. (Fridlender et al. 2009)

Transkriptomanalysen dieser, durch TGF- β Blockade erzeugten, N1-TAN zeigten eine erhöhte mRNA-Konzentrationen für proinflammatorische Zytokine (u.a IL-12, TNF- α), sowie für eine Vielzahl an Chemokinen (CCL2, CCL3, CCL7, CXCL10). Diese sind als potenter Stimulus für die Rekrutierung von T-Zellen und Makrophagen bekannt.

Weiters zeigten diese Analysen, dass es zwischen dem N1- und N2-Phänotyp in ca. 9000 Genen Unterschiede bezüglich deren Expression gibt. Darunter befanden sich essentielle

Gene der Signalpathways von Immunreaktion, Antigenpräsentation, Chemokinproduktion und Zytoskelettorganisation. (Shaul et al. 2016) Aus diesem Grund lässt sich vermuten, dass es sich bei der Unterscheidung zwischen N1 und N2 tatsächlich um unterschiedliche Subsets handelt. Durch die Produktion der proinflammatorischen Zytokine, ähnelt die Funktion von N1-TAN der neutrophiler Granulozyten in non-malignen entzündlichen Prozessen. In diesen sind sie ebenfalls nicht nur direkt an der Elimination des auslösenden Agens beteiligt, sondern besitzen auch eine zentrale Rolle bei der Regulation der weiteren Immunreaktion.

Ein weiterer Hinweis auf das antitumoröse Potential von TAN, stammt aus Beobachtungen an „*spontaneous regression/complete resistance*“ (SR/CR) - Mäusen:

Für diese Tiere charakteristisch ist, dass selbst die Injektionen hoher Tumorzellkonzentrationen nicht zur Etablierung von Tumoren führt. Im Wildtyp hingegen reichen bereits niedrige Dosen derselben Tumorzellen aus, um einen letalen Effekt zu erzielen. Obwohl die genauen Mechanismen hierfür nicht bekannt sind wurde beobachtet, dass die Injektion von isolierten SR/CR - Neutrophilen in WT-Mäuse ebenfalls zur Resistenz gegenüber der Tumoretablierung führt. (Hicks et al. 2006)

Neben der Blockade von TGF- β sind mittlerweile auch andere Zytokine bekannt, welche die Entwicklung dieses antitumorösen Phänotyps induzieren: Hierzu in der Lage ist ebenfalls INF- β . (Jablonska et al. 2010) Mittlerweile lässt sich auch eine direkte Verbindung zwischen dem N1-TAN und den Abläufen der Eliminationsphase im Zuge des Immunoediting herstellen: So wurde beschrieben, dass der N1 auch durch das Einwirken von IFN- γ und IL-12 auf naive Neutrophile entstehen kann. (Sionov et al. 2014) Wie bereits beschrieben sind dies die beiden Zytokine, deren Wechselwirkung sowie positives Feedback den Auslöser des initialen Angriffs auf den Tumor darstellen. (siehe S. 79) Es ist möglich, dass maligne Zellen zu diesem Zeitpunkt nicht nur durch die Effekte von NK-Zellen, Makrophagen und direktem IFN- γ Einfluss, sondern auch durch den antitumorösen N1-TAN zugrunde gehen, wodurch infolge tumorspezifische Antigene zur freigesetzt werden. Ein Mechanismus, mit welchem TAN in der Lage sind maligne Zellen abzutöten, ist die Produktion von ROS im Zuge des ‚*oxidative-burst*‘. Durch die NADPH⁺-Oxidase sowie die MPO werden H₂O₂ und hypochlorige Säure (HOCL) produziert. (Clark and Klebanoff 1975; Dissemond et al. 2003; Zivkovic et al. 2005)

Ein Beleg für deren wichtigen Beitrag im Rahmen maligner Erkrankungen ist, dass aus Patientinnen/Patienten mit defekter H₂O₂-Bildung oder MPO-Defizienz isolierte neutrophile

Granulozyten gegenüber Tumorzellen nicht zytotoxisch wirken können. (Clark and Klebanoff 1975) Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass HOCL-Freisetzung direkt an der Zellmembran einer malignen Zelle zu deren Lyse führt. (Dallegri et al. 1991)

Es zeigte sich weiters, dass enger Kontakt nicht nur für die effektive Wirkung von HOCL eine obligate, sondern vielmehr generell notwendig für die Vermittlung verschiedener Effekte, u.a. der Neutrophilen-medierte-Zytotoxizität, ist. (Lichtenstein and Kahle 1985; Queen et al. 2005; Granot et al. 2011) Beispielsweise wurde dieser Kontakt im Frühstadium von Magenkarzinomen beobachtet, infolge dessen betroffene Tumorzellen ein variables Maß an Zellschäden aufwiesen. (Caruso et al. 1994)

Kontaktunabhängig ließ sich diese Zytotoxizität dann erreichen, wenn man die neutrophilen Granulozyten mittels dem Phorbol-ester *PMA* stimuliert. Dadurch kam es ebenfalls zur H_2O_2 Freisetzung. Aus dieser Beobachtung wurde geschlossen, dass die Freisetzung von ROS nicht konstitutiv erfolgt, sondern erst nach Kontakt mit malignen Zielzellen induziert wird. (Granot et al. 2011) Chemolumineszenzexperimente belegten, dass es an den Orten direkter Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Tumorzellen zur erhöhten ROS-Akkumulation kommt. (Saito et al. 1992) Zusätzlich zu ROS besitzen viele weitere Produkte neutrophiler Granulozyten potentiell antitumoröse Wirkung. Beispielsweise kam es nach Stimulation von Rattenneutrophilen mit $IFN-\gamma$ zur Freisetzung von NO, welches das Wachstum maligner Zellen inhibierte und Apoptose in diesen auslöste. (Uchida et al. 1997; Yamashita et al. 1997)

Allerdings konnte dieser Effekt nicht durch die Applikation eines NO-Scavengers unterbunden werden, weshalb vermutet wurde, dass die Inhibition dieses apoptotischen Mechanismus möglicherweise durch andere zytotoxische Mechanismen ausgeglichen wird. (Fridlender et al. 2009, Sionov et al. 2014)

Zu den antitumorösen Produkten zählen auch die diversen Proteasen neutrophiler Granulozyten, darunter Cathepsin-G und die NE. (Di Carlo et al. 2001) Jedoch ist für dieses Enzyme ebenfalls ein protumoröser Effekt bekannt. (siehe S. 63) Daher wird über deren konkrete Funktion immer noch spekuliert. Im Fall der Neutrophilen Elastase wird zwar angenommen, dass diese theoretisch tumorzytotoxisch wirken könne, allerdings seien die hierfür notwendigen Konzentrationen in vivo nicht erreichbar. (McGarry Houghton et al. 2010)

Besonders erwähnenswert ist ein antitumoröses Protein, welches von neutrophilen Granulozyten produziert wird, der *TRAIL*. Seit langem als Therapie des niedrig malignen Harnblasenkarzinoms etabliert, ist eine spezielle onkologische Immuntherapie mit *BCG*. Trotz

ihrer hohen Effektivität, ist deren genaue Funktionsweise jedoch bis dato nur teilweise entschlüsselt.

Allerdings hat sich gezeigt, dass sich bei BCG-Therapie im Patientinnen/Patientenurin neutrophile Granulozyten auffinden lassen, die hohe Mengen an TRAIL produzierten.

Die Freisetzung der löslichen Forms dieses Proteins aus diesen, dürfte durch die Interaktion mit Bestandteilen der BCG-Zellwand induziert werden. (Martínez-Lorenzo et al. 1998; Ludwig et al. 2004; Kemp et al. 2005; Rosevear et al. 2009; Brincks et al. 2013)

An seinen Zielzellen bindet TRAIL an 5 verschiedene Rezeptoren, wobei es sich bei zwei von diesen um sog. „*death-receptors*“ (*DR*) handelt, deren Aktivierung zur Induktion der Caspase-kaskade und nachfolgendem Zelltod führt. (Cullen and Martin 2015)

Die Besonderheit von TRAIL besteht darin, dass Dieses ausschließlich mutierte Zellen eliminiert, wohingegen gesunde Zellen nicht beeinflusst werden. (Brincks et al. 2013; Amarante-Mendes and Griffith 2015)

Allerdings sind TAN nicht die einzigen Zellen, welche im Zuge einer malignen Erkrankung TRAIL zum Schutz des Organismus produzieren. Ebenfalls hierfür bekannt sind NK-Zellen. (Takeda et al. 2002) Mittlerweile wird vermutet, dass TAN weitere antitumoröse Mechanismen mit NK-Zellen teilen könnten. Da Sie zur Abtötung maligner Zellen engen physischen Kontakt benötigen wird beispielsweise spekuliert, ob sie möglicherweise ebenfalls direkte Tumorzelllyse über die Perforine und Granzyme auslösen könnte. (Bodduluru et al. 2014)

Beispielsweise konnten humane Mammakarzinomzellen durch neutrophile Granulozyten humane abgetötet werden, nacheem diese mit HER2-Antikörpern markiert wurden. (Stockmeyer et al. 2003)

Jedoch existieren diesbezüglich einige Unklarheiten: Zum einen scheint der enge Kontakt zwischen TAN und Tumorzellen auch eine notwendige Voraussetzung für die Elimination von malignen Zellen mittels ROS zu sein. (Lichtenstein and Kahle 1985; Queen et al. 2005; Granot et al. 2011) Außerdem wird die Behauptung, dass neutrophile Granulozyten zur Produktion von Granzymen und Perforieren in der Lage sind, durchaus kontrovers. (Metkar and Fröhlich 2004; Wagner et al. 2004) Ebenso lässt sich bestreiten ob der Mechanismus der „direkten Zytotoxizität“ tatsächlich eigenständig existiert. So könnte es sich bei der anti-HER2 vermittelten Zytotoxizität nicht um einen eigenständigen Mechanismus, sondern um eine Form eines weiteren antitumorösen Mechanismus, der für TAN beschrieben wurde, handeln. Damit gemeint wurde die „*Antibody-dependent-cell-mediated-Cytotoxicity*“ (*ADCC*) (Di Carlo et al. 2001; Souto et al. 2011)

Neutrophile Granulozyten besitzen verschiedene Varianten von Fc-Rezeptoren, mit welchen sie verschiedenste Antikörper erkennen und binden können. Dazu zählen FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIIb (CD16b) (Iliopoulos et al. 1989; Kushner and Cheung 1992; Valerius et al. 1993)

Bespielsweise ist bekannt, dass GD2⁺ Melanomzellen durch Neutrophile infolge der Applikation eines GD2-Antikörpers über CD32a und CD16b eliminiert. (Kushner and Cheung 1992)

Bei Menschen mit Mangel an CD11/CD18-Molekülen kommt es zum Auftreten des *Leukozyten-Adhäsionsdefekt (LAD)*, durch welchen bei Diesen auch der Verlust der ADCC-Fähigkeit beobachtet werden konnte. Die Applikation von anti-CD11b, anti-CD11c und anti-CD18, führt auch in gesunden Zellen zur Blockade dieses Mechanismus. (Kushner and Cheung 1992)

Wie es genau zur Elimination von Tumorzellen durch ADCC kommt, ist bis dato nicht bekannt. Es werden ROS-abhängige und ROS-unabhängige Mechanismen diskutiert. (Dall'egri et al. 1984) Bei Ersteren handelt es sich v.a um die direkte Bereitstellung von HOCL an der Tumorzellmembran, bei Letzteren wiederum um die kontroverse Überlegung, dass neutrophile Granulozyten Perforine und Granzyme produzieren. (Uribe-Querol and Rosales 2015)

Somit kann durchaus angezweifelt werden, ob es sich bei der „direkten Zytotoxizität“ und der ADCC tatsächlich um zwei unabhängige Mechanismen handelt, wie es bisher in der Literatur beschrieben wird. (Sionov et al. 2014) Für beide ist die Fähigkeit zur Adhäsion zwischen neutrophilen Granulozyten und Tumorzellen eine Voraussetzung, und als Resultat beider Prozesse werden dieselben tumoreliminierenden Mechanismen vermutet. (Sionov et al. 2014; Uribe-Querol and Rosales 2015) In manchen Publikationen werden sogar Mechanismen des einen Prozesses als Beweis für die Existenz des Anderen herangezogen. Beispielsweise dient die Erwähnung der Elimination von humanen Brustkrebszellen bei Anwesenheit von anti-HER2 Antikörpern in einer Publikation, als Beleg für die Existenz der direkten Zytotoxizität. (Uribe-Querol and Rosales 2015)

Gegen diese Vermutung würde allerdings sprechen, dass aus Lungentumoren im Frühstadium isolierte TAN in vitro zytotoxischer gegenüber kokultivierten Tumorzellen sind, als TAN aus höher entwickelten Malignomen. (Mishalian et al. 2013)

Da sich in dieser artifiziellen Situation keine spezifischen Antikörper vorfinden, deutet dies wiederum auf die Existenz eines Mechanismus hin, welcher sich der ADCC unterscheidet. Ebenfalls dafür würde sprechen, dass neutrophile Granulozyten, neben Makrophagen und NK-Zellen, wahrscheinlich ebenfalls eine Beteiligung im Rahmen der ersten Immunreakti-

on Eliminationsphase haben. (siehe S. 78) In dieser sind jedoch solch spezifische Vorgänge wie die Antikörperproduktion, mangels Aktivierung des erworbenen Immunsystems, noch nicht vorhanden. Aufgrund dieser derzeitigen Datenlage, ist es jedoch bis dato schwer möglich beide Mechanismen auch mit letzter Sicherheit zu unterscheiden. Außerdem existieren zahlreiche widersprüchliche Aussagen bezüglich der Rolle der scheinbar schützenden Mechanismen: Beispielsweise beschreibt eine Publikation, dass in frühen Tumorstadien die genotoxischen Effekte von ROS/RNS überwiegen, und sie somit die Entartung weiter beschleunigen würden. Weiters würden erst nach der Etablierung des Malignoms die antitumorösen Effekte wirkungsvoll in Effekt treten. (Shaul et al. 2016) Jedoch ist eine der definierenden Eigenschaften der N1-TAN des Frühstadiums die erhöhte Produktion von H₂O₂ und eine erhöhte Zytotoxizität. (Mishalian et al. 2013) Die Gegenüberstellung dieser Ergebnisse, zeigt somit auch die bestehende Ungewissheit und teilweise Widersprüchlichkeit des derzeitigen Wissensstands der TAN-Effekte auf.

Abseits direkter zytotoxischer Effekte, fanden sich im Laufe der letzten Jahre vermehrt Hinweise darauf, dass TAN auch durch die Stimulation von antitumorösen T-Zell-Reaktionen eine protektive Rolle zu spielen scheinen. (Singhal et al. 2016)

Die Effekte neutrophiler Granulozyten scheinen daher nicht nur an der initialen Attacke des Immunsystems beteiligt zu sein, sondern beeinflussen auch den Verlauf der nachfolgenden Immunreaktion, ähnlich ihres Verhaltens in non-malignen Entzündungen. (Nathan 2006) Aus Resektaten von Lungentumoren in frühen Entwicklungsstadien, konnte ein einzigartiges hybridisiertes APC-TAN-Subset isoliert werden, welches neben typischen PMN-Oberflächenmarkern ebenfalls spezifische Marker von Makrophagen und DC exprimierten. (Singhal et al. 2016)

Ähnliche Beobachtungen waren zuvor bereits in non-malignen Prozessen beschrieben worden. Im Zuge dieser ließ sich nach Exposition gegenüber entzündlichen Zytokinen, die Expression der Co-stimulatorischen Marker CD80, CD86 und MHC-II beobachten. (Iking-Konert et al. 2005, Wagner et al. 2006) Mittlerweile ist auch bekannt, dass neutrophile Granulozyten bakterielle und virale Antigene aufnehmen, präsentieren und dadurch eine effektive Th1 und Th17-Reaktionen induzieren können. (Radsak et al. 2000; Tvinnereim et al. 2004; Abi Abdallah et al. 2011)

Aus dem Mausmodell konnte ebenso ein Neutrophil-DC-Hybrid isoliert werden. (Geng et al. 2013; Matsushima et al. 2013) Jedoch dürfte es sich hierbei nicht um dieselbe Zelle wie der APC-TAN, da dieser zwar einige typische Makrophagen- (CD14, CD32, CD64, CD206) und DC-Oberflächenmarkern (MHC-II, CD86, CCR7), jedoch keine essentiellen linienspe-

zifische Marker beider dieser Zelltypen exprimierte (CD1c, CD80, CD83, CD163, CD204, CD209). (Singhal et al. 2016)

Diese Vielfältigkeit deckt sich mit den Daten mehrerer in vitro Experimente, in denen es gelang, unterschiedliche Hybriden aus neutrophilen Granulozyten und antigenpräsentierenden Zellen zu generieren: So führte die Kultivierung von Neutrophilen mit einer Kombination von GM-CSF, TNF- α und IL-4 dazu, dass die Zellen die Marker CD1a/b/c, CD40, CD86 und MHC-II exprimierten. (Oehler et al. 1998) Eine Kombination aus GM-CSF, TNF- α und INF- γ hingegen führte zur Ausprägung von MHC-II, CD80, CD83 und CD86. (Iking-Konert et al. 2001)

Ebenfalls wurde in vitro die vollständige Transdifferenzierung Neutrophiler sowohl in Makrophagen als auch in dendritische Zellen beobachtet. (Araki et al. 2004; Iking-Konert et al. 2005; Köffel et al. 2014) Da allerdings die zu diesem Zweck verwendeten Zytokinkonzentrationen unphysiologisch hoch seien, ist es eher unwahrscheinlich, dass exakt dieser Prozess in vivo ablaufen würde. Jedoch wurden v.a in den resezierten Lungentumoren mit hohen Konzentrationen an APC-TAN ebenfalls erhöhte Mengen dieser Zytokine vorgefunden wurden. (Singhal et al. 2016)

Der APC-TAN Phänotyp konnte in vitro generiert werden: So führte die Kultivierung von CD10⁺/CD16^{low}/int stabkernigen Neutrophilen mit GM-CSF und INF- γ im Verlauf von fünf Tagen zur Bildung des Hybriden. Als kausal hierfür wurde der synergistische Effekt dieser Zytokine vermutet, welcher zu einer Downregulation des Transkriptionsfaktors *Ikaros* führte. (Singhal et al. 2016) Bereits zuvor war aus dem Mausmodell bekannt, dass dieser Transkriptionsfaktor wichtige Gene für die Entwicklung von Monozyten/Makrophagen inaktiviert, weshalb die Vorläuferzellen infolge in neutrophile Granulozyten differenzieren. (Papanasiou et al. 2003)

Der APC-TAN wies besondere Fähigkeiten auf: So waren diese Zellen dazu in der Lage antitumoröse T-Zell Reaktionen zu stimulieren. Um dies experimentell zu beweisen, wurden T-Zellen zunächst derart modifiziert, dass ihr T-Zell-Rezeptor in der Lage war eine spezifische Peptidsequenz des Antigens NY-ESO-1 mit hoher Affinität zu erkennen. Im Anschluss wurden sie mit A549 Lungentumorzellen co-kultiviert, die selbst derart modifiziert wurden, dass sie dieses entsprechende Peptid über HLA-A präsentieren. Erwartungsgemäß kam es dadurch zur Produktion der tumorzytotoxischen Proteine INF- γ und Granzym-B. Infolge der Zugabe von APC-TAN, zeigten sich signifikant höhere Konzentrationen diesen Faktoren. Die Beigabe von normalen neutrophilen Granulozyten führte nicht

zu diesem Effekt. Außerdem wurden diese Effekte überhaupt nicht beobachtet, wenn die Co-Kultivierung mit unveränderten A549 Zellen erfolgte. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass APC-TAN die T-Zellen nicht automatisch stimulieren, sondern eine ablaufende T-Zell-Reaktion zusätzlich verstärken. Dies erreichen sie über die Expression der Co-stimulatorischen Moleküle OX40L, 4-1BBL, CD86 sowie CD54. Weiters war direkter Kontakt notwendig, damit dieser Prozess ablaufen konnte. Die Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen Zelladhäsionsmoleküle, schwächte den stimulierenden Effekt auf T-Zellen deutlich ab. (Singhal et al. 2016)

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass APC-TAN dazu in der Lage waren NY-ESO-1 zu phagozytieren, prozessieren und den T-Zellen zu präsentieren. Voraussetzung hierfür war die Bereitstellung des Proteins durch einen IgG-Komplex. Die Aufnahme erfolgte über die IgG-Rezeptoren FcγRI (CD64) und FcγRII (CD32a), deren Expression, im Vergleich mit naiven neutrophilen Granulozyten, auf APC-TAN signifikant erhöht vorhanden waren. Jedoch erwähnt die Publikation, dass sie diesen Prozess zwar beobachten konnten, dieser jedoch nur in geringem Ausmaß stattfand. (Singhal et al. 2016) Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass diese Zellen die Antigene einzig aufnehmen und prozessieren. Danach könnten diese abermals in das TME sezerniert werden, woraus eine effizientere MHC-Be-ladung der regulären APC resultieren könnte. (Potter and Harding 2001)

Die beschriebenen antitumorösen Funktionen von TAN, sowie die ihrer speziellen Hybrid Subsets, deutet darauf hin, dass diese Zellen eine essentielle Rolle einerseits im Rahmen der initialen Abwehr gegenüber malignen Erkrankungen, andererseits bei der Regulation des weiteren Entzündungsablaufs spielen könnten. Im Mausmodell zeigen TAN selbst ohne TGF-β Blockade (bzw. vergleichbare N1-TAN produzierende Modifikation), in früheren Entwicklungsstadien eine erhöhte Zytotoxizität, welche jedoch mit zunehmender Pro-gression abnimmt. (Mishalian et al. 2013) Jedoch ist bei der Interpretation dieser Ergeb-nisse unbedingt die Tatsache zu beachten, dass die hierfür verwendeten Tumorzelllinien naturgemäß bereits einmal den Prozess des Cancerimmunoeditings durchlaufen haben. Somit entspricht das Verhalten der dadurch generierten Tumoren, wie auch deren Beein-flussung anderer Zellen, eher dem einer Malignität der Escapephase. (Eruslanov 2017) Daher könnte es möglich sein, dass die in diesen Modellen beobachteten antitumorösen N1-Effekte, nur einen Bruchteil der tatsächlich stattfindenden Prozesse der Eliminations und Equilibriumsphase darstellen. Die Generierung genauerer und insbesondere humaner Daten, gestaltet sich jedoch aus offensichtlichen Gründen als schwierig. Denn humanes Untersuchungsmaterial wird erst nach dem Zeitpunkt der klinischen Diagnose verfügbar,

wodurch diese Tumoren diese Phasen des Immunoeditings bereits durchlaufen haben. Jedoch könnten die Daten der APC-TAN Hybriden auf eine Dominanz der antitumorösen N1 hinweisen, welche in diesen frühen Tumorentwicklungsstadien noch existent ist. Es ist gut möglich, dass sich die Wechselwirkung zwischen Tumor und Immunsystem zu diesem Zeitpunkt am Kipppunkt befindet, nach dessen Überschreiten die protumorösen Effekte zunehmend an Einfluss gewinnen, wohingegen die Antitumorösen schwächer werden. Dies würde auch erklären, warum das Auftreten von APC-TAN in Tumoren < 3 cm deutlich höher als in Tumoren > 3 cm war, und in Tumoren > 5 - 7 cm komplett fehlte. (Singhal et al. 2016) In der folgenden Beschreibung von Equilibrium- und Eliminationsphase, wird nun näher erörtert, wie sich maligne Zellen dem antitumorösen Angriff des Immunsystems entziehen. Wie sich zeigen wird, sind daran diverse immunsuppressive Effekte von N2-TAN beteiligt.

3.14. Die weiteren Phasen des Cancer-Immunoeditings:

Bei der *Equilibriumphase* handelt es sich um die längste Phase des Cancerimmunoeditings. Gelingt es während der Eliminationsphase nicht, sämtliche entartete Zellen abzutöten, resultiert nun ein dynamisches Gleichgewicht zwischen beiden „Kontrahenten“. (Dunn et al. 2004) Die aus der Genominstabilität resultierende hochgradige Heterogenität der malignen Zellen, führt zur Bildung diverser Tumorzellphänotypen, von welchen manche unempfindlicher für die Angriffe des Immunsystems sind als andere. (Loeb 1991) Ab diesem Zeitpunkt, dienen die Effekte des angreifenden Immunsystem paradoxerweise nicht mehr nur dem Schutz des Organismus. So üben sie auf die entstehende Neoplasie nun auch einen Selektionsdruck aus, der dazu führt, dass hoch immunogene maligne Zellen effizient eliminiert werden, allerdings die Zellen überleben, welche durch Mutationen Mechanismen entwickelt haben, mit denen sie sich besser gegen die Angriffe der körperlichen Abwehr schützen. Die Schutzreaktion des Organismus kollaboriert somit plötzlich mit der Erkrankung, da Sie die Etablierung eines Darwin'schen Selektionsmechanismus ermöglicht. (Dunn et al. 2004)

Diese Tatsache konnte durch Transplantationsexperimente im Mausmodell beobachtet werden: Infolge der Transplantation von Tumorzellen, welche in einer immundefizienten Mäusen generiert wurden, in Mäuse mit erhaltener Immunkompetenz, war es diesen unmöglich erneut einen Tumor zu etablieren. Im Gegensatz dazu konnten Tumorzellen aus immunkompetenten Mäusen dies, nach Transplantation in immundefiziente Tieren, erreichen. (Kim et al. 2007; Teng et al. 2008) Sind Tumoren während ihrer Entstehung keiner

funktionierende Immunabwehr ausgesetzt, kann sich das Malignom ungehindert etablieren. Aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks durch das Immunsystem, ist die Entstehung eines schwach immunogenen Phänotyps nicht notwendig. Sind diese entarteten Zellen, nach ihrer Transplantation in ein immunkompetentes Tier, nun erstmals einem funktionierenden Immunsystem ausgesetzt, führt deren hohe Immunogenität zu einer raschen Elimination dieser. In den Tumoren der immunkompetenten Tieren entwickeln die malignen Zellen durch Mutationen nach und nach Mechanismen, welche die Effekte des Immunsystems unterminieren. Transplantiert in immundefiziente Tiere sind diese logischerweise ungehindert dazu in der Lage, einen Tumor zu etablieren. (Smyth et al. 2006)

Hierbei spielen sowohl die Prozesse der Equilibriumphase, als auch die der nachfolgenden Escapephase eine Rolle. (Dunn et al. 2004)

Auch in klinischen Beobachtungen, finden sich Beweise für die Existenz einer Equilibriumphase: Innerhalb von 1-2 Jahren beobachtete man bei zwei Patientinnen/Patienten, welche jeweils eine Niere derselben Spenderin erhielten, das Auftreten eines metastasierten Melanoms. Die Spenderin, welche zum Zeitpunkt der Spende als tumorfrei galt, erhielt 16 Jahre vor ihrem Tod eine Therapie wegen eines primären Melanoms. (MacKie et al. 2003)

Weitere Fallberichte beschreiben ebenfalls derartige Beobachtungen, unter anderem auch bei Spendern mit blander Malignomhistorie. (Elder et al. 1997; Suranyi et al. 1998)

Daher wurde belegt, dass trotz klinischer Tumorfreiheit durchaus maligne Zellen im Organismus existieren können. Sie werden von der Abwehrreaktion des Immunsystems unter Kontrolle gehalten und befinden sich mit dieser in einem dynamischen Gleichgewicht. Die, infolge einer Transplantation notwendige, immunsuppressive Therapie, erlaubt den malignen Zellen nun die rasche Entartung, wodurch es bei den Rezipienten zum Auftreten einer vollständig ausgeprägten Neoplasie kommt. (Dunn et al. 2004)

Bei der „herkömmlichen“ Krebsentstehung entwickelt sich sukzessive eine Unempfindlichkeit gegenüber den Effekten des Immunsystems. Wenn diese erworben wird, kommt es zum Übergang in die Escapephase. Ursächlich hierfür ist u.a. die Instabilität des Genoms. Dadurch kommt es zu Nukleotid-Exzisions-Reperaturinstabilitäten (NIN), Mikrosatelliteninstabilität (MIN) und chromosomale Instabilität (CIN), wobei letztere mit Abstand die Relevanteste zu sein scheint. So besitzen geschätzt 25-50% aller Malignome Aberrationen ganzer Chromosomen. (Lengauer et al. 1998)

Durch diesen Prozess, können Varianten maligner Zellen mit niedriger Immunogenität entstehen, welche durch die Prozesse der Equilibriumphase, zur weiteren Entartung befähigt werden. In der Escapephase gewinnen die Resistenzmechanismen gegen die Immunreak-

tion derart an Einfluss, dass die malignen Zellen dazu befähigt werden auch in einer immunkompetenten Umgebung zu wachsen. (Dunn et al. 2004) Dies erreichen sie durch den Erhalt einer Vielzahl verschiedenster Eigenschaften, welche hemmend auf Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems wirken. (Swann and Smyth 2007) Da sich bei individuellen Tumoren unterschiedliche Kombinationen verschiedener immunsuppressiver Strategien beobachten ließen, deutet dies ebenfalls auf deren sukzessive Entstehung aufgrund der Genominstabilität hin. (Dunn et al. 2004) Zu diesen zählen einerseits die Manipulation von physiologischen Mechanismen der Immunreaktion, andererseits auch Veränderungen an der Tumorzelle, welche die direkt dafür sorgen, dass die antitumoröse Abwehrreaktion abgeschwächt wird. Dabei handelt es sich zum einen um Mechanismen, welche die Erkennung der malignen Zelle ermöglichen (Downregulation von HLA-Molekülen, Verlust der Antigenpräsentation, IFN- γ -Insensitivität) oder in Signaltransduktionswegen, welche an der Vermittlung der Effekte der Immunzellen beteiligt sind (Defekte im *death-receptor-Signaling*, verstärkte Expression von antiapoptotischen Signalen) (Kaplan et al. 1998; Catlett-Falcone et al. 1999; Marincola et al. 2000; Takeda et al. 2002) So zeigte sich in einer weitreichenden Analyse von Tumorgewebsmaterial, dass zwischen 40-90% aller humanen Tumoren einen partiellen oder kompletten Verlust der HLA-I Proteine aufweisen. (Algarra et al. 2000; Marincola et al. 2000) Eine andere Studie fand in 4 von 17 humanen Lungentumorzelllinien eine komplette IFN- γ Insensitivität. (Kaplan et al. 1998)

Neben Veränderungen an der Tumorzelle selbst existieren Mechanismen, über welche der normalen Abläufe der Immunreaktion unterminiert wird. Eine Eigenschaft der Mehrheit an Tumoren scheint zu sein, dass trotz der individuell unterschiedlichen Generierung der immunsuppressiven Effekte, zu Beginn vor allem humorale Mechanismen (u.a Produktion von IL10, TGF- β , Prostaglandin E2, VEGF) eingesetzt werden. (Gerlini et al. 2004; Fridlender et al. 2009; Gholamin et al. 2009; Greenhough et al. 2009) In fortgeschrittenen Entwicklungsstadien werden zusätzlich auch zelluläre Mechanismen aktiv. Neben der Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen und TAM, spielen auch hier vor allem TAN und PMN-MDSC eine wichtige Rolle. (Sakaguchi et al. 2001; Sionov et al. 2014)

3.15. Immunsuppression durch TAN und Abgrenzung zu PMN-MDSC:

Das immunsuppressive TME wird im Verlauf der Erkrankung zu Teilen über manipulierte oder gänzlich neu generierte granulozytäre Populationen erzeugt. Zu diesen zählen einerseits die von Fridlender et al. beschriebenen N2-TAN, sowie die PMN-MDSC. (Fridlender

et al. 2009; Fridlender et al. 2012) Beide Zelltypen können ihre hemmenden Effekte über die Freisetzung verschiedener Mediatoren oder Enzyme entweder direkt ausüben, oder durch die Rekrutierung anderer Immunzellen und die Regulation des inflammatorischen Prozesses indirekt beeinflussen. Da beide Phänotypen teilweise über dieselben Oberflächenmarker, sowie ähnliche immunsuppressive Mechanismen verfügen, gestaltet es sich bis dato schwierig ihre spezifische Effekte klar zuzuordnen. (Fridlender et al. 2012) Überhaupt war es bis unlängst unklar ob es sich bei N2-TAN und PMN-MDSC nicht eigentlich um dieselbe Zelle handelt. Erst Transkriptionanalysen machten deutlich, dass es sich bei TAN um ein eigenes, von naiven zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und PMN-MDSC unterscheidbares Subset handelt. (Fridlender et al. 2012)

Im Rahmen einer Krebserkrankung lässt oftmals das Auftreten einer heterogenen Population unreifer granulozytärer und monozytärer Zellen mit T-Zell-hemmenden Fähigkeiten beobachten. Zu den Tumorentitäten bei welchen die Bildung dieser MDSC beobachtet wurde zählen u.a. *Prostatakarzinom, HCC, Blasenkarzinom, NSCLC, Magenkarzinom, Mammakarzinom, Kolorektaleskarzinom, Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom*. (Solito et al. 2011; Filipazzi et al. 2012; Pico de Coaña et al. 2013; Jordan et al. 2013; Zhang et al. 2013; Weide et al. 2014; Condamine et al. 2016; Elliot et al. 2017) Außerdem korreliert die Konzentration dieser Zellen in der Zirkulation bei vielen Tumorarten mit einer schnelleren Krankheitsprogression, sowie schlechterer Prognose. (Solito et al. 2011; Filipazzi et al. 2012; Pico de Coaña et al. 2013; Zhang et al. 2013; Weide et al. 2014; Romano et al. 2015) Niedrige Konzentrationen wiederum, korrelieren mit einem verbesserten therapeutischen Effekt von Checkpoint-Inhibitor Therapien. (Pico de Coaña et al. 2013; Gebhardt et al. 2015; Sade-Feldman et al. 2016) Nach adaptivem Transfer in tumorbefallene Tiere, waren sowohl M- als auch PMN-MDSC in der Lage, aus der Zirkulation in das TME zu migrieren sich dort in reife TAM oder neutrophile Granulozyten zu differenzieren. (Kusmartsev et al. 2005)

Als grobe Unterscheidung lässt sich festhalten, dass es sich bei PMN-MDSC um unreifere granulozytäre Zellen in der Zirkulation handelt, wohingegen TAN als gewebständige, reife Neutrophile im TME definiert wurden. Auf transkriptioneller Ebene unterscheiden sich diese beiden Zelltypen merklich voneinander, sodass es sich bei TAN nicht bloß um gewebständige PMN-MDSC handelt. (Fridlender et al. 2012) Die immunsuppressiven Effekte von TAN (sowie die der PMN-MDSC) können, neben einem direkt hemmenden Einfluss auf das Immunsystem, auch über indirekte Wege etabliert werden. Zusätzlich sind manche Substanzen in der Lage, über verschiedene Effekte beide Wege zu beeinflussen:

Ein prominentes Beispiel hierfür sind die Wirkungen von reaktive Sauerstoff und Stickstoffverbindungen. Diese können auf mehrere Arten die normale Funktion von T-Zellen zu hemmen. (Siehe S. 11) Der tatsächliche Einfluss von TAN produzierten ROS, lässt sich allerdings aufgrund der Daten der Transkriptionsanalyse hinterfragen. Hierbei zeigte sich, dass die mRNA-Expression der dafür verantwortlichen Signalpathways, ausgehend von zirkulierenden naiven neutrophilen Granulozyten über PMN-MDSC hin zu TAN deutlich abnimmt. Weiters ließ sich in TAN, eine solche mRNA-Verringerung sich auch bei jenen Pathways beobachten, welche essentiell für die Produktion aller drei neutrophilen Granulatypen sind. (Fridlender et al. 2012) Interessant wiederum ist, dass es sich bei einem Mediator, welcher die Degranulation der Neutrophilen und die ROS/RNS-Produktion hemmt, um TGF- β handelt. (Malipiero et al. 2006; Shen et al. 2007) Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man vermuten, dass ein direkt T-Zell hemmender Effekt durch ROS/RNS, in erster Linie von PMN-MDSC stammt. Eine andere Publikationen jedoch beschrieb, im Rahmen der in vitro Co-Kultivierung von T-Zellen und PMN-MDSC, keine Veränderung der T-Zell-Proliferation, unabhängig davon ob die ROS Produktion gehemmt wurde oder nicht. (Lang et al. 2018)

Weiters ist zu betonen, dass gerade die erhöhte Produktion von Superoxid und H₂O₂ ein wichtiges Merkmal für die antitumorösen N1-TAN darstellt. (Fridlender and Albelda 2012)

Trotz dieser scheinbar widersprüchlichen Studienlage könnte sich Erklärung für den immunsuppressiven Effekt von ROS/RNS finden lassen, wenn man deren Einfluss auf einen weiteren Mediator mit potenten hemmenden Wirkungen bedenkt, nämlich TGF- β : Erhöhte Konzentrationen dieses Zytokins, finden sich häufig in humanen Malignomen. (Wojtowicz-Praga 2003; Levy and Hill 2006; Sionov et al. 2015) Eine seiner Quellen sind die Tumorzellen selbst, jedoch sezernieren diese TGF- β hauptsächlich in einem inaktiven Komplex, aus dem es zunächst freigesetzt werden muss. Dies kann u.a durch MMP9, die Neutrophile Elastase, aber auch durch freie Sauerstoffradikale bewerkstelligt werden. (Barcellos-Hoff and Dix 1996; Bierie and Moses 2010) Dem Konzept des Cancer-Immunoeditings zufolge, findet in frühen Tumorstadien zunächst eine antitumoröse Immunreaktion statt. (Dunn et al. 2004) Entsprechend ihrer Aufgabe als *first-line defense*, sollten hierbei auch antitumorös wirkende Neutrophile beteiligt sein. Dies bestätigen Untersuchungen humaner Lungentumoren im Frühstadium. (Eruslanov 2017) Wenn ein wichtiges Kriterium antitumoröser TAN eine erhöhte ROS-Produktion ist, diese bekanntlich in der Lage sind TGF- β freizusetzen, so würde dies schlussendlich zu einem sukzessiven Anstieg dessen Konzentration führen. (Sionov et al. 2014)

Zu den Effekten, über welche TGF- β auf das Immunsystem beeinflusst, zählen:

- Hemmung der T-Helferzellendifferenzierung
- Konversion von naiven T-Zellen in regulatorische T-Zellen
- Hemmung der Proliferation von B-/T-Zellen
- Hemmung der Produktion von wichtigen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-2, IL-4 und IFN- γ
- Hemmung von Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen.

(Yoshimura and Muto 2010)

Außerdem sei hier abermals die TGF- β induzierte Etablierung des protumorösen N2-Phänotyps erwähnt. (Fridlender et al. 2009, Fridlender and Albelda 2012)

Zwar existieren widersprüchliche Daten bezüglich der direkten Hemmung von T-Zellen durch ROS/RNS, möglicherweise könnten sie jedoch indirekt an der Vermittlung eines u.a. immunsuppressiven Effekts beteiligt sein, der zusätzlich einen zentralen Stellenwert in der Krankheitsprogression besitzt. Da die ROS/RNS-Freisetzung jedoch nicht mit den protumorösen N2, sondern den antitumorösen N1-TAN assoziiert zu scheinen scheint, könnte es sich auch in diesem Fall um einen der zentralen Kippunkte handeln, dessen Überschreitung dafür sorgt, dass die Elimination der malignen Zellen durch das Immunsystem fehlschlägt.

Auch der dadurch induzierte N2-Phänotyp leistet im Anschluss einen Beitrag zur TGF- β Konzentration im TME, indem er u.a. Makrophagen sowie MDSC rekrutiert, welche wiederum als Quellen für TGF- β bekannt sind. (Yang et al. 2008; Zamarron and Chen 2011; Fridlender et al. 2012, Sionov et al. 2014)

Dass neutrophile Granulozyten keineswegs bloß professionelle Phagozyten sind, sondern ebenfalls die Fähigkeit besitzen, andere Zellen des Immunsystems zu rekrutieren und deren Effekte zu beeinflussen, ist mittlerweile eine anerkannte Tatsache. So produzieren sie zahlreiche Mediatoren, welche eine zentrale Rolle in der weiteren Regulation der Immunreaktion spielen. (Scapini et al. 2000) Gerade im Verlauf einer malignen Erkrankung scheint dieser Effekt von essentieller Bedeutung zu sein. Der Vergleich der Transkription zwischen TAN, naiven Neutrophilen und PMN-MDSC, zeigte in Ersteren eine deutliche Erhöhung der Expression einer Vielzahl an Chemokinen und Zytokinen. Darunter befanden sich u.a. CCL-2,3,4,8,12,17 sowie CXCL-1,2,9,16. Weiters wurde festgestellt, dass eine derartige Aktivität ebenfalls bei Neutrophilen im Rahmen der Wundheilung beobachtbar

sei. (Fridlender et al. 2012) Für viele der erwähnten Mediatoren, ist mittlerweile ein potenter protumoröser Effekt bekannt, über den diverse Hallmarks of Cancer beeinflusst werden. (Sionov et al. 2014) Dazu zählen auch die Effekte, durch welche es zu einer Rekrutierung und Regulation verschiedener Immunozyten kommt, welche in der Regel immunsuppressiv wirken. So korreliert CCL-2 beispielsweise nicht nur mit einer schlechteren Prognose, sondern rekrutiert ebenfalls MDSC in das TME, durch welche ein hemmender Effekt erzielt wird. (Huang et al. 2007) Außerdem scheint es ebenfalls für die Rekrutierung protumoröser Makrophagen verantwortlich zu sein. (Fridlender et al. 2012) Auch bezüglich CXCL1 und CXCL2 sind mehrere protumoröse Effekte bekannt. (Uribe-Querol and Rosales 2015) Interessanterweise war die Expression dieser Chemokine in TAN, im Vergleich zu den anderen beiden Subsets, drastisch erhöht (im Fall von CXCL2 um das 188-fache). (Fridlender et al. 2012) Beide dieser Mediatoren erzeugen ein positives Feedbacksignal, über welches weitere naive neutrophile Granulozyten in das TME rekrutiert werden. Dort angekommen, werden diese durch sukzessiv ansteigende TGF- β Konzentrationen in Richtung des N2 polarisiert. Infolge beteiligen sie sich selbst an diversen protumorösen Effekten. (Fridlender and Albelda 2012; Uribe-Querol and Rosales 2015)

Besonders erwähnenswert bezüglich der Chemokinexpression, ist eine Analyse dieser Studie, im Zuge derer die transkriptionellen Unterschiede zwischen N1 und N2-TAN verglichen wurden: Im Vergleich zu N1 waren in N2 136 Gene downreguliert, hingegen zeigte sich in nur zwei Gegen eine Upregulation. Das Genprodukt eines dieser beiden, war das Chemokin CCL-17. Bekannt ist CCL-17 vor allem für seine Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen. Regulatorische T-Zellen wirken nicht nur stark hemmend auf das Immunsystem, des Weiteren sind sie auch für ihre direkten tumorprogressionsfördernden Effekte bekannt. (Karavitis and Zhang 2013; Sionov et al. 2015) Interessanterweise war die Expression eben jenes Chemokins, in den antitumorösen N1-TAN stark verringert. (Shaul et al. 2016)

Zusammenfassend lässt sich somit behaupten, dass TAN ebenfalls eine wichtige Funktion im Rahmen der tumorinduzierten Immunsuppression besitzen. Verursachen könnten sie diese einerseits über direkte Einflüsse, welche ihrer Effektormoleküle auf die Funktion anderer Immunkomponenten ausüben. Allerdings existieren hierzu widersprüchliche Daten, weshalb die zugrundeliegenden Mechanismen bis dato noch nicht vollständig entschlüsselt wurden und nicht geklärt ist, welche Rolle unreife PMN-MDSC in diesem Prozess spielen. Hingegen als gesichert gilt, dass ihre Freisetzung von Chemo- und Zytokinen,

insbesondere der Produkte von N2-TAN, dazu in der Lage ist, die gesamte antitumoröse Immunreaktion zu Gunsten des Tumors zu beeinflussen. Außerdem könnten sie maßgeblich verantwortlich für die initiale Bildung der TME-Zusammensetzung sein, durch welche u.a die Polarisation von N2 TAN erst möglich gemacht wird. Zwar bestimmen zunächst v.a. antitumoröse Mechanismen den Verlauf der ersten Phase des Cancer-Immunoeditings, jedoch könnten es paradoxerweise eben jene Vorgänge sein, die, u.a. durch zunehmende TGF- β Freisetzung, zu den fatalen Folgen führen, welche schlussendlich in der Resistenz des Tumors gegen das Immunsystem und somit dem Immunoescape enden.

3.16. Die Suche nach einer Methode zur ontogenetischen Phanotypisierung von Tumor-associated-neutrophils:

Aufgrund der Vielseitigkeit ihrer Effekte, ihres gewichtigen Einfluss auf den Krankheitsverlauf, sowie der Tatsache, dass bis dato noch nicht klar ist, welche spezifischen Stimuli und welchen spezifischen Vorläuferzellen der Bildung der unterschiedlichen Subsets der TAN zugrunde liegen, bestand unser Ziel darin, neue eine Methodik zu finden, die es erlaubt eben diese Fragen genauer zu untersuchen. Aufgrund unserer Vermutung, dass möglicherweise unterschiedliche Vorstufen der neutrophilen Granulozyten für die Entstehung der unterschiedlichen TAN-Subsets verantwortlich sein könnten, bestand eine Anforderungen an dieses Modell darin, diese Hypothese überprüfbar zu machen. Aufgrund des Effekts von TGF- β auf die die Polarisation TAN-Phänotypen, sowie der Tatsache, dass nur unreife starkernige Vorläuferzellen dazu in der Lage sind den antitumorösen APC-TAN zu bilden, war es für uns wichtig, dass das Modell die direkten Effekte von Tumorzellen auf spezifische, einzig dadurch beeinflusste Zellen der neutrophilen Linie zulässt. (Fridlender et al. 2009; Singhal et al. 2016) Dies erforderte die eigenhändige Generierung eines dreidimensionalen Tumor-Analogs, und im besten Fall dessen Kultivierung in einem *in vivo* Modell. Außerdem legten wir uns bezüglich der zu verwendenden Zellen auf jede des Lungenkarzinoms fest, da sich der Großteil der für uns interessanten TAN-Publikationen auf eben solche bezieht. Unsere Herangehensweise an diese Aufgabenstellung war die Folgende: Zunächst sollte ein 3-dimensionaler Tumorspheroid erzeugt werden. Um eine Interaktion zwischen den Zellen des Tumors und jenen des Immunsystems zu ermöglichen, musste ein Weg gefunden werden, wie Letztere in diesen künstlich geschaffenen Tumor eingebracht werden könnten. Daher entschlossen wir uns, vor der Spheroidbildung eine Suspension aus beiden Zelltypen zu erstellen. Mittels eines speziellen Protokolls

(siehe Material und Methoden), sollten anschließend die geforderten 3-dimensionalen Tumorcluster generiert werden.

Da es sich bei den verwendeten Immunzellen um Vorläuferzellen des neutrophilen Granulozyten handeln sollte, wurden zuvor hämatopoetische Stammzellen, unter Verwendung eines spezifischen Zytokinmix, zur Differenzierung in Zellen der granulozytären Linie ange-regt (siehe Material und Methoden).

Um sicherzustellen, dass diese auch tatsächlich in den Tumor inkorporiert werden konn-ten, wurden diese vor der Co-Kultivierung, mit dem fluoreszierenden Farbstoff CFSE mar-kiert.

Anschließend wurde die Spheroidbildung für einen definierten Zeitraum beobachtet, und zunächst einerseits mittels Fluoreszenzmikroskopie, auf die Lokalisation der markierten Zellen untersucht. Andererseits wurden die ersten Spheroiden, mittels eines speziellen Dis-aggregationsprotokolls, erneut in eine Zellsuspension umgewandelt, wodurch eine durch-flusszytometrische Analyse der Zellen möglich wurde.

In dieser wurde die Suspension, anhand eines zuvor festgelegten Oberflächenmarkerpro-fils, mit zwei Kontrollen verglichen. Eine bestand aus einer, zeitgleich durchgeführten, Mo-nokultur der Zellen der neutrophilen Reihe. Die Andere bestand aus, erneut in Suspension gebrachten, reinen Spheroiden, welche ausschließlich aus Tumorzellen bestanden.

In der nächsten Etappe bestand das Ziel darin, diese Methodik auf ein *in vivo* Modell zu applizieren. Dafür wurde das „Chick-Chorionallantoismembran-Modell“ (CAM-Modell) ge-wählt. Hierbei handelt es sich um ein leicht zu handhabendes *in vivo* Modell, welches mitt-lerweile in einigen Bereichen der Tumorforschung zum Einsatz kommt. Die, im Zuge der Embryogenese des Huhns entstehende, CAM, bietet aus mehreren Gründen (s.u) einen optimalen Nährboden für die Applikation von Tumorzellen und erlaubt dadurch eine Beob-achtung und Dokumentation der Tumorgenese. Im Anschluss an deren Generierung, soll-ten die Tumorspheroiden in dieses Modell überführt werden und schlussendlich erneut re-seziert, disaggregiert und auf Veränderungen der Oberflächenmarkerexpression unter-sucht werden.

3.17. Das Chorionallantoismembran (CAM)-Modell in der Tumorforschung:

Die Generierung von *in vivo* Daten genießt in der präklinischen Tumorforschung höchsten Stellenwert. Die hierfür i.d.R verwendeten Mausmodelle, bringen jedoch einige Nachteile mit sich: Zunächst wird eine große Anzahl an Versuchstieren benötigt um verlässliche Da-

ten zu generieren. Außerdem ist der durchschnittliche benötigte Zeitaufwand für ein derartiges Modell eher ausgeprägt. Grund hierfür ist nicht zuletzt die Natur maligner Erkrankungen hinsichtlich ihrer Etablierung. Daraus ergibt sich mitunter eine nicht unerhebliche finanzielle Belastung. Dies sind gute Gründe für die Suche nach alternativen Methoden, welche bezüglich dieser Faktoren günstige Eigenschaften aufweisen. (Lokman et al. 2012) Als eine dieser hat sich das Chorionallantoismembran (CAM)-Modell bewährt, welches u.a zur Erforschung von angiogenen, invasiven und metastatischen Prozessen verwendet wurde. (Wilting et al. 1996; Tufan and Satiroglu-Tufan 2005; Cimpean et al. 2008; Deryugina and Quigley 2008; Klingenberg et al. 2014)

Am 4. Tag der Embryogenese des Huhns bildet sich die CAM, durch die Verschmelzung von Chorion und Allantois. Auf diese können u.a. Tumorzellen oder Pharmaka aufgetragen werden, was die Beobachtung ihrer Biologie und ihren Effekte auf den Organismus möglich macht. (Lokman et al. 2012) Im Vergleich mit dem Mausmodell erweist sich das CAM-Assay, aufgrund seiner vergleichsweise kurzen Versuchsdauer, seinen geringeren Kosten und der Möglichkeit im Verlauf eines Experiments eine große Anzahl von individuellen Versuchsobjekten zu generieren, als vorteilhaft. Des Weiteren muss die gute Reproduzierbarkeit dieser Methode hervorgehoben werden. Selbstverständlich soll an dieser Stelle nicht behauptet werden, dass dadurch gängigen Mausmodelle obsolet werden. Eher kann man sich das CAM-Assay als eine Art „Filter“ vorstellen, welcher eine erste Überprüfung einer Hypothese in vivo möglich macht. Im Idealfall lassen sich durch die so gewonnen Daten, Fragestellungen, die im Mausmodell geklärt werden sollen, konkretisieren und präzisieren.

Mittlerweile wird das CAM-Modell auch zur Analyse des Tumormicroenvironments diverser Malignome herangezogen. In der Vergangenheit wurden damit insbesondere *Melanome*, *Fibrosarkome*, *Gliome* und *Kolonkarzinome* untersucht. (Chambers et al. 1990; Deryugina and Quigley 2008; Zijlstra et al. 2008) Interessant ist, dass Morphologie und Verhalten von Tumoren auf CAM humanen Neoplasien sehr ähnlich ist. Beispielsweise bilden BL2B95-Zellen des humanen Burkitt-Lymphoms ebenfalls das charakteristische, diagnostisch relevante „Sternenhimmel-Muster“, das typische Stroma lymphoider Organe mit rektikulären Fasern und weisen einen Ki67-Index von > 90% auf. Hierbei handelt es sich um typische Eigenschaften des, im Menschen entstehenden, Burkitt-Lymphoms. (Klingenberg et al. 2014) Im Kontext dieser Arbeit besonders hervorzuheben, ist das erwähnte „Sternenhimmelmuster“. Hierbei handelt es sich das histologische Hauptcharakteristikum des Burkitt-Lymphoms. Es entsteht durch das Auftreten von Makrophagen, die karryorhektische und apoptotische Tumorzellen phagozytierten, also um eine komplexe Interaktion zwischen

Zellen des Tumors und des Immunsystems. (Jaffe and Pittaluga 2011) Das Auftreten dieser Formation im CAM-Modell, deutet die Verwendbarkeit des CAM-Modells zur Erforschung solcher Prozesse an.

Außerdem wurde nach Kultivierung von Burkitt-Lymphomzellen auf der CAM, auch das Auftreten dendritischer Zellen beobachtet, welche direkte Zell-Zellverbindungen mit den malignen Zellen bildeten und eine TME-Infiltration durch heterophile Granulozyten induzierten. Hierbei handelt es sich um das aviane Äquivalent des neutrophilen Granulozyten. (Klingenberg et al. 2016) Eine weitere CAM-Studie analysierte den Einfluss dieser Zellen auf die Induktion der Angiogenese. Diese wurde einerseits durch Applikation von bFGF und VEGF, andererseits durch HT-1080 Fibrosarkomzellen stimuliert, nachdem zuvor eine dreidimensionale Kollagen-Matrix aufgebracht wurde. In beiden Fällen zeigte sich eine starke Migration heterophiler Granulozyten in die Matrix, weshalb diesen eine zentrale Rolle im Rahmen der Angiogenese zugeschrieben wurde. Infolge der Hemmung dieses Influx durch anti-inflammatorische Pharmaka (Cortisol, Ibuprofen), kam es zu einer deutlichen Abschwächung der Angiogenese. (Zijlstra et al. 2006) Wie bereits in vorigen Abschnitten dieser Arbeit erläutert wurde, konnte selbiges auch beim Menschen nachgewiesen werden. (Sionov et al. 2014) Auch im CAM-Modell scheint MMP9 hierbei eine besondere Rolle zu spielen. Im Anschluss an die Infiltration, wurde die Freisetzung dieses Enzyms durch die granulozytären Zellen beobachtet. Durch die Interaktion mit MMP13, welche durch Makrophagen bereitgestellt wird, führte MMP9 zum ECM-Remodelling im angiogenen Areal. Wird MMP9 direkt auf die CAM appliziert, kommt es jedoch zu keiner Induktion der Angiogenese. (Zijlstra et al. 2006) Bei der Applikation von MMP13 wiederum, ist dies allerdings der Fall. (Zijlstra et al. 2004) Wurde MMP9 jedoch aufgetragen, nachdem die angiogenen Vorgänge zuvor durch Ibuprofen gehemmt wurden, kam es im Anschluss zu einer Wiederherstellung der Angiogenese.

Als Grund hierfür wurde angenommen, dass MMP9 durch Gewebsremodelling zur katalytischen Freisetzung diverser Zytokine, bioaktiver Regulatoren und Peptiden führt. (Zijlstra et al. 2006) Daten anderer in vivo Modelle deuten ebenfalls die Existenz eines derartigen Mechanismus an. (Acuff et al 2006; Nozawa et al. 2006; Ardi et al. 2007)

Mitunter aufgrund der hier erwähnten Publikationen, sahen wir im CAM-Modell eine interessante Möglichkeit, zur Etablierung der von uns gewünschten Methodik.

4. Material und Methoden - Auswahl der Tumorzelllinien:

Wie erwähnt, stammt eine Vielzahl des heute bekannten Wissens über TAN, aus der Untersuchung von Lungenkarzinomen. Aus diesem Grund entschlossen wir uns zur Verwendung von derartigen Zellen. In unseren Experimenten verwendeten wir die Zelllinien A549, und LT22s, beides Zellen des Lungenadenokarzinoms. Die A549-Zelllinie wurde 1972 von D. J. Giard aus einem 58-jährigen, männlichen Patienten isoliert und wird seitdem für die Erforschung des Verhaltens von Lungentumoren sowie deren Pharmakotherapie verwendet. (Giard et al. 1973; Andrei et al. 2019) Bereits zuvor wurde die Fähigkeit von A549 zur Sphäroidbildung beschrieben, die über mehrere Wege erreicht werden kann, u.a. durch Zentrifugation. (Meenach et al. 2016) Bei LT22s handelt es sich um eine neuartige, primäre Zelllinie, an deren Entwicklung u.a. das Institut für Pathophysiologie und Immunologie der Medizinischen Universität Graz beteiligt war. Isoliert wurden die ursprünglichen Zellen aus einem 43-jährigen männlichen Patienten, der an einem Lungenadenokarzinom erkrankt war. Dieses wies eine schlechte Differenzierung, sowie eine seltene primäre Resistenz gegenüber einer Vielzahl an verschiedenen Therapien auf, weshalb der Patient bereits sechs Monate nach der Diagnose verstarb. In der Analyse konnten zwei unterschiedliche Zellpopulationen (LT22a, LT22s) gefunden werden, welche sich sowohl im Genotyp als auch im Phänotyp unterschieden. So sind LT22a-Zellen nur unter adhärennten Bedingungen zu Wachstum und Proliferation in der Lage und weisen ein spindelförmiges, mesenchymales Erscheinungsbild auf. LT22s-Zellen hingegen bilden spheroidale-glanduläre Strukturen aus und weisen einen typisch epithelialen Phänotyp auf. Anders als LT22a exprimierten LT22s vermehrt Oberflächenmarker von Krebsstammzellen (CSC) und wiesen ein aggressiveres Verhalten auf. Außerdem besitzen sie eine höhere Resistenz gegenüber Cisplatin. (Tiran et al. 2017) Interessant ist, dass diese Ergebnisse das derzeit etablierte Modell der CSC, sowie die Assoziation zwischen CSC und EMT in Frage stellen. (Hanahan and Weinberg 2011, Tiran et al. 2017). Aufgrund der Hinweise, dass TAN mindestens einen dieser beiden Prozesse, die EMT, beeinflussen könnten (siehe S 64), aber auch aufgrund der Neigung von LT22s zur Sphäroidbildung, entschlossen wir uns ebenfalls zur Verwendung dieser Zelllinie.

Die Kultur erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C mit 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ Gehalt inkubiert.

Die Kultivierung der A549-Zellen erfolgte unter adhärennten Bedingungen und unter Verwendung von RPMI 1640 Medium. Dessen Zusammensetzung bestand insgesamt

aus 50 ml (88%) aus 44 ml RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), zu dem 5 ml (10%) FBS (PAA), 0,5 ml (1%) Glutamax (Thermo Fisher) und 0,5 ml (1%) Penstrep (Sigma-Aldrich) hinzugefügt wurden. Die Kulturdauer vor experimentaler Verwendung betrug mindestens 7 Tage. Der Mediumwechsel erfolgte zwei mal wöchentlich. Alle 5 bis 7 Tage erfolgte ein Splitting der Zellen mit TrypLE (Gibco).

Die Kultivierung der LT22s-Zellen erfolgte, entsprechend dem Protokoll von Tiran et al. (2017), unter nicht-adhärenenten Bedingungen für mindestens 10 Tage. Es wurden 50 ml Medium verwendet. Dessen Zusammensetzung bestand aus 48,87 ml (97,74%) DMEM/F-12 Medium (Gibco), 1 ml (2%) B27 (Konzentration: 50x) (Gibco), 100 µl (0,2%) Kanamycin-Lösung (Konzentration: 100 µg/ml) (Sigma-Aldrich), 11 µl (0,022%) EGF (Konzentration: 20ng/ml) (Peprotech), 11 µl (0,022%) FGF (20ng/ml) (Peprotech) und 10 µl (0,02%) Heparin (Konzentration 4µg/ml) (Glivasan). Zweimal pro Woche erfolgt ein Mediumwechsel. Der Split der Zellen erfolgte nach Auftreten von bräunlichen Verfärbungen im Spheroidzentrum alle 5-7 Tage. Hierfür wurde TrypLE (Gibco) verwendet.

4.1. Kultur der neutrophilen Progenitorzellen:

Wie im theoretischen Teil meiner Arbeit beschrieben wurde, scheint durch den Einfluss des TME eine Differenzierung von unterschiedlichen neutrophilen Phänotypen ausgelöst zu werden, deren Eigenschaften sich, im Bezug auf die Beeinflussung der Krankheitsprogression, deutlich unterscheiden. Nicht zuletzt aufgrund der Beschreibung des APC-TAN lässt sich vermuten, dass das Reifestadium der neutrophilen Zelle selbst einer der zentralen Faktoren ist, anhand derer sich entscheidet, welcher TAN-Phänotyp entsteht.

So sind beispielsweise ausschließlich stabkernige neutrophile Granulozyten unter bestimmten Umständen in der Lage, den APC-TAN-Phänotyp zu bilden. (Singhal et al. 2016) Aus diesem Grund entschlossen wir zur Verwendung von Zellen der gesamten neutrophilen Differenzierungslinie, um unsere Methodik zu etablieren. Sollte uns dies gelingen, ließen sich in zukünftigen Experimenten spezifische neutrophile (Vorläufer-)Zellen in die Spheroiden inkorporieren, um den TME-Einfluss auf diese zu analysieren.

Zum Erhalt der neutrophilen Vorläuferzellen wurden CD34⁺ HSC verwendet, die aus Nabelschnurblut gewonnen wurden. Dieses wurde uns dankenswerterweise von der Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Medizinischen Universität Graz zur Verfügung gestellt. Da ein Teil der Stammzellen von uns in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, bestand in diesem Fall die Notwendigkeit, diese zunächst für einen Tag in einem speziel-

len Zytokin-haltigen Medium zu kultivieren. Dadurch sollten die vulnerablen Zellen den auf-taubedingten Stress überleben. Insgesamt wurde ein Volumen von ca. 3,067 ml verwendet. Die Grundlage hierfür bildeten 3 ml X-VIVO Medium (Lonza), zu welchen 30 µl (1%) Penstrep (Sigma-Aldrich), 30 µl (1%) Glutamax (Thermo Fischer) sowie 3 µl (0,1%) TPO (Peprotech), 3 µl (0,1%) SCF (Peprotech) und 1,5 µl (0,05%) FLT3L (Peprotech) hinzugefügt wurden.

Nach dieser eintägigen Erholungsphase konnte mit der Differenzierung der Zellen begonnen werden. Wurden die HSC sofort nach deren Isolation aus dem Nabelschnurblut verwendet, entfiel der oben genannte Schritt. Um die Bildung der neutrophilen Progenitorzellen zu induzieren, wurden die Zellen für 10 Tage in einem speziellen Differenzierungsmedium kultiviert. Hierfür wurde eine Gesamtmenge von 13 ml verwendet. Die Grundlage des Mediums bildeten 11,44 ml (88%) RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). Hinzugefügt wurden 1,3 ml (10%) FBS (PAA), 130 µl (1%) Glutamax (Thermo Fischer) und 130 µl (1%) Penstrep (Sigma-Aldrich). Um die Differenzierung zu induzieren wurden 13 µl G-CSF (Konzentration: 100ng/ml) (Peprotech) und 5,2 µl SCF (Konzentration: 20ng/ml) (Peprotech) hinzugefügt. Während der nachfolgenden 10 Tage erfolgte jeden 3. Tag ein Mediumwechsel und Zellsplit. Die entstandene, heterogene neutrophile Zellpopulation wird nachfolgend als *G.diff.* bezeichnet.

4.2. CFSE-Markierung der neutrophilen Vorläuferzellen:

Um die Lokalisation der neutrophilen Zellen innerhalb des Tumors nachweisen zu können, entschlossen wir uns dazu, diese mittels eines fluoreszierenden Farbstoffs zu markieren. Dies ermöglichte den Nachweis der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Verwendet wurde Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidyl-ester (CFSE), bei welchem es sich um ein zellpermeables Molekül handelt, das nach Überwinden der Zellmembran jedoch noch nicht fluoreszierend ist. Dies erfolgt erst durch dessen Metabolisierung durch intrazelluläre Enzyme, aus welcher die Fähigkeit zur grünen Fluoreszenz resultiert. Weiters ist das Molekül nach seiner Verstoffwechslung nicht mehr in der Lage, die Zellmembran zu überwinden. Im Anschluss daran bindet CFSE kovalent an zytoplasmatische Proteinstrukturen. (Parish 1999) Daher ist nicht von einer Weitergabe des Farbstoffes an benachbarte Zellen auszugehen. Zunächst wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute (RPM) zentrifugiert. Anschließend wurde die überstehende Flüssigkeit mittels Pipettierung entfernt und der zelluläre Rückstand (Pellet) in 100 µl Medium (siehe „Kultur der neutrophilen Progenitorzellen“) resuspendiert. Zur Aufbereitung des Farbstoffs wurden 3 µl der

CFSE-Stammlösung (5 mM) mit 197 µl Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt. Im Falle einer Zellzahl von $> 1 \times 10^7/100 \mu\text{l}$ wurden 11,5 µl der verdünnten Markerlösung hinzugefügt. Bei einer geringeren Zellzahl wurden 8 µl hinzugegeben. Zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Verteilung, wurde ein Vortexmischer verwendet. Aufgrund der Gefahr des Fluoreszenzverlusts erfolgte die Arbeit mit dem Farbstoff im verdunkelten Raum. Nach einer Inkubationzeit von 5 min. bei Raumtemperatur wurde erneut Medium hinzugefügt, und die Zellen mittels Zentrifugation gewaschen. Dieser Schritt erfolgte zweimalig. Abschließend wurde das Pellet in 2 ml des jeweils tumorspezifischen Mediums (siehe „Auswahl der Tumorzelllinien“) resuspendiert.

4.3. Generierung der Tumorspheroid:

Die Erzeugung von dreidimensionalen Tumorspheroïden ist ein häufig genutztes Verfahren, welches bei einer Vielzahl von biologischen sowie pharmakologischen Studien angewandt wird. Die Eigenschaft zur Spheroidbildung in vitro wurde für mehrere Tumorzelllinien beschrieben. (Ivascu and Kubbies 2006)

Zur Erzeugung der Spheroid wurde ein 96 well - ultra low attachment plate - System verwendet. Aufgrund früherer Erfahrungen unserer Gruppe bezüglich der Anwendung dieser Methodik wurde eine Gesamt-Zellzahl von mindestens 10.000 Zellen/Well zu Beginn der Kultur festgelegt. Ziel unserer ersten Experimente war es herauszufinden, ob die Erzeugung der geforderten Spheroid bzw. die Inkorporation neutrophiler Zellen darin möglich sei. Es wurde publiziert, dass neutrophile Zellen bis zu 25 % aller Zellen eines Tumors ausmachen können. (Eruslanov et al. 2014) Neben der geforderten Mindestanzahl an Zellen wurde dies ebenfalls berücksichtigt. In unseren ersten Experimenten wurden daher Spheroid mit einer Ratio von 1:4, bei einer Gesamtzellzahl von 10.000 Zellen, generiert. Hierfür wurden 7.500 A549-Zellen mit 2.500 G.diff. in 100 µl Medium über sieben Tage co-kultiviert. In dieser Zeit erfolgte kein Mediumwechsel.

Hierbei handelte es sich um die ersten drei Experimente (A1-A3) mit Spheroiden, die von uns durchgeführt wurden. Sie dienten einerseits zur Klärung, ob diese Methodik grundsätzlich durchführbar sei. Andererseits dienten sie dazu sich mit der Handhabung der einzelnen Arbeitsschritte vertraut zu machen.

Im Anschluss wurden weitere drei Experimente (LT1-LT3) durchgeführt, in welchen anstatt den „künstlichen“ A549 die primäre Tumorzelllinie LT22s verwendet wurde. Die ersten beiden Experimente hatten zum Ziel, etwaige Optimierungen am Protokoll durchzuführen, sowie mittels FACS erste Daten zu generieren. Als Kontrollen wurden hier zusätzlich reine

Tumorspheroide und eine Monokultur der G.diff. erzeugt. Beide Kontrollen wurden bereits in diesen Experimenten in die FACS-Analyse miteinbezogen. Im dritten Experiment erfolgte der komplette Durchlauf aller Teilschritte. Spheroide aus Co- sowie Monokultur wurden auf CAM transferiert, im Anschluss reseziert und disaggregiert. Danach erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Zellsuspensionen und der zeitgleich weiterkultivierten neutrophilen Zellen. Im Verlauf dieser Experimente wurden einige Spheroide zusätzlich bereits am dritten Tag geerntet und analysiert.

4.4. CAM-Modell:

Die Durchführung unserer ex ovo CAM-Assays erfolgte wie in der Publikation von Deryugina und Quigley im Jahr 2008 beschrieben. (Deryugina and Quigley 2008) Vor der Inkubation wurden die Eier zunächst mit einer Zahnbürste in lauwarmen Wasser gereinigt. Danach erfolgte die sorgfältige Desinfektion mittels 75%iger Ethanollösung. Anschließend wurden die Eier für drei Tage bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Während der Inkubation wurden außerdem maschinell sanfte Bewegungen erzeugt.

Vor Entfernung der Schale erfolgte zunächst eine erneute Desinfektion. Anschließend wurden die Eier, unter Zuhilfenahme eines elektronischen Sägeblatts, geöffnet. Der Inhalt wurde sofort in eine sterilisierte Petrischale aus Plastik transferiert und abgedeckt, um eine etwaige Kontamination zu verhindern. Danach erfolgte die weitere Kultivierung für 7 Tage.

4.5. Xenotransplantation der Tumorspheroide auf CAM:

Die in den Experimenten A2, A3 und LT3 generierten Tumorspheroide, wurden anschließend auf die CAM transferiert. Dies geschah an Tag 10 der Ei-, respektive Tag 3 der Spheroidekultivierung. Hierfür wurden zunächst autoklavierte Silikonringe unter sterilen Bedingungen auf der Membran installiert. Innerhalb dieser wurden 10 µl Matrigel© appliziert und die Eier anschließend für 30 min. inkubiert, damit sich dieses verfestigen konnte. Bei Matrigel© handelt es sich um eine gallertartige Proteinmischung der Firma Corning Life Sciences. Produziert wird diese von kultivierten Sarkomzellen der EHS-Maus. Die Besonderheit dieser Mischung ist, dass sie strukturell stark dem komplexen Aufbau der extrazellulären Matrix ähnelt. Nach dem Auftragen bilden sich komplexe, dreidimensionale Bindegewebsnetzwerke, mit welchen u.a. Tumorzellen interagieren können. Dadurch ist es möglich Vorgän-

ge zu beobachten, welche auf dieser Interaktion beruhen (z.B. Invasion und Metastasierung). (Hughes et al. 2010)

Unter Einsatz eines Stereomikroskops und einer Glaspipette mit Mundstück wurden die Tumorspheroide von der 96-Well-Kulturplatte in die Mitte der Silikonringe überführt. Pro Ring wurden jeweils 4 (A2-A3) bzw. 6 Spheroide (LT1-LT3) aufgetragen. Insgesamt erhielten wir so 10 Embryos von denen jeweils 5 einer Art von Spheroide (Cokultur/Monokultur) entsprachen. Anschließend wurden die Eier für weitere 3 Tage kultiviert.

Im Zuge der Experimente A2 und A3 entschlossen wir uns, zusätzlich auch Zellsuspensionen auf die CAM aufzutragen (in Folge als S2 und S3 bezeichnet). Dadurch sollte das grundsätzliche Verhalten der Zellen auf der CAM beobachtet werden, um gegebenenfalls den Vorgang der Xenotransplantation zu optimieren. Wie oben beschrieben wurden die Eier auch in diesem Fall mit Silikonring und Matrigel© vorbereitet. In den Ring wurden anschließend je 100 µl Zellsuspensionen der Co-kultur aufgetragen. Im Gegensatz zur Erzeugung der Tumorspheroide, wurden jedoch in diesem Fall höhere Gesamtkonzentrationen verwendet. (Gesamt 1×10^6 Zellen/100 µl). Das relative Verhältnis zwischen Tumor- und Immunzellen wurde jedoch beibehalten ($7,5 \times 10^5$ A549/ $2,5 \times 10^5$ G.diff.) Grund hierfür war die zu diesem Zeitpunkt bestehende Vermutung, dass die, aus A2 entstehenden Tumoren zu klein sein könnten, weshalb eventuell mehr Spheroide pro Ei benötigt würden. Die Cokultursuspension wurde auf zwei Eier aufgetragen. Auch bei diesen Versuchen erfolgte zuvor eine Fluoreszenzmarkierung der G.diff. Als Kontrolle dienten 2 weitere Eier, auf welchen eine A549-Monokultursuspension aufgetragen wurde. Danach wurden die Eier ebenfalls für weitere 3 Tage kultiviert.

4.6. Tumorresektion:

An Tag 3 erfolgte die Resektion der Tumoren von der CAM. Unter Zuhilfenahme des Stereomikroskops Olympus SZX16, wurde der Verlauf zuvor dokumentiert. Danach wurden die Silikonringe mittels sterilisierter Pinzette und Schere vorsichtig aus der CAM herausgeschnitten und in PBS eingelegt. Dann erfolgte erneut eine Fotodokumentation mit dem Olympus SZX16.

4.7. Disaggregation der Tumorspheroide:

Um eine FACS-Analyse unserer Proben zu ermöglichen war es notwendig, aus dem entstandene Tumorgewebe erneut eine Zellsuspension zu generieren. Als Grundlage diente uns hierfür das Protokoll, welches bei der Beschreibung des APC-TAN zu diesem Zweck genutzt wurde. (Quatromoni et al. 2015) Die daran von uns vorgenommene Optimierung diente dazu, den Vorgang möglichst schonend zu gestalten, sodass die verwendeten Enzyme möglichst nicht mit den CD-Oberflächenmolekülen interagieren, und diese dadurch zerstören können. Hierzu wurden die Spheroide der Experimente A1, LT1 und LT2, sowie die von der CAM resezierten Tumoren der Experimente A2, A3, S2, S3 und LT3 in separate Röhrchen mit Disaggregations-Mix transferiert. Dieser bestand aus 5 ml RPMI 1640 zu welchem zuvor 10 µl Desoxyribonuklease (Worthington; Konzentration: 20.000 U/ml), 25 µl Kollagenase I (Worthington; Konzentration: 10.000 U/ml), 25 µl Kollagenase II (Worthington; Konzentration: 10.000 U/ml), 25 µl Kollagenase IV (Worthington; Konzentration: 10.000 U/ml) und 5 µl Elastase (Worthington; Konzentration: 75 U/ml) hinzugefügt wurden. Nach 15 min. wurden die Proben anschließend für 5 min. bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand mittels Pipette entfernt und das Zellpellet erneut in 1 ml Disaggregationsmix resuspendiert. Danach wurde die so entstandene Lösung in 1,5 ml Röhrchen überführt und bei 37 °C im Thermoblock inkubiert, welcher Schüttelbewegungen mit 450 rpm ausführte. Dieser Schritt dauerte 7 min. Um verbleibende Zellaggregationen zu vermeiden, wurde anschließend mehrmals auf- und abpipettiert, und die Suspension erneut für 5 min. bei 1200 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde das Zellpellet in reinem Medium resuspendiert, und es erfolgte das zweimalige Waschen der Zellen mit Medium und Zentrifugation. Danach wurden die Suspensionen in FACS-Röhrchen überführt. Ebenfalls wurden, aus einer Monokultur generierte, Tumorspheroide dieser Disaggregation unterzogen, um dadurch eine Kontrolle zu erhalten.

4.8. FACS-Analyse:

Sämtliche FACS Untersuchungen wurden mit dem LSR Fortessa in unserem Institut durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode ist der Nachweis von exprimierten, zellcharakteristischen Oberflächenmolekülen, wodurch Aussagen über deren Ontogenese sowie Phänotyp getroffen werden können. Hierzu werden Antikörper verwendet, welche in der Lage sind, an spezifischen Oberflächenmolekülen zu binden. Da diese Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert sind, kann mittels LASER-Bestrahlung ein Signal erzeugt

werden. Diese Bestrahlung erfolgt, während die Zellsuspension im Gerät einen Mikrokanal durchfließt. Dessen geringer Durchmesser stellt sicher, dass nur einzelne Zellen nacheinander den Kanal passieren können. Dadurch wird während der Messung jede Zelle einzeln bestrahlt, wodurch ein Datensatz generiert wird. Dieser beinhaltet neben den fluoreszierenden Signalen das auch Streulicht. Unterschieden wird Vorwärtsstreulicht (*FSC*) und Seitwärtsstreulicht (*SSC*) unterschieden. Da Licht beim Durchtritt durch eine Zelle gebeugt wird, kann über den *FCS* eine Aussage über das Zellvolumen getätigt werden. Je stärker die Beugung, desto größerer muss das Volumen sein. Die Seitwärtsstreuung wiederum wird durch eine Brechung des hindurchtretenden Lichts erzeugt. Hierfür verantwortlich sind insbesondere die Oberflächenstruktur und intrazelluläre Vesikeldichte. Je dichter eine Zelle bzw. je „rauer“ deren Oberfläche ist, desto mehr wird das durch sie hindurchtretende Licht gebrochen und seitwärts gestreut. Da es sich bei den von uns untersuchten neutrophilen Granulozyten um kleine Zellen mit hoher Granularität handelt, kommt es bei Bestrahlung zu wenig Lichtbeugung und viel Lichtbrechung. Bei der Analyse von Suspensionen, die mehrere Zelltypen beinhalten, lassen sich durch *FSC* und *SSC* gezielt Zellpopulationen eingrenzen. Will man z.B. ausschließlich die Oberflächenmarker neutrophiler Zellen analysieren, wird durch diese Vorauswahl sichergestellt, dass nur Singale aus dieser Population in den weiteren, spezifischen Messungen berücksichtigt werden. Da es sich hier um eine quantitative Analyse handelt, kann dadurch in unserem konkreten Fall vermieden werden, dass die große Anzahl an nicht-fluoreszierenden Tumorzellen das Ergebnis verfälscht.

Für die Messungen wurde von uns ein spezifisches Profil aus fünf verschiedenen CD-Oberflächenmarkern zusammen gestellt. Dieses beinhaltete *CD11b* (Biolegend; Farbstoff: PE-Cy7), *CD14* (BD Pharmingen; Farbstoff: APC), *CD15* (BD Bioscience; Farbstoff: BU-V395), *CD45* (BD Bioscience; Farbstoff: PE), *CD66b* (BD Bioscience; Farbstoff: BV421). Zum näheren Verständnis unserer Auswahl, möchte ich kurz auf die einzelnen Oberflächenproteine eingehen:

CD11b: Hierbei handelt es sich um eine, auch als Integrin α_M (ITGAM) bezeichnete, Untereinheit des Integrin $\alpha_M\beta_2$ - Moleküls. In Verbindung mit der Integrin β_2 -Untereinheit, wird dadurch das Protein Mac-1 bzw. der Komplementrezeptor 3 (CR3) gebildet. (Larson and Springer 1990; Solovjov et al. 2005) Exprimiert wird es von einer Vielzahl an myeloischen Zellen, darunter Granulozyten, Monozyten/Makrophagen sowie NK-Zellen. (Solovjov et al. 2005) Es ist an der Vermittlung einer Vielzahl verschiedener Funktionen dieser Zellen beteiligt. Besonders hervorzuheben ist zum einen seine Fähigkeit, das Adhäsionsmolekül

ICAM-1 zu binden. (Diamond et al. 1990) Dadurch ist es u.a. an der Chemotaxis, der Zellmigration und an der Vermittlung von direkten Zell-Zell-Interaktionen z.B. beim Vorgang der zellmedierten Zytotoxizität (cell-mediated-cytotoxicity) beteiligt. (Solovjov et al. 2005) Außerdem ist es am Prozess der Phagozytose beteiligt. Über Mac-1 wird es den Zellen ermöglicht, das Molekül C3b zu binden. Dieses wiederum ist als Teil des Komplementsystems dazu in der Lage, körperfremde Pathogene zu opsonieren, wodurch diese für die Phagozytose „markiert“ werden. (Arnaout et al. 1983)

CD14: Das, auch als Monozyten/Makrophagen-Differenzierungsantigen bezeichneten Protein, dient in besagten Zellen als Co-Rezeptor von TLR-4 v.a. der Erkennung von charakteristischen Molekülstrukturen verschiedener Pathogene (PAMP). (Kitchens 2000) Neben seinen Hauptliganden, den LPS, ist es u.a. auch in der Lage verschiedene Lipoteichonsäuren (LTA) zu binden. Dadurch wird es Monozyten und Makrophagen ermöglicht, eine Vielzahl an bakteriellen sowie mykotischen Erregern zu erkennen. (Ranoa et al. 2013) Zwar konnte eine Expression von CD14 auch auf neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden, diese sei allerdings um das 10-fache geringer als bei Monozyten/Makrophagen. (Kitchens 2000)

CD15: Hierbei handelt es sich um eine Kohlenhydratkette, welche auf Oberfläche vieler verschiedenen Zellen existiert. Bei den Zellen des Immunsystems findet sich dieses, auch als Sialyl-Lewis-X (sLeX) bezeichnete, Molekül insbesondere auf Granulozyten und Makrophagen. Die Funktion von CD15 ist die Bindung von E-Selektin, welches auf der Oberfläche von Endothelzellen zu finden ist, wodurch es den initialen Schritt des Extravasationsprozesses, dem „Leukozyten-Rolling“, vermittelt. (Kerr and Stocks 1992)

CD45: Alternativ auch als Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor-Typ-C (PTPRC) bezeichnet, handelt es sich bei CD45 um ein Oberflächenglykoprotein, welches ausschließlich von hämatopoetischen Zellen gebildet wird. Neben verschiedenen Granulozyten findet es sich auch auf Monozyten/Makrophagen, Histozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen, sowie auf Lymphozyten und Plasmazellen. (Holmes 2006)

CD66b: Hierbei handelt es sich um ein Mitglied der Familie der carcinoembryonischen Antigene (CEA). Auch als antigen-related cell adhesion molecule 8 (CEACAM8) bezeichnet, findet sich CD66b ausschließlich auf Granulozyten, und dient daher als Marker für diese

Zellen. Funktionell scheint es ebenfalls an der Zellmigration und Zellaktivierung beteiligt zu sein. (Yoon et al. 2007)

Wie aus der näheren Beschreibung ersichtlich wird, bestand unser Oberflächenmarkerprofil ausschließlich aus solchen, die exklusiv auf Zellen des Immunsystems zu finden sind. Der für Immunozyten exklusive Anti-CD45 diente zur weiteren Differenzierung der Zellpopulation, welche zuvor durch die FSC- und SSC-Daten grob eingegrenzt wurde. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass etwaige, darin enthaltene Zellen nicht-immunologischer Herkunft, zuverlässig herausgefiltert werden. Die weiteren verwendeten Marker sollten eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Phänotypen der Zellen des Immunsystems ermöglichen. So lassen sich durch die gewählten Marker Strukturen nachweisen, welche entweder exklusiv auf Monozyten/Makrophagen (CD14), auf Granulozyten (CD66b) oder auf beiden Zelltypen (CD15) vorzufinden sind. Dies war für uns aufgrund der zuvor erwähnten Publikationen von Interesse, in welchen nicht nur die vollständige Transdifferenzierung neutrophiler Granulozyten in Makrophagen *in vitro*, sondern auch die Hybridisierung neutrophiler Zellen in APC-TAN im Rahmen einer malignen Erkrankung *in vivo* beschrieben wurde. (Koeffel et al. 2014; Singhal et al. 2016)

Zwar war das Ziel unsere Experimente in erster Linie die Etablierung einer neuen Methodik, jedoch war für uns bereits zu diesem Zeitpunkt von Interesse, ob es im Rahmen dieser zu Veränderungen in der Oberflächenmarkerexpression kommt. Die CFSE-Markierung der G.diff. ermöglichte, zusätzlich zum Nachweis von TAN, außerdem Aussagen über die Proliferationsrate der Zellen.

Im Anschluss an die Disaggregation wurde zunächst 2 ml PBS-Puffer in die FACS-Röhrchen hinzugefügt, und diese für 5 min. bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstands wurden die Proben in 40 µl „brilliant stain“-Puffer resuspendiert, und 10 µl FACS-Block hinzugefügt. Dieser diente dazu, die unspezifische Bindung von Antikörpern zu hemmen, die falsch positive Ergebnisse zur Folge hätte. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 10 min., woraufhin 6 µl Antikörper „master-mix“, unter Zuhilfenahme eines Vortexmischers, hinzugefügt wurden. Der „master-mix“ bestand aus einer Kombination aller verwendeten Antikörpern. Dessen Gesamtvolumen betrug 36 µl, welches aus jeweils 6 µl CD11b, CD15, CD45 und CD66b sowie 12 µl CD14 bestand. Nachfolgend wurden sämtliche Proben für 25 min. bei 4 °C inkubiert, um die Bindung der Antikörper zu ermöglichen. Der nachfolgenden Schritt diente zur Entfernung von überschüssigem Farbstoff. Hierzu wurden 2 ml PBS Puffer hinzugefügt, und die Proben für 5 min. bei 1200 rpm

zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 200 µl Calcium-Magnesium-freiem Puffer resuspendiert, und erneut auf Eis gelagert. Im Anschluss erfolgte die FACS-Analyse der Proben mit dem LSR-Fortessa.

3 Tage nach der Durchführung erfolgte zusätzlich eine separate Analyse der CFSE gefärbten G.diff Monokultur. Dadurch sollte ein etwaiger Einfluss des Farbstoffes auf die Expression der Oberflächenmarker nachgewiesen werden. Die entsprechenden Zellen befanden sich im oben beschriebenen Differenzierungsmedium. Abb.1 zeigt einen Überblick des Experimentalsetups. Dieser beinhaltet ein Schema der beiden Teilschritte (Zellkultivierung mit Zellmarkierung und Spheroidbildung, CAM-Assay). Zusätzlich zeigt diese fotografische Daten der Verlaufsbeobachtung.

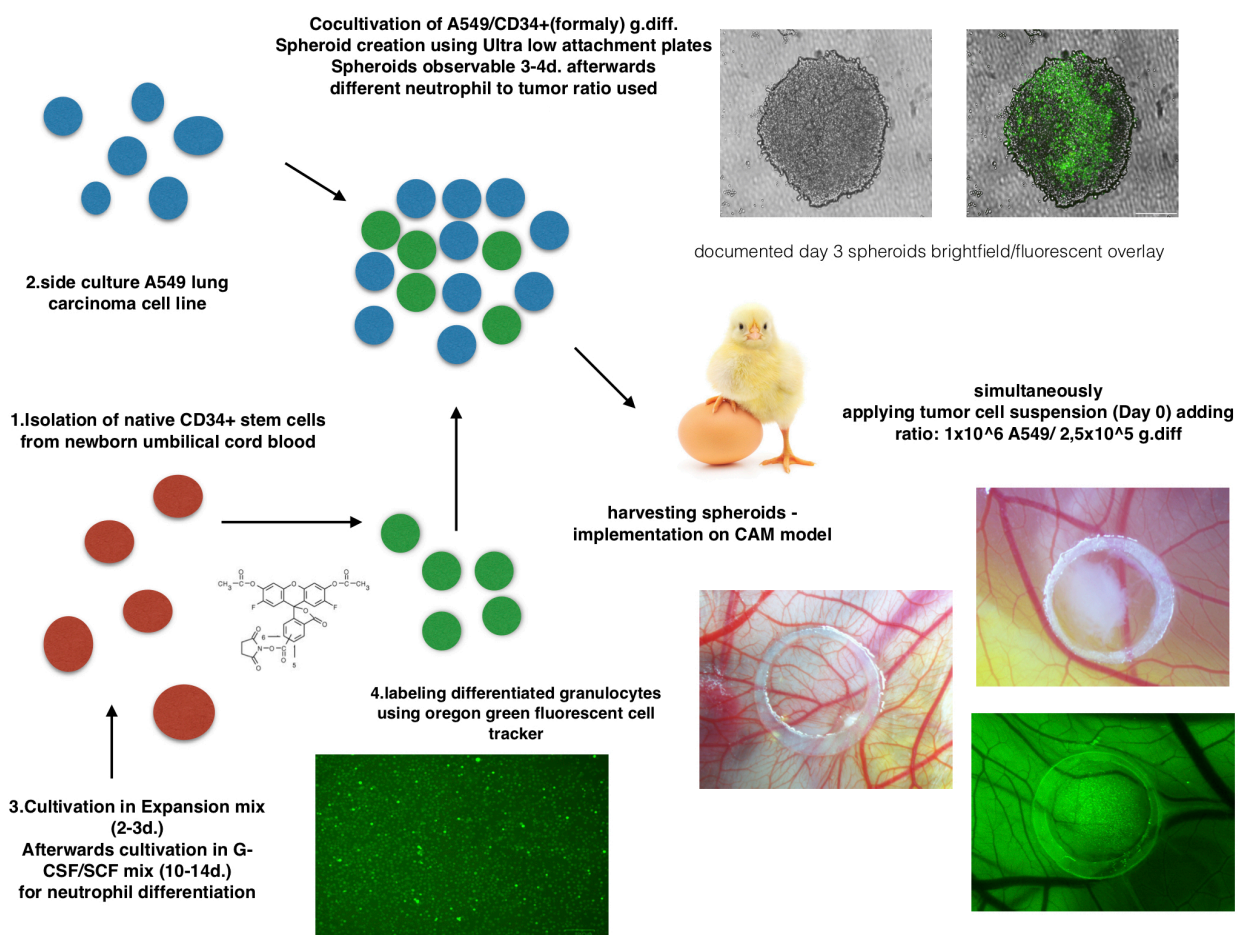


Abb. 1: schematische Darstellung aller Schritte des Experimental-Designs exklusive der Disaggregation und Analyse mittels FACS. Die Fotodokumentation erfolgte mittels der Verwendung des Bio-Rad ZOE.

5. Ergebnisse:

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Experimentalteils meiner Diplomarbeit vorgestellt. Insgesamt wurden 8 unabhängigen Experimenten durchgeführt (A1-3, S2-3 und LT1-3). Im Zuge der in vitro Experimente A1, LT1 und LT2 erfolgte die Bildung von Tumorspheroïden aus einer Co-Kultur, welche NSCLC-Tumorzelllinien sowie neutrophile Progenitorzellen beinhaltete. Hierfür wurde zunächst die Tumorzelllinie A549 (Exp. A1-A3), anschließend die primäre Lungentumorzelllinie LT22s (Exp. LT1-LT3) verwendet. Den Abschluss dieser Experimente stellte die Disaggregation und FACS-Analyse dar.

In den anschließenden in vivo Experimenten A2, A3 und LT3 wurden die Spheroïde zusätzlich auf der Chorion-Allantoismembran von Hühnerembryos kultiviert. Außerdem erfolgte diese Kultivierung auch im Zuge der Experimente S2 und S3. Hierbei wurde eine Zellsuspension aus der Co-Kultur von A549 und neutrophilen Progenitorzellen direkt auf CAM kultiviert.

An den Experimenten waren zusätzlich weitere Mitgliederinnen/Mitglieder der Forschungsgruppen von Prof. Herbert Strobl sowie Priv.-Doz.ⁱⁿ Nassim Ghaffari Tabrizi-Wiszy beteiligt. Für ihre Bachelorarbeit im Studiengang Biomedizinische Analytik an der FH Joanneum verwendete meine Kollegin Pia Flaschka B.Sc. ebenfalls einen Teil unserer Ergebnisse. Deren Erwähnung wird nachfolgend mit Flaschka 2020 zitiert.

5.1. Neutrophile Progenitorzellen formen 3D-Spheroïde mit A549-Tumorzellen:

Ziel der Experimente A1 und A2 war es nachzuweisen, ob aus der Co-Kultivierung von A549- und G.diff. tatsächlich die gewünschten Spheroïde entstehen würden. Dazu wurden die Immunzellen zunächst mit CFSE gefärbt. Dies geschah an Tag 10 ihrer Kultur im Differenzierungsmedium und unmittelbar vor der Überführung auf die ultra-low-attachment-plates. Zum Nachweis der erfolgreichen Färbung, erfolgte zuvor eine Kontrolle und Fotodokumentation mittels BIO-Rad ZOE. Abb 2. und Abb. 3 zeigen jeweils einen Ausschnitt der gefärbten Monokultur einerseits hellfeld-, andererseits fluoreszenzmikroskopisch.

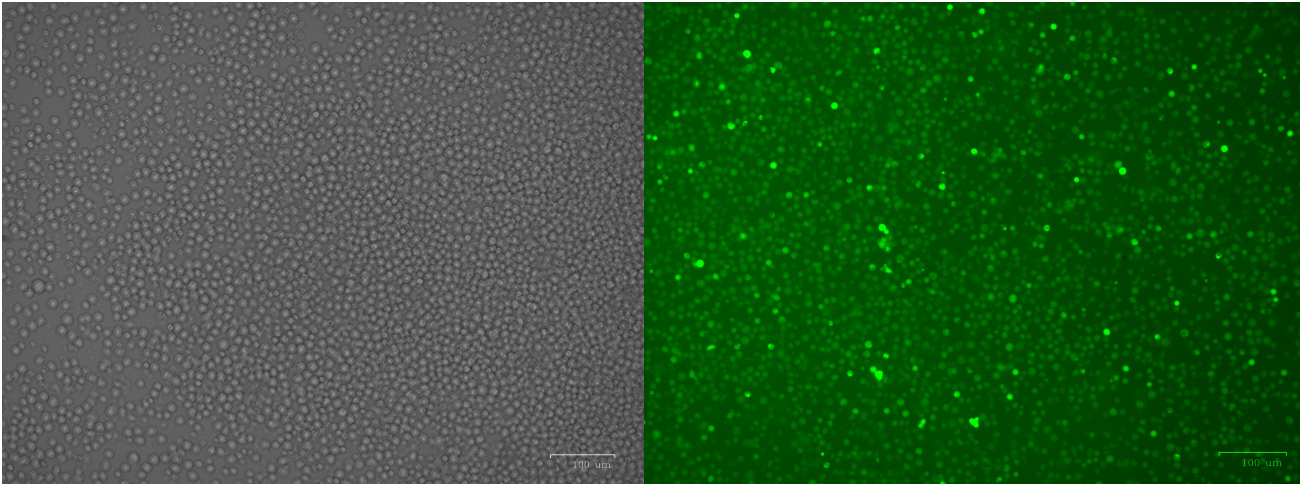


Abb. 2: Hellfeldmikroskopischer Überblick der neutrophilen Monokultur nach Färbung

Abb. 3: Fluoreszenzmikroskopischer Überblick der neutrophilen Monokultur nach Färbung

Wie diesen zu entnehmen ist fand sich eine ausreichende Anzahl an gesunden, differenzierten G.diff. vor. Ausgedrückt wird dies u.a. durch die vorzufindende charakteristische Morphologie des Zellkerns. Vereinzelt finden sich hier bereits segmentkernige Granulozyten, jedoch überwiegen wie erwartet deren unmittelbare Vorstufen (v.a. Metamyelozyten und stabkernige Granulozyten). Die erfolgreiche Färbung konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

Nach der 7 tägigen Kultur erfolgte die mikroskopische Analyse der entstandenen Spheroide. Erneut wurden sowohl hellfeld- als auch fluoresszenzmikroskopische Bilder erstellt, welche anschließend digital übereinander gelegt wurden, um eine Auswertung zu ermöglichen. Abb. 4 - Abb. 7 zeigen diese Aufnahmen der Spheroide #5 - #8.

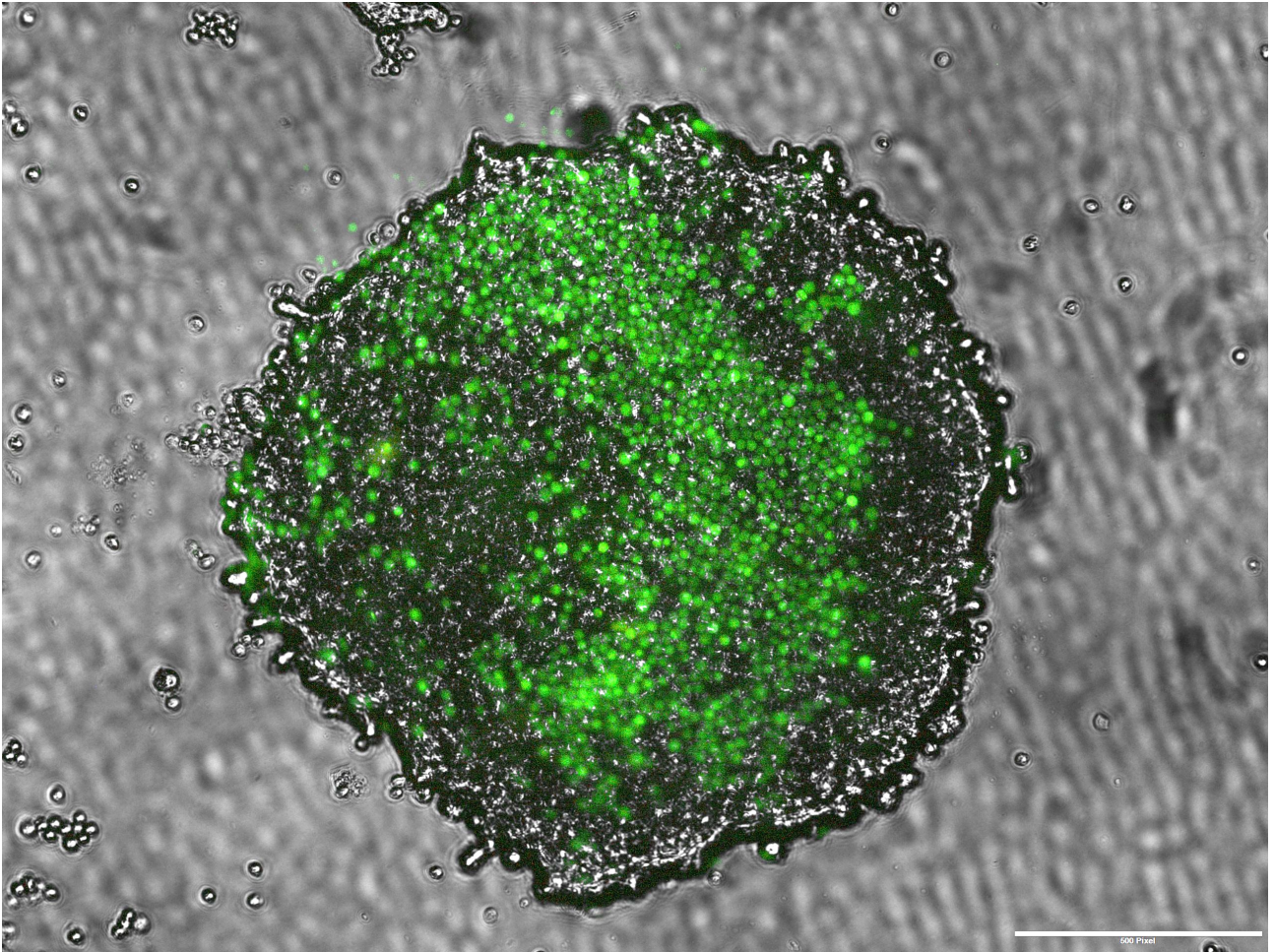


Abb. 4: Overlay-Aufnahme des A459/TAN-Spheroids #5

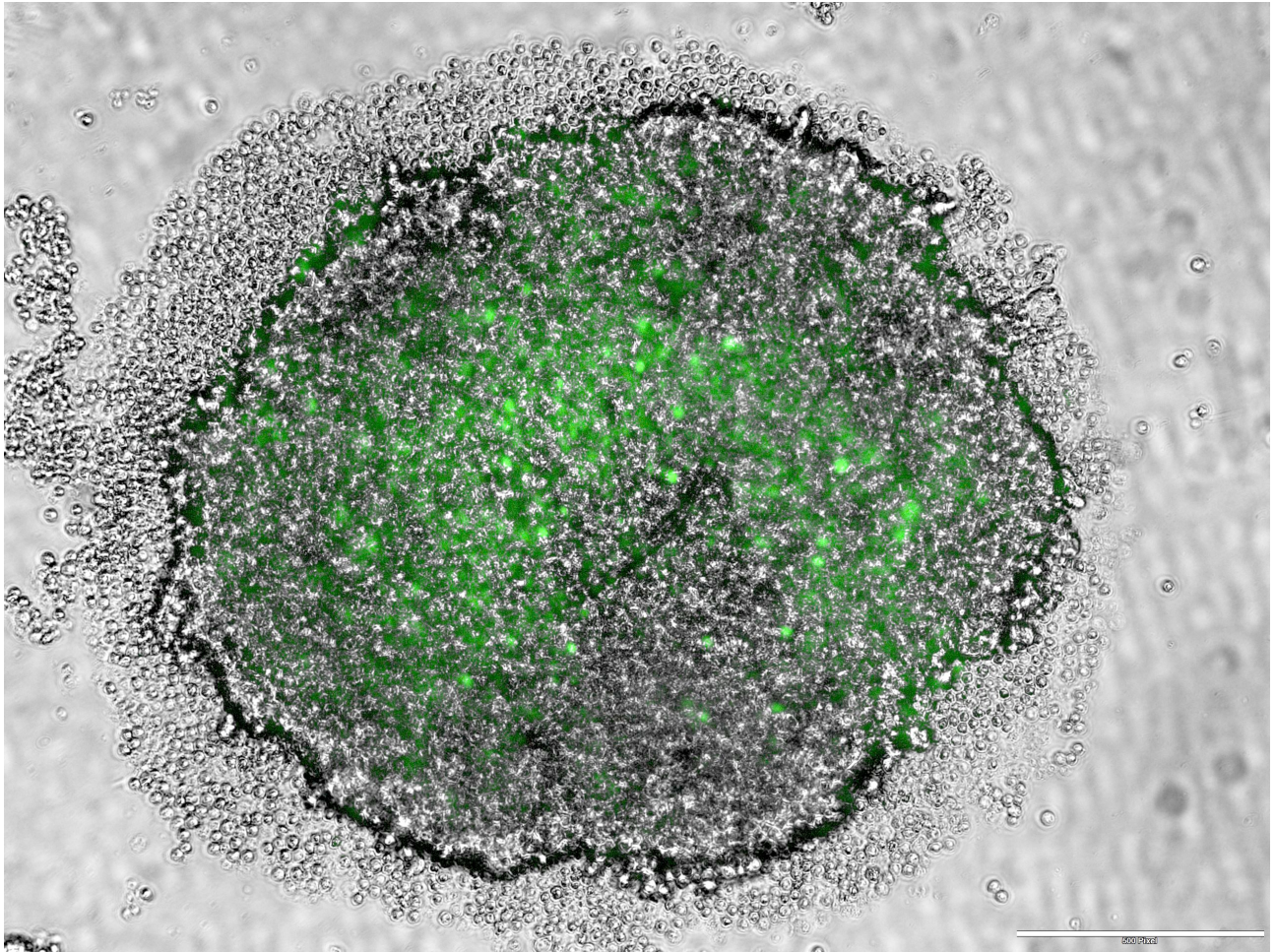


Abb. 5: Overlay-Aufnahme des A459/TAN-Spheroids #6

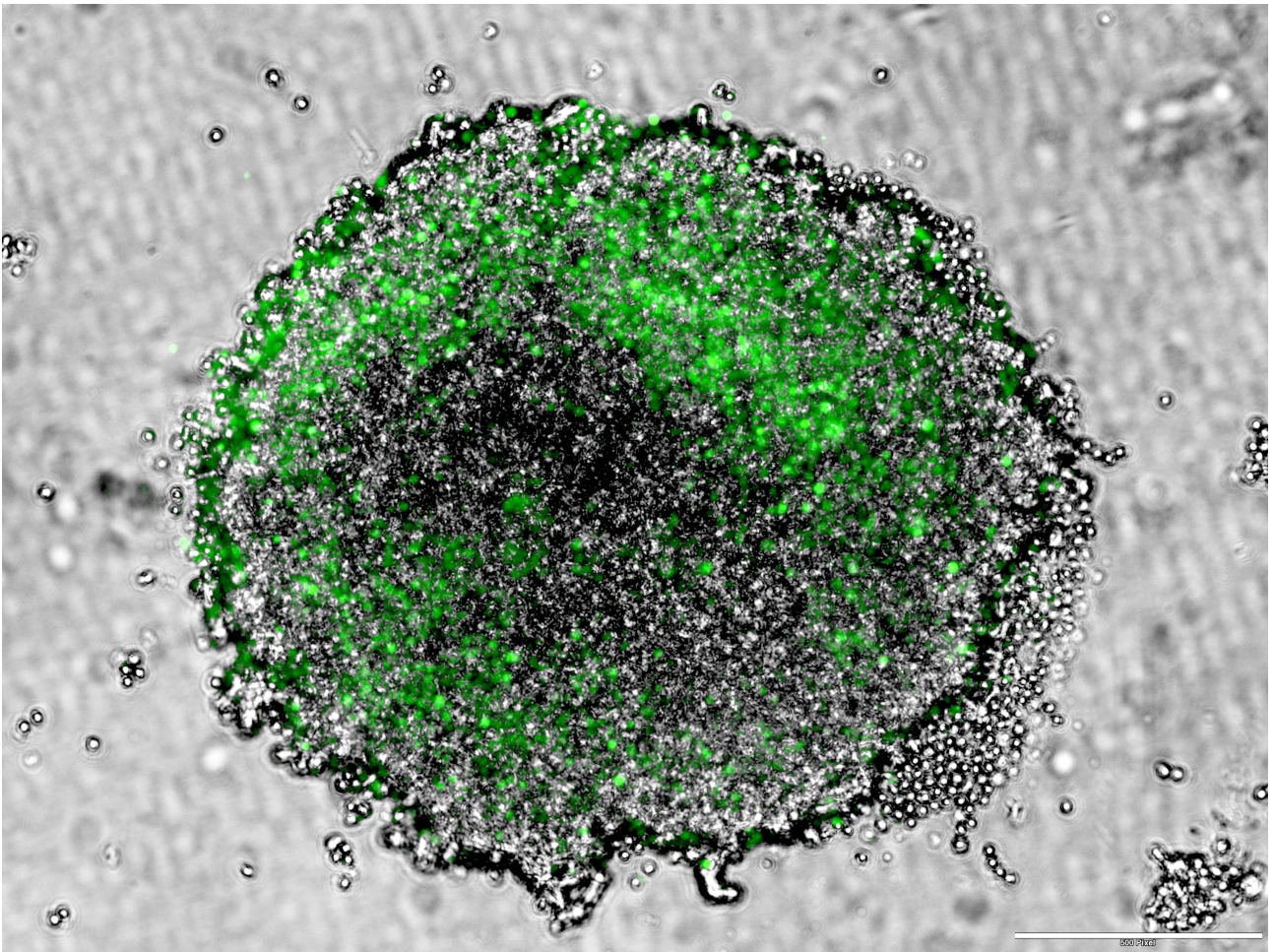


Abb. 6: Overlay-Aufnahme des A459/TAN-Spheroids #7

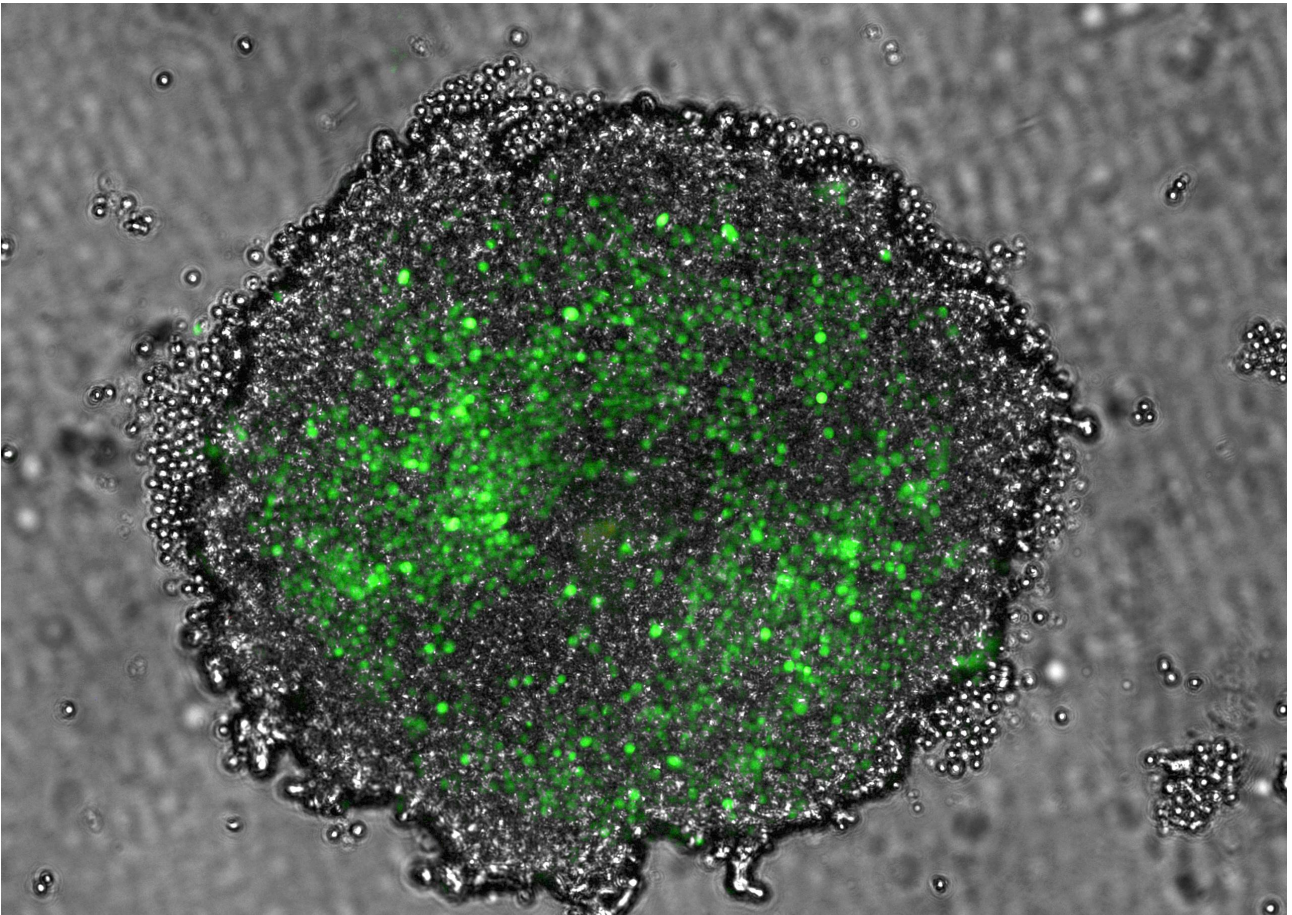


Abb. 7: Overlay-Aufnahme des A459/TAN-Spheroids #8

In allen Spheroiden zeigte sich ein charakteristisches Verteilungsmuster der G.diff. Diese waren überwiegend im Zentrum auffindbar. Dies ist insofern interessant, als das TAN nach aktuellem Wissensstand schrittweise in Tumoren rekrutiert werden, sich in frühen Entwicklungsstadien einer Malignität v.a. an der Grenzen zwischen TME und gesundem Gewebe befinden, und erst im weiteren Verlauf tiefer in den Tumor eindringen. Wie bereits beschrieben, scheint die randständige Lokalisation auch mit antitumorösen Effekten assoziiert zu sein (siehe S.76). In fortgeschritteneren Tumorstadien befinden sich TAN eher zentral im TME, und dies ist wiederum mit einer deutlichen Abnahme ihrer Tumorzytotoxizität assoziiert. (Mishalian et al. 2013) Ähnliches wurde auch in der Beschreibung der APC-TAN beobachtet: So mutmaßten die Autorinnen/Autoren der Publikation, dass sich verschiedene Faktoren (u.a. Hypoxie) negativ auf die Bildung dieses antitumorösen TAN-Phänotypen auswirken. (Singhal et al. 2016) Da Hypoxie-assoziierte Faktoren wie VEGF einen rekrutierenden Effekt auf myeloische Zellen, insbesondere jene der neutrophilen Linie besitzen, der gleichzeitig auch ihrer antitumorösen Effekte zu hemmen scheint, könnte die zentrale

Lokalisation ein Ausdruck des Wandels von N1 zu N2-Phänotyp sein. (Kaplan et al. 2005; Hiratsuka et al. 2006; Zijlstra et al. 2006; Sionov et al. 2014) Weiters lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Sollte dieser hemmende Effekt durch die Hypoxie selbst vermittelt werden, lässt sich vermuten, dass zunächst randständige, antitumoröse TAN über Faktoren wie VEGF in die hypoxischen Areale, welche typischerweise im zentralen TME vorzufinden sind, rekrutiert werden, und dort in einen protumorösen Phänotyp polarisiert werden. Selbstverständlich gilt dies auch für die konstant neu einströmenden naiven Neutrophilen, die durch die konstante Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen im TME rekrutiert werden.

Die zentrale Lokalisation der G.diff lässt vermuten, dass diese im Verlauf der Spheroidbildung bereits durch die Tumorzellen beeinflusst werden. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass Zellen etablierter Tumorzelllinien bereits zum Immunoescape fähig sind, deren Verhalten also dem fortgeschrittener Tumoren entspricht. (Eruslanov 2017) Dadurch wären A549 in der Lage Zellen des Immunsystems zu rekrutieren, und für ihre Zwecke zu manipulieren. (siehe S. 89) Und Fall von TAN äußert sich dies u.a. durch deren zentrale Lokalisation.

5.2. Spheroide sowie Suspension von A549/Neutrophilen-Cokultur bilden Tumoren auf CAM:

Um die Interaktion in vivo zu beobachten, wurden die A2- und A3-Spheroide in einem CAM-Modell kultiviert. Da das Ziel dieser Experimente bestand v.a. darin, etwaige Problemstellungen zu identifizieren, und ggf. Optimierungen vorzunehmen. Daher erfolgte die Kultivierung auf mehreren Arten. Zusätzlich zu A2-A3, wurde in S2-S3 die Spheroidbildung übersprungen, um das grundsätzliche Tumorstadium bzw. die Verteilung der G.diff. zu beobachten. Hierbei wurde die verwendete Gesamtzellzahl entsprechend erhöht. Die CFSE-Markierung der G.diff. erlaubte es auch in diesem Fall, deren Lokalisation im entstehenden Gewebe zu beobachten. Nach 3 tägiger Kultivierung entwickelten sich in S2-S3 rundlich/ovale, i.d.R. zentral organisierte, ausgedehnte Tumormassen. Aufgrund multipler Ausläufer war die makroskopische Abgrenzung zum umliegenden Gewebe überwiegend unscharf. Abb. 8. zeigt exemplarisch das Resultat dieser Kultur aus dem Experiment S3.

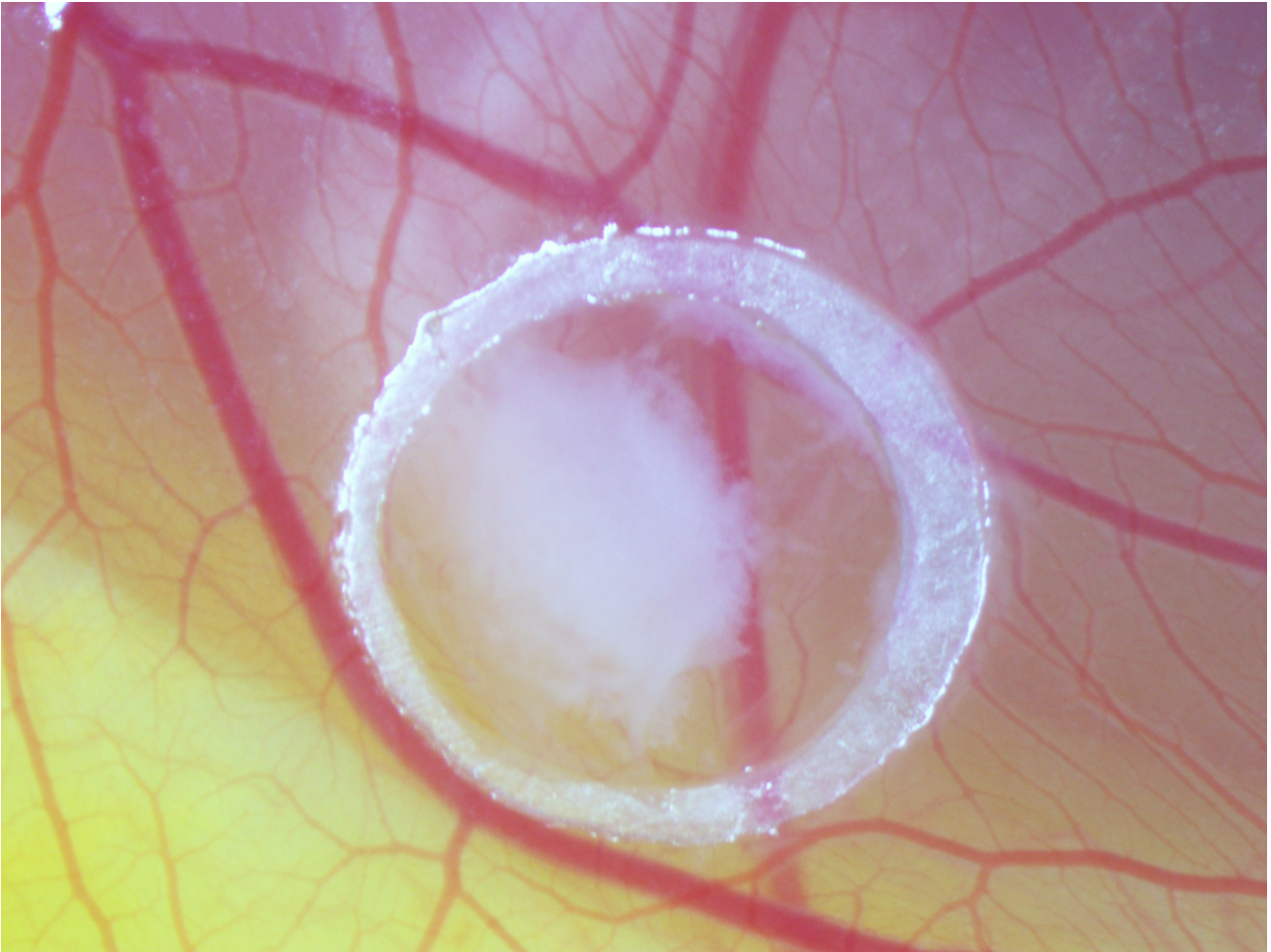


Abb. 8: Tumorformation auf Ei #7 an d3. Ergebnis von A549/Neutr.Prog. Cokultur nach Suspensionsapplikation auf CAM

Abb. 9 zeigt die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie des Gewebes. Diese Daten zeigen, dass die Applikation einer Cokultur aus A549 und G.diff. zur Bildung von ausgedehnten Tumorkläsionen führt. Erkennbar ist, dass sich die Verteilung der G.diff. mit der, in Spheroïden Beobachteten, ähnelt. Auch in diesem Fall finden sich die Zellen vorwiegend im Zentrum des TME wieder. Im Gegensatz zu den Spheroïden zeigte sich in diesen Experimenten ebenfalls eine, zwar in Relation geringe, jedoch dennoch vorhandene randständige Lokalisation.

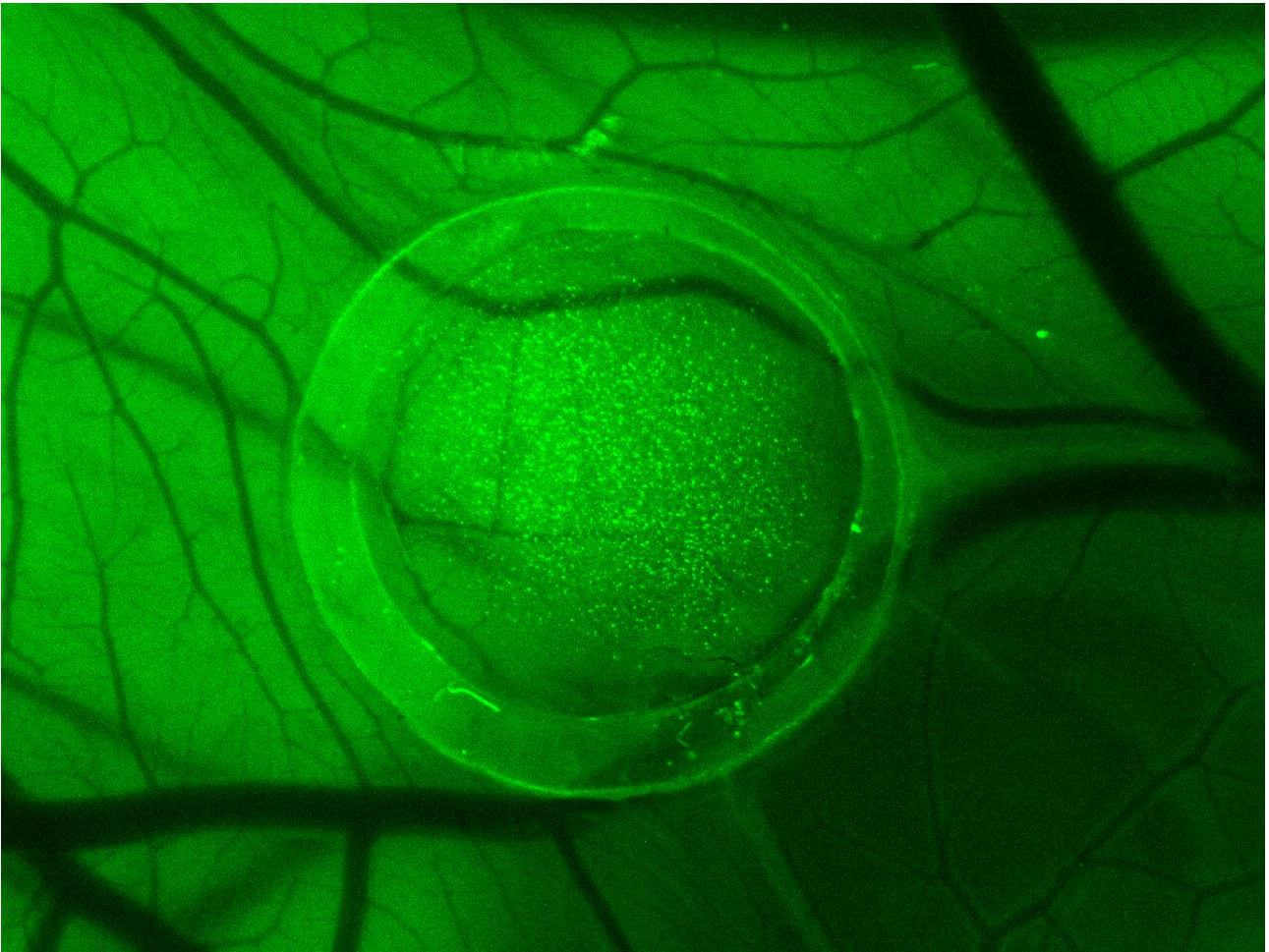


Abb. 9: Lokalisation der CFSE-markierten Neutrophilen im Tumorgewebe von Ei #7 d3.

Dies erhärtete den Verdacht, dass die Lokalisation der Immunzellen in A1-A2, tatsächlich aufgrund einer Rekrutierung zustande kommt, da sich die Inkorporation der G.diff. in diesen ebenfalls durch die Methodik zur Erzeugung erklären lassen würde. Die erneute zentrale Häufung der G.diff. in Suspensions-generierten Tumoren auf CAM deutet - da in diesem Fall keine Zentrifugation angewendet wurde, welche ebenfalls die Verteilung in den Spheroïden erklären könnte - auf die Existenz eines entsprechenden Stimulus hin, der für die Rekrutierung der G.diff. sorgt. Dadurch ist ebenfalls erklärbar, warum in den Spheroïden keine, in den Suspensions-generierten Tumoren jedoch durchaus eine randständige Lokalisation der Neutrophilen erkennbar ist. Das diese in Relation deutlich geringer als im Zentrum ist, kann ebenfalls eine Rekrutierung durch den Tumor andeuten.

Im Gegensatz zur aufgetragenen Suspension, bildeten Spheroïde auf CAM zwar deutlich abgrenzbare, jedoch kleinere Tumoren. Aus diesem Grund wurden die Anzahl der Spheroï-

iden/Ei in den nachfolgenden Experimenten sukzessive erhöht. In A2-A3 wurden je 4 Spheroide pro Ei verwendet. Insgesamt wurden pro Experimentdurchlauf 10 Eier verwendet. Der Transfer der Spheroide erfolgte mittels einer modifizierten Pasteur-Pipette, dieser Vorgang wird in Abb. 10 veranschaulicht.



Abb. 10: Überführung der Tumorspheroide auf ein kultiviertes CAM-Modell. Über das mit der Pipette in Verbindung stehende Mundstück können die Proben sanft angesaugt werden. Der feine Durchmesser der Pipette erlaubt dann eine gezielte Platzierung im Silikonring.

Abb. 11 zeigt das resultierende Tumorgewebe von Ei #2 am 3. Tag der Kultur. Im Gegensatz zu den Experimenten S2 und S3 kam es hier zur Formation deutlich kleinerer Tumoren. Diese präsentierten sich makroskopisch jedoch bereits auch deutlich dichter. Des weiteren kann hier deutlich der angiogene Effekt des Tumors beobachtet werden. So findet sich zirkulär um das Gewebe ein dichtes Netz aus kleinen Gefäßen.

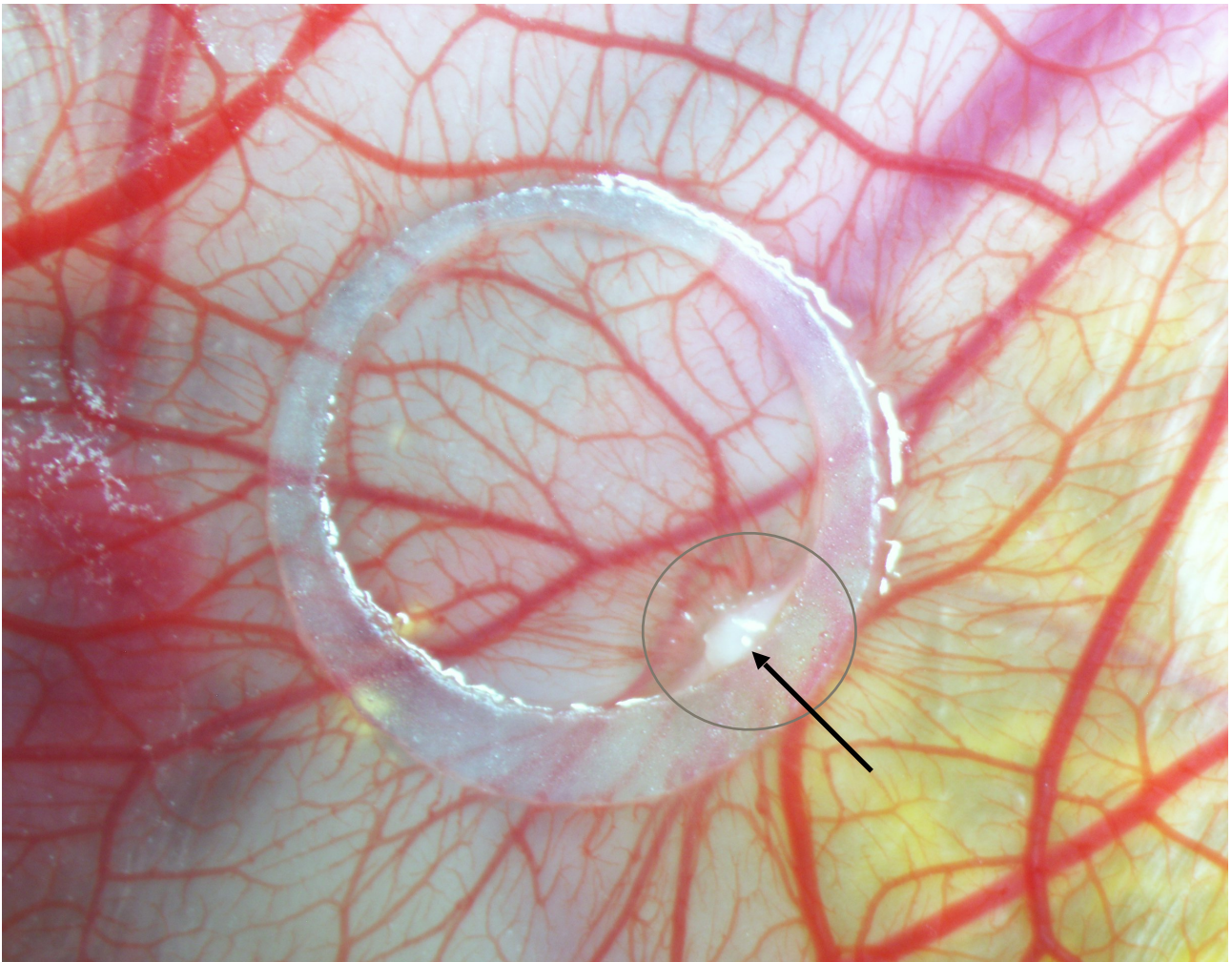


Abb. 11: Tumorgewebe auf Ei #2 an d3 der CAM-Kultivierung. Es wurden 4 Spheroide à 10.000 Zellen (7500 A549/ 2500 Neut. Prog) transferiert. Die resultierende Tumormasse wird durch den Pfeil verdeutlicht. Der Kreis zeigt das umliegende Einwachsen kleiner Gefäße in den Tumor.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Co-Kultivierung von A549 und neutrophilen Vorläuferzellen zur Tumorformation auf CAM führt. Die Fluoreszenzmikroskopie deutet weiters auf eine ähnliche Verteilung der Immunzellen in auf CAM de novo generierten Tumoren hin. Auch die erfolgreiche Kultivierung von Tumorspheroide im CAM-Modell konnte gezeigt werden. Besonders auffällig war der Größenunterschied. Um eine bessere Auswertbarkeit zu ermöglichen entschlossen wir uns in den Folgeexperimenten mit der LT22s-Zelllinie dazu die Anzahl an Spheroide pro Ei zu erhöhen.

5.3. Erstellung des CD-Markerpanels:

Um Veränderungen der G.diff. zu beobachten, war es zunächst notwendig, eine Oberflächenmarkerprofil zu erstellen, und diese damit zu phänotypisieren. Zunächst wurde hierfür, neben den bereits erwähnten Markern CD11b, CD14, CD45, auch der Marker CD35 ausgetestet. Dabei handelt es sich um den CR1, welcher, ähnlich wie CR3, eine Rolle bei der Phagozytose von C3b-markierten Pathogenen spielt. (Ahearn and Fearon 1989) Aufgrund der gefundenen Ergebnisse erfolgte die Ergänzung des Markerspektrums mit CD15 und CD66b. Als Basis unserer Untersuchung dient die, aus HSC differenzierte, Monokultur der G.diff. Abb. 12 a - h zeigt die FACS-Daten der Negativkontrolle.

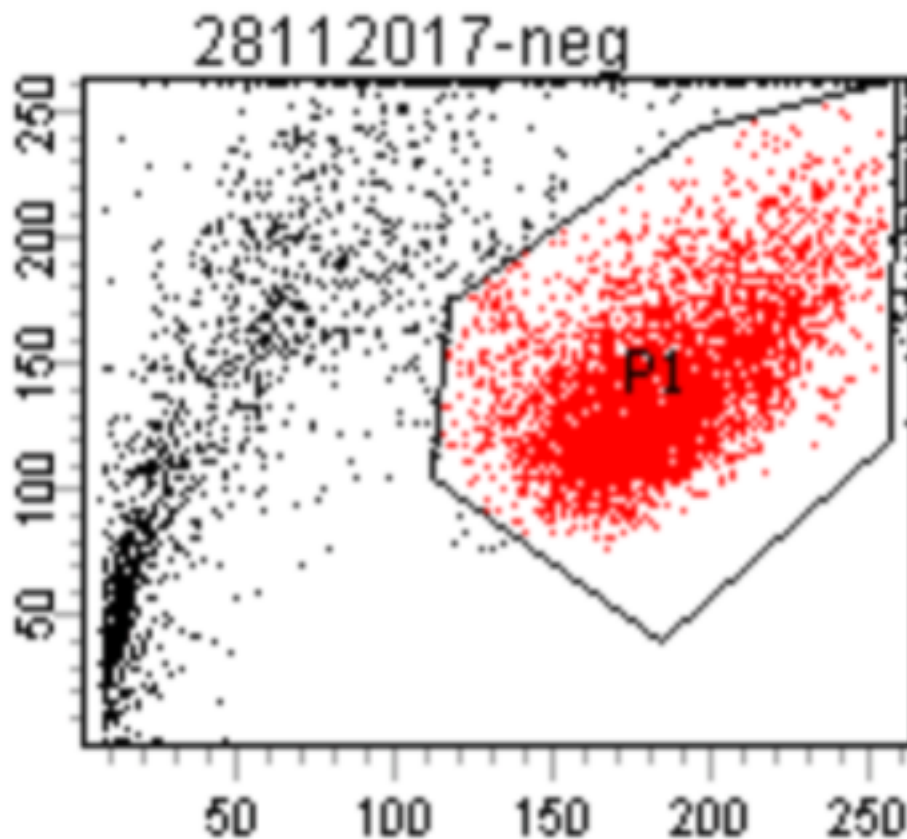


Abb. 12a: Eingrenzung der Zellpopulation mittels FSC und SSC

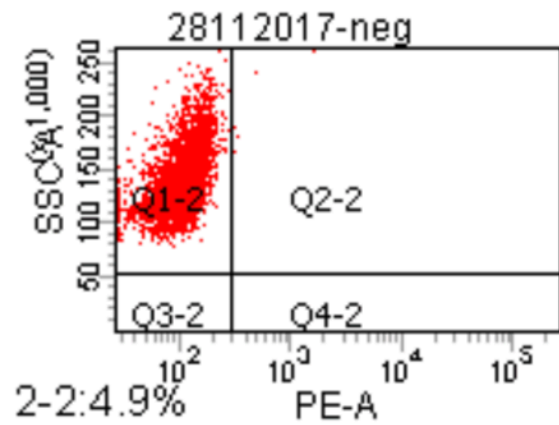
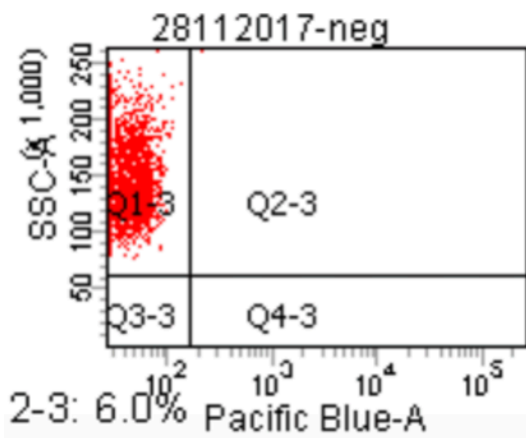
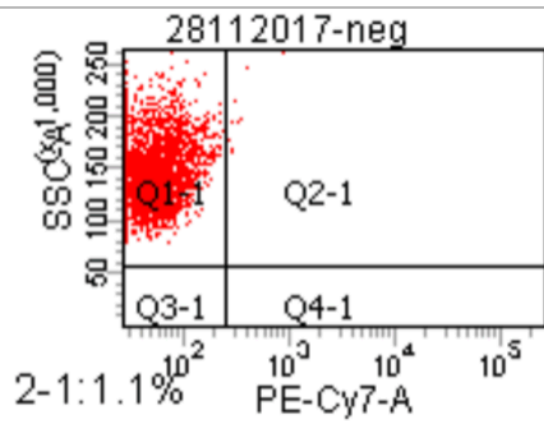
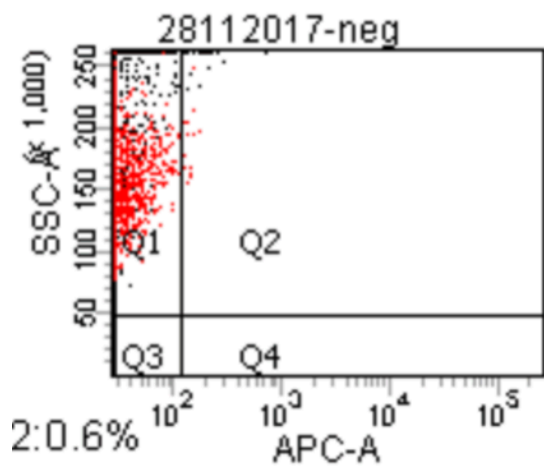


Abb. 12b-e: Ergebnisse der Messung der einzelnen Antikörperfarbstoffe gegen die SSC-Messung aufgetragen. Im linken unteren Eck finden sich der prozentuelle Anteil der Population in den relevanten Quadranten (Q2, Q2-1, Q2-2, Q2-3).

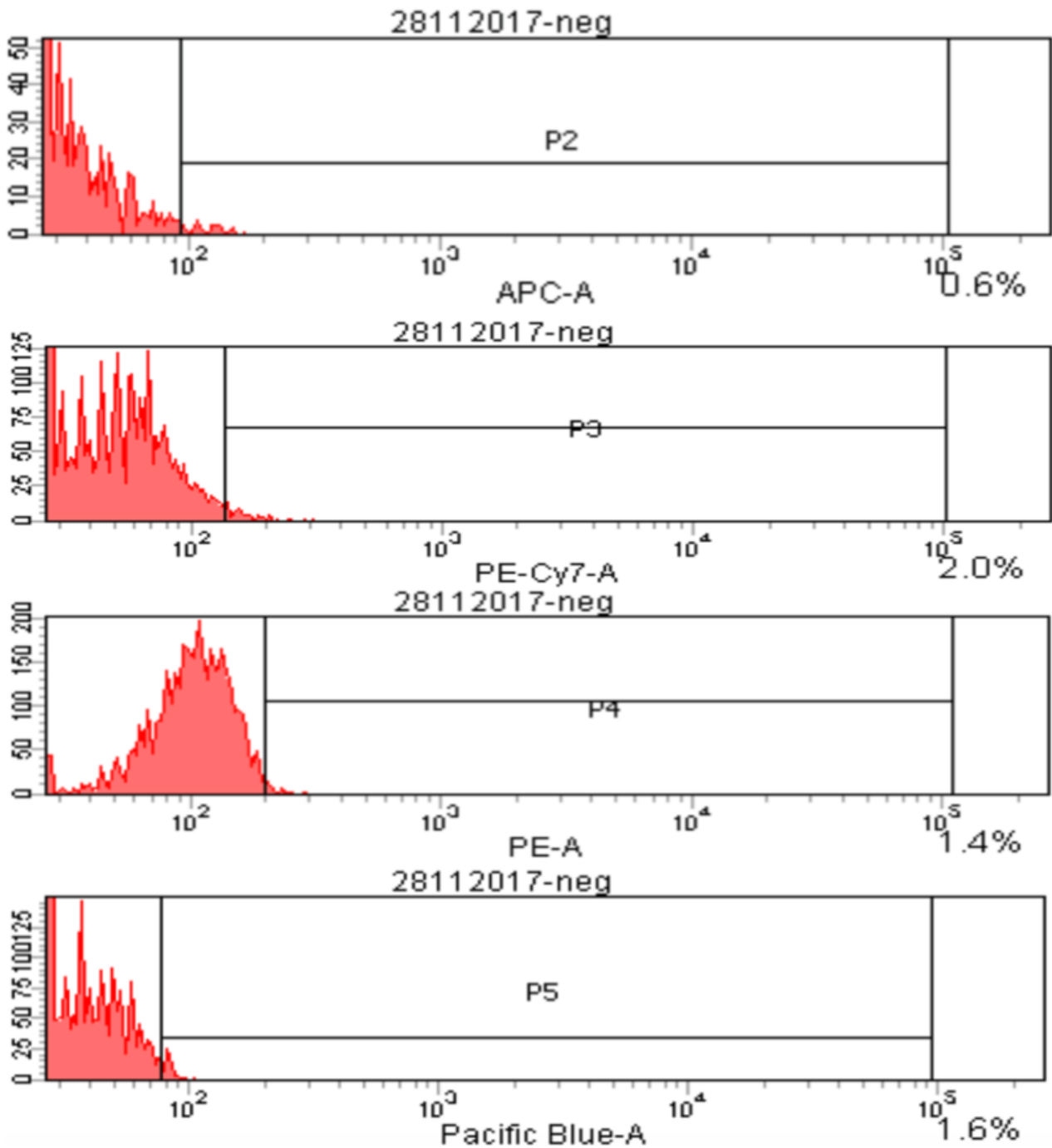


Abb. 12f-h: Graphische Darstellung der gemessenen Fluoreszenz gegen die absolute Zellzahl aufgetragen. Im rechten, unteren Eck wird der prozentuale Anteil der Population innerhalb der Gate-Grenzen angegeben.

Erwartungsgemäß wiesen die Kontrollprobe keine Fluoreszenz auf. Der geringe prozentuale Anteil der Population, welcher sich innerhalb des Gates befindet, ist das Resultat der vernachlässigbaren Messungsgenauigkeit.

Die Abb. 13a - f zeigen die Messergebnisse der markierten G.diff. Um etwaige Signalinterferenzen auszuschließen, wurden die Zellen auf mehrere Proben aufgeteilt. Es wurden unterschiedliche Kombinationen der Antikörper getestet. Ausnahmen stellen die Proben aus Abb. 13a und Abb. 13f dar. Erstere wurde alleinig mit CD45, die der Letzten mit sämtlichen Antikörpern markiert.

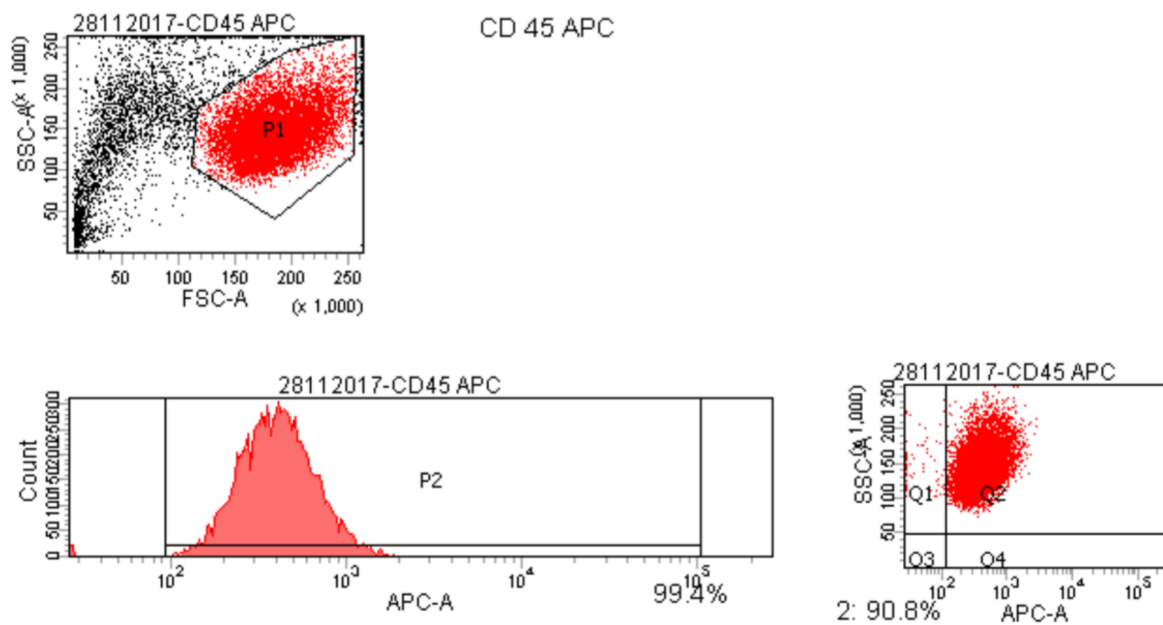


Abb. 13a: Ergebnisse von Populationsgating, APC/Zellzahl- und APC/SSC-Messung. Hierbei handelt es sich um die einzige Probe, welche nur mit einem Antikörper (CD45) markiert wurde. Unterhalb der Diagramme ist der prozentuale Anteil der Gesamtpopulation im relevanten Gate angegeben. 90,8 - 99,4% der Zellen sind CD45⁺.

CD45 APC + CD 14 PE

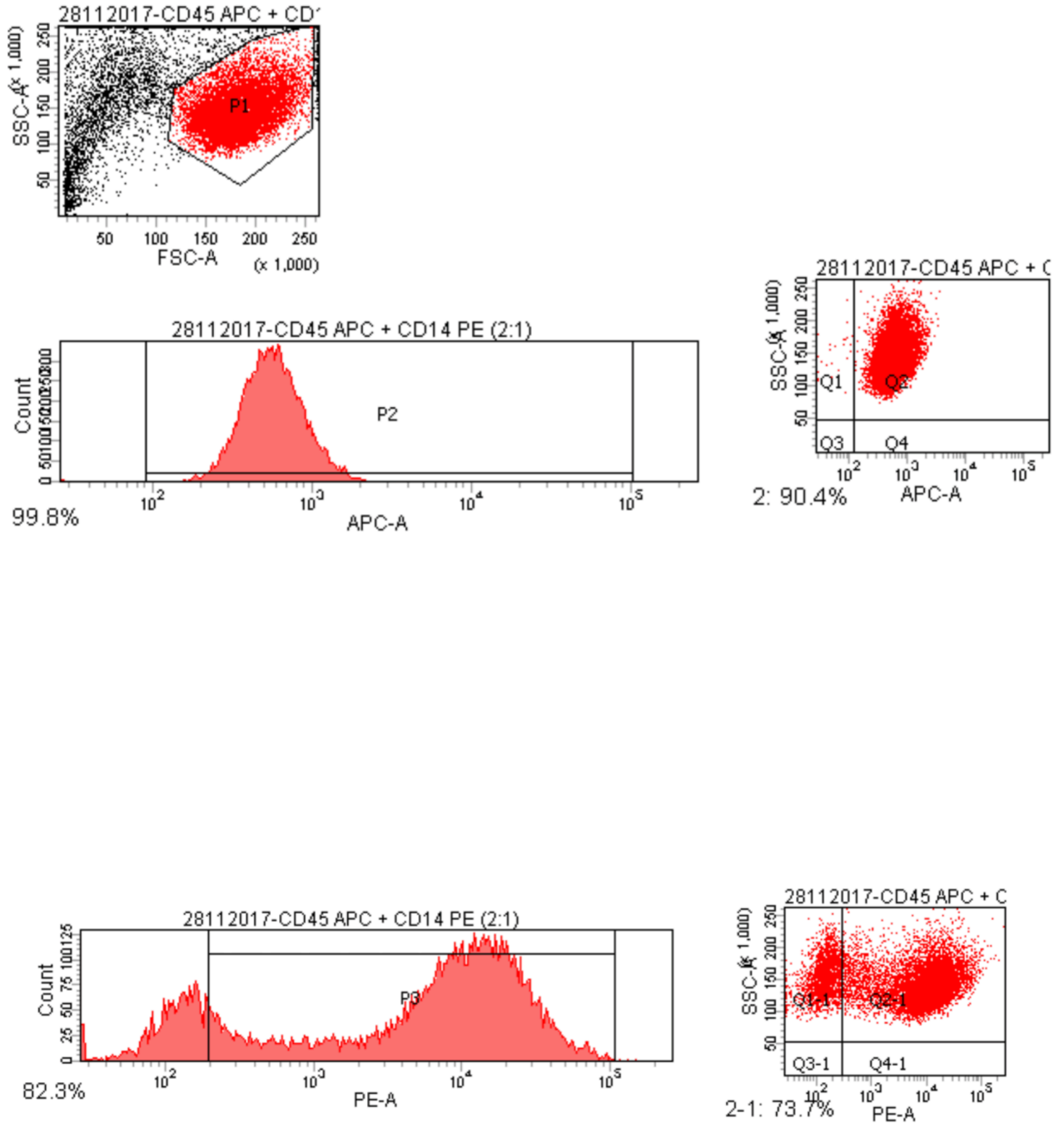


Abb. 13b: Ergebnisse von Populationsgating, APC/Zellzahl-, APC/SSC-, PE/Zellzahl- und PE/SSC-Messung. Diese Probe wurde mit Anti-CD45 und Anti-CD14 markiert. Unterhalb der Diagramme ist der prozentuale Anteil der Gesamtpopulation im relevanten Gate angegeben. 90,4 - 99,8% der Zellen sind CD45⁺. 73,7 - 82,3% Zellen sind CD14⁺.

CD45 APC + CD11b PeCy7

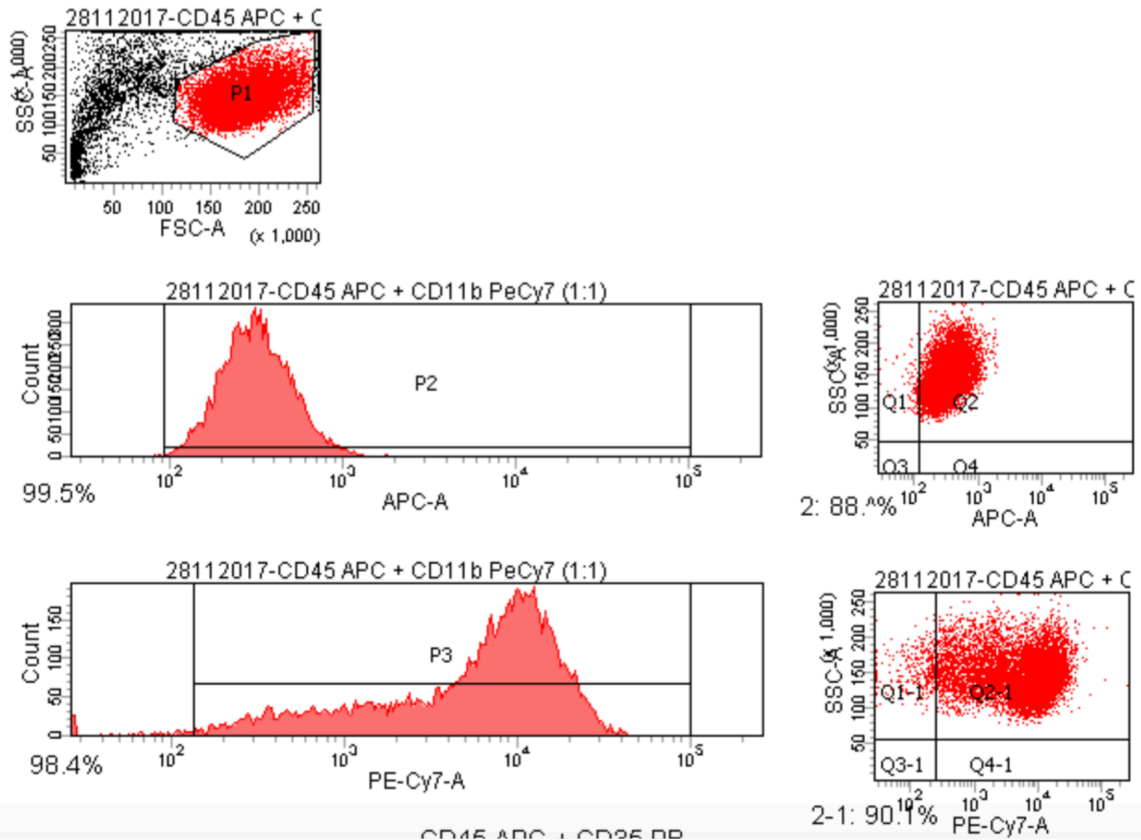


Abb. 13c: Ergebnisse von Populationsgating, APC/Zellzahl-, APC/SSC-, PE-Cy7/Zellzahl- und PE-Cy7/SSC-Messung. Diese Probe wurde mit Anti-CD45 und Anti-CD11b markiert. Unterhalb der Diagramme ist der prozentuale Anteil der Gesamtpopulation im relevanten Gate angegeben. 88,0 - 99,5% der Zellen sind CD45⁺. 90,1 - 98,4% der Zellen sind CD11b⁺.

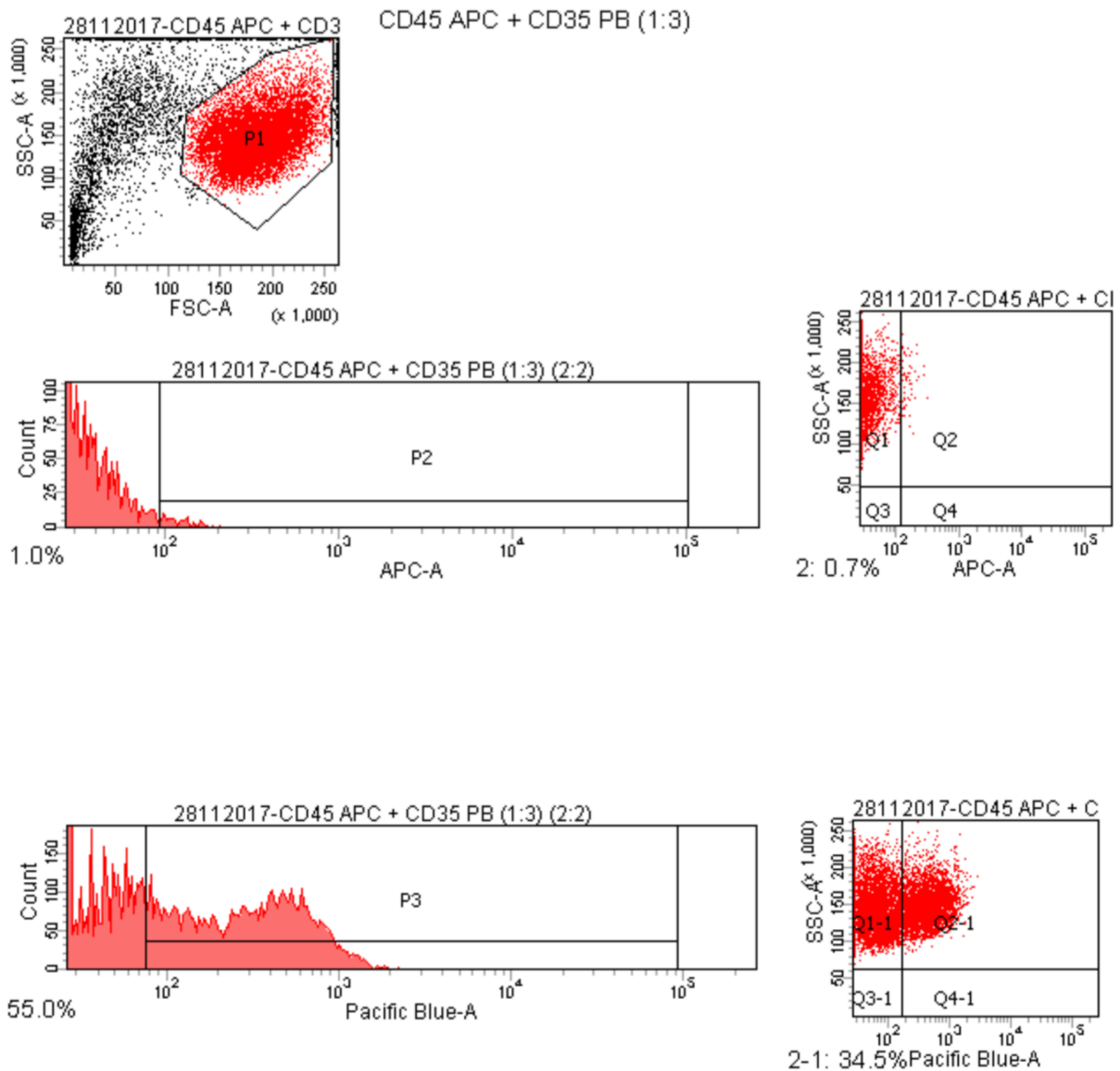


Abb. 13d: Ergebnisse von Populationsgating, APC/Zellzahl-, APC/SSC-, PB/Zellzahl- und PB/SSC-Messung. Diese Probe wurde mit Anti-CD45 und Anti-CD35 (1:3 verdünnt) markiert. Unterhalb der Diagramme ist der prozentuale Anteil der Gesamtpopulation im relevanten Gate angegeben. Die Ergebnisse der CD45-Messung deuten auf eine fehlgeschlagene Färbung hin (max. 1% der Population im Gate). Die Anzahl der CD35⁺ Zellen beträgt zwischen 34,5 - 55,0%. Jedoch deutet die Messung hier eine ungleichmäßige Verteilung des Farbstoffs an. Daher findet sich nicht der gewünschten Messpeak. Aus diesem Grund wurde eine weitere Probe mit CD45 und unverdünntem Anti-CD35 analysiert (siehe Abb. 13e)

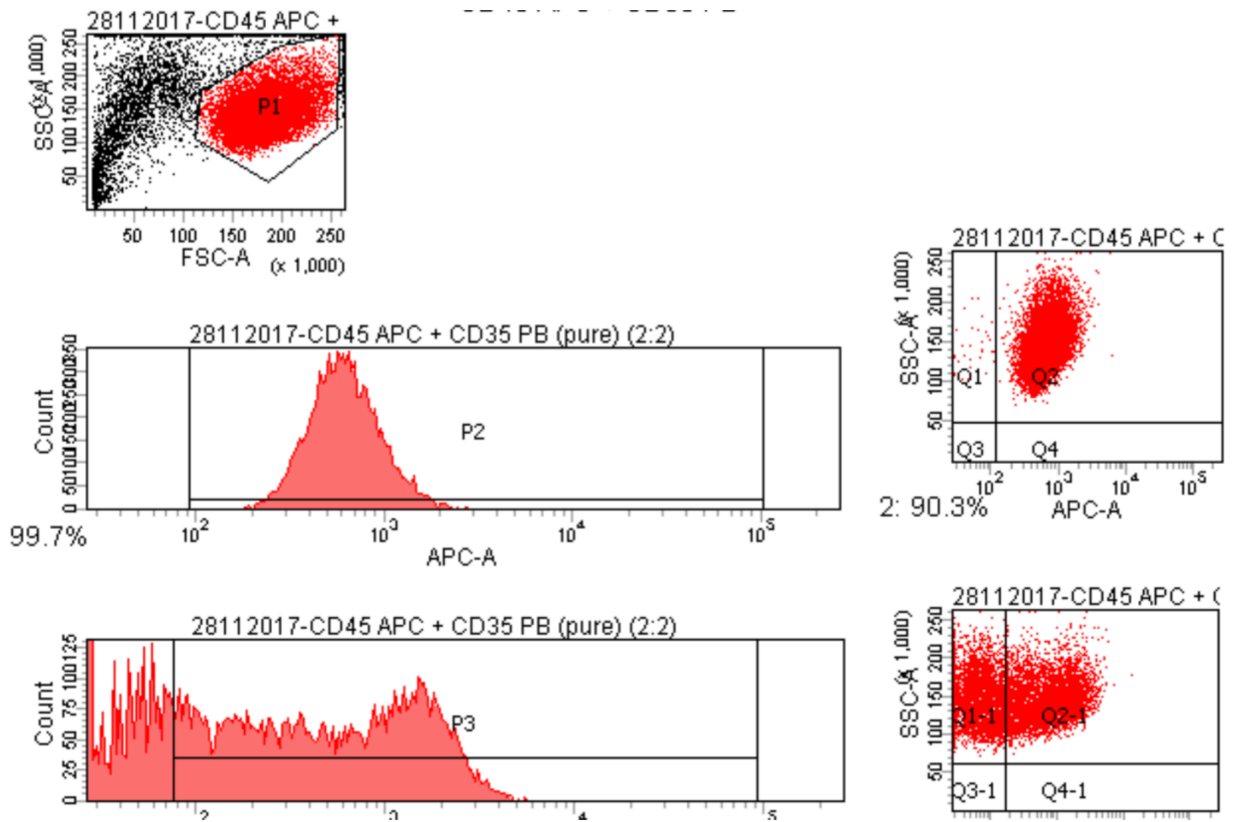


Abb. 13e: Ergebnisse von Populationsgating, APC/Zellzahl-, APC/SSC-, PB/Zellzahl- und PB/SSC-Messung. Bei dieser Probe erfolgte keine Verdünnung des Anti-CD35. Unterhalb der Diagramme ist der prozentuale Anteil der Gesamtpopulation im relevanten Gate angegeben. In dieser Probe kann eine erfolgreiche Anti-CD45-Markierung festgestellt werden. 90,3 - 99,7% der Zellen sind CD45⁺. Bzgl. CD35 finden sich trotz Verzicht auf Verdünnung erneut Anzeichen einer ungleichmäßigen Färbung.

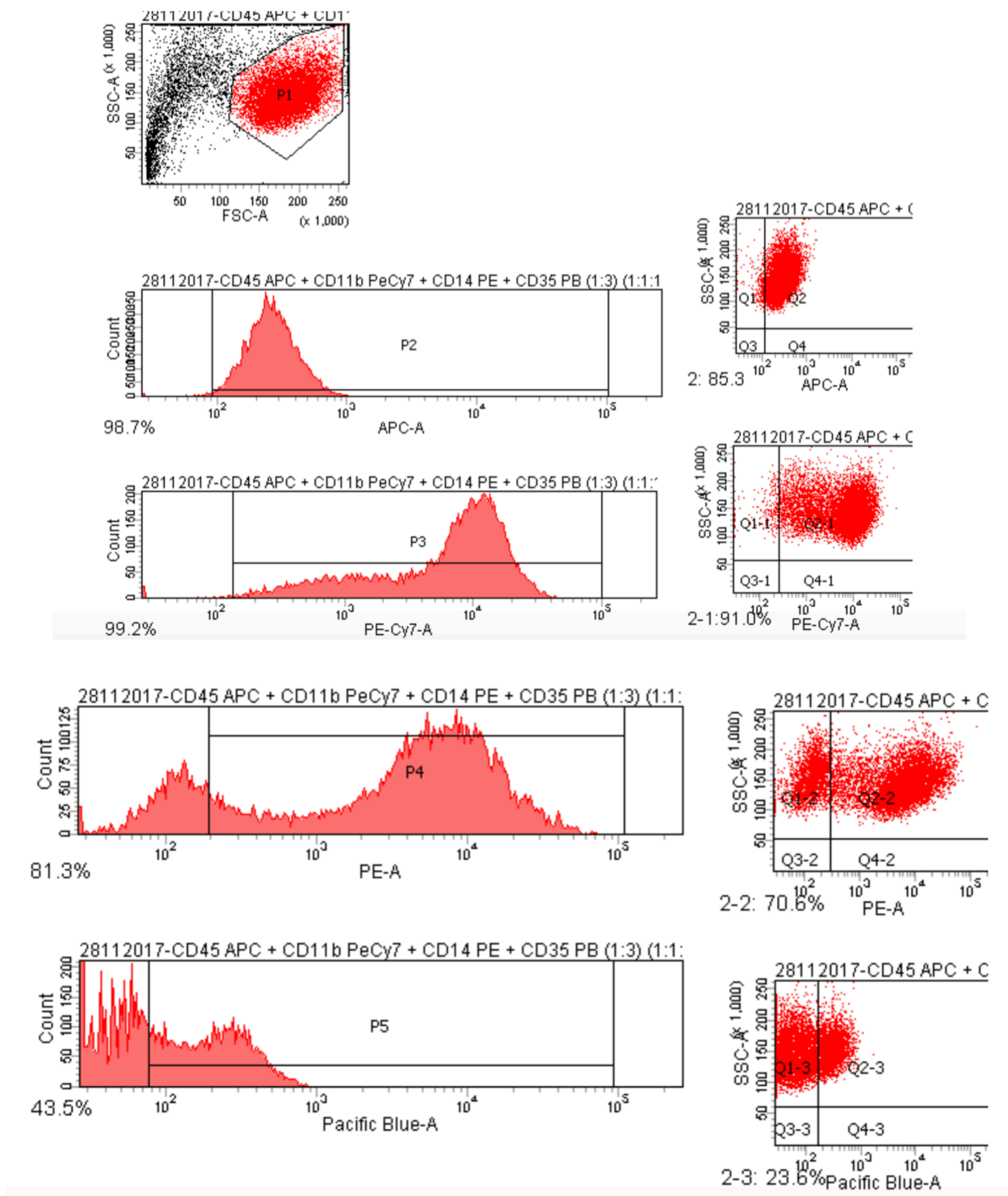


Abb. 13f: Ergebnisse von Populationsgating, APC/Zellzahl-, APC/SSC-, PE-Cy7/Zellzahl-, PE-Cy7/SSC, PE/Zellzahl-, PE/SSC-, PB/Zellzahl- und PB/SSC-Messung. Unterhalb der Diagramme ist der prozentuale Anteil der Gesamtpopulation im relevanten Gate angegeben. Die Messergebnisse der Kombination aller Antikörper entsprechen denen der vorangegangenen Messungen. 85,3 - 98,7% der Zellen CD45+. 91,0 - 99,2% der Zellen CD11b+. 70,6 - 81,3% der Zellen CD14+. Auch in dieser Probe findet sich eine unzureichende Markierung der Zellen mit Anti-CD35.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass drei der getesteten Antikörper (CD11b, CD14, CD45) auf den G.diff. nachgewiesen werden konnten. Darunter befanden sich ein exklusiven Marker hämatologischer Zellen (CD45), sowie eine klassischer Marker neutrophiler Granulozyten (CD11b). CD14 wird in vielfach geringerer Konzentration auch von neutrophilen Zellen exprimiert, und ist einer der Marker der APC-TAN. Dies erklärt die gemessene Expression dieses Markers in G.diff. Außerdem könnte dessen Veränderung in post-Spheroid G.diff. ein Hinweis auf eine Beeinflussung durch das TME sein. Für die Ergebnisse der CD35 Messungen existieren mehrere Erklärungen: Einerseits ist bekannt, dass es v.a. im Zuge von bakteriellen Infektion zu einem Anstieg der zirkulierenden CD35⁺ neutrophilen Granulozyten kommt. (Nuutila et al. 2013) Dies lässt einerseits auf eine Aktivierungs-abhängige Komponente der Expression des CR1 zu. Dies ergibt auch in der mechanistischen Betrachtung Sinn, da im Zuge einer bakteriellen Infektion eine effiziente Phagozytose notwendig ist. Andererseits könnte es sich hierbei ebenfalls um ein Reifezeichen der Zellen handeln. Da prinzipiell jede Vorläuferzelle des neutrophilen Granulozyten in den G.diff. auffindbar ist, kann die uneinheitliche CD35-Markierung auch ein Ausdruck dieser unterschiedlichen Stadien sein. Außerdem besteht die Möglichkeit auf fehlerhafte Durchführung der Färbung. Hierfür würde sprechen, dass bei der Probe, welche in Abb. 13d abgebildet wurde, auch die CD45 Markierung fehlschlug. Allerdings findet sich sowohl bei Verwendung des unverdünnten Anti-CD35, sowie bei der Kombination aller Marker immer dasselbe Muster mit uneinheitlichem Messpeak. Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten auf die Verwendung dieses Markers verzichtet. Stattdessen wurde das Markerprofil um zwei weitere charakteristische Oberflächenmoleküle der neutrophilen Linie erweitert, CD15 und CD66b. Diese finden sich sowohl bei vollständig differenzierten Granulozyten, als auch auf deren Vorstufen. (Carus et al. 2013, Singhal et al. 2016; Zhu et al. 2018)

5.4. CFSE-Markierung hat keinen Einfluss auf die Oberflächenmarkerexpression:

Im nächsten Schritt unserer Experimente galt es zu klären, ob die CFSE-Färbung der G.-diff. die Expression der ausgewählten Marker beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde ein Teil der Zellen gefärbt und für weitere 3 Tage kultiviert. Im Anschluss erfolgte die FACS-Analyse der markierten Immunzellen. Als Kontrolle dienten die restlichen, ungefärbte Zellen, welche in eine separate Kultur überführt wurden. Abb. 14 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse.

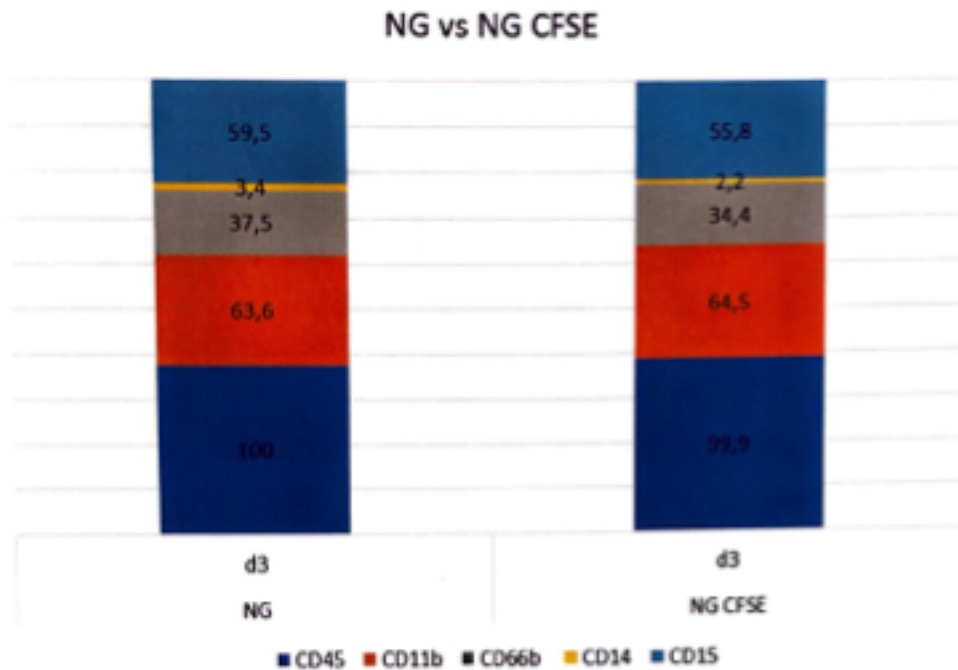
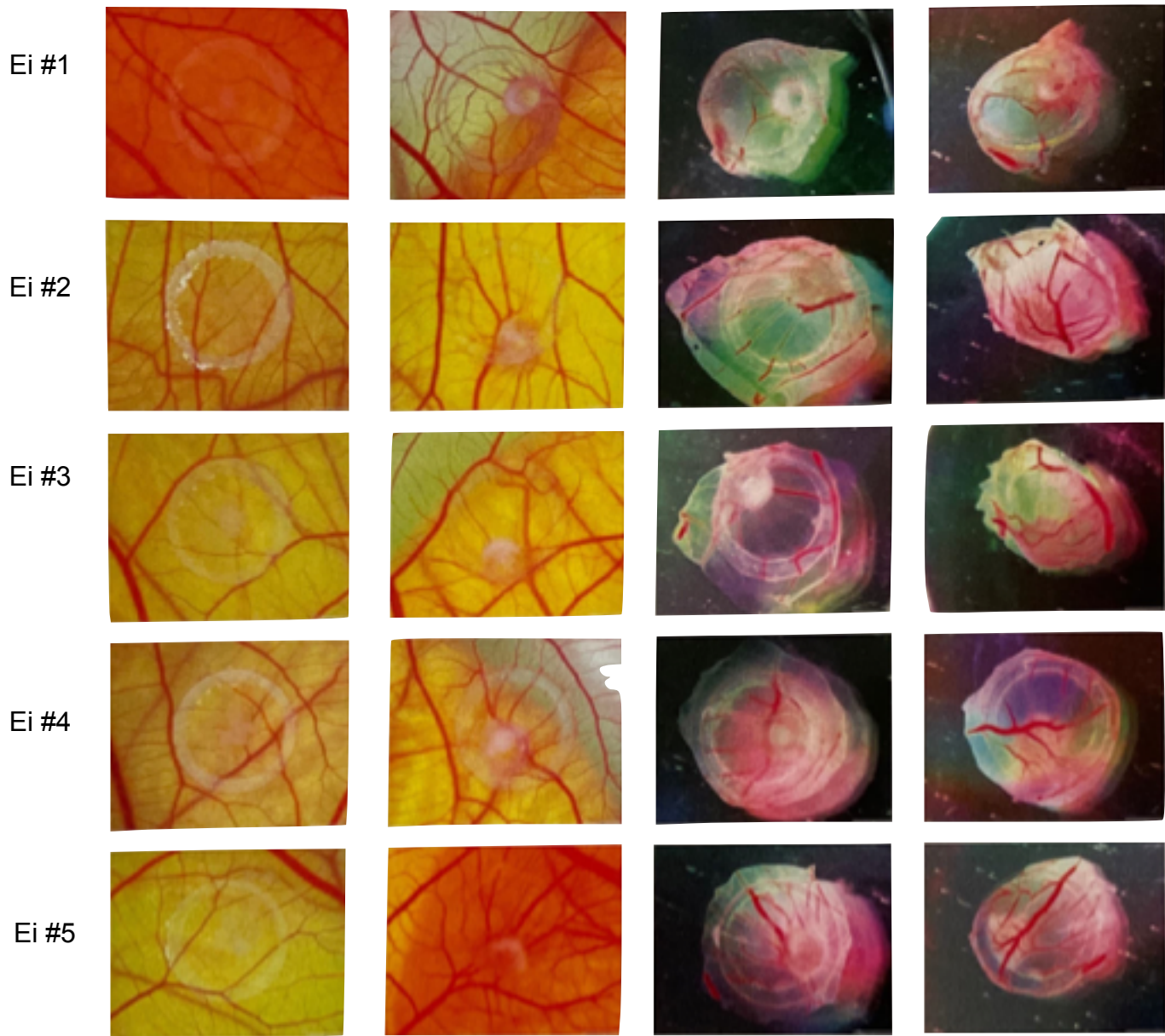


Abb. 14: Analyse der Expression unserer ausgewählten Oberflächenmarker auf CFSE gefärbten Neutrophilen Granulozyten (NG CFSE). Als Kontrolle wurden nicht markierte Neutrophile Granulozyten aus dem Differenzierungsmix verwendet (NG). Es zeigen sich keine Unterschiede bezüglich der Markerexpression. (Flaschka 2020)

Wie sich aus dieser entnehmen lässt, konnte infolge der CFSE-Färbung keine Veränderung festgestellt werden. Daher konnte dieser etwaige Confounder ausgeschlossen werden.

5.5. LT22s-Spheroidkultur auf CAM:

Nachdem wir in der ersten Phase unserer Experimente die grundsätzliche Durchführbarkeit der Methodik anhand von A549 überprüft hatten, entschlossen wir uns nun diese durch LT22s zu ersetzen. Da ein Charakteristikum der LT22s-Fraktion die Fähigkeit zur Spheroidbildung ist, wollten wir herausfinden, ob deren Verhalten im CAM-Modell dem von A549 ähnelt. (Tiran et al. 2017) Abb. 15 zeigt die Tumorgewebe der Eier #1 - #5 der CAM-Kultur des Experiments LT3. Diese wurden aus reinen LT22s-Spheroiden generiert. Aufgrund der Erfahrungen bzgl. der Zellzahl wurden 6 Spheroide (à 10.000 Zellen) pro Ei verwendet.



d0

d3

d3 - Draufsicht

d3 - Untersicht

Abb. 15: Übersicht der Tumorformation d0/d3. Rechts zeigt den Blick von oben/unten auf das Resektat.

Ursprung: monokultivierte LT22s-Spherode

(Flaschka 2020)

Auch bei der Verwendung von LT22s-Zellen bildeten sich oval, rundliche dichte Spherode. Aufgrund der höheren Anzahl an Spheroiden pro Ei, verhält sich auch die Größe dementsprechend.

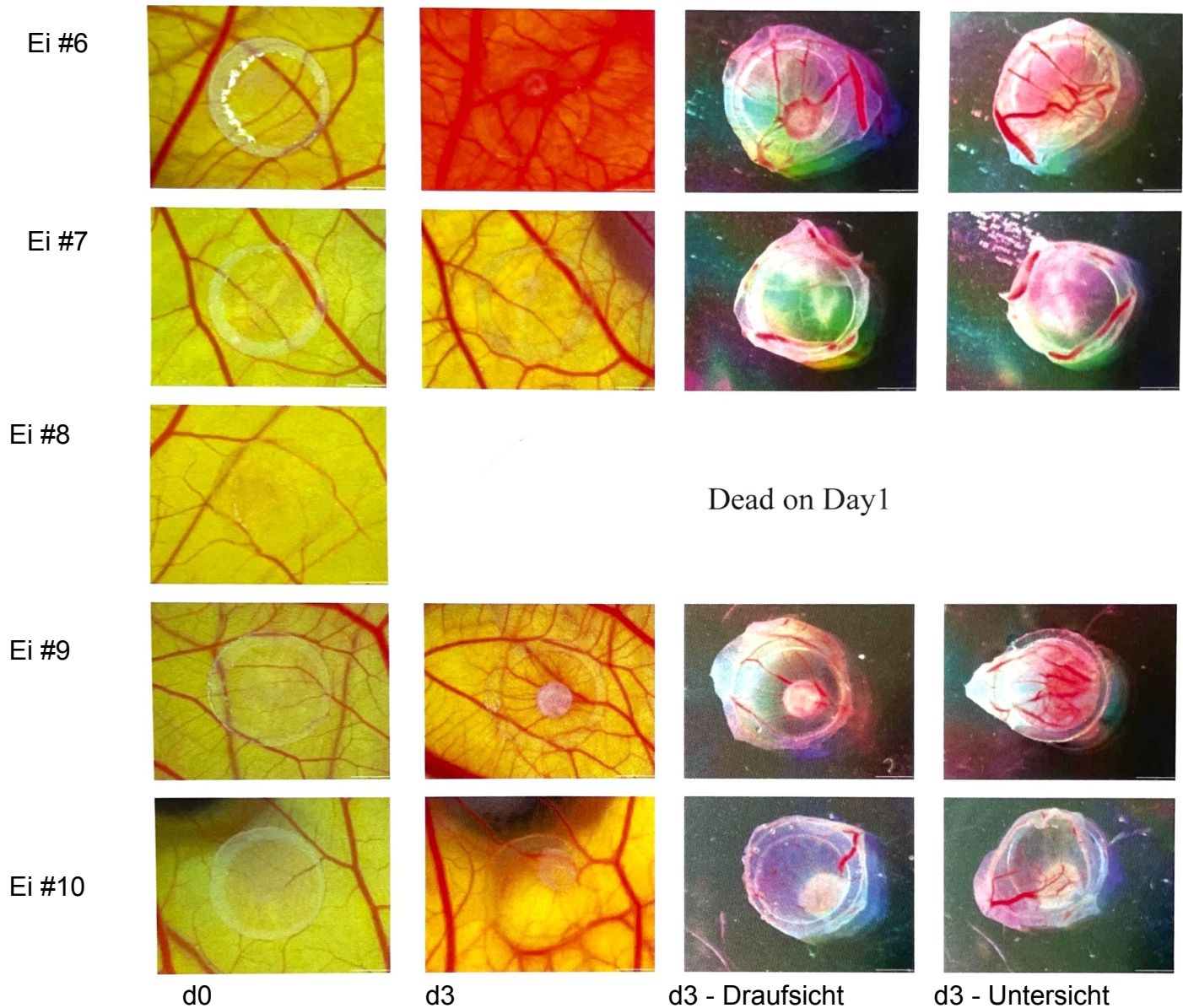


Abb. 16: Übersicht der Tumorformation d0/d3. Rechts zeigt den Blick von oben/unten auf das Resektat. Ursprung: Kokultur LT22s + G.diff-Spherioide (Flaschka 2020)

Zusätzlich erfolgte die Kultivierung von LT22s/G.diff-Spheroiden auf CAM. Abb. 16 zeigt die resultierenden Tumorgewebe der Eier #6 - #10. Ei #8 verstarb im Verlauf der Kultur. Bei Betrachtung ließen sich mehrere Unterschiede zwischen der Tumoren der Mono- und der Co-Kultur erkennen. Die G.diff. beinhaltenden Tumoren erscheinen einerseits makroskopisch dichter, andererseits teilweise größer.

In Abb. 17 soll dies exemplarisch durch die Draufsicht auf die Resektate der Eier #3, #4, #7 und #10 verdeutlicht werden.

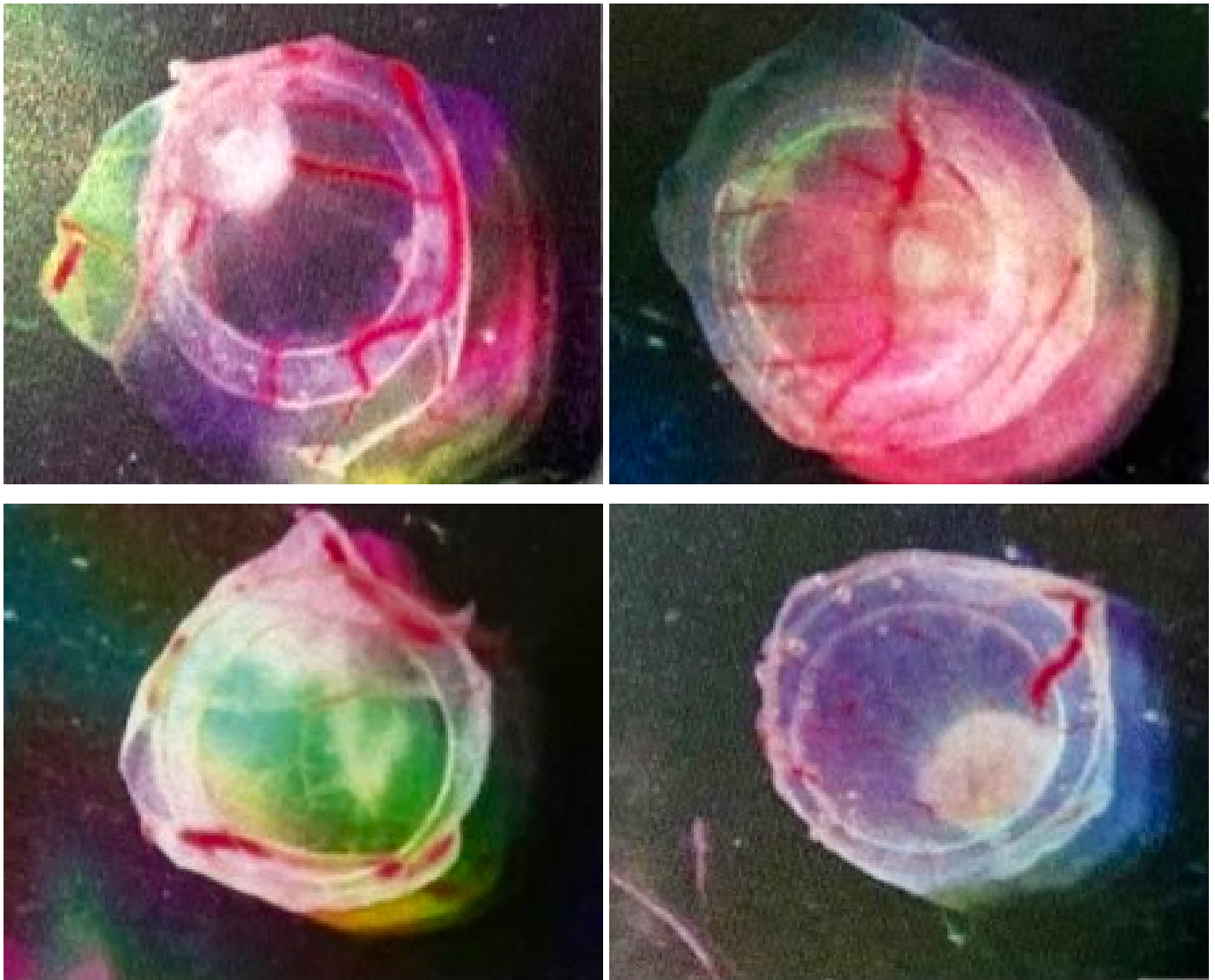


Abb. 17: Gegenüberstellung der Draufsicht der Resektate #3 und #4 (oben; LT22s) sowie #7 und #10 (unten; LT22s+G.diff.). Auffallend ist einerseits die dichtere Gewebestruktur bei annähernd gleichem Durchmesser (Ei #10), andererseits die ausladend, irreguläre Struktur mit deutlichen Dichteunterschieden (Ei #7)

Die Vielseitigkeit der bisher bekannten, protumorösen Effekte von TAN könnten hierfür eine Erklärung liefern. Beispielsweise kann die höhere Dichte der Tumoren sowohl durch den TAN Einfluss die unkontrollierte Proliferation (siehe S. 39), als auch die Hemmung der Wachstumssuppression (siehe S. 47) bedingt sein.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass das CAM-Assay sowohl die Erforschung von reinen LT22s-, als auch von LT22s+G.diff.-Spheroïden erlaubt. Auch lassen sich strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Kulturformen erahnen, für die der Ein-

136

fluss der G.diff. eine plausible Erklärung liefern könnte. Jedoch muss hierbei angemerkt werden, dass es sich hierbei um eine bloße makroskopische Betrachtung handelt, weshalb eine definitive Aussage über die Unterschiede, bzw. TAN Einflüsse an dieser Stelle nicht getroffen, allenfalls vermutet werden kann. Infolge der erfolgreichen Etablierung der Methodik, kann zukünftig auch diese Fragestellung untersucht werden.

5.6. Cokultur in LT22s-Spheroiden beeinflusst die Differenzierung von Neutrophilen Granulozyten:

Um eine Beeinflussung der G.diff. durch das Tumorgewebe nachzuweisen, erfolgte die Disaggregation der Spheroiden, mit nachfolgender FACS-Analyse der Zellsuspension. Diese wurde in LT1-LT3 durchgeführt, wobei in den ersten beiden Experimenten zunächst nur eine in vitro Kultur der Spheroiden erfolgte. Im Verlauf des Experiments LT1 wurde die erste Durchflusszytometrie bei einem Teil der Proben an Tag 3 durchgeführt. Der restlichen Proben wurden für weitere 4 Tage kultiviert und an Tag 7 analysiert. Als Kontrolle dienten monokultivierte, CFSE-gefärbte G.diff. Abb. 18 zeigt die Ergebnisse der Messung von LT1.

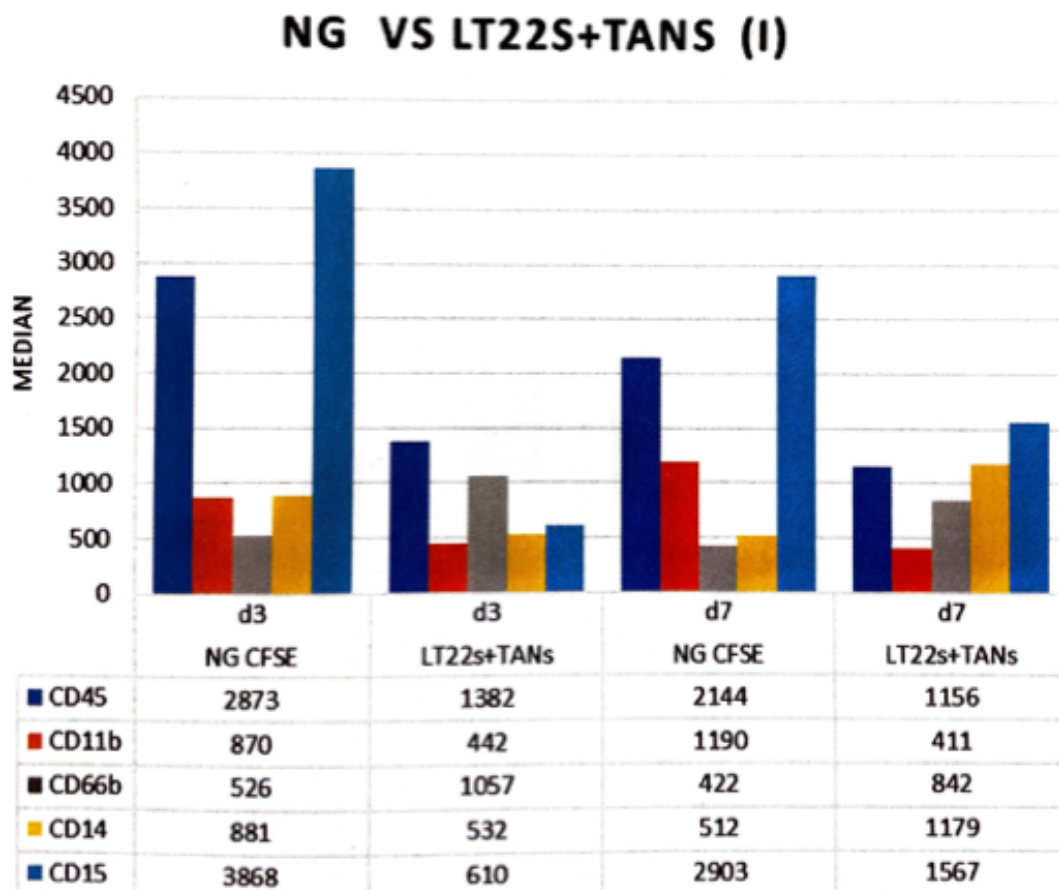


Abb.

18: FACS-Analyse der cokultivierten LT22s/TAN-Spheroide. In beiden Messungen zeigte sich eine Reduktion der Expression der Marker CD11b, CD15 und CD45 im Vergleich zur Kontrolle.

An beiden Tagen fand sich jedoch eine vergleichsweise höhere Expression von CD66b in TAN. An d7 konnte zusätzlich noch eine ca. 1,3-fach höhere CD14-Konzentration in TAN nachgewiesen werden.

(Flaschka 2020)

Diese Ergebnisse zeigten, dass G.diff. durch die Interaktion mit malignen Zellen in ihrem Phänotyp beeinflusst werden. Interessanterweise handelte es sich bei einem der betroffenen Moleküle um CD11b. Über dieses ist eine Assoziation mit den antitumorösen der TAN bekannt, da dessen Funktionsverlust zur Entwicklung des Leukozyten-Adhäsionsdefekt (LAD) führen, wodurch neutrophilen Granulozyten auch ihre Fähigkeit zur ADCC-verlieren. (Kushner and Cheung 1992) Außerdem spielt dieses Protein auch in der Publikation von Fridlender et al. eine wichtige Rolle, in welcher TAN erstmals beschrieben wurden: So beobachtete man in Mäusen eine Zunahme der myeloischen CD11b⁺ Zellen im TME um 30-45%, nachdem der TGF- β -Inhibitor SM16 verabreicht wurde. Mittes anti-Ly6G wurde festgestellt, dass es sich hierbei fast ausschließlich um neutrophile Granulozyten handelte. Im Vergleich zu CD11b⁺ Zellen aus Kontrollmäusen war deren Durchschnittliche Zyto-

toxizität um 36% höher, u.a. aufgrund einer 40% höheren Sekretion von zytotoxischem NO, respektive 45% höherer Sekretion von H₂O₂. (Fridlender et al. 2009)

Weiters erwähnenswert ist die die relative Erhöhung von CD66b, das bei manche Tumoren bereits als ungünstiger Prognosefaktor für ein Rückfall-freies-Überleben (*RFS*) verwendet wird. (Carus et al. 2013)

Aufgrund niedriger Zellzahlen erfolgte im zweiten derartigen Experiment LT2 einzig eine FACS-Analyse an Tag 3. Abb. 19 zeigt die Ergebnisse der Messung. In diesem Fall kam zwar ebenfalls zu einer verringerten Expression von CD15 und CD45 im Vergleich zur Kontrolle, wobei letztere allenfalls gering war (-8,7%). Jedoch ist die Expression von CD11b und CD14 in diesem Fall höher (+27,6%; +23,4%).

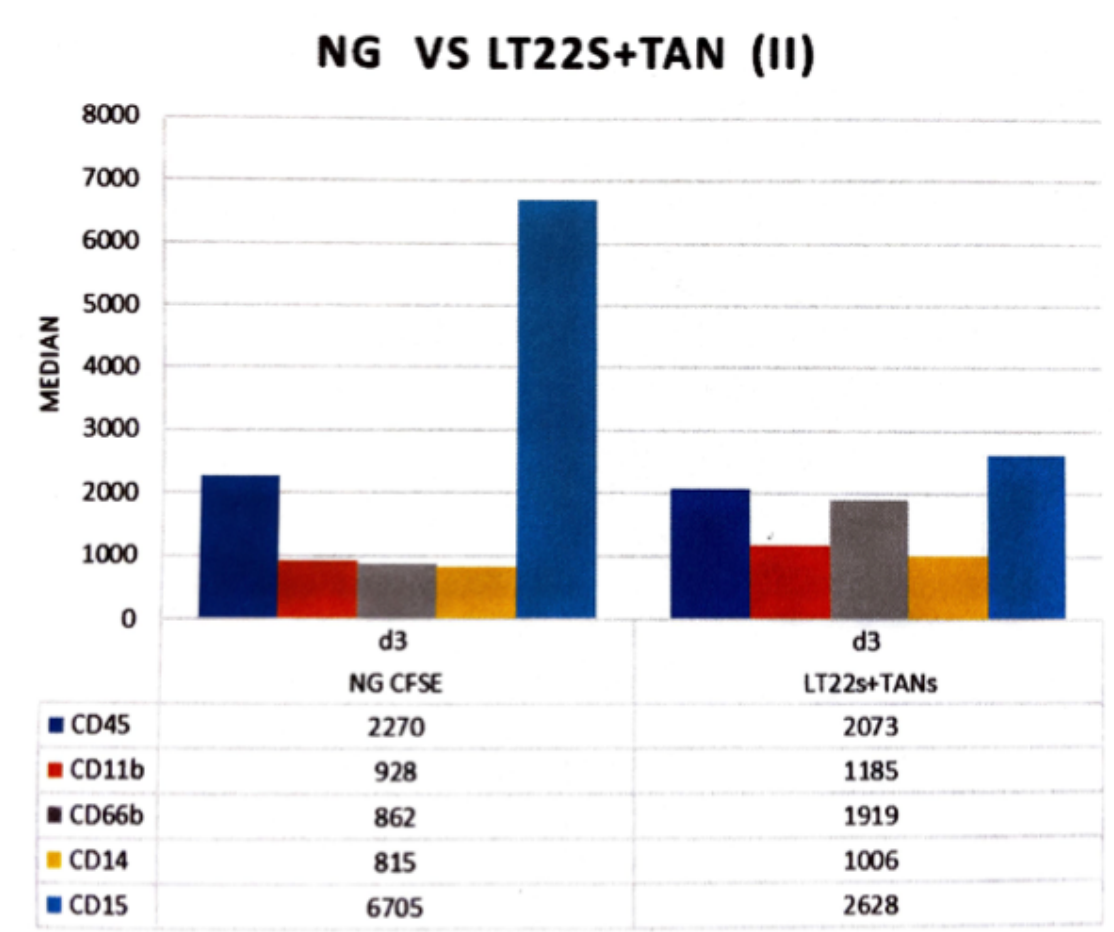


Abb. 19: FACS-Analyse der kokultivierten LT22s/TAN-Spheroide des Experiments LT2 an d3. Am deutlichsten erkennbar ist eine Reduktion der Expression von CD15, jedoch mit gering erhöhten Konzentration von CD11b und CD14. (Flaschka 2020)

Dass die CD11b Expression, welche eng mit der antitumorösen TAN-Funktion assoziiert ist, und diese wiederum v.a. mit frühen Erkrankungsstadien auftritt, an Tag 3 der Co-Kultur

erhöht war, könnte möglicherweise ein Indiz dafür sein, dass die Dichotomie der TAN-Funktion auch in unserem Modell auftritt. Allerdings muss hierzu kritisch erwähnt werden, dass in LT1 die CD11b Expression an Tag 3 im Vergleich bereits deutlich reduziert war (-49,1%). Eine mögliche Erklärung könnte jedoch die geringe Zellzahl liefern. Plausibel wäre, dass es dadurch zu einer langsameren Beeinflussung der G.diff. kommt, wodurch auch die Abnahme des Markers etwas gebremst wird. Bzgl. der ebenfalls erhöhten Expression von CD14 muss gesagt werden, dass mithilfe der aktuellen Daten wenig über dessen Relevanz ausgesagt werden kann. Um dies zu ermöglichen, müssen zunächst mehrere Fragen geklärt werden. Beispielsweise wurde beschrieben, dass einige Tumorzellen in der Lage ebenfalls in der Lage sind, CD14 zu exprimieren, jedoch bezieht sich die genannte Publikationen nicht auf Malignome der Lunge. (Cheah et al. 2015)

Im Kontext von Lungenkarzinomen wurde zwar das Auftreten einer erhöhten CD14 Konzentration ebenfalls beschrieben, welche weiters auch mit einer Immunsuppression assoziiert war, allerdings handelt es sich hierbei überwiegend um die Rekrutierung von CD14⁺ Makrophagen mit diesen Eigenschaften. (Schenk and Dietz 2015) Dies in unserem Kontext, zur Beantwortung der Frage nach der erhöhten Expression, zunächst nicht weiter hilfreich. Aus den selben Gründen wie sie gerade eben für die Erhöhung des CD11b vorgebracht würden, konnten man zwar hier argumentieren, dass es sich hierbei möglicherweise sogar um das Auftreten des APC-TAN handeln könnte, für welchen ja ebenfalls eine CD14 Expression bekannt ist, allerdings findet sich hierfür kein weiteres Indiz, wodurch dies schlussendlich nicht über eine bloße Spekulation hinausreicht. Dem zunächst widersprechen würde weiters der in LT1 beobachtete, 2,3-fache Anstieg von CD14 an d7. Sollte es sich tatsächlich um den APC-TAN handeln, würde dies bedeuten, dass sich dessen Vorkommen mit dem Fortschreiten der Malignität erhöht. Unter der Voraussetzung, dass es sich bei den Spheroide an Tag 7 ebenfalls noch um einen Tumor handelt, dessen Fähigkeiten mit denen einer Neoplasie im Frühstadium vergleichbar sind, erscheint dies zwar prinzipiell als plausibel. Unter der Berücksichtigung, dass es sich bei den LT22s-Zellen um solche eines hochaggressiven, bereits therapieresistenten Lungenadenokarzinoms handelt, scheint dieser Vergleich eher erzwungen.

Sollte diese Beobachtung jedoch in zukünftigen Experimenten öfter beobachtet werden, ist eine Adaptierung des Markerprofils, zur Beantwortung dieser Frage, grundsätzlich angebracht.

Schlussendlich erfolgte in LT3 die Durchführung der kompletten Methodik. Hierfür wurden die Spheroide nach ihrer 7-tägigen Kultivierung in das CAM-Assay überführt.

An Tag 3 bzw. 7 erfolgte die Resektion, Disaggregation und FACS-Analyse. In Abb. 20 werden die Ergebnisse präsentiert.

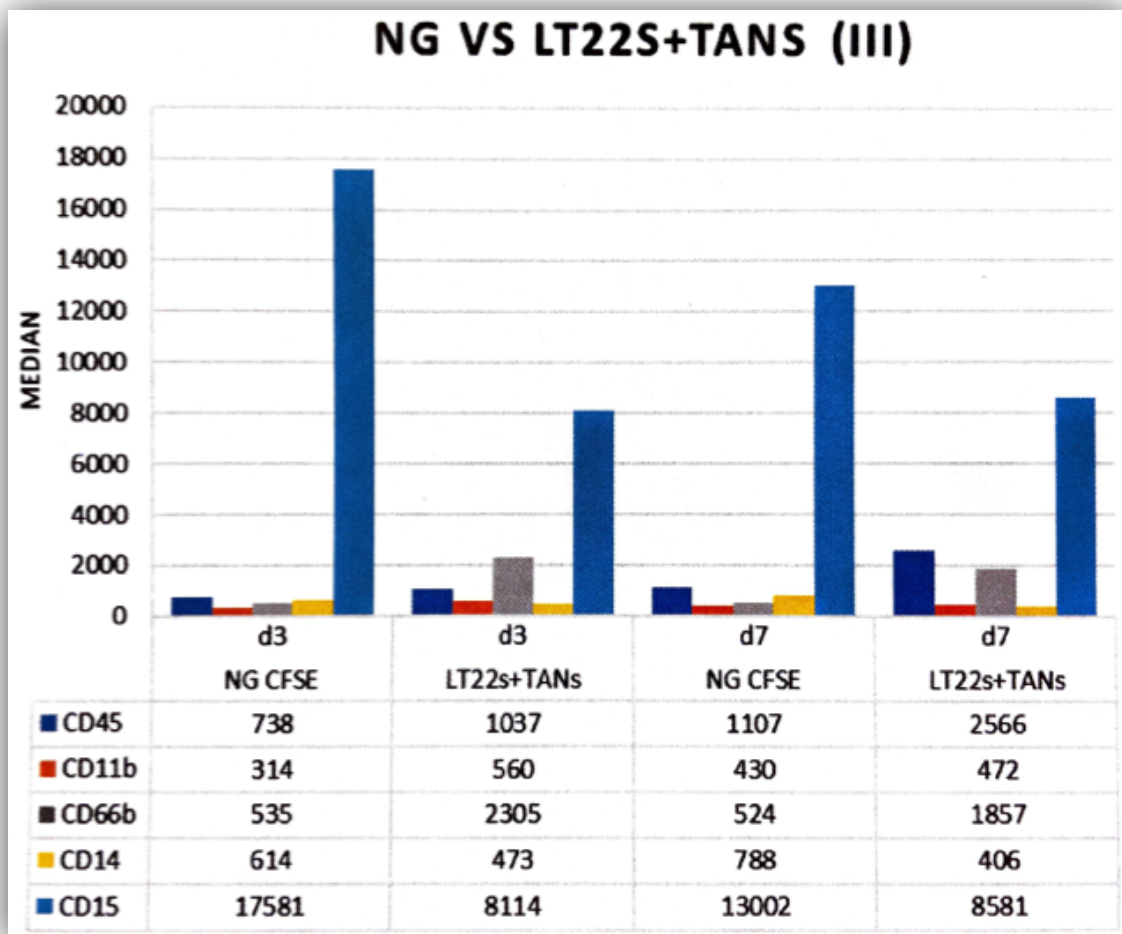


Abb. 20: FACS-Analyse der in vitro und CAM-cokultivierten LT22s/TAN-Spheroide des Experiments LT3 an d3 und d7. Im Vergleich mit den vorherigen Experimenten ist einzig die Reduktion von CD15 gleichbleibend. Auffällig ist, dass sich in diesem Experiment erneut eine neue Situation zeigt. So ist CD14 im Vergleich nun reduziert, jedoch sind sowohl CD45, CD11b und CD66b erhöht.

Sowohl an Tag 3, als auch an Tag 7 konnte eine Reduktion von CD14 (-22,9%; -48,4%) und CD15 (-53,8%; -34,0%) beobachtet werden. Obwohl ich, in Anbetracht der eben erwähnten Widersprüche, sowie aufgrund des Fehlens weiterer Daten, an dieser Stelle über das Mutmaßen nicht hinauskomme, ist es dennoch interessant, dass die CD14 Expression in allen 3 Experimenten grundsätzlich mit dem Auftreten des APC-TAN vereinbar wären, so auch in diesem Fall. Hierfür muss der zeitliche Kontext der Experimente berücksichtigt werden. Würde man LT1-LT3 vereinheitlichen, so erhalten wir zwei Phänotypisierungen an Tag 3 (LT1, LT2), eine an Tag 7 (LT2), sowie jeweils eine an Tag 10 und Tag 14 (LT3). In

LT1 und LT2 fand sich jeweils eine Messung, mit einer deutlich erhöhten CD14-Expression. Vergleicht man diese an Tag 10 bzw. 14 mit jener an Tag 7, so scheint deren initialem Anstieg ein ebenso rascher Abfall zu folgen. Dies scheint durchaus mit jenem Muster des stadienabhängigen TAN-Verhaltens vergleichbar. Aus diesem Grund sollten zukünftige Experimente ebenfalls die Analyse der *in vitro* Spheroide an Tag 10 bzw. 14 enthalten, um festzustellen, ob es sich hierbei um ein regelmäßig auftretendes Phänomen handelt.

Die Reduktion von CD15 kann über dessen Funktion erklärt werden: Da dieses Protein v.a. im Rahmen von Extravasations-/Migrationsprozessen eine Rolle spielt, ist es pausibel, dass sich dessen Konzentration nach Erreichen des Rekrutierungsortes vermindert. Erneut ist die Gegenüberstellung der Daten aus LT1 und LT3 interessant. So ist zwar auffällig, dass CD15 in LT15 zwar an beiden Tagen niedriger war, als in der Kontrolle. Jedoch findet sich in den Spheroid-G.diff. ein sukzessiver Anstieg der Expression, welcher darüber hinaus auch an Tag 10 und 14 messbar war. Der sprunghafte Anstieg in LT3 ließe sich dadurch erklären, dass im Rahmen der CAM-Modells weitere Zellen in den Tumor migrieren könnten (z.B. heterophile Granulozyten). Allerdings konnte ein noch stärkerer Anstieg an Tag 10 auch in den G.diff. der Kontrolle gemessen werden. Da CD15 bereits auf früh unipotenten Zellen nachgewiesen wurde, widerspricht dies einem Reifungsbedingten Anstieg. (Dinh et al. 2020) Somit lässt sich aus diesen Daten nur schlussfolgern, dass die Tumor-G.diff. Interaktion zu einer verminderten Expression von CD15 führt, möglicherweise aufgrund Mangels einer Funktion.

Für die beobachteten relativen Erhöhungen von CD11b, CD45 sowie CD66b an d7 hingegen findet sich schwieriger eine Erklärung. Nicht außer Acht gelassen werden, darf die Entwicklung des avianen Immunsystems, die gegen Ende des CAM-Assays stattfindet. Um einen diesbezüglich möglichen Confounder auszuschließen, sollten in zukünftigen Experimenten auch die, aus monokultivierten Spheroide entstandenen, Tumorgewebe auf CAM per FACS untersucht werden. Dadurch kann eine eventuelle Expression dieser Marker durch das embryonale Immunsystem des Huhns sicher bewiesen oder ausgeschlossen werden. Diese These verstärkt insbesondere die Erhöhung der CD45 Expression. Diese konnte in LT1 und LT2 nicht beobachtet werden, und lässt sich am besten durch eine Vergrößerung des Pools zu rekrutierender Immunozyten erklären, die eine Folge der Entwicklung des wirtseigenen Immunsystems ist. Untermauert wird dies durch die Tatsache, dass die Expression von CD45 auf avianen Thymozyten bereits in Publikationen erwähnt wurde. (Paramithiotis et al. 1991)

Ähnliches gilt auch bzgl. der Erhöhung von CD11b und CD66b. Allerdings entspräche der Letztere, aufgrund des bekannten Wissens über CD66b und die Krankheitsprognose, prinzipiell dem Verhalten von TAN im menschlichen Organismus. (Carus et al. 2013) Zur Klärung des CD11b Anstiegs sollten einerseits monokultivierte CAM-Tumoren per FACS analysiert werden, um eine Beteiligung avianer Zellen auszuschließen. Außerdem wäre es interessant, diese Zellen, nach dem Vorbild der Publikation von Fridlender et al., auf ihre zytotoxischen Eigenschaften zu prüfen (u.a. Messung der NO/H₂O₂-Sekretion).

6. Diskussion und weiterer Ausblick:

Diese Arbeit liefert einerseits eine theoretische Zusammenfassung über Historie, Konzepte und aktuelle Fragestellungen des Feldes der Tumorummunologie, mit speziellem Fokus auf die Tumor-associated-neutrophils. Zum Anderen konnte ich als Teil der Forschungsgruppe von Prof. Herbert Strobl erfolgreich eine neuartige Methodik zur Analyse von Herkunft und Funktion dieser Zellen etablieren. Hierbei gelang es uns zunächst, dreidimensionale Tumorspheroide aus einer Co-Kultur von mehreren Lungenkarzinomzelllinien mit granulozytär differenzierten HSC zu generieren. Im Anschluss wurden diese auf in ein CAM-Assay transferiert, wodurch eine in vivo Betrachtung möglich wurde. Mittels Fluoreszenzmarkierung konnte eine charakteristische, der Literatur entsprechende Verteilung der Immunozyten im Tumorgewebe nachgewiesen werden.

Mittels FACS-Analyse gelang es uns schlussendlich tumorzellinduzierte Veränderungen in der Differenzierung der granulozytären Zellen zu beobachten. Diese konnte in 3 unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte meine Kollegin Pia Flaschka in ihrer Arbeit erfolgreich einen signifikanten, proangiogenen Effekt der TAN in den CAM-Spheroïden beobachten. (Flaschka 2020) Zusammengefasst konnte dadurch nachgewiesen werden, dass sich das Verhalten der G.diff. in unserem Modell mit dem der, aus murinem und humanem Gewebe isolierten, TAN ähnelt. Wir sind zuversichtlich, dass diese Methodik zukünftig dafür genutzt werden kann, viele offenen Fragen bzgl. der Herkunft spezifischer TAN-Subsets zu beantworten. Nicht zuletzt aufgrund der Beobachtungen von Singhal et al. (2016) gehen wir davon aus, dass verschiedene Vorläuferzellen neutrophiler Granulozyten den Ursprung der funktional unterschiedlichen TAN-Phänotypen im TME darstellen könnten. Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell ermöglicht es, über einen relativ gesehen kurzen Zeitraum, eine große Anzahl von Daten zu generieren. Verglichen mit herkömmlichen Modellen, ist dessen größter Vorteil die selektive Kontrolle einzelner Pa-

parameter. So lässt sich beispielsweise genau kontrollieren, welches granulozytäre Subset in das Spheroid inkorporiert wird. Dies ermöglicht es, die Entwicklung von unterschiedlichen Progenitorzellen zu beobachten. Beispielsweise wäre es interessant, einzig die isolierte BSN-Fraktion in das Spheroid zu integrieren und dessen Verhalten zu beobachten, da deren Fähigkeit zur Bildung des APC-TAN Subsets im Menschen bereits beschrieben wurden. Da mit unserer Methodik auch kontrolliert werden kann, welche non-immunogenen Zellen (nicht zuletzt die malignen Zellen selbst) im Spheroid vorkommen (oder eben nicht), erlaubt dies auch eine Eingrenzung der kausalen Faktoren. Würde sich der APC-TAN beispielsweise bereits in den Spheroiden nachweisen lassen, kann daraus geschlossen werden, dass dieser Effekt durch die Interaktion der BSN mit malignen Zellen bedingt sein muss. In herkömmlichen in vivo Modellen kann die Zusammensetzung des TME nicht derart spezifisch kontrolliert werden. Naturgemäß kommt es in diesem Fall auch zum Auftreten anderer Zellen im TME. Dazu zählen diverse immunologische (TAM, DC, MC, CD4⁺, CD8⁺, NK-Zellen), sowie stromale Zelltypen (Fibroblasten, endotheliale Zellen), für die ebenfalls eine wichtige Rolle im „cross-talk“ des TME bekannt ist. Da dies im Zuge der humanen Tumorgenese logischerweise ebenfalls der Fall ist, ist es selbstverständlich, dass mit einer selektiven Methodik, nur einen Teilaspekt der tatsächlich ablaufenden Prozesse beobachtet werden kann, und immer die Gefahr besteht, dass Auffälligkeiten rein aus der Abwesenheit anderer beteiligter Faktoren entstehen, dadurch in Summe keine klinische Relevanz besitzen. Diese Tatsache sollte immer im Hinterkopf behalten werden, und die erhobenen Daten, wenn möglich, sorgfältig mit Daten anderer in vivo Modelle, im besten Fall mit humanen Daten, abgeglichen werden müssen. Allerdings gewann ich im Rahmen meiner Recherche den Eindruck, dass viele widersprüchliche Ergebnisse eben dadurch zustandekommen, dass es bis dato nicht wirklich möglich ist spezifische Interaktion einzelner Komponenten unter Ausschluss der restlichen zu beobachten. Durch den Versuch in vivo Vorgänge so gut es geht nachzubilden (z.B. durch Spheroidbildung), jedoch im Zuge dessen gleichzeitig die beteiligten Komponenten einzugrenzen, könnte es möglich werden, die einzelnen mechanistischen „Bausteine“ dieses Prozesses zu entschlüsseln. Kombination sowie sukzessive Erweiterung des Modells könnten schlussendlich dazu führen, dass sich immer mehr an die Realsituation angenähert werden kann, und die Teilschritte des Prozesses auf diesem Weg genau beschrieben werden können. Genau hierbei kann das CAM-Modell nützlich werden. Da es sich hierbei zwar um einen Organismus handelt, sich jedoch einige dessen Komponenten noch in der Entwicklung befinden (z.B. Immunsystem), wird genau solch eine Annäherung dadurch ermöglicht. Das Spheroid - fast ausschließlich aus malignen, und den gewünschten Zellen des Immunsys-

tems bestehend - kommt dadurch in Kontakt mit den typischen Bestandteilen der ECM, jedoch immer noch weitgehend unter Ausschluss anderer Faktoren. Wie bereits im Ergebnissteil erwähnt, sollte jedoch in zukünftigen Experimenten ebenfalls analysiert werden, ob sich das aviane Immunsystem über die Dauer der Kultivierung soweit ausbildet, dass es als möglicher Confounder wirken kann. Dies ist relativ einfach durch eine FACS-Analyse von CAM-kultivierten Monokulturspheroiden zu erreichen.

Insgesamt könnte dieses Modell ermöglichen, die pro-/antitumorösen Funktionen der TAN-Subsets auf unterschiedliche Vorläuferzellen zurückzuführen und diese zu phänotypisieren. Können dadurch die Mechanismen entschlüsselt werden, die in der jeweiligen Zelle zur Bildung des jeweiligen Phänotyps führt, ermöglicht dies schlussendlich die Erarbeitung neuer therapeutischer Strategien. Grob umrissen könnte es dadurch möglich werden, die Bildung von antitumorösen (bzw. protumorösen) TAN gezielt zu fördern, oder zu hemmen. Die erst kürzlich klinisch etablierte CAR-T-Zell-Therapie zeigt eindrucksvoll auf, wieviel Potential eine derartige Herangehensweise mit sich bringen kann.

Im Rahmen unserer FACS-Analysen konnte eine Verringerung der CD15, sowie eine relative Erhöhung der CD66b Expression nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt konnte diese Ergebnisse entweder anhand der Funktion des Moleküls (Downregulation von CD15 wenn keine Extravasation stattfindet), sowie durch allgemein anerkannte Erkenntnisse (CD66b als prognostischer Faktor) plausibel erklärt werden. (Kerr and Stocks 1992; Carus et al. 2013; Sionov et al. 2015) Mit unseren bisherigen Daten nicht erklärbar, war das beobachtete Verhalten der G.diff. bzgl. CD14. Interessanterweise handelt es sich gerade bei diesem um einen typischen Marker der Hybridisierung neutrophiler Granulozyten. Eben diese Tatsache verleitet dazu, einen zugrundeliegenden Mechanismus zu vermuten, nicht zuletzt aufgrund des grundsätzlich passenden zeitlichen Verlaufs. Meiner Einschätzung nach rechtfertigen diese Daten definitiv eine genauere Analyse mit einem erweiterten Oberflächenmarkerprofil, welches spezifisch auf Hybride der Neutrophilen ausgelegt ist. Jedoch erfordert die kritisch-wissenschaftliche Betrachtung von Daten auch, einen überschießenden Enthusiasmus zu bremsen, da eine derartige Expression auch anderweitig erklärbar wäre nicht zuletzt durch die malignen Zellen selbst. Dem gegenüber kann allerdings entgegen gebracht werden, dass diese durch das initiale FSC/SSC-Gating eigentlich nicht in der Messung beinhaltet sein dürften. Es ist eben jenes Für und Wider, das durchaus eine genauere Untersuchung rechtfertigt. Eine weitere interessante Fragestellung ist, ob eine Variation der Zellzahl maligner Zellen zu einer Veränderung im Profil, und nicht zu-

letzt in der Funktion der G.diff. resultiert. Hierbei könnten die entstehenden TAN hinsichtlich ihrer Zytotoxizität verglichen werden.

Ingesamt lieferten die Experimente die erhofften Ergebnisse. Einerseits konnte die prinzipielle Durchführbarkeit der Methodik bestätigt, andererseits der Einfluss auf die Differenzierung der granulozytären Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich möchte ich erwähnen, dass dieses Modell nicht nur auf die Thematik der TAN begrenzt ist, sondern es ermöglicht, die selektive Interaktion des gesamten Zellspektrums mit Sphäroblasten-Tumorzellen zu beobachten. Abschließend möchte ich erneut das Potential betonen, welches in der Berücksichtigung des myeloischen Immunsystems im Rahmen maligner Erkrankungen steckt. Die Erfahrungen der Vergangenheit, in welcher dieses schlimmstenfalls komplett ignoriert, und der Fokus ausschließlich auf das lymphatische Immunsystem gelenkt wurde, haben speziell im Bereich der Checkpoint-Inhibitoren und der Tumorstimulation sehr schnell aufgezeigt, dass ohne ein solides Fundament, eine zufrieden stellende Funktion jeder „spezialisierten“ Zellen nicht gewährleistet werden kann. Eben jenes Fundament scheint jedoch gerade durch das „unspezifische“, myeloische Immunsystem gebildet zu werden, welches maßgeblich zur Heilung beitragen könnte. Die im Laufe seiner Entwicklung erworbenen Strategien des Tumors, scheinen in der großen Mehrzahl der Fälle jenes Fundament nicht zu destabilisieren, sondern sich dadurch selbst eine - nun protumoröse - Grundlage zu bilden.

Gerade in Zeiten, in denen durch die Etablierung von mRNA-Impfstoffen das Tor der Vakzinations-basierten Tumorthherapie wieder geöffnet wird, sollte die Chance nicht ungenutzt bleiben, und das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten des Immunsystems strukturiert entschlüsselt werden. Bestenfalls führt dies zur Etablierung effektiver neuer Therapiemöglichkeiten.

Literaturverzeichnis:

- Aaronson, S. A. (1991). Growth factors and cancer. *Science*, 254(5035), 1146-1153.
- Abi Abdallah, D. S., Egan, C. E., Butcher, B. A., & Denkers, E. Y. (2011). Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *International Immunology*, 23(5), 317-326.
- Abrams, S. I., & Waight, J. D. (2012). Identification of a G-CSF-Granulocytic MDSC axis that promotes tumor progression. *Oncoimmunology*, 1(4), 550-551.
- Acuff, H. B., Carter, K. J., Fingleton, B., Gorden, D. L., & Matrisian, L. M. (2006). Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Research*, 66(1), 259–266.
- Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews. Cancer*, 7(11), 834-846.
- Ahearn, J. M., & Fearon, D. T. (1989). Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Advances in Immunology Volume 46*, 183–219.
- Albert, M. L., Sauter, B., & Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted ctls. *Nature*, 392(6671), 86–89.
- Algarra, I., Cabrera, T., & Garrido, F. (2000). The HLA Crossroad in tumor immunology. *Human Immunology*, 61(1), 65–73.
- Almand, B., Clark, J. I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N. R., Knight, S. C., Carbone, D. P., & Gabrilovich, D. I. (2001). Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer. *The Journal of Immunology (1950)*, 166(1), 678-689.
- Amarante-Mendes, G. P., & Griffith, T. S. (2015). Therapeutic applications of trail receptor agonists in cancer and beyond. *Pharmacology & Therapeutics*, 155, 117–131
- Ancrile, B. B., O'Hayer, K. M., & Counter, C. M. (2008). Oncogenic Ras-induced expression of cytokines: A new target of Anti-Cancer Therapeutics. *Molecular Interventions*, 8(1), 22–27.
- Andrei, L., Kasas, S., Ochoa Garrido, I., Stanković, T., Suárez Korsnes, M., Vaclavikova, R., Assaraf, Y. G., & Pešić, M. (2020). Advanced technological tools to study multidrug resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*, 48, 100658.
- Araki, H., Katayama, N., Yamashita, Y., Mano, H., Fujieda, A., Usui, E., Mitani, H., Ohishi, K., Nishii, K., Masuya, M., Minami, N., Nobori, T., & Shiku, H. (2004). Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors. *Blood*, 103(8), 2973–2980.

- Arbeit, J. M., Howley, P. M., & Hanahan, D. (1996). Chronic Estrogen-Induced Cervical and Vaginal Squamous Carcinogenesis in Human Papillomavirus Type 16 Transgenic Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 93(7), 2930-2935.
- Ardi, V. C., Kupriyanova, T. A., Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2007). Human Neutrophils Uniquely Release TIMP-Free MMP-9 to Provide a Potent Catalytic Stimulator of Angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 104(51), 20262-20267.
- Ardi, V. C., Van den Steen, Philippe E, Opdenakker, G., Schweighofer, B., Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2009). Neutrophil MMP-9 Proenzyme, Unencumbered by TIMP-1, Undergoes Efficient Activation in Vivo and Catalytically Induces Angiogenesis via a Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2)/FGFR-2 Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(38), 25854-25866.
- Arnaout, M. A., Todd, R. F., Dana, N., Melamed, J., Schlossman, S. F., & Colten, H. R. (1983). Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (mol). *Journal of Clinical Investigation*, 72(1), 171–179.
- Arpinati, L., Shaul, M. E., Kaiser-Iluz, N., Mali, S., Mahroum, S., & Fridlender, Z. G. (2020). NETosis in cancer: a critical analysis of the impact of cancer on neutrophil extracellular trap (NET) release in lung cancer patients vs. mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 69(2), 199-213.
- Atzpodien, J., & Reitz, M. (2008). Peripheral Blood Neutrophils as Independent Immunologic Predictor of Response and Long-Term Survival upon Immunotherapy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 23(1), 129-134.
- Avalos, B. R., Gasson, J. C., Hedvat, C., Quan, S. G., Baldwin, G. C., Weisbart, R. H., Williams, R. E., Golde, D. W., & DiPersio, J. F. (1990). Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor: Biologic Activities and Receptor Characterization on Hematopoietic Cells and Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Blood*, 75(4), 851-857.
- Bai, R., Lv, Z., Xu, D., & Cui, J. (2020). Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomarker Research*, 8(1), 1-34.
- Balbín, M., Fueyo, A., Tester, A. M., Pendás, A. M., Pitiot, A. S., Astudillo, A., Overall, C. M., Shapiro, S. D., & López-Otín, C. (2003). Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nature genetics*, 35(3), 252–257.
- Balkwill, F. (2002). Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(2), 135–141.
- Balkwill, F., Charles, K. A., & Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7(3), 211-217.

- Baluk, P., Hashizume, H., & McDonald, D. M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current opinion in genetics & development*, 15(1), 102–111.
- Bancroft, G. J., Schreiber, R. D., & Unanue, E. R. (1991). Natural Immunity: A T-Cell-Independent Pathway of Macrophage Activation, Defined in the scid Mouse. *Immunological Reviews*, 124(1), 5-24.
- Barcellos-Hoff, M. H., & Dix, T. A. (1996). Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Molecular Endocrinology*, 10(9), 1077–1083.
- Barkan, D., Green, J.E., and Chambers, A.F. (2010). Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur. J. Cancer* 46, 1181–1188
- Barnes, D. E., & Lindahl, T. (2004). Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 445-476.
- Bellocq, A., Antoine, M., Flahault, A., Philippe, C., Crestani, B., Bernaudin, J. F., Mayaud, C., Milleron, B., Baud, L., & Cadranel, J. (1998). Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *The American journal of pathology*, 152(1), 83–92.
- Benlagha, K., & Bendelac, A. (2000). CD1d-restricted mouse V α 14 and human V α 24 T cells: lymphocytes of innate immunity. *Seminars in Immunology*, 12(6), 537-542.
- Berger-Achituv, S., Brinkmann, V., Abed, U. A., Kühn, L. I., Ben-Ezra, J., Elhasid, R., & Zychlinsky, A. (2013). A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoeediting. *Frontiers in Immunology*, 4, 48.
- Berx, G., & van Roy, F. (2009). Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6),
- Bhat, T. A., Panzica, L., Kalathil, S. G., & Thanavala, Y. (2015). Immune Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annals of the American Thoracic Society*, 12 Suppl 2(Suppl 2), S169–S175.
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015), 332–337.
- Bierie, B., & Moses, H. L. (2010). Transforming growth factor beta (TGF- β) and inflammation in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(1), 49-59.
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 6(8), 611-622.
- Bodduluru, L. N., Kasala, E. R., Madhana, R. M., & Sriram, C. S. (2014). Natural killer cells: The journey from puzzles in biology to treatment of cancer. *Cancer Letters*, 357(2), 454-467.
- Boland, C. R., Komarova, N. L., & Goel, A. (2009). Chromosomal instability and cancer: not just one CINgle mechanism. *Gut*, 58(2), 163-164.

- Boshoff, C., & Weiss, R. (2002). Aids-related malignancies. *Nature Reviews. Cancer*, 2(5), 373-382.
- Braun, B., Lange, M., Oeckler, R., & Mueller, M. (2004). Expression of G-CSF and GM-CSF in Human Meningiomas Correlates with Increased Tumor Proliferation and Vascularization. *Journal of Neuro-Oncology*, 68(2), 131-140.
- Brincks, E. L., Risk, M. C., & Griffith, T. S. (2013). PMN and anti-tumor immunity—The case of bladder cancer immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*, 23(3), 183-189.
- Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (36), 1724.
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *The Journal of Cell Biology*, 198(5), 773-783.
- Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Wen, Z., Schreiber, R. D., & Darnell, J. E. (1996). Transcriptionally active STAT1 is Required for the antiproliferative effects of both Interferon α and Interferon γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 93(15), 7673-7678.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H., & Gajrlovich, D. I. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature communications*, 7, 12150.
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in Tumor Research*, 1-27.
- Cameron, F., Whiteside, G., & Perry, C. (2011). Ipilimumab - first global approval. *Drugs*, 71(8), 1093-1104.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology*, 69(3), 4-10.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249-257.
- Carus, A., Ladekarl, M., Hager, H., Nedergaard, B. S., & Donskov, F. (2013). Tumour-associated CD66B+ neutrophil count is an independent prognostic factor for recurrence in localised cervical cancer. *British Journal of Cancer*, 108(10), 2116-2122.
- Caruso, R. A., Bellocco, R., Pagano, M., Bertoli, G., Rigoli, L., & Inferrera, C. (2002). Prognostic Value of Intratumoral Neutrophils in Advanced Gastric Carcinoma in a High-Risk Area in Northern Italy. *Modern Pathology*, 15(8), 831-837.

- Caruso, R. A., Speciale, G., & Inferrera, C. (1994). Neutrophil interaction with tumour cells in small early gastric cancer: ultrastructural observations. *Histology and histopathology*, 9(2), 295–303.
- Casbon, A., Reynaud, D., Park, C., Khuc, E., Gan, D. D., Schepers, K., Passequé, E., & Werb, Z. (2015). Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 112(6), E566-E575.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J. L., Nuñez, G., Dalton, W. S., & Jove, R. (1999). Constitutive Activation of Stat3 Signaling Confers Resistance to Apoptosis in Human U266 Myeloma Cells. *Immunity*, 10(1), 105-115.
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMS in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 118–132.
- Chambers, A. F., Wilson, S. M., Tuck, A. B., Denhardt, G. H., & Cairncross, J. G. (1990). Comparison of metastatic properties of a variety of mouse, rat, and human cells in assays in nude mice and chick embryos. *In vivo*, 4(4), 215–219.
- Cheah, M. T., Chen, J. Y., Sahoo, D., Contreras-Trujillo, H., Volkmer, A. K., Scheeren, F. A., Volkmer, J., & Weissman, I. L. (2015). CD14-expressing cancer cells establish the inflammatory and proliferative tumor microenvironment in bladder cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 112(15), 4725-4730.
- Chen, Q., Li, T., & Yue, W. (2018). Drug response to PD-1/PD-L1 blockade: based on biomarkers. *OncoTargets and Therapy*, 11, 4673-4683.
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming Growth Factor- β Signaling–Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Molecular Cancer Research*, 6(10), 1521-1533.
- Cheng, Y. C., & Ueno, N. T. (2011). Improvement of survival and prospect of cure in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer*, 19(3), 191-199.
- Chin, K., de Solorzano, C. O., Knowles, D., Jones, A., Chou, W., Rodriguez, E. G., Kuo, W. L., Ljung, B. M., Chew, K., Myambo, K., Miranda, M., Krig, S., Garbe, J., Stampfer, M., Yaswen, P., Gray, J. W., & Lockett, S. J. (2004). In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nature genetics*, 36(9), 984–988.
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, 40(2), 179-204.
- Clark, R. A., & Klebanoff, S. J. (1975). Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: Role of the peroxidase system. *The Journal of Experimental Medicine*, 141(6), 1442-1447.

- Clarke, S. J., Chua, W., Moore, M., Kao, S., Phan, V., Tan, C., Charles, K., & McMillan, D. C. (2011). Use of Inflammatory Markers to Guide Cancer Treatment. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 90(3), 475-478.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073-1081.
- Condamine, T., Dominguez, G. A., Youn, J. I., Kossenkov, A. V., Mony, S., Alicea-Torres, K., Tcyganov, E., Hashimoto, A., Nefedova, Y., Lin, C., Partlova, S., Garfall, A., Vogl, D. T., Xu, X., Knight, S. C., Malietzis, G., Lee, G. H., Eruslanov, E., Albelda, S. M., Wang, X., ... Gaborilovich, D. I. (2016). Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Science immunology*, 1(2), aaf8943.
- Cong, Y.-S., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2002). Human telomerase and its regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 407–425
- Contardi, E., Palmisano, G. L., Tazzari, P. L., Martelli, A. M., Falà, F., Fabbi, M., Kato, T., Lucarelli, E., Donati, D., Polito, L., Bolognesi, A., Ricci, F., Salvi, S., Gargaglione, V., Mantero, S., Alberghini, M., Ferrara, G. B., & Pistillo, M. P. (2005). CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *International Journal of Cancer*, 117(4), 538-550.
- Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., Bourdeau, F., Kubes, P., & Ferri, L. (2013). Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(8), 3446-3458.
- Cooper, P. R., Palmer, L. J., & Chapple, I. L. C. (2013). Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontology 2000*, 63(1), 165-197.
- Coughlin, C. M., Salhany, K. E., Gee, M. S., LaTemple, D. C., Kotenko, S., Ma, X., Gri, G., Wysocka, M., Kim, J. E., Liu, L., Liao, F., Farber, J. M., Pestka, S., Trinchieri, G., & Lee, W. M. F. (1998). Tumor Cell Responses to IFN γ Affect Tumorigenicity and Response to IL-12 Therapy and Antiangiogenesis. *Immunity*, 9(1), 25-34.
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867.
- Coussens, L. M., Hanahan, D., & Arbeit, J. M. (1996). Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *The American Journal of Pathology*, 149(6), 1899-1917.
- Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D., & Werb, Z. (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, 103(3), 481–490.

- Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2015). Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 39, 26-34.
- Curto, M., Cole, B. K., Lallemand, D., Liu, C., & McClatchey, A. I. (2007). Contact-Dependent Inhibition of EGFR Signaling by Nf2/Merlin. *The Journal of Cell Biology*, 177(5), 893-903.
- Dabas, N., Byrnes, D. M., Rosa, A. M., Eller, M. S., & Grichnik, J. M. (2012). Diagnostic role of chromosomal instability in melanoma. *Journal of Skin Cancer*, 2012, 1–7.
- Daley, J. M., Thomay, A. A., Connolly, M. D., Reichner, J. S., & Albina, J. E. (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(1), 64-70.
- Dallegri, F., Ottonello, L., Ballestrero, A., Dapino, P., Ferrando, F., Patrone, F., & Sacchetti, C. (1991). Tumor cell lysis by activated human neutrophils: Analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation*, 15(1), 15-30. 10.1007/BF00917906
- Dallegri, F., Patrone, F., Frumento, G., & Sacchetti, C. (1984). Antibody-Dependent Killing of Tumor Cells by Polymorphonuclear Leukocytes. Involvement of Oxidative and Nonoxidative Mechanisms. *JNCI : Journal of the National Cancer Institute*, 73(2), 331-339.
- Daniel, D., Chiu, C., Giraud, E., Inoue, M., Mizzen, L. A., Chu, N. R., & Hanahan, D. (2005). CD4+ T Cell-Mediated Antigen-Specific Immunotherapy in a Mouse Model of Cervical Cancer. *Cancer Research*, 65(5), 2018-2025.
- Daniel, D., Meyer-Morse, N., Bergsland, E. K., Dehne, K., Coussens, L. M., & Hanahan, D. (2003). Immune Enhancement of Skin Carcinogenesis by CD4+T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(8), 1017-1028.
- De Larco, J. E., Wuertz, B. R., & Furcht, L. T. (2004). The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clinical Cancer Research*, 10(15), 4895–4900.
- De Sanctis, F., Solito, S., Ugel, S., Molon, B., Bronte, V., & Marigo, I. (2016). MDSCs in cancer: Conceiving new prognostic and therapeutic targets. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1865(1), 35-48.
- de Visser, K. E., Eichten, A., & Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews. Cancer*, 6(1), 24–37.
- de Visser, K. E., Korets, L. V., & Coussens, L. M. (2005). De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*, 7(5), 411-423.
- De Visser, K. E., Schumacher, T. N., & Kruisbeek, A. M. (2003). CD8+ T cell tolerance and cancer immunotherapy. *Journal of immunotherapy*, 26(1), 1–11.

- Demers, M., Krause, D. S., Schatzberg, D., Martinod, K., Voorhees, J. R., Fuchs, T. A., Scadden, D. T., & Wagner, D. D. (2012). Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, *109*(32), 13076-13081.
- Demicheli, R., Retsky, M. W., Hrushesky, W. J. M., Baum, M., & Gukas, I. D. (2008). The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. *Annals of Oncology*, *19*(11), 1821-1828.
- DeNardo, D. G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, *29*(2), 309-316.
- Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2008). Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and Cell Biology*, *130*(6), 1119-1130.
- Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2015). Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biology*, *44-46*, 94-112.
- Deryugina, E. I., Zajac, E., Juncker-Jensen, A., Kupriyanova, T. A., Welter, L., & Quigley, J. P. (2014). Tissue-Infiltrating Neutrophils Constitute the Major In Vivo Source of Angiogenesis-Inducing MMP-9 in the Tumor Microenvironment. *Neoplasia*, *16*(10), 771-788.
- Di Carlo, E., Forni, G., Lollini, P., Colombo, M. P., Modesti, A., & Musiani, P. (2001). The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood*, *97*(2), 339-345.
- Di Paolo, N. C., & Shayakhmetov, D. M. (2016). Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nature Immunology*, *17*(8), 906–913.
- Diamond, M. S., Staunton, D. E., de Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M. L., & Springer, T. A. (1990). ICAM-1 (CD54): A counter-receptor for mac-1 (CD11B/CD18). *Journal of Cell Biology*, *111*(6), 3129–3139.
- Diaz-Montero, C. M., Salem, M. L., Nishimura, M. I., Garrett-Mayer, E., Cole, D. J., & Montero, A. J. (2008). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *58*(1), 49-59.
- Dinh, H. Q., Eggert, T., Meyer, M. A., Zhu, Y. P., Olingy, C. E., Llewellyn, R., Wu, R., & Hedrick, C. C. (2020). Coexpression of CD71 and CD117 Identifies an Early Unipotent Neutrophil Progenitor Population in Human Bone Marrow. *Immunity*, *53*(2), 319–334.e6.
- Dissemond, J., Weimann, T. K., Schneider, L. A., Schneeberger, A., Scharffetter-Kochanek, K., Goos, M., & Wagner, S. N. (2003). Activated Neutrophils Exert Antitumor Activity Against Human Melanoma Cells: Reactive Oxygen Species-Induced Mecha-

nisms and Their Modulation by Granulocyte-Macrophage–Colony-Stimulating Factor. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(4), 936-938.

- Doi, K., Horiuchi, T., Uchinami, M., Tabo, T., Kimura, N., Yokomachi, J., Yoshida, M., & Tanaka, K. (2002). Neutrophil Elastase Inhibitor Reduces Hepatic Metastases Induced by Ischaemia-Reperfusion in Rats. *The European Journal of Surgery*, 168(8), 507-510.
- Donskov, F. (2013). Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Seminars in Cancer Biology*, 23(3), 200-207.
- Ducray, C., Pommier, J.-P., Martins, L., Boussin, F. D., & Sabatier, L. (1999). Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process. *Oncogene*, 18(29), 4211–4223.
- Dumitru, C. A., Fechner, M. K., Hoffmann, T. K., Lang, S., & Brandau, S. (2012). A novel p38-MAPK signaling axis modulates neutrophil biology in head and neck cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 91(4), 591-598.
- Dumitru, C. A., Gholaman, H., Trellakis, S., Bruderek, K., Dominas, N., Gu, X., Bankfalvi, A., Whiteside, T. L., Lang, S., & Brandau, S. (2011). Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor modulates the biology of head and neck cancer cells via neutrophil activation. *International Journal of Cancer*, 129(4), 859-869.
- Dumitru, C. A., Lang, S., & Brandau, S. (2013). Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: Mechanisms and consequences for tumor progression. *Seminars in Cancer Biology*, 23(3), 141-148.
- Dumitru, C. A., Moses, K., Trellakis, S., Lang, S., & Brandau, S. (2012). Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(8), 1155-1167.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoeediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998.
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 329-360.
- Ebrahem, Q., Chaurasia, S. S., Vasanji, A., Qi, J. H., Klenotic, P. A., Cutler, A., Asosingh, K., Erzurum, S., & Anand-Apte, B. (2010). Cross-Talk between Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinases in the Induction of Neovascularization in Vivo. *The American Journal of Pathology*, 176(1), 496-503.
- Ehrlich, P. (1908). Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 5, 273–290.
- Elder, G. J., Hersey, P., & Branley, P. (1997). Remission of transplanted melanoma—clinical course and tumour cell characterisation. *Clinical transplantation*, 11(6), 565–568.

- Elliott, L. A., Doherty, G. A., Sheahan, K., & Ryan, E. J. (2017). Human tumor-infiltrating myeloid cells: phenotypic and functional diversity. *Frontiers in Immunology*, 8, 86.
- Eruslanov, E. B. (2017). Phenotype and function of tumor-associated neutrophils and their subsets in early-stage human lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(8), 997-1006.
- Eruslanov, E. B., Bhojnarwala, P. S., Quatromoni, J. G., Stephen, T. L., Ranganathan, A., Deshpande, C., Akimova, T., Vachani, A., Litzky, L., Hancock, W. W., Conejo-Garcia, J. R., Feldman, M., Albelda, S. M., & Singhal, S. (2014). Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(12), 5466-5480.
- Evan, G. I., & Juntila, M. R. (2009). p53 - a Jack of all trades but master of none. *Nature Reviews. Cancer*, 9(11), 821-829.
- Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, 92(3), 329-333.
- Ferrara, N. (2009). Vascular Endothelial Growth Factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(6), 789-791.
- Filipazzi, P., Huber, V., & Rivoltini, L. (2012). Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(2), 255-263.
- Filipazzi, P., Valenti, R., Huber, V., Pilla, L., Canese, P., Iero, M., Castelli, C., Mariani, L., Parmiani, G., & Rivoltini, L. (2007). Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(18), 2546-2553.
- Finch, C. E., & Crimmins, E. M. (2004). Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. *Science*, 305(5691), 1736-1739
- Flaschka P. (2020). Interaction of human lung cancer cells with neutrophil granulocytes in 3D cell culture and in CAM Assay. *Bachelorarbeit, FH Johanneum*.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1(1), 27-30.
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology*, 29(6), 15-18.
- Fridlender, Z. G., & Albelda, S. M. (2012). Tumor-associated neutrophils: Friend or foe? *Carcinogenesis*, 33(5), 949-955.

- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., & Albelda, S. M. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*, 16(3), 183-194.
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Cheng, G., Kapoor, V., Horng, W., Fridlender, G., Bayuh, R., Worthen, G. S., & Albelda, S. M. (2012). Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PloS One*, 7(2), e31524.
- Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 298–306.
- Gabhann, F. M., & Popel, A. S. (2008). Systems Biology of Vascular Endothelial Growth Factors. *Microcirculation*, 15(8), 715-738.
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews. Immunology*, 12(4), 253-268. 10.1038/nri3175
- Gabrilovich, D. I., Velders, M. P., Sotomayor, E. M., & Kast, W. M. (2001). Mechanism of Immune Dysfunction in Cancer Mediated by Immature Gr-1+ Myeloid Cells. *The Journal of Immunology* (1950), 166(9), 5398-5406.
- Gaida, M. M., Steffen, T. G., Günther, F., Tschaharganeh, D. F., Felix, K., Bergmann, F., Schirmacher, P., & Hänsch, G. M. (2012). Polymorphonuclear neutrophils promote dyshesion of tumor cells and elastase-mediated degradation of E-cadherin in pancreatic tumors. *European Journal of Immunology*, 42(12), 3369–3380.
- Galdiero, M. R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., & Jaillon, S. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*, 218(11), 1402–1410.
- Galdiero, M. R., Marone, G., & Mantovani, A. (2018). Cancer Inflammation and Cytokines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(8), a028662.
- Gao, D., Joshi, N., Choi, H., Ryu, S., Hahn, M., Catena, R., Sadik, H., Argani, P., Wagner, P., Vahdat, L. T., Port, J. L., Stiles, B., Sukumar, S., Altorki, N. K., Raffi, S., & Mittal, V. (2012). Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition. *Cancer Research*, 72(6), 1384–1394.
- Gearhart, J., Pashos, E. E., & Prasad, M. K. (2007). Pluripotency Redux — advances in stem-cell research. *New England Journal of Medicine*, 357(15), 1469–1472.
- Gebhardt, C., Sevko, A., Jiang, H., Lichtenberger, R., Reith, M., Tarnanidis, K., Holland-Letz, T., Umansky, L., Beckhove, P., Sucker, A., Schadendorf, D., Utikal, J., & Umansky, V. (2015). Myeloid cells and related chronic inflammatory factors as novel predictive markers in melanoma treatment with ipilimumab. *Clinical Cancer Research*, 21(24), 5453-5459.

- Geng, S., Matsushima, H., Okamoto, T., Yao, Y., Lu, R., Page, K., Blumenthal, R. M., Ward, N. L., Miyazaki, T., & Takashima, A. (2013). Emergence, origin, and function of neutrophil–dendritic cell hybrids in experimentally induced inflammatory lesions in mice. *Blood*, *121*(10), 1690–1700.
- Gerlini, G., Tun-Kyi, A., Dudli, C., Burg, G., Pimpinelli, N., & Nestle, F. O. (2004). Metastatic melanoma secreted Il-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions. *The American Journal of Pathology*, *165*(6), 1853–1863.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., & Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *195*(3), 327-333.
- Gerrard, T. L., Cohen, D. J., & Kaplan, A. M. (1981). Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute*, *66*(3), 483–488.
- Gervais, A., Levêque, J., Bouet-Toussaint, F., Burtin, F., Lesimple, T., Sulpice, L., Patard, J., Genetet, N., & Catros-Quemener, V. (2005). Dendritic cells are defective in breast cancer patients: a potential role for polyamine in this immunodeficiency. *Breast Cancer Research*, *7*(3), R326-R335.
- Gholamin, M., Moaven, O., Memar, B., Farshchian, M., Naseh, H., Malekzadeh, R., Sotoudeh, M., Rajabi-Mashhadi, M. T., Forghani, M. N., Farrokhi, F., & Abbaszadegan, M. R. (2009). Overexpression and Interactions of Interleukin-10, Transforming Growth Factor β , and Vascular Endothelial Growth Factor in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *World Journal of Surgery*, *33*(7), 1439-1445.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P. (1973). In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors. *JNCI : Journal of the National Cancer Institute*, *51*(5), 1417-1423.
- Gijsbers, K., Gouwy, M., Struyf, S., Wuyts, A., Proost, P., Opdenakker, G., Penninckx, F., Ectors, N., Geboes, K., & Van Damme, J. (2005). GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated with angiogenesis in gastrointestinal tumors. *Experimental Cell Research*, *303*(2), 331-342.
- Ginzberg, H. H., Cherapanov, V., Dong, Q., Cantin, A., McCulloch, C. A., Shannon, P. T., & Downey, G. P. (2001). Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *281*(3), 705-717.
- Goodrich, D. W., Wang, N. P., Qian, Y.-W., Lee, E. Y.-H. P., & Lee, W.-H. (1991). The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, *67*(2), 293–302.
- Granot, Z., Henke, E., Comen, E., King, T., Norton, L., & Benezra, R. (2011). Tumor Entrained Neutrophils Inhibit Seeding in the Premetastatic Lung. *Cancer Cell*, *20*(3), 300-314.

- Greenhough, A., Smartt, H. J. M., Moore, A. E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C., & Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis (New York)*, 30(3), 377-386.
- Gregory, A. D., & Houghton, A. M. (2011). Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer research*, 71(7), 2411–2416.
- Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z.-W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., & Karin, M. (2004). IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, 118(3), 285–296.
- Griffiths, A. P., Rice, A., & Dixon, M. F. (1998). Anaplastic gastric adenocarcinoma with extensive neutrophilic infiltration. *Histopathology*, 33(4), 392–392.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Große-Steffen, T., Giese, T., Giese, N., Longerich, T., Schirmacher, P., Hänsch, G. M., & Gaida, M. M. (2012). Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Pancreatic Tumor Cell Lines: The Role of Neutrophils and Neutrophil-Derived Elastase. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, 1-12.
- Guthrie, G. J. K., Charles, K. A., Roxburgh, C. S. D., Horgan, P. G., McMillan, D. C., & Clarke, S. J. (2013). The systemic inflammation-based neutrophil–lymphocyte ratio: Experience in patients with cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 88(1), 218-230.
- Halazun, K. J., Hardy, M. A., Rana, A. A., Woodland, D. C., Luyten, E. J., Mahadev, S., Witkowski, P., Siegel, A. B., Brown, R. S., & Emond, J. C. (2009). Negative impact of Neutrophil-lymphocyte ratio on outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgery*, 250(1), 141–151.
- Hanahan, D., Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., & Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2(10), 737-744.
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353–364.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hansel, D. E., Meeker, A. K., Hicks, J., De Marzo, A. M., Lillemoe, K. D., Schulick, R., Hruban, R. H., Maitra, A., & Argani, P. (2006). Telomere length variation in biliary tract metaplasia, dysplasia, and carcinoma. *Modern Pathology*, 19(6), 772-779.

- Haqqani, A. S., Sandhu, J. K., & Birnboim, H. C. (2000). Expression of Interleukin-8 Promotes Neutrophil Infiltration and Genetic Instability in Mutated Tumors. *Neoplasia*, 2(6), 561-568.
- Hayakawa, Y., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Darcy, P. K., Diefenbach, A., Raulet, D., & Smyth, M. J. (2002). Cutting Edge: Tumor Rejection Mediated by NKG2D Receptor-Ligand Interaction Is Dependent upon Perforin. *The Journal of Immunology*, 169(10), 5377-5381.
- Heiss, M. M., Allgayer, H., Gruetzner, K. U., Funke, I., Babic, R., Jauch, K.-W., & Schildberg, F. W. (1995). Individual development and UPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: A reference to early systemic disease in solid cancer. *Nature Medicine*, 1(10), 1035-1039.
- Herr, H. W., & Morales, A. (2008). History of Bacillus Calmette-Guerin and Bladder Cancer: An Immunotherapy Success Story. *The Journal of Urology*, 179(1), 53-56.
- Hettinger, J., Richards, D. M., Hansson, J., Barra, M. M., Joschko, A., Krijgsveld, J., & Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology*, 14(8), 821-830.
- Hicks, A. M., Riedlinger, G., Willingham, M. C., Alexander-Miller, M. A., Von Kap-Herr, C., Pettenati, M. J., Sanders, A. M., Weir, H. M., Du, W., Kim, J., Simpson, A. J. G., Old, L. J., & Cui, Z. (2006). Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 103(20), 7753-7758.
- Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J. M., Senior, R. M., & Shibuya, M. (2002). MMP9 induction by Vascular Endothelial Growth Factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*, 2(4), 289-300.
- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H., & Maru, Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nature Cell Biology*, 8(12), 1369-1375.
- Hodge-Dufour, J., Noble, P. W., Horton, M. R., Bao, C., Wysoka, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Trinchieri, G., & Puré, E. (1997). Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *Journal of immunology*, 159(5), 2492-2500.
- Holmes, N. (2006). CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology*, 117(2), 145-155.
- Hordyjewska, A., Popiołek, Ł., & Horecka, A. (2014). Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cytotechnology*, 67(3), 387-396.
- Hsu, D. M., Agarwal, S., Benham, A., Coarfa, C., Trahan, D. N., Chen, Z., Stowers, P. N., Courtney, A. N., Lakoma, A., Barbieri, E., Metelitsa, L. S., Gunaratne, P., Kim, E. S., & Shohet, J. M. (2013). G-CSF receptor positive neuroblastoma subpopulations are enriched in chemotherapy-resistant or relapsed tumors and are highly tumorigenic. *Cancer Research*, 73(13), 4134-4146.

- Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., & Levitsky, H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science*, 264(5161), 961–965.
- Huang, B., Lei, Z., Zhao, J., Gong, W., Liu, J., Chen, Z., Liu, Y., Li, D., Yuan, Y., Zhang, G., & Feng, Z. (2006). CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers. *Cancer Letters*, 252(1), 86-92.
- Hughes, C. S., Postovit, L. M., & Lajoie, G. A. (2010). Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 10(9), 1886-1890.
- Hugo, H., Ackland, M. L., Blick, T., Lawrence, M. G., Clements, J. A., Williams, E. D., & Thompson, E. W. (2007). Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 374-383.
- Huh, S. J., Liang, S., Sharma, A., Dong, C., & Robertson, G. P. (2010). Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. *Cancer Research*, 70(14), 6071–6082.
- Iking-Konert, C. (2005). Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: Evidence for activation by T cells. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(10), 1436–1442.
- Iking-Konert, C., Csekö, C., Wagner, C., Stegmaier, S., Andrassy, K., & Hänsch, M. (2001). Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *Journal of Molecular Medicine*, 79(8), 464-474.
- Ilie, M., Hofman, V., Ortholan, C., Bonnetaud, C., Coëlle, C., Mouroux, J., & Hofman, P. (2012). Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 118(6), 1726-1737.
- Iliopoulos, D., Ernst, C., Steplewski, Z., Jambrosic, J. A., Rodeck, U., Herlyn, M., Clark, W. H., Koprowski, H., & Herlyn, D. (1989). Inhibition of metastases of a human melanoma xenograft by monoclonal antibody to the GD2/GD3 gangliosides. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 81(6), 440–444.
- Imada, A., Shijubo, N., Kojima, H., & Abe, S. (2000). Mast cells correlate with angiogenesis and poor outcome in stage I lung adenocarcinoma. *The European Respiratory Journal*, 15(6), 1087-1093.
- Imai, Y., Imai, Y., Kubota, Y., Yamamoto, S., Tsuji, K., Shimatani, M., Shibatani, N., Takamido, S., Matsushita, M., & Okazaki, K. (2005). Neutrophils enhance invasion activity of human cholangiocellular carcinoma and hepatocellular carcinoma cells: An in vitro study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20(2), 287–293.

- Ivascu, A., & Kubbies, M. (2006). Rapid Generation of Single-Tumor Spheroids for High-Throughput Cell Function and Toxicity Analysis. *Journal of Biomolecular Screening*, 11(8), 922-932.
- Jablonska, J., Leschner, S., Westphal, K., Lienenklaus, S., & Weiss, S. (2010). Neutrophils responsive to endogenous IFN- β regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1151-1164.
- Jaffe, E. S., & Pittaluga, S. (2011). Aggressive B cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. *Hematology*, 2011(1), 506-514.
- Jakowlew, S. (2006). Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3), 435-457.
- Jayaraman, P., Parikh, F., Lopez-Rivera, E., Hailemichael, Y., Clark, A., Ma, G., Cannan, D., Ramacher, M., Kato, M., Overwijk, W. W., Chen, S., Umansky, V. Y., & Sikora, A. G. (2012). Tumor-expressed inducible nitric oxide synthase controls induction of functional myeloid-derived suppressor cells through modulation of vascular endothelial growth factor release. *The Journal of Immunology (1950)*, 188(11), 5365-5376.
- Jensen, H. K., Donskov, F., Marcussen, N., Nordmark, M., Lundbeck, F., & von der Maase, H. (2009). Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27(28), 4709–4717.
- Jiang, B., & Liu, L. (2008). PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, 1784(1), 150-158.
- Jiang, H., Gebhardt, C., Umansky, L., Beckhove, P., Schulze, T. J., Utikal, J., & Umansky, V. (2014). Elevated chronic inflammatory factors and myeloid-derived suppressor cells indicate poor prognosis in advanced melanoma patients. *International Journal of Cancer*, 136(10), 2352–2360.
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development*, 23(5), 537-548.
- Jorch, S. K., & Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in non-infectious disease. *Nature Medicine*, 23(3), 279–287.
- Jordan, K. R., Amaria, R. N., Ramirez, O., Callihan, E. B., Gao, D., Borakove, M., Mantey, E., Borges, V. F., & McCarter, M. D. (2013). Myeloid-derived suppressor cells are associated with disease progression and decreased overall survival in advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(11), 1711-1722.
- Junttila, M. R., & Evan, G. I. (2009). P53 — a jack of all trades but master of none. *Nature Reviews Cancer*, 9(11), 821–829.
- Kaliss N. (1958). Immunological enhancement of tumor homografts in mice: a review. *Cancer research*, 18(9), 992–1003.

- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an Interferon γ -dependent Tumor Surveillance System in Immunocompetent Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 95(13), 7556-7561.
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K. K., ... Lyden, D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), 820–827.
- Kapsenberg, M. (1999). The concept of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. *Immunology Letters*, 69(1), 5–6.
- Karavitis, J., & Zhang, M. (2013). COX2 regulation of breast cancer bone metastasis. *Oncimmunology*, 2(3), e23129.
- Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews. Immunology*, 5(10), 749-759.
- Katano, M., & Torisu, M. (1982). Neutrophil-mediated tumor cell destruction in cancer ascites. *Cancer*, 50(1), 62–68.
- Kawai, T., Hiroi, S., Nakanishi, K., & Meeker, A. K. (2007). Telomere length and telomerase expression in atypical adenomatous hyperplasia and small bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *American Journal of Clinical Pathology*, 127(2), 254–262.
- Kemp, T. J., Ludwig, A. T., Earel, J. K., Moore, J. M., VanOosten, R. L., Moses, B., Leidal, K., Nauseef, W. M., & Griffith, T. S. (2005). Neutrophil stimulation with mycobacterium bovis bacillus calmette-guérin (BCG) results in the release of functional soluble trail/APO-2L. *Blood*, 106(10), 3474–3482.
- Kennedy, K. M., & Dewhirst, M. W. (2010). Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncology*, 6(1), 127-148.
- Kerr, M. A., & Stocks, S. C. (1992). The role of CD15-(Le(X))-related carbohydrates in neutrophil adhesion. *The Histochemical Journal*, 24(11), 811-826.
- Keskinov, A. A., & Shurin, M. R. (2014). Myeloid regulatory cells in tumor spreading and metastasis. *Immunobiology (1979)*, 220(2), 236-242.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*, 141(1), 52-67.
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1-14.
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386(6627), 761–763.

- Kitchens, R. L. (2000). Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chemical Immunology*, 74, 61-82.
- Klemen, N. D., Wang, M., Feingold, P. L., Cooper, K., Pavri, S. N., Han, D., Detterbeck, F. C., Boffa, D. J., Khan, S. A., Olino, K., Clune, J., Ariyan, S., Salem, R. R., Weiss, S. A., Kluger, H. M., Sznol, M., & Cha, C. (2019). Patterns of failure after immunotherapy with checkpoint inhibitors predict durable progression-free survival after local therapy for metastatic melanoma. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 7(1), 196.
- Klingenberg, M., Becker, J., Eberth, S., Kube, D., & Wilting, J. (2014). The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. *BMC Cancer*, 14(1), 339.
- Knaapen, A. M., Güngör, N., Schins, R. P. F., Borm, P. J. A., & Van Schooten, F. J. (2006). Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis*, 21(4), 225-236.
- Knudson A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1(2), 157–162.
- Kobashi, Y., Okimoto, N., & Sakamoto, K. (2004). Squamous cell carcinoma of the lung producing granulocyte colony-stimulating factor and resembling a malignant pleural mesothelioma. *Internal medicine*, 43(2), 111–116.
- Kobayashi Y. (2006). Neutrophil infiltration and chemokines. *Critical reviews in immunology*, 26(4), 307–316.
- Kobayashi, Y. (2008). The role of chemokines in neutrophil biology. *Frontiers in Bioscience*, 13(13), 2400-2407.
- Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Whitney, A. R., & DeLeo, F. R. (2005). Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(6), 1408-1418.
- Köffel, R., Meshcheryakova, A., Warszawska, J., Hennig, A., Wagner, K., Jörgl, A., Gubi, D., Moser, D., Hladik, A., Hoffmann, U., Fischer, M. B., van den Berg, W., Koenders, M., Scheinecker, C., Gesslbauer, B., Knapp, S., & Strobl, H. (2014). Monocytic cell differentiation from band-stage neutrophils under inflammatory conditions via MKK6 activation. *Blood*, 124(17), 2713–2724.
- Korkmaz, B., Moreau, T., & Gauthier, F. (2008). Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*, 90(2), 227-242.
- Kowanetz, M., Wu, X., Lee, J., Tan, M., Hagenbeek, T., Qu, X., Yu, L., Ross, J., Korsisaari, N., Cao, T., Bou-Reslan, H., Kallop, D., Weimer, R., Ludlam, M. J. C., Kaminker, J. S., Modrusan, Z., van Bruggen, N., Peale, F. V., Carano, R., . . . Ferrara, N. (2010). Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 107(50),

- Krenn-Pilko, S., Langsenlehner, U., Thurner, E. M., Stojakovic, T., Pichler, M., Gerger, A., Kapp, K. S., & Langsenlehner, T. (2014). The elevated preoperative platelet-to-lymphocyte ratio predicts poor prognosis in breast cancer patients. *British journal of cancer*, *110*(10), 2524–2530.
- Kroschinsky, F., Stölzel, F., von Bonin, S., Beutel, G., Kochanek, M., Kiehl, M., & Schellongowski, P. (2017). New drugs, new toxicities: Severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Critical Care*, *21*(1), 89.
- Kuang, D., Zhao, Q., Peng, C., Xu, J., Zhang, J., Wu, C., & Zheng, L. (2009). Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(6), 1327-1337.
- Kuang, D. M., Zhao, Q., Wu, Y., Peng, C., Wang, J., Xu, Z., Yin, X. Y., & Zheng, L. (2011). Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, *54*(5), 948–955.
- Kumar, A., Commane, M., Flickinger, T. W., Horvath, C. M., & Stark, G. R. (1997). Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science*, *278*(5343), 1630–1632.
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., & Gaborilovich, D. I. (2016). The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in Immunology*, *37*(3), 208-220.
- Kushner, B. H., & Cheung, N. K. (1992). Absolute requirement of CD11/CD18 adhesion molecules, FcRII and the phosphatidylinositol-linked FcRIII for monoclonal antibody-mediated neutrophil antihuman tumor cytotoxicity. *Blood*, *79*(6), 1484–1490.
- Kusmartsev, S., Cheng, F., Yu, B., Nefedova, Y., Sotomayor, E., Lush, R., & Gaborilovich, D. (2003). All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer research*, *63*(15), 4441–4449.
- Kusmartsev, S., Nagaraj, S., & Gaborilovich, D. I. (2005). Tumor-Associated CD8+ T Cell Tolerance Induced by Bone Marrow-Derived Immature Myeloid Cells. *The Journal of Immunology (1950)*, *175*(7), 4583-4592.
- Labrousse, A., Ntayi, C., Hornebeck, W., & Bernard, P. (2004). Stromal reaction in cutaneous melanoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *49*(3), 269-275.
- Lacroix, M. (2006). Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, *13*(4), 1033-1067.
- Lang, S., Bruderek, K., Kaspar, C., Höing, B., Kanaan, O., Dominas, N., Hussain, T., Droege, F., Eyth, C., Hadaschik, B., & Brandau, S. (2018). Clinical Relevance and Suppressive Capacity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *24*(19), 4834–4844.

- Larson, R. S., & Springer, T. A. (1990). Structure and Function of Leukocyte Integrins. *Immunological Reviews*, 114(1), 181-217.
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., Greenfield, E. A., Bourque, K., Boussiotis, V. A., Carter, L. L., Carreno, B. M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A. H., ... Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*, 2(3), 261–268.
- Lazennec, G., & Richmond, A. (2010). Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, 16(3), 133-144.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science*, 271(5256), 1734-1736.
- Lee, W. L., & Downey, G. P. (2001). Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 164(5), 896–904.
- Leek, R. D., Lewis, C. E., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J., & Harris, A. L. (1996). Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer research*, 56(20), 4625–4629.
- Leek, R. D., Landers, R. J., Harris, A. L., & Lewis, C. E. (1999). Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *British journal of cancer*, 79(5-6), 991–995.
- Lehrer, R., & Ganz, T. (1990). Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood*, 76(11), 2169-2181.
- Leliefeld, P. H., Koenderman, L., & Pillay, J. (2015). How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 6, 471.
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643-649.
- Levy, L., & Hill, C. S. (2006). Alterations in components of the TGF- β superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17(1), 41-58.
- Lichtenstein, A., & Kahle, J. (1985). Anti-tumor effect of inflammatory neutrophils: Characteristics of in vivo generation and in vitro tumor cell lysis. *International Journal of Cancer*, 35(1), 121-127.
- Liou, T. G., & Campbell, E. J. (1996). Quantum proteolysis resulting from release of single granules by human neutrophils: a novel, nonoxidative mechanism of extracellular proteolytic activity. *Journal of immunology*, 157(6), 2624–2631.

- Loeb L. A. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer research*, 51(12), 3075–3079.
- Lokman, N. A., Elder, A. S. F., Ricciardelli, C., & Oehler, M. K. (2012). Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an In Vivo Model to Study the Effect of Newly Identified Molecules on Ovarian Cancer Invasion and Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 9959-9970.
- Loukinova, E., Dong, G., Enamorado-Ayalya, I., Thomas, G. R., Chen, Z., Schreiber, H., & Van Waes, C. (2000). Growth regulated oncogene-alpha expression by murine squamous cell carcinoma promotes tumor growth, metastasis, leukocyte infiltration and angiogenesis by a host CXC receptor-2 dependent mechanism. *Oncogene*, 19(31), 3477–3486.
- Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307–315.
- Ludwig, A. T., Moore, J. M., Luo, Y., Chen, X., Saltsgaver, N. A., O'Donnell, M. A., & Griffith, T. S. (2004). Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand: A Novel Mechanism for Bacillus Calmette-Guerin-Induced Antitumor Activity. *Cancer Research*, 64(10), 3386-3390.
- Luo, J., Maeda, S., Hsu, L., Yagita, H., & Karin, M. (2004). Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*, 6(3), 297-305.
- Luster, A. D., & Leder, P. (1993). IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 178(3), 1057–1065.
- Mac Gabhann, F., & Popel, A. S. (2008). Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation*, 15(8), 715–738.
- Mackie, R. M., Reid, R., & Junor, B. (2003). Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *The New England journal of medicine*, 348(6), 567–568.
- Macleod K. (2000). Tumor suppressor genes. *Current opinion in genetics & development*, 10(1), 81–93.
- MacMicking, J., Xie, Q., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, 15(1), 323-350.
- Malipiero, U., Koedel, U., Pfister, H., Levéen, P., Bürki, K., Reith, W., & Fontana, A. (2006). TGF β receptor II gene deletion in leucocytes prevents cerebral vasculitis in bacterial meningitis. *Brain*, 129(9), 2404-2415.
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169(3), 381-405.

- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology*, 229(2), 176-185. 1
- Mantovani, A., & Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current Opinion in Immunology*, 22(2), 231-237. 10.1016/j.coi.2010.01.009
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*, 23(11), 549–555.
- Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J., & Ferrone, S. (2000). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Advances in immunology*, 74, 181–273.
- Martínez-Lorenzo, M. J., Alava, M. A., Gamen, S., Kim, K. J., Chuntharapai, A., Piñeiro, A., Naval, J., & Anel, A. (1998). Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *European journal of immunology*, 28(9), 2714–2725.
- Matsushima, H., Geng, S., Lu, R., Okamoto, T., Yao, Y., Mayuzumi, N., Kotol, P. F., Chojnacki, B. J., Miyazaki, T., Gallo, R. L., & Takashima, A. (2013). Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*, 121(10), 1677-1689.
- Houghton A. M. (2010). The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell cycle*, 9(9), 1732–1737.
- McGarry Houghton, A. M., Rzymkiewicz, D. M., Ji, H., Gregory, A. D., Egea, E. E., Metz, H. E., Stolz, D. B., Land, S. R., Marconcini, L. A., Kliment, C. R., Jenkins, K. M., Beaulieu, K. A., Mouded, M., Frank, S. J., Wong, K. K., & Shapiro, S. D. (2010). Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nature medicine*, 16(2), 219–223.
- McGowan, P. M., Kirstein, J. M., & Chambers, A. F. (2009). Micrometastatic disease and metastatic outgrowth: clinical issues and experimental approaches. *Future Oncology*, 5(7), 1083-1098.
- Meenach, S. A., Tsoras, A. N., McGarry, R. C., Mansour, H. M., Hilt, J. Z., & Anderson, K. W. (2016). Development of three-dimensional lung multicellular spheroids in air- and liquid-interface culture for the evaluation of anticancer therapeutics. *International journal of oncology*, 48(4), 1701–1709.
- Metkar, S. S., & Froelich, C. J. (2004). Human neutrophils lack granzyme A, granzyme B, and perforin. *Blood*, 104(3), 905–908.
- Mishalian, I., Bayuh, R., Eruslanov, E., Michaeli, J., Levy, L., Zolotarov, L., Singhal, S., Al-belda, S. M., Granot, Z., & Fridlender, Z. G. (2014). Neutrophils recruit regulatory T-

cells into tumors via secretion of CCL17--a new mechanism of impaired antitumor immunity. *International journal of cancer*, 135(5), 1178–1186.

- Mishalian, I., Bayuh, R., Levy, L., Zolotarov, L., Michaeli, J., & Fridlender, Z. G. (2013). Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(11), 1745-1756.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B., & Lewis, C. E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 8(8), 618–631.
- Murnane, J. P. (2012). Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutation Research*, 730(1-2), 28-36.
- Nagy, J. A., Chang, S. H., Shih, S. C., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 36(3), 321–331.
- Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E., & Rubin, B. Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 158(3), 670-689.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews. Immunology*, 6(3), 173-182.
- Naumov, G. N., Folkman, J., Straume, O., & Akslen, L. A. (2008). Tumor-vascular interactions and tumor dormancy. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 116(7-8), 569–585.
- Nawa, M., Osada, S., Morimitsu, K., Nonaka, K., Futamura, M., Kawaguchi, Y., & Yoshida, K. (2012). Growth effect of neutrophil elastase on breast cancer: favorable action of sivelestat and application to anti-HER2 therapy. *Anticancer research*, 32(1), 13–19.
- Nefedova, Y., Fishman, M., Sherman, S., Wang, X., Beg, A. A., & Gabrilovich, D. I. (2007). Mechanism of All-Trans Retinoic Acid Effect on Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research*, 67(22), 11021-11028.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(3), 220–228.
- Nersesian, S., Schwartz, S. L., Grantham, S. R., MacLean, L. K., Lee, S. N., Pugh-Toole, M., & Boudreau, J. E. (2021). NK cell infiltration is associated with improved overall survival in solid cancers: A systematic review and meta-analysis. *Translational Oncology*, 14(1), 100930.
- Ninci, E. B., Brandstetter, T., Meinhold-Heerlein, I., Bettendorf, H., Sellin, D., & Bauknecht, T. (2000). G-CSF receptor expression in ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 10(1), 19-26.

- Noman, M. Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., Dessen, P., Bronte, V., & Chouaib, S. (2014). PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(5), 781-790.
- Nozawa, H., Chiu, C., & Hanahan, D. (2006). Infiltrating Neutrophils Mediate the Initial Angiogenic Switch in a Mouse Model of Multistage Carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 103(33), 12493-12498.
- Nuutila, J., Jalava-Karvinen, P., Hohenthal, U., Kotilainen, P., Pelliniemi, T., Nikoskelainen, J., & Lilius, E. (2013). Use of complement regulators, CD35, CD46, CD55, and CD59, on leukocytes as markers for diagnosis of viral and bacterial infections. *Human Immunology*, 74(5), 522-530.
- O'Sullivan, C., & Lewis, C. E. (1994). Tumour-associated leucocytes: friends or foes in breast carcinoma. *The Journal of pathology*, 172(3), 229-235.
- Oehler, L., Majdic, O., Pickl, W. F., Stöckl, J., Riedl, E., Drach, J., Rappersberger, K., Geissler, K., & Knapp, W. (1998). Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(7), 1019-1028.
- Ohki, Y., Heissig, B., Sato, Y., Akiyama, H., Zhu, Z., Hicklin, D. J., Shimada, K., Ogawa, H., Daida, H., Hattori, K., & Ohsaka, A. (2005). Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(14), 2005-2007.
- Okada, T., Lopez-Lago, M., & Giancotti, F. G. (2005). Merlin/NF-2 Mediates Contact Inhibition of Growth by Suppressing Recruitment of Rac to the Plasma Membrane. *The Journal of Cell Biology*, 171(2), 361-371.
- Okazaki, T., & Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International Immunology*, 19(7), 813-824.
- Olive, K. P., Jacobetz, M. A., Davidson, C. J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M. A., Caldwell, M. E., Allard, D., Frese, K. K., Denicola, G., Feig, C., Combs, C., Winter, S. P., Ireland-Zecchini, H., Reichelt, S., Howat, W. J., Chang, A., Dhara, M., ... Tuveson, D. A. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, 324(5933), 1457-1461.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(10), 1593-1600.
- Owen, C. A., & Campbell, E. J. (1995). Neutrophil proteinases and matrix degradation. The cell biology of pericellular proteolysis. *Seminars in cell biology*, 6(6), 367-376.

- Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M. C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., & Fridman, W. H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8), 1093–1102.
- Papathanasiou, P., Perkins, A. C., Cobb, B. S., Ferrini, R., Sridharan, R., Hoyne, G. F., Nelms, K. A., Smale, S. T., & Goodnow, C. C. (2003). Widespread Failure of Hematolymphoid Differentiation Caused by a Recessive Niche-Filling Allele of the Ikaros Transcription Factor. *Immunity*, 19(1), 131-144.
- Paramanathan, A., Saxena, A., & Morris, D. L. (2014). A systematic review and meta-analysis on the impact of pre-operative neutrophil lymphocyte ratio on long term outcomes after curative intent resection of solid tumours. *Surgical Oncology*, 23(1), 31-39.
- Paramithiotis, E., Tkalec, L., & Ratcliffe, M. J. (1991). High levels of CD45 are coordinately expressed with CD4 and CD8 on avian thymocytes. *The Journal of Immunology* (1950), 147(11), 3710-3717.
- Parish C. R. (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and cell biology*, 77(6), 499–508.
- Parker, K. H., Beury, D. W., & Ostrand-Rosenberg, S. (2015). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Advances in Cancer Research*, 128, 95-139.
- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H. J., Fusenig, N., Nieto, M. A., & Cano, A. (2004). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *Journal of cell science*, 117(Pt 13), 2827–2839.
- Peng, B., Wang, Y., Liu, Y., & Ma, L. (2015). Prognostic significance of the neutrophil to lymphocyte ratio in patients with non-small cell lung cancer: a systemic review and meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(3), 3098-3106. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064198>
- Piccard, H., Muschel, R. J., & Opdenakker, G. (2011). On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 82(3), 296-309.
- Perona R. (2006). Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 8(2), 77–82.
- Piccard, H., Muschel, R. J., & Opdenakker, G. (2012). On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Critical reviews in oncology/hematology*, 82(3), 296–309.
- Pickup, M., Novitskiy, S., & Moses, H. L. (2013). The roles of TGFβ in the tumour microenvironment. *Nature Reviews. Cancer*, 13(11), 788-799.
- Pico de Coaña, Y., Poschke, I., Gentilcore, G., Mao, Y., Nyström, M., Hansson, J., Masucci, G. V., & Kiessling, R. (2013). Ipilimumab Treatment Results in an Early Decrease

in the Frequency of Circulating Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells as well as Their Arginase1 Production. *Cancer Immunology Research*, 1(3), 158-162.

Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., & Ben-Neriah, Y. (2004). NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 431(7007), 461–466.

Pistelli, M., De Lisa, M., Ballatore, Z., Caramanti, M., Pagliacci, A., Battelli, N., Ridolfi, F., Santoni, M., Maccaroni, E., Bracci, R., Santinelli, A., Biscotti, T., Berardi, R., & Cascinu, S. (2015). Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio may be a useful tool in predicting survival in early triple negative breast cancer patients. *BMC Cancer*, 15(1), 195.

Polyak, K., & Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 265-273.

Potter V. R. (1958). The biochemical approach to the cancer problem. *Federation proceedings*, 17(2), 691–697

Potter, N. S., & Harding, C. V. (2001). Neutrophils Process Exogenous Bacteria Via an Alternate Class I MHC Processing Pathway for Presentation of Peptides to T Lymphocytes. *The Journal of Immunology (1950)*, 167(5), 2538-2546.

Powell, D. R., & Huttenlocher, A. (2015). Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends in Immunology*, 37(1), 41-52.

Qian, B., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, 141(1), 39-51.

Qin, Z., & Blankenstein, T. (2000). CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*, 12(6), 677–686.

Quatromoni, J. G., Singhal, S., Bhojnagarwala, P., Hancock, W. W., Albelda, S. M., & Eruslanov, E. (2015). An optimized disaggregation method for human lung tumors that preserves the phenotype and function of the immune cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 97(1), 201-209.

Queen, M. M., Ryan, R. E., Holzer, R. G., Keller-Peck, C. R., & Jorcyk, C. L. (2005). Breast Cancer Cells Stimulate Neutrophils to Produce Oncostatin M: Potential Implications for Tumor Progression. *Cancer Research*, 65(19), 8896-8904.

Radsak, M., Iking-Konert, C., Stegmaier, S., Andrassy, K., & Hänsch, G. M. (2000). Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology*, 101(4), 521-530.

Raica, M., Cimpian, A. M., & Ribatti, D. (2009). Angiogenesis in pre-malignant conditions. *European Journal of Cancer (1990)*, 45(11), 1924-1934.

- Ran, M., & Witz, I. P. (1972). Tumor-associated immunoglobulins. Enhancement of syngeneic tumors by IgG2-containing tumor eluates. *International journal of cancer*, 9(1), 242–247.
- Ranoa, D. R. E., Kelley, S. L., & Tapping, R. I. (2013). Human Lipopolysaccharide-binding Protein (LBP) and CD14 Independently Deliver Triacylated Lipoproteins to Toll-like Receptor 1 (TLR1) and TLR2 and Enhance Formation of the Ternary Signaling Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 9729-9741.
- Raynaud, C. M., Hernandez, J., Llorca, F. P., Nuciforo, P., Mathieu, M., Commo, F., Delaloge, S., Sabatier, L., André, F., & Soria, J. (2010). DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, 33(4), 341-345.
- Redondo-Muñoz, J., Ugarte-Berzal, E., Terol, M. J., Van den Steen, Philippe E, Hernández del Cerro, M., Roderfeld, M., Roeb, E., Opdenakker, G., García-Marco, J. A., & García-Pardo, A. (2010). Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Chronic Lymphocytic Leukemia B Cell Survival through Its Hemopexin Domain. *Cancer Cell*, 17(2), 160-172..
- Reid, M. D., Basturk, O., Thirabanjasak, D., Hruban, R. H., Klimstra, D. S., Bagci, P., Altinel, D., & Adsay, V. (2011). Tumor-infiltrating neutrophils in pancreatic neoplasia. *Modern Pathology*, 24(12), 1612-1619.
- Revoltella, R. P., Menicagli, M., & Campani, D. (2012). Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor as an autocrine survival-growth factor in human gliomas. *Cytokine*, 57(3), 347-359.
- Ribatti, D., Ennas, M. G., Vacca, A., Ferrelli, F., Nico, B., Orru, S., & Sirigu, P. (2003). Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *European Journal of Clinical Investigation*, 33(5), 420-425.
- Ribatti, D. (2008). The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis*, 11(3), 215-221.
- Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., White, M. R., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2011). IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *The Journal of Immunology* (1950), 187(9), 4835-4843.
- Romano, A., Parrinello, N. L., Vetro, C., Forte, S., Chiarenza, A., Figuera, A., Motta, G., Palumbo, G. A., Ippolito, M., Consoli, U., & Di Raimondo, F. (2015). Circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical outcome in Hodgkin Lymphoma patients treated up-front with a risk-adapted strategy. *British journal of haematology*, 168(5), 689–700.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., & Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Medicine*, 10(9), 909-915.

- Rosevear, H. M., Lightfoot, A. J., O'Donnell, M. A., & Griffith, T. S. (2009). The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette–Guérin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(3-4), 345-353.
- Sade-Feldman, M., Kanterman, J., Klieger, Y., Ish-Shalom, E., Olga, M., Saragovi, A., Shtainberg, H., Lotem, M., & Baniyash, M. (2016). Clinical Significance of Circulating CD33+CD11b+HLA-DR- Myeloid Cells in Patients with Stage IV Melanoma Treated with Ipilimumab. *Clinical Cancer Research*, 22(23), 5661-5672.
- Sagiv, J. Y., Michaeli, J., Assi, S., Mishalian, I., Kisos, H., Levy, L., Damti, P., Lumbroso, D., Polyansky, L., Sionov, R. V., Ariel, A., Hovav, A. H., Henke, E., Fridlender, Z. G., & Granot, Z. (2015). Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell reports*, 10(4), 562–573.
- Saito, H., Fukumura, D., Kurose, I., Suematsu, M., Tada, S., Kagawa, T., Miura, S., Morizane, T., & Tsuchiya, M. (1992). Visualization of oxidative processes at the cellular level during neutrophil-mediated cytotoxicity against a human hepatoma cell line, HCC-M. *International Journal of Cancer*, 51(1), 124-129.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., & Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological Reviews*, 182(1), 18-32.
- Salk, J. J., Fox, E. J., & Loeb, L. A. (2010). Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annual Review of Pathology*, 5(1), 51-75.
- Sangaletti, S., Tripodo, C., Vitali, C., Portararo, P., Guarnotta, C., Casalini, P., Cappetti, B., Miotti, S., Pinciroli, P., Fuligni, F., Fais, F., Piccaluga, P. P., & Colombo, M. P. (2014). Defective Stromal Remodeling and Neutrophil Extracellular Traps in Lymphoid Tissues Favor the Transition from Autoimmunity to Lymphoma. *Cancer Discovery*, 4(1), 110-129.
- Sato, T., Takahashi, S., Mizumoto, T., Harao, M., Akizuki, M., Takasugi, M., Fukutomi, T., & Yamashita, J. (2006). Neutrophil elastase and cancer. *Surgical Oncology*, 15(4), 217-222.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., & Cassatella, M. A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews*, 177(1), 195-203.
- Sceneay, J., Chow, M. T., Chen, A., Halse, H. M., Wong, C. S., Andrews, D. M., Sloan, E. K., Parker, B. S., Bowtell, D. D., Smyth, M. J., & Möller, A. (2012). Primary tumor hy-

poxia recruits CD11b+/Ly6Cmed/Ly6G+ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer research*, 72(16), 3906–3911.

- Schaider, H., Oka, M., Bogenrieder, T., Nesbit, M., Satyamoorthy, K., Berking, C., Matsushima, K., & Herlyn, M. (2003). Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8. *International Journal of Cancer*, 103(3), 335-343.
- Schenk, E., & Dietz, A. (2015). Lung cancer recruitment of CD14+ cells results in an immunosuppressive phenotype and improved tumor survival under stress conditions. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 3(S2), P416.
- Schilling, B., Sucker, A., Griewank, K., Zhao, F., Weide, B., Görgens, A., Giebel, B., Schandorf, D., & Paschen, A. (2013). Vemurafenib reverses immunosuppression by myeloid derived suppressor cells. *International journal of cancer*, 133(7), 1653–1663.
- Schmidt, H., Bastholt, L., Geertsen, P., Christensen, I. J., Larsen, S., Gehl, J., & von der Maase, H. (2005). Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *British journal of cancer*, 93(3), 273–278.
- Schmielau, J., & Finn, O. J. (2001). Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer research*, 61(12), 4756–4760.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., & Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 393(6684), 480–483.
- Schreiber, R. D., Pace, J. L., Russell, S. W., Altman, A., & Katz, D. H. (1983). Macrophage-activating factor produced by a T cell hybridoma: physiochemical and biosynthetic resemblance to gamma-interferon. *Journal of immunology*, 131(2), 826–832.
- Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 197-223.
- Semenza, G. L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(12), 3835-3837.
- Shabani, F., McNeil, J., & Tippett, L. (1998). The Oxidative Inactivation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) by Hypochlorous Acid (HOCl) is Suppressed by Anti-Rheumatic Drugs. *Free Radical Research*, 28(2), 115-123.
- Shang, K., Bai, Y., Wang, C., Wang, Z., Gu, H., Du, X., Zhou, X., Zheng, C., Chi, Y., Mukaida, N., & Li, Y. (2012). Crucial Involvement of Tumor-Associated Neutrophils in the Regulation of Chronic Colitis-Associated Carcinogenesis in Mice. *PloS One*, 7(12), e51848.

- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, *410*(6832), 1107–1111.
- Shaul, M. E., & Fridlender, Z. G. (2017). Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment. *Journal of Leukocyte Biology*, *102*(2), 343-349.
- Shaul, M. E., & Fridlender, Z. G. (2019). Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *16*(10), 601-620.
- Shaul, M. E., Levy, L., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Kapoor, V., Horng, W., Fridlender, G., Albelda, S. M., & Fridlender, Z. G. (2016). Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF β modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncoimmunology*, *5*(11), e1232221.
- Shen, L., Smith, J. M., Shen, Z., Eriksson, M., Sentman, C., & Wira, C. R. (2007). Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor-beta1. *Clinical and experimental immunology*, *149*(1), 155–161.
- Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell*, *2*(2), 103–112.
- Shojaei, F., & Ferrara, N. (2008). Refractoriness to Antivascular Endothelial Growth Factor Treatment: Role of Myeloid Cells. *Cancer Research*, *68*(14), 5501-5504.
- Shojaei, F., Wu, X., Zhong, C., Yu, L., Liang, X. H., Yao, J., Blanchard, D., Bais, C., Peale, F. V., van Bruggen, N., Ho, C., Ross, J., Tan, M., Carano, R. A., Meng, Y. G., & Ferrara, N. (2007). Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature*, *450*(7171), 825–831.
- Singhal, S., Bhojnagarwala, P. S., O'Brien, S., Moon, E. K., Garfall, A. L., Rao, A. S., Quatromoni, J. G., Stephen, T. L., Litzky, L., Deshpande, C., Feldman, M. D., Hancock, W. W., Conejo-Garcia, J. R., Albelda, S. M., & Eruslanov, E. B. (2016). Origin and Role of a Subset of Tumor-Associated Neutrophils with Antigen-Presenting Cell Features in Early-Stage Human Lung Cancer. *Cancer cell*, *30*(1), 120–135.
- Sionov, R. V., Fridlender, Z. G., & Granot, Z. (2014). The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*, *8*(3), 125-158.
- Smith, J. A. (1994). Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of Leukocyte Biology*, *56*(6), 672-686.
- Smith-McCune, K., Zhu, Y. H., Hanahan, D., & Arbeit, J. (1997). Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice. *Cancer research*, *57*(7), 1294–1300.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltrot, R. H., Sedger, L. M., Kayagaki, N., Yagita, H., & Okumura, K. (2001). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

(TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(6), 661-670.

- Smyth, M. J., Dunn, G. P., & Schreiber, R. D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in immunology*, 90, 1–50.
- Snell G. D. (1957). Incompatibility reactions to tumor homotransplants with particular reference to the role of the tumor; a review. *Cancer research*, 17(1), 2–10.
- Solito, S., Falisi, E., Diaz-Montero, C. M., Doni, A., Pinton, L., Rosato, A., Francescato, S., Basso, G., Zanovello, P., Onicescu, G., Garrett-Mayer, E., Montero, A. J., Bronte, V., & Mandruzzato, S. (2011). A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood*, 118(8), 2254-2265.
- Solovjov, D. A., Pluskota, E., & Plow, E. F. (2005). Distinct Roles for the α and β Subunits in the Functions of Integrin α M β 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1336-1345.
- Song, J., Wu, C., Zhang, X., & Sorokin, L. M. (2013). In vivo processing of CXCL5 (LIX) by matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 promotes early neutrophil recruitment in IL-1 β -induced peritonitis. *The Journal of Immunology (1950)*, 190(1), 401-410.
- Souto, J. C., Vila, L., & Brú, A. (2011). Polymorphonuclear neutrophils and cancer: Intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. *Medicinal Research Reviews*, 31(3), 311-363.
- Sparmann, A., & Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*, 6(5), 447-458.
- Spicer, J. D., McDonald, B., Cools-Lartigue, J. J., Chow, S. C., Giannias, B., Kubes, P., & Ferri, L. E. (2012). Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells. *Cancer research*, 72(16), 3919–3927.
- Stairs, D., Bayne, L., Rhoades, B., Vega, M., Waldron, T., Kalabis, J., Klein-Szanto, A., Lee, J., Katz, J., Diehl, J., Reynolds, A., Vonderheide, R., & Rustgi, A. (2011). Deletion of p120-Catenin Results in a Tumor Microenvironment with Inflammation and Cancer that Establishes It as a Tumor Suppressor Gene. *Cancer Cell*, 19(4), 470-483.
- Stathopoulos, G. T., Sherrill, T. P., Karabela, S. P., Goleniewska, K., Kalomenidis, I., Rousos, C., Fingleton, B., Yull, F. E., Peebles, R. S., Jr, & Blackwell, T. S. (2010). Host-derived interleukin-5 promotes adenocarcinoma-induced malignant pleural effusion. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(10), 1273–1281.
- Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2001). How Matrix Metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1), 463-516.

- Stockmeyer, B., Beyer, T., Neuhuber, W., Repp, R., Kalden, J. R., Valerius, T., & Herrmann, M. (2003). Polymorphonuclear Granulocytes Induce Antibody-Dependent Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *The Journal of Immunology* (1950), 171(10), 5124-5129.
- Striedinger, K., VandenBerg, S. R., Baia, G. S., McDermott, M. W., Gutmann, D. H., & Lal, A. (2008). The Neurofibromatosis 2 Tumor Suppressor Gene Product, Merlin, Regulates Human Meningioma Cell Growth by Signaling through YAP. *Neoplasia*, 10(11), 1204-1212.
- Strieter, R. M., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Arenberg, D. A., Burdick, M. D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., Chan, S., Rocznik, S., & Shanafelt, A. B. (1995). The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-mediated Angiogenesis (). *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27348-27357.
- Stutman, O. (1974). Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice. *Science*, 183(4124), 534-536.
- Suranyi, M. G., Hogan, P. G., Falk, M. C., Axelsen, R. A., Rigby, R., Hawley, C., & Petrie, J. (1998). Advanced donor-origin melanoma in a renal transplant recipient: immunotherapy, cure, and retransplantation. *Transplantation*, 66(5), 655-661.
- Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D., & Remington, J. S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, 240(4851), 516-518.
- Swann, J. B., & Smyth, M. J. (2007). Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1137-1146.
- Tachibana, M., Miyakawa, A., Uchida, A., Murai, M., Eguchi, K., Nakamura, K., Kubo, A., & Hata, J. I. (1997). Granulocyte colony-stimulating factor receptor expression on human transitional cell carcinoma of the bladder. *British journal of cancer*, 75(10), 1489-1496.
- Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., & Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(2), 161-169.
- Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*, 70(14), 5649-5669.
- Talmadge, J. E., & Gabilovich, D. I. (2013). History of myeloid-derived suppressor cells. *Nature reviews. Cancer*, 13(10), 739-752.
- Taube, J. H., Herschkowitz, J. I., Komurov, K., Zhou, A. Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T. T., Gupta, P. B., Evans, K. W., Hollier, B. G., Ram, P. T., Lander, E. S., Rosen, J. M., Weinberg, R. A., & Mani, S. A. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and

metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 107(35), 15449-15454.

- Tay, R. E., Richardson, E. K., & Toh, H. C. (2021). Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. *Cancer gene therapy*, 28(1-2), 5–17.
- Tecchio, C., Scapini, P., Pizzolo, G., & Cassatella, M. A. (2013). On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. *Seminars in Cancer Biology*, 23(3), 159-170.
- Templeton, A. J., McNamara, M. G., Šeruga, B., Vera-Badillo, F. E., Aneja, P., Ocaña, A., Leibowitz-Amit, R., Sonpavde, G., Knox, J. J., Tran, B., Tannock, I. F., & Amir, E. (2014). Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(6), dju124.
- Teng, M. W. L., Swann, J. B., Koebel, C. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4), 988-993.
- Thomas L. (1959) Discussion. *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*, ed. HS Lawrence, pp. 529–32.
- Tiemessen, M. M., Jagger, A. L., Evans, H. G., van Herwijnen, Martijn J C, John, S., & Taams, L. S. (2007). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells Induce Alternative Activation of Human Monocytes/Macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 104(49), 19446-19451.
- Tiran, V., Lindenmann, J., Brcic, L., Heitzer, E., Stanzer, S., Tabrizi-Wizsy, N. G., Stacher, E., Stoeger, H., Popper, H. H., Balic, M., & Dandachi, N. (2017). Primary patient-derived lung adenocarcinoma cell culture challenges the association of cancer stem cells with epithelial-to-mesenchymal transition. *Scientific reports*, 7(1), 10040.
- Tomer, Y., Sherer, Y., & Shoenfeld, Y. (1998). Autoantibodies, autoimmunity and cancer. *Oncology reports*, 5(3), 753–761.
- Townson, J. L., & Chambers, A. F. (2006). Dormancy of Solitary Metastatic Cells. *Cell Cycle*, 5(16), 1744-1750.
- Trellakis, S., Bruderek, K., Dumitru, C. A., Gholaman, H., Gu, X., Bankfalvi, A., Scherag, A., Hütte, J., Dominas, N., Lehnerdt, G. F., Hoffmann, T. K., Lang, S., & Brandau, S. (2011). Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: Enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *International Journal of Cancer*, 129(9), 2183-2193.
- Tufan, A. C., & Satiroglu-Tufan, N. L. (2005). The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model System for the Study of Tumor Angiogenesis, Invasion and Development of Anti-Angiogenic Agents. *Current Cancer Drug Targets*, 5(4), 249-266.

- Tvinnereim, A. R., Hamilton, S. E., & Harty, J. T. (2004). Neutrophil Involvement in Cross-Priming CD8+ T Cell Responses to Bacterial Antigens. *The Journal of Immunology (1950)*, 173(3), 1994-2002.
- Uchida, T., Yamashita, T., Araki, A., Watanabe, H., & Sendo, F. (1997). rIFN-gamma-activated rat neutrophils induce tumor cell apoptosis by nitric oxide. *International journal of cancer*, 71(2), 231–236.
- Umansky, V., Adema, G. J., Baran, J., Brandau, S., Van Ginderachter, J. A., Hu, X., Jablonska, J., Mojsilovic, S., Papadaki, H. A., Pico De Coaña, Y., Santegoets, K. C. M., Santibanez, J. F., Serre, K., Si, Y., Sieminska, I., Velegraki, M., & Fridlender, Z. G. (2018). Interactions among myeloid regulatory cells in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68(4), 645-660.
- Umansky, V., Blattner, C., Gebhardt, C., & Utikal, J. (2016). The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. *Vaccines*, 4(4), 36.
- Urduingui, R. G., Fernandez, A. F., Moncada-Pazos, A., Huidobro, C., Rodriguez, R. M., Ferrero, C., Martinez-Cambor, P., Obaya, A. J., Bernal, T., Parra-Blanco, A., Rodrigo, L., Santacana, M., Matias-Guiu, X., Soldevilla, B., Dominguez, G., Bonilla, F., Cal, S., Lopez-Otin, C., & Fraga, M. F. (2013). Immune-dependent and independent antitumor activity of GM-CSF aberrantly expressed by mouse and human colorectal tumors. *Cancer research*, 73(1), 395–405.
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2015). Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *Journal of immunology research*, 2015, 983698.
- Valerius, T., Repp, R., de Wit, T., Berthold, S., Platzer, E., Kalden, J., Gramatzki, M., & van de Winkel, J. (1993). Involvement of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI; CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy. *Blood*, 82(3), 931-939.
- Van Den Eeckhout, B., Tavernier, J., & Gerlo, S. (2021). Interleukin-1 as Innate Mediator of T Cell Immunity. *Frontiers in immunology*, 11, 621931.
- Van den Steen, Philippe E, Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., & Opdenakker, G. (2000). Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood*, 96(8), 2673-2681.
- Van der Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033.
- Verbeke, H., Struyf, S., Berghmans, N., Van Coillie, E., Opdenakker, G., Uyttenhove, C., Van Snick, J., & Van Damme, J. (2010). Isotypic neutralizing antibodies against mouse GCP-2/CXCL6 inhibit melanoma growth and metastasis. *Cancer Letters*, 302(1), 54-62.

- Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D., & Miyamoto, S. (1995). Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & Development*, 9(22), 2723-2735. 10.1101/gad.9.22.2723
- Von Köckritz-Blickwede, M., & Nizet, V. (2009). Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *Journal of Molecular Medicine*, 87(8), 775-783.
- Wada, Y., Yoshida, K., Hihara, J., Konishi, K., Tanabe, K., Ukon, K., Taomoto, J., Suzuki, T., & Mizuiri, H. (2006). Sivelestat, a specific neutrophil elastase inhibitor, suppresses the growth of gastric carcinoma cells by preventing the release of transforming growth factor- α . *Cancer Science*, 97(10), 1037-1043.
- Wada, Y., Yoshida, K., Tsutani, Y., Shigematsu, H., Oeda, M., Sanada, Y., Suzuki, T., Mizuiri, H., Hamai, Y., Tanabe, K., Ukon, K., & Hihara, J. (2007). Neutrophil elastase induces cell proliferation and migration by the release of TGF- α , PDGF and VEGF in esophageal cell lines. *Oncology reports*, 17(1), 161–167.
- Wagner, C., Iking-Konert, C., Hug, F., Stegmaier, S., Heppert, V., Wentzensen, A., & Hansch, G. M. (2006). Cellular inflammatory response to persistent localized *Staphylococcus aureus* infection: phenotypical and functional characterization of polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Clinical and Experimental Immunology*, 143(1), 70-77.
- Wagner, C., Iking-Konert, C., Deneffle, B., Stegmaier, S., Hug, F., & Hänsch, G. M. (2004). Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood*, 103(3), 1099-1104.
- Waight, J. D., Hu, Q., Miller, A., Liu, S., & Abrams, S. I. (2011). Tumor-Derived G-CSF Facilitates Neoplastic Growth through a Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Dependent Mechanism. *PloS One*, 6(11), e27690.
- Wakabayashi, O., Yamazaki, K., Oizumi, S., Hommura, F., Kinoshita, I., Ogura, S., Dosaka-Akita, H., & Nishimura, M. (2003). CD4⁺ T cells in cancer stroma, not CD8⁺ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Science*, 94(11), 1003-1009.
- Walsh, S. R., Cook, E. J., Goulder, F., Justin, T. A., & Keeling, N. J. (2005). Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 91(3), 181-184.
- Wan Y. Y. (2014). GATA3: a master of many trades in immune regulation. *Trends in immunology*, 35(6), 233–242.
- Wang, L., Chang, E. W. Y., Wong, S. C., Ong, S., Chong, D. Q. Y., & Ling, K. L. (2013). Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *The Journal of Immunology* (1950), 190(2), 794-804.

- Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309–314.
- Weide, B., Martens, A., Zelba, H., Stutz, C., Derhovanessian, E., Di Giacomo, A. M., Maio, M., Sucker, A., Schilling, B., Schadendorf, D., Büttner, P., Garbe, C., & Pawelec, G. (2014). Myeloid-derived suppressor cells predict survival of patients with advanced melanoma: comparison with regulatory T cells and NY-ESO-1- or melan-A-specific T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(6), 1601–1609.
- Welch, D. R., Schissel, D. J., Howrey, R. P., & Aeed, P. A. (1989). Tumor-elicited polymorphonuclear cells, in contrast to "normal" circulating polymorphonuclear cells, stimulate invasive and metastatic potentials of rat mammary adenocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(15), 5859–5863.
- Wels, J., Kaplan, R. N., Rafii, S., & Lyden, D. (2008). Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes & development*, 22(5), 559–574.
- Wilson, T. J., Nannuru, K. C., Futakuchi, M., & Singh, R. K. (2009). Cathepsin G-mediated enhanced TGF- β signaling promotes angiogenesis via upregulation of VEGF and MCP-1. *Cancer Letters*, 288(2), 162-169.
- Wilting, J., Birkenhäger, R., Eichmann, A., Kurz, H., Martiny-Baron, G., Marmé, D., McCarthy, J. E. G., Christ, B., & Weich, H. A. (1996). VEGF121Induces Proliferation of Vascular Endothelial Cells and Expression of flk-1 without Affecting Lymphatic Vessels of the Chorioallantoic Membrane. *Developmental Biology*, 176(1), 76-85.
- Wislez, M., Antoine, M., Rabbe, N., Gounant, V., Poulot, V., Lavolé, A., Fleury-Feith, J., & Cadranet, J. (2007). Neutrophils promote aerogenous spread of lung adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma features. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(12), 3518–3527.
- Wislez, M., Rabbe, N., Marchal, J., Milleron, B., Crestani, B., Mayaud, C., Antoine, M., Soler, P., & Cadranet, J. (2003). Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer research*, 63(6), 1405–1412.
- Wojtowicz-Praga S. (2003). Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF-beta inhibitors. *Investigational new drugs*, 21(1), 21–32.
- Wu, C., Hsieh, C., Lin, C., Chen, W., Hong, J., & Chen, M. (2012). Significance of IL-6 in the transition of hormone-resistant prostate cancer and the induction of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 90(11), 1343-1355.
- Wu, Q. D., Wang, J. H., Condrón, C., Bouchier-Hayes, D., & Redmond, H. P. (2001). Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 280(4), 814-822.

- Wu, Y., Zhao, Q., Peng, C., Sun, L., Li, X., & Kuang, D. (2011). Neutrophils promote motility of cancer cells via a hyaluronan-mediated TLR4/PI3K activation loop. *The Journal of Pathology*, 225(3), 438-447.
- Yamashita, T., Uchida, T., Araki, A., & Sendo, F. (1997). Nitric oxide is an effector molecule in inhibition of tumor cell growth by rIFN-gamma-activated rat neutrophils. *International journal of cancer*, 71(2), 223–230.
- Yan, H. H., Pickup, M., Pang, Y., Gorska, A. E., Li, Z., Chytil, A., Geng, Y., Gray, J. W., Moses, H. L., & Yang, L. (2010). Gr-1+ CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung. *Cancer Research*, 70(15), 6139-6149.
- Yang, H., Biermann, M. H., Brauner, J. M., Liu, Y., Zhao, Y., & Herrmann, M. (2016). New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 7, 302.
- Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell*, 14(6), 818-829.
- Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A. E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D. P., Matrisian, L., Richmond, A., Lin, P. C., & Moses, H. L. (2008). Abrogation of TGF β Signaling in Mammary Carcinomas Recruits Gr-1+CD11b+ Myeloid Cells that Promote Metastasis. *Cancer Cell*, 13(1), 23-35.
- Yang, X., Liu, F., Xu, Z., Chen, C., Wu, X., Li, G., & Li, J. (2005). Expression of granulocyte colony stimulating factor receptor in human colorectal cancer. *Postgraduate Medical Journal*, 81(955), 333-337.
- Yoon, J., Terada, A., & Kita, H. (2007). CD66b Regulates Adhesion and Activation of Human Eosinophils. *The Journal of Immunology (1950)*, 179(12), 8454-8462.
- Yoshimura, A., & Muto, G. (2011). TGF- β function in immune suppression. *Current topics in microbiology and immunology*, 350, 127–147.
- Yoshimura, T., & Takahashi, M. (2007). IFN- γ -Mediated Survival Enables Human Neutrophils to Produce MCP-1/CCL2 in Response to Activation by TLR Ligands. *The Journal of Immunology (1950)*, 179(3), 1942-1949.
- Yu, P., Spiotto, M. T., Lee, Y., Schreiber, H., & Fu, Y. (2003). Complementary Role of CD4+T Cells and Secondary Lymphoid Tissues for Cross-presentation of Tumor Antigen to CD8+T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(8), 985-995.
- Yu, W., Hua, Y., Qiu, H., Hao, J., Zou, K., Li, Z., Hu, S., Guo, P., Chen, M., Sui, S., Xiong, Y., Li, F., Lu, J., Guo, W., Luo, G., & Deng, W. (2020). PD-L1 promotes tumor growth and progression by activating WIP and β -catenin signaling pathways and predicts poor prognosis in lung cancer. *Cell Death & Disease*, 11(7), 506.

- Zamarron, B. F., & Chen, W. (2011). Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *International journal of biological sciences*, 7(5), 651–658.
- Zhang, Q., Yang, X., Pins, M., Javonovic, B., Kuzel, T., Kim, S. J., Parijs, L. V., Greenberg, N. M., Liu, V., Guo, Y., & Lee, C. (2005). Adoptive transfer of tumor-reactive transforming growth factor-beta-insensitive CD8+ T cells: eradication of autologous mouse prostate cancer. *Cancer research*, 65(5), 1761–1769.
- Zhang, B., Wang, Z., Wu, L., Zhang, M., Li, W., Ding, J., Zhu, J., Wei, H., & Zhao, K. (2013). Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. *PloS One*, 8(2), e57114.
- Zhu, Y. P., Padgett, L., Dinh, H. Q., Marcovecchio, P., Blatchley, A., Wu, R., Ehinger, E., Kim, C., Mikulski, Z., Seumois, G., Madrigal, A., Vijayanand, P., & Hedrick, C. C. (2018). Identification of an Early Unipotent Neutrophil Progenitor with Pro-tumoral Activity in Mouse and Human Bone Marrow. *Cell Reports*, 24(9), 2329-2341.e8.
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557–1569.
- Zijlstra, A., Aimes, R. T., Zhu, D., Regazzoni, K., Kupriyanova, T., Seandel, M., Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2004). Collagenolysis-dependent Angiogenesis Mediated by Matrix Metalloproteinase-13 (Collagenase-3). *The Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27633-27645.
- Zijlstra, A., Lewis, J., DeGryse, B., Stuhlmann, H., & Quigley, J. P. (2008). The Inhibition of Tumor Cell Intravasation and Subsequent Metastasis via Regulation of In Vivo Tumor Cell Motility by the Tetraspanin CD151. *Cancer Cell*, 13(3), 221-234.
- Zijlstra, A., Seandel, M., Kupriyanova, T. A., Partridge, J. J., Madsen, M. A., Hahn-Dantona, E. A., Quigley, J. P., & Deryugina, E. I. (2006). Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood*, 107(1), 317–327.
- Zivkovic, M., Poljak-Blazi, M., Egger, G., Sunjic, S. B., Schaur, R. J., & Zarkovic, N. (2005). Oxidative burst and anticancer activities of rat neutrophils. *BioFactors*, 24(1-4), 305-312.

Abkürzungen:

TME	-	Tumor microenvironment
HOC	-	Hallmarks of cancer
CD4-TH1/2	-	T-helper-cell 1/2
CD8-CTL	-	CD8+ cytotoxic T-lymphocyte
CAR-T-Cell	-	Chimeric Antigen Receptor-T-Zelle
ROS	-	Reactive oxygen species
TAN	-	Tumor associated neutrophils
APC	-	Antigen presenting cell
CAM-Modell	-	Chorionallantois-membrane Modell
CRI	-	Cancer related inflammation
CPI	-	Checkpoint Inhibitor
CRS	-	Cytokine release syndrome
Treg	-	Regulatory T-Cell
MC	-	Mast cell
NO	-	Nitrous oxide
TCR	-	T-cell-receptor
DC	-	Dendritic Cell
IL-x	-	Integrin-cytokine-family
TGF-beta	-	Transforming growth factor beta
TNF-alpha	-	Tumor necrosis factor alpha
CCL-x/CCR-x	-	Ligand/receptor CC-Chemokins
CxCL-x/CxCL-x	-	Ligand/Rezeptor CxC-Chemokins
HDN	-	high density neutrophil
LDN	-	low density neutrophil
ATRA	-	all trans retinoic acid
INF	-	Interferon
EGF	-	epidermal growth factor
FGF	-	fibroblast growth factor
BAC	-	Bronchoalveolar carcinoma
NSCLC	-	Non-small-cell lung cancer
HNSCC	-	Head-Neck squamous cell carcinoma
NeP	-	Early-unipotent neutrophil progenitocell (murine)
hNeP	-	Early-unipotent neutrophil progenitocell (human)

NLR	-	Neutrophil-to-lymphocyte ratio
CRC	-	Colorectal carcinoma
HCC	-	Hepatocellular carcinoma
BCG	-	Bacille Calmette-Guérin
ECM	-	Extracellular matrix
TCM	-	Tumor conditioned medium
NET	-	Neutrophil extracellular traps
HSC	-	Hematopoietic stem cell
hMoP	-	Early-unipotent monocytic progenitor cell
NE	-	Neutrophil elastase
CG	-	Cathepsin G
PR3	-	Proteinase 3
MMP	-	Matrix metalloproteinases
BSN	-	Band-stage neutrophil
PMN	-	Polymorphonuclear neutrophil
LF	-	Lactoferrin
MPO	-	Myeloperoxidase
BPI	-	Bactericidal permeability increasing protein
PAD4	-	Peptidylarginin-deiminase 4
TLR	-	Toll like receptor
FcR	-	Fc-Receptor
LPS	-	Lipopolysaccharide
CAF	-	Cancer associated fibroblasts
RT-PCR	-	Reverse transcription PCR
BMN	-	Bone marrow neutrophils
IRS-1	-	Insulin-receptor-substrate 1
PDGFR	-	Platelet derived growth factor receptor
TIMP	-	Tissue inhibitors of metalloproteinases
HOCL	-	Hypochloric acid
Rb-Protein	-	Retinoblastoma protein
CDK	-	Cyclin-dependent kinases
PDAC	-	Pancreatic ductal adenocarcinoma
IGF1/2	-	Insulin-like-growth-factor 1/2
ATP	-	Adenosin triphosphate
VEGF	-	Vascular endothelial growth factor

PIGF	-	Placental growth factor
TSP1	-	Thrombospondin-1
G-CSF	-	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	-	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
MIF	-	Macrophage-migration-inhibiting-factor
GSK3beta	-	Glycogen synthase kinase 3 beta
tc-PMN	-	Tumor elicited PMN
EMT	-	Epithelial to mesenchymal transition
MET	-	Mesenchymal to epithelial transition
Sparc	-	Secreted-protein-acidic-and-rich-in-cystein
CIN	-	Chromosomal instability
SR/CR	-	Spontaneous regression/complete resistance
DR	-	Death-receptor
ADCC	-	Antibody-dependent-cell-mediated-Cytotoxicity
LAD	-	Leukocyte adhesions deficiency
NIN	-	Nucleotide-Excision-Repair instability
MIN	-	Microsatellite instability
CSC	-	Cancer-stem cell
RPM	-	Revolutions per minute
PBS	-	Phosphate buffered saline
FSC	-	Forward scatter
SSC	-	Side scatter
CR	-	Complement receptor
PAMP	-	Pathogen associated molecular pattern
LTA	-	Lipoteichoic acid
PTPRC	-	Protein-tyrosin-phosphatase-receptor-tyr-C
CEA	-	Carcinoembryonic-antigene
CEACAM8	-	Antigen-related cell adhesion molecule 8
NG	-	Neutrophil granulocyte
RFS	-	Relapse free survival